

**EXPESSÃO DE Ric c 1, UM IMPORTANTE ALÉRGENO DE *Ricinus communis*, EM *Escherichia coli* E MUTAÇÕES EM SEUS EPITOPOS ALERGÊNICOS**

THAÍS PACHECO SOARES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ  
FEVEREIRO DE 2014

**EXPESSÃO DE Ric c 1, UM IMPORTANTE ALÉRGENO DE *Ricinus communis*, EM *Escherichia coli* E MUTAÇÕES EM SEUS EPITOPOS ALERGÊNICOS**

THAÍS PACHECO SOARES

Dissertação de mestrado apresentado ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ  
FEVEREIRO DE 2014

**Dedico este trabalho a todas as  
pessoas que acreditaram que era  
possível faze-lo,**

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi fruto do esforço de um grupo de pessoas, que ajudaram direta e indiretamente para a sua realização. Por isso agradeço:

- A Universidade Estadual do Norte Fluminense, por proporcionar a realização do curso com excelência de qualidade.
- A minha orientadora Dra. Olga Lima Tavares Machado, pela sua dedicação e ensinamentos.
- Ao meu coorientador Dr. André de Oliveira Carvalho, por sua perseverança e disciplina.
- A professora Vardirene Gomes, pela colaboração em uso de espaço e reagentes.
- Ao professor Gustavo Rezende, por auxiliar contatos importantes e revisar esta dissertação.
- A todo grupo do LQFPP e LFBM, pelo companheirismo e ajuda nos momentos de dificuldades.
- A todos os técnicos do LQFPP e LFBM, pela a ajuda auxiliar.
- Ao apoio financeiro oferecido pela CAPES e FAPERJ.
- A minha família, que foi o meu apoio psicológico e afetivo para que eu continuasse em frente.
- Ao meu namorado, pelo companheirismo e por acreditar que eu conseguiria realizar esta etapa da minha vida.
- A minha fé que nunca me desamparou e sempre me fez acreditar que eu seria capaz, até nos momentos mais difíceis.

Meu sincero obrigada.

## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	7
<b>RESUMO</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1-A MAMONA E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO .....	11
1.2-AS ALBUMINAS 2S .....	12
1.3-O DESENCADEAMENTO DA ALERGIA POR ALÉRGENOS DE <i>RICINUS COMMUNIS</i> .....	16
1.4- AS ALBUMINAS 2S COMO INIBIDORES DE $\alpha$ -AMILASES .....	18
<b>2- OBJETIVO GERAL</b> .....	20
2.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
3.1-MATERIAL BIOLÓGICO .....	21
3.2- OBTENÇÃO DA PROTEÍNA RIC C 1 DE SEMENTES DE MAMONA ..	21
3.3- CLONAGEM DO FRAGMENTO GENICO CODIFICANTE DE Ric c 1 ..	22
3.3.1-DESENHO DOS INICIADORES PARA O FRAGMENTO GENICO DE <i>Ric c 1</i> .....	22
3.3.2- EXTRAÇÃO DE DNA .....	23
3.3.3- QUANTIFICAÇÕES DO DNA POR ESPECTROFOTOMETRIA.....	24
3.3.4- AMPLIFICAÇÃO GÊNICA DE <i>Ric c 1</i> POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE .....	24
3.3.5- TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA - <i>E. Coli</i> (JM 109).....	25
3.3.6- EXTRAÇÃO DO PLASMÍDEO .....	26
3.4- EXPRESSÃO FUNCIONAL DE Ric c 1.....	26
3.4.1- CLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO pET-32 EK/LIC .....	26
3.4.2- TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA EM CEPA DE SUPEREXPRESSÃO – <i>E. Coli</i> linhagem Rosetta-gami2 (DE3) pLysS.....	30
3.4.3- INDUÇÃO DA SUPEREXPRESSÃO DE RIC c 1r .....	30
3.5- EXTRAÇÃO DE RIC c 1r E PADRONIZAÇÃO DE SUA PURIFICAÇÃO..	31
3.5.1- CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE .....	31
3.5.2 CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA.....	33
3.6-CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO RECOMBINANTE .....	34
3.6.1- AVALIAÇÃO DA HOMOGENEIDADE, DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR E IMUNODETECÇÃO.....	34
3.6.2- DETERMINAÇÃO DA SEQUENCIA N-TERMINAL PARCIAL.....	35
3.7- AVALIAÇÃO DA ALERGENICIDADE DA Ric 1 e Ric c 1r.....	35
3.7.1-OBTENÇÃO DOS MASTÓCITOS DE RATOS.....	36

3.7.2- ENSAIO DE DESGRANULAÇÃO .....	36
3.7.3- AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DE DESGRANULAÇÃO POR MICROSCOPIA ÓTICA.....	36
3.8.-DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE $\alpha$ -AMILÁSICA PELA Ric 1r.....	37
3.8.1- OBTENÇÃO DAS $\alpha$ -AMILASES .....	37
3.8.2- ENSAIOS DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA $\alpha$ -AMILASE SALIVAR HUMANA E INTESTINAL DO BESOIRO <i>C. maculatus</i> .....	37
3.9- SINTESE DE Ric c 1r CONTENDO MUTAÇÕES .....	37
<b>4- RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
4.1- OBTENÇÃO DAS ISOFORMAS DE Ric c 1ALBUMINAS 2S DE SEMENTES DE MAMONA .....	40
4.2- EXTRAÇÃO DE DNA .....	41
4.3- PCR GRADIENTE PARA Ric c1 .....	41
4.4- EXTRAÇÃO E DIGESTÃO PLASMIDIAL DE <i>E. COLI</i> - JM109 TRANSFORMADA COM O GENE <i>RIC C 1</i> .....	42
4.5- PCR PARA CLONAR NO VETOR DE EXPRESSÃO PET-32 EK/LIC ..	43
4.6- PADRONIZAÇÃO DA INDUÇÃO DA SUPEREXPRESSÃO DE Ric c 1r .....	43
4.7- PURIFICAÇÃO DE Ric c1r POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....	44
4.8- PURIFICAÇÃO DE Ric c 1r POR CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA .....	46
4.9-AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALERGÊNICA DE Ric c 1r RECOMBINANTE.....	48
4.10- ENSAIO DE INIBIÇÃO CONTRA $\alpha$ -AMILASE PELA RIC C 1r. ....	49
4.11- PCR PARA CLONAR Ric c 1 RECOMBINANTE MUTADA (Ric c 1rm) NO VETOR DE EXPRESSÃO pET-32 EK/LIC .....	50
4.12- INDUÇÃO DA SUPEREXPRESSÃO DE RIC C 1rm .....	50
<b>5- DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>6- CONCLUSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>7- REFERÊNCIAS .....</b>	<b>58</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1:** Estruturas de *R. communis*

**Figura 2:** Estrutura terciária de Ric c 1 e Ric c 3

**Figura 3:** Fragmento da sequência gênica e sequência de aminoácidos correspondentes

**Figura 4:** Processamento pós traducional de Ric c 1 e Ric c 3 em seu sistema natural de expressão (na planta *R. communis*)

**Figura 5:** Esquema ilustrativo da reação de Hipersensibilidade do tipo I

**Figura 6:** Estrutura primária das isoformas de albuminas 2S de *R. communis*, Ric c 1 e Ric c 3, destacando as cadeias leve e pesada e os epitopos alergênicos

**Figura 7:** Sequência de DNA da região codificante de Ric 1 c de *Ricinus communis*, representadas pelas fitas 5' e 3' obtido do sítio NCBI

**Figura 8:** Vetor pET-32EK/LIC

**Figura 9:** Sequência dos iniciadores usados para a ligação da sequência codificante de Ric 1 c ao plasmídeo pET-32 EK/LIC.

**Figura 10:** Esquema das etapas da cromatografia de afinidade em coluna de Ni-NTA, para purificação de proteínas contendo cauda de histidina.

**Figura 11:** Esquema representando a interação entre a cauda de histidinas consecutivas de proteínas recombinantes produzidas pelo vetor pET-32 Ek/LIC ao Ni da coluna de Ni-NTA agarose

**Figura 12:** Sequências comparativas do gene Ric c 1 e do gene sintético mutante de Ric c 1

**Figura 13:** Mapa do vetor pMA fornecido pela Invitrogen.

**Figura 14:** Cromatograma do extrato protéico de *R. communis*, após Sephadex G-50

**Figura 15:** Cromatograma de fase reversa em coluna C2/C18 da fração II da cromatografia de filtração em gel, rica em albumina 2S

**Figura 16:** Visualização eletroforética da extração de DNA de folhas de *R. communis*.

**Figura 17:** Visualização eletroforética das amostras amplificadas por PCR gradiente usando os iniciadores ric1s e ric1as específicos para o gene *Ric c 1*.

**Figura 18:** Visualização eletroforética da digestão dos plasmídeos extraídos das colônias de JM 109 transformada com o vetor pJET contendo o gene *Ric c 1* e digeridos com enzima *Bgl* II

**Figura 19:** PCR em gradiente de temperatura requerido como pré-requisito para ligar o fragmento gênico codante para Ric c 1 ao vetor pET-32 EK/LIC.

**Figura 20:** Visualização eletroforética da indução da expressão da proteína recombinante Ric c 1 com 1 mM de IPTG

**Figura 21:** Cromatográfico do estrato bruto induzido em coluna de afinidade Ni-NTA agarose..

**Figura 22:** SDS-PAGE corado com azul de comassie e *Western Blotting* da purificação de Ric c 1r por cromatografia de afinidade em coluna NI-NTA

**Figura 23:** Sobreposição dos cromatogramas de fase reversa em colunas C2/C8 em sistema HPLC

**Figura 24:** Visualização eletroforética dos picos obtidos da cromatografia de fase reversa em gel de poliacrilamida

**Figura 25:** Comparação da sequência N-terminal parcial de Ric c 1r, obtida por degradação de Edman da proteína superexpressa e purificada com Ric c 1, obtida do NCBI

**Figura 26:** Ensaio de desgranulação de mastócitos

**Figura 27:** Ensaio de inibição da Ric c 1r contra atividade de  $\alpha$ -amilase

**Figura 28:** Visualização eletroforética do produto da PRC feito com os iniciadores específicos para ligar Ric c 1rm ao vetor pET-32 EK/LIC

**Figura 29:** Visualização eletroforética das amostras induzidas e não induzidas de Ric c 1rm e da membrana de *Western Blotting* contendo as mesmas amostras visualizadas no gel

## RESUMO

As isoformas albuminas 2S de semente mamona, Ric c 1 e Ric c 3 são proteínas de reserva e de defesa destas sementes. Entre as funções de defesa, incluímos a inibição de  $\alpha$ -amilase larval de insetos. Apesar destas importantes funções para as sementes, Ric c 1 e Ric c 3 apresentam propriedades alergênicas que promovem riscos à saúde dos trabalhadores rurais e distribuidores de sementes ou de torta de mamona. Recentemente nosso grupo identificou seis epitopos responsáveis pelo desencadeamento da alergia (epitopos ligantes de IgE). A reação cruzada entre IgE e estas proteínas alergênicas, é mediada por dois resíduos de ácidos glutâmicos presentes em cada um dos seis epitopos previamente identificados. Estudos teóricos subsequentes em nosso grupo demonstraram que mutações específicas nestes ácidos glutâmicos, podem reduzir a alergenicidade e conservar a atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase. Verificou-se que somente um resíduo de ácido glutâmico de um dos epitopos alergênicos é necessário para a interação entre  $\alpha$ -amilase e o inibidor, tanto em Ric c 1 quanto em Ric c 3. Para validar os estudos de modelagem realizados anteriormente pelo nosso grupo este trabalho teve como objetivo adequar as condições para clonagem e expressão das proteínas alergênicas Ric c 1 e Ric c 1 mutada nas regiões aminoácido-específicas, em *Escherichia coli*, a fim de comprovar a teoria proposta pelo grupo. A extração do DNA foi feita usando o kit DNeasy®Plant e DNA submetido a PCR. O produto do PCR foi inserido no vetor de expressão pET 32 EK LI e estes usados para transformar *E. coli* (DE3). A indução da proteína recombinante foi feita por adição de IPTG à cultura. A purificação da proteína recombinante foi padronizada, utilizando cromatografia de afinidade em coluna de Ni-NTA e cromatografia de fase reversa em sistema HPLC coluna C2C18. A confirmação da purificação por SDS-PAGE e por imunoblot e sequenciamento segundo Edman. Afim de confirmar a preservação das funções biológicas da proteína recombinante foi realizado ensaios de desgranulação de mastócitos e o teste de inibição de  $\alpha$ -amilase. Após a produção da proteína Ric c 1 recombinante biologicamente funcional, elucidamos a produção através do mesmo sistema Ric c 1 recombinante contendo as mutações em seus resíduos de ácidos glutâmicos. Para tanto genes sintéticos usando a ferramenta GeneArt (Invitrogen) foram comercializados, já inseridos em um vetor de clonagem pMA. O vetor pMA contendo o gene sintético foi utilizado para transformar uma cepa de clonagem XL-10. O procedimento de transformação e indução foi seguido como padronizado anteriormente. Os estudos moleculares mostraram que foi possível clonar e expressar Ric c 1 recombinante biologicamente ativa e Ric c 1r recombinante mutante em um sistema bacteriano *E.coli*. A melhor condição de purificação encontrada foi através de cromatografia de fase reversa em sistema HPLC, por apresentar menor tempo e mais rendimento da amostra. Os ensaios biológicos que irão comprovar a redução da alergenicidade e a preservação da inibição da  $\alpha$ -amilase da variedade mutante deverão ser realizados em trabalhos seguintes em nosso grupo.

**Palavras-chave:** *Ricinus communis*, albuminas 2S, alergia.

## ABSTRACT

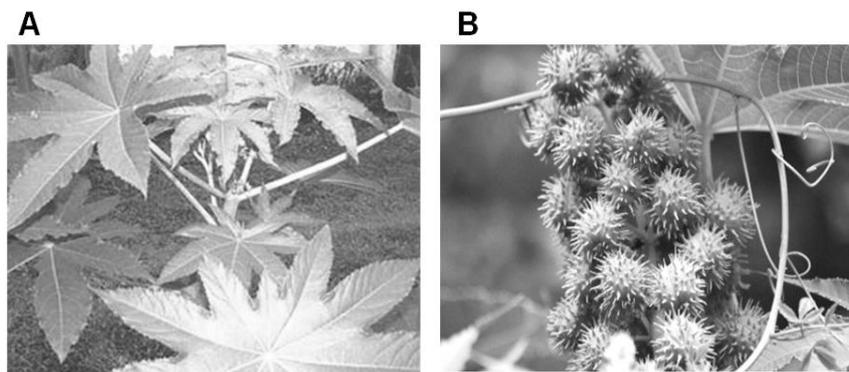
The 2S albumin isoforms from castor seed, Ric c 1 and Ric c 3 are storage and defense proteins of these seeds. Among the functions of defense, include the inhibition of  $\alpha$ -amylase larval insects. Despite these important functions for seed, Ric c 1 and Ric c 3 have allergenic properties that promote health risks to farm workers and distributors of seed or castor bean . Our group recently identified six epitopes responsible for triggering allergic (IgE -binding epitopes). The cross reaction between these allergens and IgE proteins, is mediated by two glutamic acid residues present in each of the six previously identified epitopes. Subsequent theoretical studies in our group demonstrated that specific mutations in these glutamic acids may reduce the allergenicity and retain the inhibitory activity of  $\alpha$ - amylase. It was found that only a residue of glutamic acid of the allergen epitopes is required for the interaction between inhibitor and  $\alpha$  -amylase in both Ric c 1 and in Ric c 3. To validate the modeling studies carried out previously by our group this study aimed to suit the conditions for cloning and expression of allergenic proteins Ric c 1 and Ric c 1 mutated at specific amino acid regions in Escherichia coli in order to prove the theory proposed by the group. DNA extraction was performed using the DNeasy ® Plant DNA kit and subjected to PCR. The PCR product was inserted into the expression vector pET 32 EK LI and these used to transform E. coli (DE3). Induction of recombinant protein was performed by addition of IPTG to the culture. The purification of the recombinant protein was standardized using affinity chromatography on Ni-NTA column chromatography and a reverse phase HPLC column C2C18 system. Confirmation of purification by SDS-PAGE and immunoblotting and sequencing by Edman. To confirmed the preservation of the biological functions of the recombinant protein was performed testing the degranulation of mast cells and inhibition of  $\alpha$  -amylase test. After production of Ric c 1 recombinant protein functional biologically, elucidated by the same production system Ric c 1 recombinant containing mutations in their glutamic acid residues. For both synthetic genes using the GeneArt (Invitrogen) were marketed tool, already inserted into a cloning vector pMA . The pMA vector containing the synthetic gene was used to transform a strain XL -10 clone. The transformation procedure and induction was followed as previously standardized. Molecular studies showed that it was possible to clone and express biologically active recombinant Ric c 1 and recombinant Ric c 1 mutant in a bacterial system. The best condition was found to purification by reverse phase chromatography on HPLC system. The biological tests that will demonstrate the reduction of allergenicity and preservation of inhibition of  $\alpha$  - amylase mutant variety should be conducted on these works in our group.

**Keywords:** *Ricinus communis*, 2S Albumins, allergy.

## 1- INTRODUÇÃO

### 1.1-A MAMONA E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

A mamoneira (*Ricinus Communis*) pertence à família Euphorbiaceae (Figura 1A) e encontra no Brasil excelentes condições para o seu desenvolvimento, já que é uma planta de clima tropical e sub-tropical, (Azevedo e Beltrão 2007). O fruto da mamoneira (Figura 1B) é a mamona e desta, por processos industriais, são extraídos o óleo.



**Figura1: Estruturas de *R. communis*.** A) Planta de *R. communis*; B) Semente de *R. communis*

O óleo de mamona tem como principal ácido graxo o ácido ricinoléico ou 12-hidroxi-9-*cis*-octadecenóico, que constitui 90% do óleo, os outros 10% são formados por ácidos graxos não hidroxilados, principalmente os ácidos oléicos e linoléicos (Ogunniyi, 2006). O óleo extraído das sementes de mamona possui um mercado internacional crescente, garantido por extenso número de aplicações que incluem o uso medicinal e em cosméticos, e a substituição do petróleo na fabricação de plásticos e lubrificantes. Ele tem ampla utilização na fabricação de tintas, sabões, vernizes, detergentes, papel carbono, velas, nylon, produtos sintéticos, plásticos, desinfetantes, adesivos, resinas isolantes (como as usadas em cabos telefônicos), colas especiais, tubos especiais para irrigação, cosméticos, lentes de contato, entre outras (Fornazieri Júnior, 1986; Ogunniyi, 2006). Na medicina o óleo de mamona também apresenta ampla aplicação, sendo utilizado na fabricação de grande parte dos filtros hospitalares de hemodiálise, bombas corpóreas e extracorpóreas, prótese óssea de resina de mamona (material mais leve que a platina e que não apresenta o problema de rejeição), etc. O óleo de mamona tem como aspecto particular não mudar suas

características físicas em altas ou baixas temperaturas e mesmo em variações bruscas de temperaturas, razão de sua imprescindível aplicação na aviação, como lubrificante de alta precisão, aditivos para tanques de combustíveis, sem o qual as aeronaves não decolariam (Aboissa, 2005).

Uma série de estudos vem sendo realizados para tornar viável o uso da mamona para a produção de Biodiesel. A produção de biodiesel a partir do óleo de mamona tornaria o plantio desta euforbiácea uma forma de gerar recursos e emprego em diversas regiões do Brasil. Porém apesar das vantagens referentes ao uso do óleo de mamona na indústria, ocorre uma preocupação com o aumento do plantio. Quando o óleo é extraído resta um coproduto proteico conhecido como torta da mamona que apesar de rica em nitrogênio, fósforo, potássio e proteínas não pode ser utilizada como alimento, nem como aditivo em ração animal, pois suas sementes contêm substâncias tóxicas e alergênicas que não são extraídas ou inativadas pelos processos convencionais de extração do óleo. Os constituintes tóxicos da torta são a ricina, uma proteína, a ricinina, um alcalóide, e um conjunto de proteínas alergênicas muito ativas e resistentes aos processos térmicos de desintoxicação (Azevedo e Beltrão, 2007). Entre as proteínas alergênicas presentes na torta, encontra-se as isoformas de albuminas 2S (Ric c 1 e Ric c 3) as quais possuem baixo peso molecular e apresentam funções de reserva e de defesa. Além dos alérgenos encontrados na semente, recentemente foi descrito a presença das proteínas Ric c 1 e Ric c 3 no pólen da mamoneira (Nascimento 2013). Com o aumento do cultivo da mamoneira visando seu uso comercial, aumentaria a sensibilização, por contato ou inalação, com os alérgenos de mamona, por parte dos trabalhadores rurais, distribuidores da torta e da população que vive ao redor da plantação ou em torno das usinas de extração de óleo.

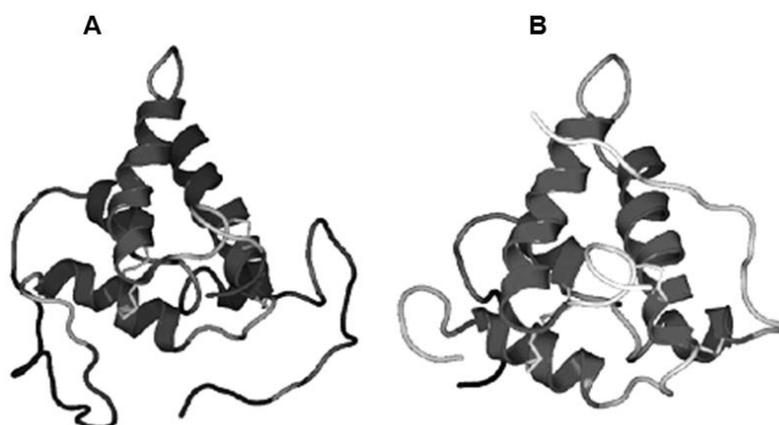
## **1.2-AS ALBUMINAS 2S**

As albuminas 2S são proteínas de reserva de dicotiledôneas, encontradas em sementes, frutos e pólen destas plantas. Elas são caracterizadas como os principais alérgenos de castanha do Pará, nozes, mostarda, gergelim e mamona (Breiteneder e Mills, 2005).

As albuminas 2S são, em algumas espécies de plantas, proteínas ricas em metionina (Kortt *et al.*, 1991; Beyer *et al.*, 2002; Hagan *et al.*, 2003), enquanto em

outras apresentam alto teor de glutamina (Odani *et al.*, 1983; Barciszewski *et al.*, 2000). Elas apresentam massa molecular de 12-15 kDa, e geralmente são compostas de duas cadeias polipeptídicas ligadas por duas pontes dissulfeto. Em sementes, as albuminas são encontradas em corpos protéicos e mobilizadas durante a germinação, sendo descritas como doadoras de nitrogênio e enxofre para este processo (Youle e Huang, 1978).

Ric c 1 e Ric c 3 estão classificados na superfamília das prolaminas. Desta superfamília fazem parte também os principais alérgenos de plantas, que possuem baixo peso molecular, são estáveis a altas temperaturas e a proteólise, devido a sua estrutura estabilizada por pontes dissulfeto (Breiteneder e Radauer, 2004; Mills *et al.*, 2004). Os alérgenos membros da superfamília das prolaminas apresentam um esqueleto conservado de 8 resíduos de cisteínas (C-X<sub>n</sub>-C-X<sub>n</sub>-CC-X<sub>n</sub>-CXC-X<sub>n</sub>-C-X<sub>n</sub>-C), que formam 4 pontes dissulfeto (Kreis *et al.*, 1985). A presença do “motif” CC e CXC não é comum em proteínas, o que facilita a identificação dos membros da superfamília das prolaminas, que possuem as  $\alpha$ -hélices como principais componentes de estrutura secundária, apresentando um enovelamento conservado (Shewry *et al.*, 2002) (Figura 2).



**Figura 2: Estrutura terciária de Ric c 1 e Ric c 3. A) Ric c 3 RMN ; B) Ric c 1 model.** Extraído e modificado de Nascimento *et al.*, 2009

As isoformas de albuminas 2S de mamona foram primeiro descritas por Spies e Coulson em 1943. No ano de 1947 a hipersensibilidade desencadeada por mamona foi descrita pela primeira vez. Em 1977, Li e colaboradores isolaram e caracterizaram uma proteína das sementes de *R. communis* de baixo peso molecular com alto “teor” de glutamina. Em 1974 Spies isolou uma fração denominada CB-1A, com baixo peso molecular e estável em altas temperaturas

(Spies, 1974). Em 1978, Youle e Huang mostraram que CB-1A, era o alérgeno descrito por Li e colaboradores em 1977, e que estas proteínas estavam presentes em corpos proteicos nas sementes de mamona.

A estrutura primária de uma das proteínas presentes no complexo alergênico CB-1A foi determinada por Sharief e Li (1982). Esta proteína, de baixo peso molecular, possuía alto teor de glutamina, e era composta por duas cadeias polipeptídicas, uma menor com 34 resíduos de aminoácidos (cadeia leve) e outra, com 61 resíduos (cadeia pesada), ligadas por duas pontes dissulfeto. A proteína descrita por Sharief e Li é conhecida como Ric c 1, obedecendo a nomenclatura indicada pelo Comitê Internacional de Alergia. Uma outra proteína alergênica, também com baixo peso molecular e alto teor de glutamina foi identificada em *R. communis* (Machado e Silva, 1992; Silva *et al.*, 1996). Esta proteína denominada inicialmente ASP-Ib, é hoje conhecida como Ric c 3, e assim como Ric c 1, apresenta duas cadeias polipeptídicas, cadeia leve com 41 resíduos de aminoácidos e a cadeia pesada com 67 resíduos, ligadas por duas pontes dissulfeto.

, Ric c 1 e Ric c 3, são oriundas de um mesmo gene, sintetizadas como um único precursor, com 237 resíduos de aminoácidos (Figura 3). O precursor sofre processamento pós-traducional, por endopeptidases e carboxipeptidases, perdendo alguns fragmentos peptídicos para assim dar origem as isoformas, Ric c 1 e Ric c 3 (Figura 4) (Irwin *et al.*, 1990).

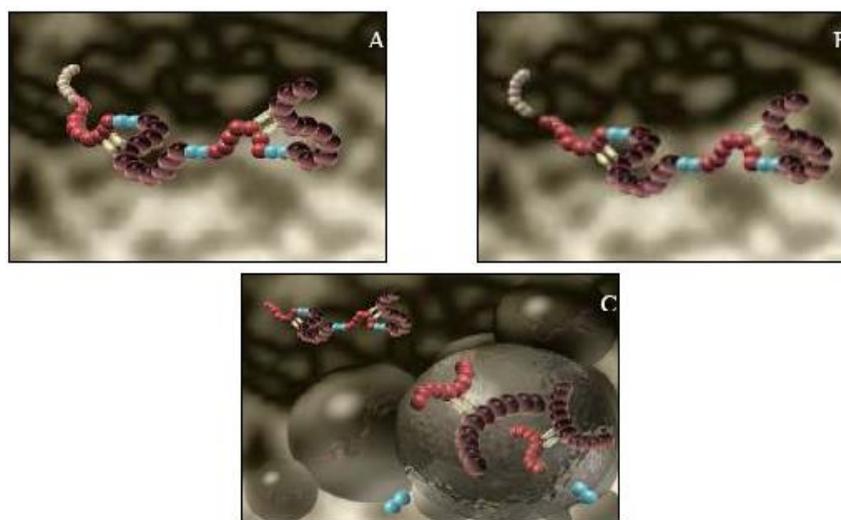
```

- gagtcaaagggtgaaaggaagga
  E S K G E R E G
tcgagctcgagcaatgccgccaggaagttcagaggaaggacttgagctcctgagcgca
S S S Q Q C R Q E V Q R K D L S S C E R
tacctgaggaatcaagttcaagaagatcaccaggagaagaagtgttaaggatgcctgga
Y L R Q S S S R R S P G E E V L R M P G
gatgaaaaacagcagcagagagccagcaactccagcaatgctgcaatcaggtaaagcaa
D E N Q Q Q E S Q Q L Q Q C C N Q V K Q
gtaagagatgaatgccaatgtgaagcaatcaaataatcgcagaggatcagattcagcag
V R D E C Q C E A I K Y I A E D Q I Q Q
ggacagctacatggagaagagtctgaaagagtggcgagagagcaggtgaaattgtatct
G Q L H G E E S E R V A Q R A G E I V S
tcttgcggtgtgctgcatgctgcaactcgaacaaacccaagccagcaggggtgctcgt
S C G V R C M R Q T R T N P S Q Q G C R
gggcagattcaagcaacaaaatctcaggcaatgccaggaatatcaacaacaagtt
G Q I Q E Q Q N L R Q C Q E Y I K Q Q V
tccggacaggaccagaagaagtgacaatcaagaacggctctctcgtgggtgctgtgac
S G Q G P R R S D N Q E R S L R G C C D
catctcaagcagatgcagtcacagtcagatgagggctgagggcaggtattgagcag
H L K Q M Q S Q C R C E G L R Q A I E Q
caacagagccagggcaactcaaggtcaggatgttttgaggcttcaggacagctgag
Q Q S Q G Q L Q G Q D V F E A F R T A A
Aattgccaatgtgctgagcgtctcaccaaccgaatgcccggtt-
N L P S M C G V S P T E C R F

```

**Figura 3: Fragmento da sequência gênica e sequência de aminoácidos correspondentes.**

Azul refere-se a sequência de Ric c 3; vermelho a sequência de Ric c 1; preto peptídeos de ligação de Ric c 3 e Ric c 1 respectivamente.



**Figura 4: Processamento pós traducional de Ric c 1 e Ric c 3 em seu sistema natural de expressão (na planta *R. communis*). A) Precursor intacto; B) perda do peptídeo sinal; C) perda do peptídeo de ligação (Gomes da Silva, L- comunicação pessoal). Em branco está identificado o peptídeo sinal; azul os peptídeos de ligação; vermelho a cadeia leve; roxo a cadeia pesada; amarelo as pontes dissulfetos.**

Nos últimos anos, diversas funções de defesa para a planta vêm sendo descritas para as albuminas 2S incluindo a atividade antifúngica (Agizzio *et al.*, 2003; Terras *et al.*, 1992, 1993), a inibição de proteases serínicas (Genov *et al.*, 1997) e atividade inibitória contra a enzima  $\alpha$ -amilase salivar humana e dos

besouros *Tenebrio molitor*, *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus*. (Nascimento et al., 2011)

### **1.3-O DESENCADEAMENTO DA ALERGIA POR ALÉRGENOS DE *RICINUS COMMUNIS***

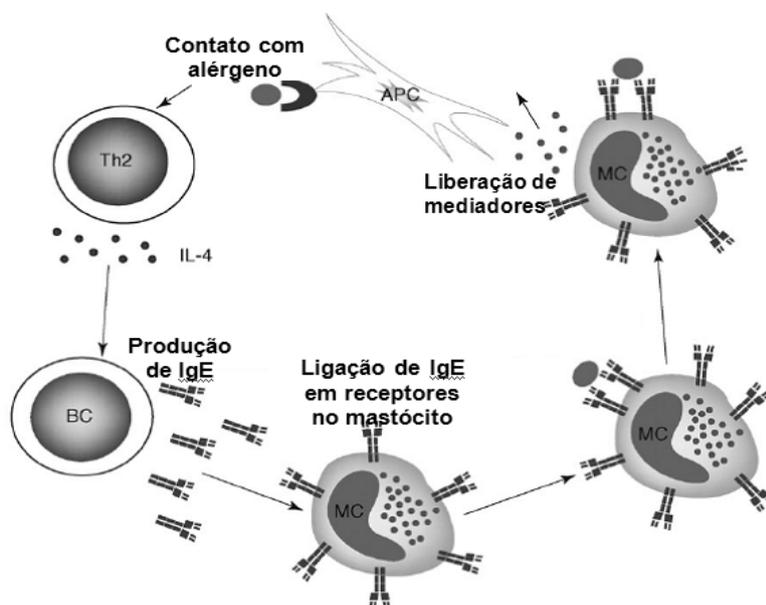
Define-se um alérgeno como uma substância normalmente inofensiva, encontrada no ambiente ou nos alimentos, capaz de produzir asma, febre, eczema e desconforto gastrintestinal ao ser posta em contato com uma pessoa previamente sensibilizada. Essencialmente existem três tipos de alergia: atópica, retardada e anafilática, sendo que as reações causadas pela torta de mamona se caracterizam como atópica, na qual os sintomas aparecem em no máximo 60 minutos após a exposição.

A alergia é comumente definida como uma reação de hipersensibilidade imediata ou do tipo I, onde os sintomas aparecem rapidamente e são causados pela exposição a macromoléculas exógenas, conhecidas como antígenos ou alérgenos, geralmente de origem proteica. A resposta alérgica é mediada por uma classe específica de anticorpos, conhecida como imunoglobulina E (IgE) (Gould e Sutton 2008). A reação de hipersensibilidade apresenta duas fases: a sensibilização, quando o indivíduo é exposto pela primeira vez ao antígeno e a reação subsequente, quando o indivíduo é novamente exposto ao antígeno (Mills *et al.*, 2003).

Os anticorpos IgE, são capazes de se ligar a receptores  $Fc\epsilon$  presentes na membrana de mastócitos e basófilos. Esta ligação se caracteriza como sensibilização, ou seja, o primeiro contato do indivíduo com o alérgeno. No segundo e nos demais contatos do indivíduo com o mesmo alérgeno, ocorrerá uma ligação entre segmentos específicos do alérgeno e duas moléculas de IgEs presentes na membrana dos mastócitos e basófilos. Esta ligação, dispara mudanças fisiológicas e anatômicas que desencadearão a ruptura da membrana destas células, liberando mediadores inflamatórios que levarão aos sintomas da alergia (Abbas *et al.*, 2003). A região de interação do alérgeno com as IgEs é conhecida como epitopo ligante de IgE. Estes epitopos podem ser conformacionais, resultantes do arranjo estrutural da molécula ou contínuos, onde a sequência primária contínua pode desencadear a resposta alérgica no

indivíduo previamente sensibilizado. Epitopos contínuos foram relacionados a processos de reações cruzadas entre alérgenos (Ivanciuc *et al.*, 2009; Felix *et al.*, 2008).

Como descrito anteriormente Ric c 1 e Ric c 3, foram descritas como proteínas alergênicas e foram identificados seis epitopos, 2 em Ric c 1 e 4 em Ric c 3, responsáveis pelo desencadeamento da alergia (Felix *et al.*, 2008) (Figura 6). Como representado no esquema 1, nos epitopos ligantes de IgE das moléculas Ric c 1 e Ric c 3 é importante que haja 2 resíduos de ácidos glutâmicos (Oliveira *et al.*, 2011) para ligarem às IgEs presentes na membrana dos mastócitos e/ou basófilos para assim, dispararem o processo de desgranulação destas células, ou seja, liberação de mediadores que levam aos sintomas da alergia.



**Figura 5: Esquema ilustrativo da reação de Hipersensibilidade do tipo I.** A reação alérgica envolve uma série de eventos que se inicia com o reconhecimento da estrutura do alérgeno por células apresentadoras de antígenos (APC), os macrófagos (MC) internalizam o alérgeno que a seguir sofre proteólise, gerando fragmentos peptídicos. Estes peptídeos, denominados epitopos de célula T, são expostos na membrana das APCs e reconhecidos pelos linfócitos T auxiliares (TH1 e/ou TH2) que juntamente com os linfócitos B, iniciarão a resposta imunológica. As células TH2 são ativadas após este primeiro contato com as APCs e produzem grandes quantidades de interleucinas 4 e 5 (IL-4 e IL-5, respectivamente). Estas por sua vez atuam como citocinas e levam a biossíntese de IgE por linfócitos B ( extraído e modificado de Shakib *et al.*, 2000)

**Ric c 1**

Cadeia leve:

1            10            20            30  
 PSQQGCRGQIQEQQNLRQCQEYIKQQVSGQGPRR  
 (Epitopo 1)

Cadeia pesada:

1            10            20            30            40            50            60  
 QERSLRGCCDHLKQMQSQCRCEGLRQAIEQQQSQGQLQGQDVFEAFRTAANLPSMCGVSPTECRF  
 (Epitopo 2)

**Ric c 3**

Cadeia leve:

1            10            20            30            40  
 ESKGEREGSSSQCRQEVQRKDLSSCERYLRQSSRRSPGE  
 (Epitopo 3)            (Epitopo 4)

Cadeia pesada:

1            10            20            30            40            50            60  
 QQQESQQLQQCCNQQVQVRDEQCCEAIKYIAEDQIQGGQLHGEESERVAQRAGEIVSSCGVRCMRQT  
 (Epitopo 5)            (Epitopo 6)

**Figura 6: Estrutura primária das isoformas de albuminas 2S de *R. communis*, Ric c 1 e Ric c 3, destacando as cadeias leve e pesada e os epitopos alergênicos.** Estão destacados em negrito os epitopos 1, 2, 3, 5 e sublinhado os epitopos 4, 6 para facilitar a visualização.

#### 1.4- AS ALBUMINAS 2S COMO INIBIDORES DE $\alpha$ -AMILASES

As  $\alpha$ -amilases ( $\alpha$ -1,4 glucano-4-glucanohidrolases) são enzimas monoméricas que constituem uma família de endoamilases e catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 do amido, glicogênio e outros carboidratos. Essas enzimas são amplamente distribuídas em plantas, animais e microrganismos, tendo um importante papel no metabolismo de carboidratos desses organismos.

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos no intuito de desvendar o funcionamento das amilases e de descobrir proteínas com função inibitória a essas enzimas digestivas (Da Silva *et al.*, 2000; Oliveira-Neto *et al.*, 2003; Zhi-Fei *et al.*, 2008). As plantas desenvolveram estratégias de defesa contra a ação de insetos, produzindo inibidores de enzimas digestivas, os chamados inibidores de  $\alpha$ -amilases e proteinases, que impedem estas enzimas de exercer sua função (Mello e Silva-Filho, 2002; Sivakumar *et al.*, 2006; Farias *et al.*, 2007). Os inibidores de  $\alpha$ -amilase vêm sendo isolados de plantas, animais e microrganismos, podendo ser de natureza protéica ou não. Os inibidores protéicos de  $\alpha$ -amilase encontrados na natureza foram divididos em sete famílias de acordo com sua similaridade de seqüência primária e estrutura tridimensional (Svensson *et al.*, 2004; Payan, 2004). A forma como os diferentes inibidores

interagem com os resíduos catalíticos da enzima apresenta enormes variações. A interação entre o inibidor e o sítio catalítico da enzima pode ser via ligação de hidrogênio direta, ou via uma molécula de água, ou envolvendo uma molécula de  $\text{Ca}^{+2}$  hidratado, ou ainda, alguns inibidores apresentam interações que mimetizam a interação do substrato com a enzima (Svensson *et al.*, 2004). Ric c 1 e Ric c 3, foram caracterizados como inibidores de  $\alpha$ -amilase dos besouros *Tenebrio molitor*, *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus*. (Nascimento *et al.*, 2011). Neste mesmo trabalho foi realizado um modelo *in silico* da interação entre a  $\alpha$ -amilase de *T. molitor* e os inibidores Ric c 1 e Ric c 3, demonstrando que Ric c 1 e Ric c 3 se associam diretamente ao sítio ativo da enzima promovendo uma inibição por competição com o substrato

Estudos teóricos foram elaborados, também por modelagem molecular, e mostraram que é viável realizar mutações nos resíduos de ácidos glutâmicos dos epitopos alergênicos, por resíduos de leucina. Estas mutações tornariam estas isoformas menos alergênicas preservando sua atividade de inibição de  $\alpha$ -amilase, possivelmente uma importante função de defesa contra predadores, associadas a estas proteínas alergênicas. Os autores demonstraram que as mutações nos epitopos alergênicos não alterariam significativamente a estrutura destas proteínas, porém as mesmas perderiam sua capacidade de interação com a IgE e, assim, não desencadeariam a degranulação dos mastócitos e por conseguinte, a resposta alérgica (Nascimento 2009). Neste trabalho procuramos estabelecer condições para a expressão de Ric c 1 para subsidiar estudos posteriores de validação do modelo proposto por Nascimento e colaboradores em 2009.

## 2- OBJETIVO GERAL

Expressar a proteína alergênica de *Ricinus communis* Ric c 1 em um sistema de expressão bacteriano com *Escherichia coli* conservando suas atividades alergênicas e inibitórias de  $\alpha$ -amilase, e realizar mutações específicas nos epitopos alergênicos de Ric c 1 como estratégia para diminuir a alergenicidade e conservar a atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase, pois esta representa uma importante função de defesa da planta.

### 2.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar a região gênica que codifica a proteína Ric c 1;
- Expressar Ric c 1 em células bacterianas;
- Purificar Ric c 1 recombinante (Ric c 1r);
- Testar a alergenicidade da Ric c 1r;
- Testar a inibição pela Ric c 1r da atividade da  $\alpha$ -amilase salivar humana e da  $\alpha$ -amilase intestinal do besouro *C. maculatus*;
- Realizar mutagênese em resíduos de ácido glutâmico nos epitopos alergênicos de Ric c 1r;
- Expressar Ric c 1r mutada em células bacterianas.

### 3- MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1-MATERIAL BIOLÓGICO

- As sementes de *Ricinus communis* (cultivar IAC-226) foi obtido do instituto Agrônômico de Campinas, São Paulo, Brazil,
- As cepas de *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS, genótipo: D (ara-leu)7697DlacX74 DphoA Pvull phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F'[lac+laclq pro]gor522::Tn10 trxBpLysSRARE23 (Cam<sub>R</sub>, Str<sub>R</sub>, Tet<sub>R</sub>)4] foi adquirida comercialmente (Novagen).
- A cepa de *E. coli* JM109, genótipo: *endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (rkmk+), *relA1*, *supE44*,  $\Delta$ (*lac-proAB*), [F', *traD36*, *proAB*, *laqlqZ* $\Delta$ M15] foi adquirida comercialmente (Promega).
- O Besouro *C. maculatus* foi cedido pelo grupo colaborador do Laboratório de Química e Função de Proteína e Peptídeo – LQFPP na Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF
- Os ratos wistar obtidos pela Universidade Estadual do Norte Fluminense.

#### 3.2- OBTENÇÃO DA PROTEÍNA RIC C 1 DE SEMENTES DE MAMONA

A proteína Ric c 1 foi extraída de sementes de *Ricinus communis* L. cultivar IAC-226 segundo a metodologia descrita por Thorpe *et al.* (1988), com adaptações propostas por Machado *et al* (2003). Cerca de 100 g de sementes foram descascadas e, após a retirada das casacas, a massa livre do tegumento foi registrada. Esta massa foi macerada com grau e pistilo e, posteriormente embebida em 400 ml de hexano visando à extração do óleo. Esta suspensão foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente, durante 2 h. Após a agitação, a amostra foi centrifugada a 2.500 x g por 30 min a 25°C os lipídeos que formaram uma camada na superfície do líquido foram removidos. Essa metodologia foi repetida por duas vezes. Após a extração do óleo, as proteínas foram solubilizadas em 400 ml de tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 7,0) e a mistura mantida sob agitação por 3 h. Os resíduos insolúveis foram eliminados por centrifugação a 30.000 x g durante 15 min. a 4°C. O material foi filtrado para retirada do sedimento e lipídios, as proteínas do sobrenadante foram precipitadas

com sulfato de amônio até atingir a saturação de 90%. O material foi armazenado por 18 h sob agitação. Após a precipitação, a amostra foi centrifugada a 15.000 x g durante 20 min (todas as centrifugações seguiram em temperatura ambiente, aproximadamente 25°C). e o precipitado, contendo as proteínas, foi recolhido e o sobrenadante descartado. O material recolhido foi fervido durante 15 min., em banho-maria, visando flocular a ricina, posteriormente submetido a uma nova centrifugação por 10 min. a 2.500 x g, e o sobrenadante recolhido. Para separar a Ric c 1 das outras proteínas presentes na amostra, à mesma foi submetida à cromatografia de filtração em gel utilizando resina Sephadex-G-50 previamente equilibrada em TFA (ácido trifluoracético) 0,1%. A amostra foi eluída com TFA 0,1% sob um fluxo de 1,0 ml/min e frações de 1ml foram coletadas e detectadas a 280 nm. As frações correspondentes as albuminas 2S, foram acumuladas, e submetidas a uma cromatografia de fase reversa em sistema HPLC, para a separação das isoformas Ric c 1 e Ric c 3. Para tanto foi utilizada uma coluna C2/C18 e para eluição das proteínas foi utilizado um gradiente das soluções (A): 2% de ACN e 0,1 de TFA (B): ACN 80% e TFA 0,1%. O fluxo de eluição foi de 0,7ml/minuto. O picos equivalente as fração de Ric c 1 foi coletado, liofilizado e guardado a 4 °C, em pequenas alíquotas até o uso.

### **3.3- CLONAGEM DO FRAGMENTO GENICO CODIFICANTE DE Ric c 1**

#### **3.3.1-DESENHO DOS INICIADORES PARA O FRAGMENTO GENICO DE Ric c 1**

Inicialmente foi feita uma busca no banco de dados NCBI/Gene (ID:8280730), obtendo-se assim a região codificante de Ric c 1. Baseado nesta região foram desenhados os iniciadores correspondentes à região codificante de Ric 1 c, sendo a região de anelamento dos iniciadores indicada na figura 7. Suas temperaturas de anelamento, assim como sua capacidade de auto-complementaridade e porcentagem de C/G foram analisadas no sítio NCBI (*primer blast*).

Ric c 1

5' **CCAAGCCAGCAGGGGTG**TCGTGGGCAGATTCAAGAGCAACAAAATCTCAGGCAATGCCAGGAATATATCAA  
 ACAACAAGTTTCCGGACAGGGACCAAGAAGAAGTGACAATCAAGAACGGTCTCTTCGTGGGTGCTGTGACCAT  
 CTCAAGCAGATGCAGTCACAGTGCAGATGCGAGGGTCTGAGGCAGGCTATTGAGCAGCAACAGAGCCAGGGGC  
 AACTTCAAGGTCAGGATGTTTTGAGGCTTTCAGGACAGCTGCGAATTTGCCATCAATGTGCGGCGTCTCACC  
 AACCGAATGCCGGTTC3'

**Iniciador Senso (ric1s):** 5' CCAAGCCAGCAGGGGTG3' T<sub>m</sub> = 64 °C  
**Iniciador Anti-senso (ric1as):** 5' TTAGAACCGGCATTTCGGTTG3' T<sub>m</sub> = 63 °C

**Figura 7: Sequência de DNA da região codificante de Ric 1 c de *Ricinus communis*, representadas pelas fitas 5' e 3' obtido do sítio NCBI.** Os iniciadores foram desenhados a partir desta sequência de DNA de Ric c 1. A região sublinhada indica o peptídeo de ligação entre as cadeias leve e pesada. Abaixo das sequências são mostrados os iniciadores e suas respectivas temperaturas de anelamento (T<sub>m</sub>).

### 3.3.2- EXTRAÇÃO DE DNA

A extração do DNA foi realizada utilizando o kit “DNeasy Plant Mini Kit” (Qiagen) e o procedimento feito de acordo com o manual fornecido. Inicialmente 100 mg de folha de *R. communis* foram maceradas em nitrogênio líquido cuidadosamente para que não haja a degradação do DNA. Posteriormente foram adicionados 400 µl de tampão AP1\* e 4 µl de RNase A a uma concentração de 100mg/ml, a solução foi incubada por 10 min. a 65 °C, homogeneizando o tubo gentilmente de 2 a 3 vezes durante a incubação. Posteriormente foram adicionados 130 µl do tampão AP2\*, incubado por 5 min no gelo e centrifugado por 5 min. a 20.000 x g (todas as centrifugações seguiram a temperatura ambiente, aproximadamente 25°C; o sobrenadante foi transferido para a coluna QIAshredder\* (lilás) e a coluna colocada em um tubo de 2 ml para a coleta do material, sequentemente foi realizada uma centrifugação por 2 min a 20.000 x g. O líquido que passou pela coluna foi transferido para um novo tubo sem perturbar o sedimento; ao lisado, foi adicionado 1,5 ml de de tampão AP3\* e desta mistura foram pipetados 650 µl para a coluna DNeasy\* (branca). A coluna foi colocada em um tubo de 2 ml e levada a centrifugação por 1 min a 6.000 x g, o líquido eluído foi então descartado cuidadosamente; a coluna transferida para um novo tubo de coleta e adicionado 500 µl de tampão AW\* e centrifugada por 2 min a 20.000 x g. A coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 ml e adicionado 100 µl de tampão AE\* diretamente sobre a membrana, incubando por 5 min. a temperatura

ambiente, posteriormente foi centrifugado por 1 min a 6.000 x g para a eluição. O DNA obtido foi armazenado a -20°C. \* fornecido pelo fabricante.

### 3.3.3- QUANTIFICAÇÕES DO DNA POR ESPECTROFOTOMETRIA

A concentração de DNA foi determinada por medição da absorbância das amostras a 230, 260 e 280 nm no espectrofotômetro (Nanodrop). A concentração e pureza das amostras de DNA foram estimadas pelas seguintes razões:  $A[260]/A[280]$  e  $A[260]/A[230]$ , no qual um DNA bem puro é considerado estar próximo dos valores de 1,8 e 1,2, respectivamente. Para a quantificação de ácidos nucleicos, a equação de Beer-Lambert é modificada para usar um fator com unidades de ng-cm/ $\mu$ l. A equação modificada utilizada para os cálculos de ácido nucleico é a seguinte:

$$c = (A * \epsilon) / b \text{ onde}$$

$c$  = concentração de ácido nucleico em ng /  $\mu$ l

$A$  = a absorvância em AU

$\epsilon$  = comprimento de onda em cm

$b$  = o caminho óptico em cm

### 3.3.4- AMPLIFICAÇÃO GÊNICA DE *Ric c 1* POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A partir do DNA genômico extraído das folhas foram realizadas reações em cadeia da polimerase (PCRs, do inglês *polymerase chain reaction*) a fim de amplificar o locus correspondente ao gene que codifica a proteína Ric c 1. Após a obtenção dos iniciadores foram realizadas PCRs onde se testou uma variedade de temperaturas de anelamento e proporções dos iniciadores ric1s e ric1as. A reação foi realizada da seguinte forma:

Proporção Iniciador	Tampã o 10x [final]	dNTP [final]	sense [final]	Anti-sense [final]	DNA [final]	Taq [final]	MgCl <sub>2</sub> [final]	H <sub>2</sub> O volume	Total volume
1:1	1x	1,25mM	10pmol/μl	10pmol/μl	20ng/μL	0,03u/μl	1,5mM	8,24μL	20μL
1:2	1x	1,25mM	10pmol/μl	20pmol/μl	20ng/μL	0,03u/μl	1,5mM	6,32μL	20μL
2:1	1x	1,25mM	20omol/μl	10pmol/μl	20ng/μL	0,03u/μl	1,5mM	6,32μL	20μL

Condição:

95°C	1 min 30 s	} 1X
95°C	45 s	
Gradiente		} 40X
57°C		
59°C		
61°C	45 s	
63°C		
65°C		
72°C	3 min	
4°C	1 h	

A visualização da amplificação foi realizada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 5 μg/ml.

### 3.3.5- TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA - *E. Coli* (JM 109)

Para a clonagem da sequencia codificante de Ric c 1 amplificada por PCR em bactérias *E. coli*, primeiramente foi realizada a ligação dos produtos de PCR ao vetor pJET 1.2/blunt. Para tanto 75 ng do produto de cada PCR foram incubados com 1,25ng/μl do vetor a e 0,05u/μl de enzima ligase, completando o volume de 10 μl com água ultra pura; a reação foi mantida a 22 °C por 5 min. Para a transformação da cepa JM109 competente foi usado 4,5 μl da reação de ligação do vetor ao fragmento amplificado. Após a adição da ligação as células ficaram por 10 min. no gelo e sequentemente transferidas para 42 °C por 90 s., e novamente transferidas para o gelo por 10 min. Todo processo deu-se rapidamente para que ocorra choque térmico e o vetor seja capaz de ser inserido na célula. Foram adicionados 800 μl de meio LB líquido às células que foram incubadas por 1 h a 37 °C sob agitação de 200 rpm. Após a fase de crescimento, as células foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e as células

ressuspendidas e plaqueadas em meio LB sólido contendo 100 µg/ml de ampicilina. As placas foram mantidas a 37 °C por 16 h. Após as 16 h as placas foram avaliadas a fim de identificar as colônias transformadas as quais foram submetidas à extração plasmidial.

### **3.3.6- EXTRAÇÃO DO PLASMÍDEO**

Das colônias que foram visualizadas na placa após 16 h de incubação (item 3.3.5), 15 aleatoriamente foram coletadas e inoculadas em 5 ml de meio LB a 37 °C por 16 h. Após esse período foi feita a extração plasmidial de cada colônia. Para a extração do plasmídeo foram transferidos 1,5 ml da cultura celular para tubos de 1,5 ml. Esta suspensão foi centrifugada por 30 s a 15.000 x g (todas as centrifugações seguiram em temperatura ambiente, aproximadamente 25°C). Posteriormente, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu as células pela adição de 300 µL de solução TENS (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, NaOH 100 mM, SDS 25 mM) e agitação vigorosa por 10 s. Foi adicionado acetato de sódio 1,5M, seguido de centrifugação por 3 min. a 14.000 x g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, e a este sobrenadante adicionado 1 ml de etanol 100% gelado, e centrifugado por 1 min a 14.000 x g, o sobrenadante foi descartado e ao precipitado adicionado 1 ml etanol 70% gelado e centrifugado nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco para então ser ressuspendido em 40 µL de TE (Tris-HCl 10mM pH= 8,0, EDTA 1 mM) contendo RNase A 40 ng/µL. Para verificar se o fragmento foi devidamente clonado, o plasmídeo extraído foi submetido a uma digestão com a enzima *Bgl* II. Para tanto 0,5u/µl u da enzima *Bgl* II, 2µL de tampão tango 1x (33 mM de Tris-acetato pH 7,9, 10 mM de acetato de magnésio; 66 mM de acetato de potássio; 0,1 mg/mL de BSA), 5 µL do plasmídeo extraído e 11 µL de água ultra pura completando um volume final de 20 µL. A reação procedeu a 37 °C por 1 h. A digestão foi visualizada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo nas mesmas condições descritas anteriormente.

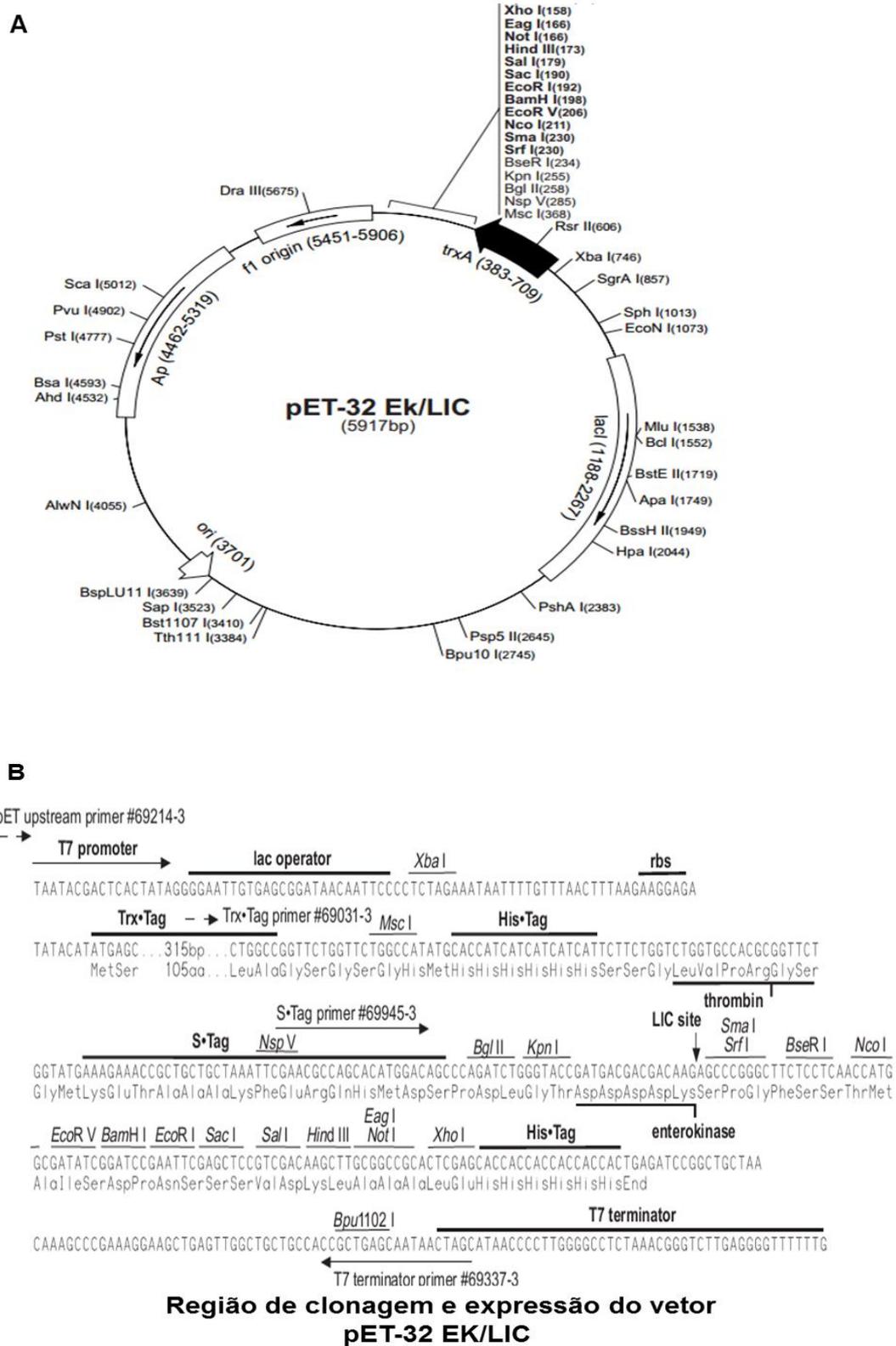
## **3.4- EXPRESSÃO FUNCIONAL DE Ric c 1**

### **3.4.1- CLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO pET-32 EK/LIC**

Para expressar Ric c 1 em um sistema de expressão bacteriano, é necessário primeiro ligar sua região codificante em um vetor de expressão. Para

tanto foi utilizado o vetor de expressão pET-32 EK/LIC (Novagem) (Figura 8). Este vetor possui características particulares importantes para que ocorra a produção da proteína de interesse: gene lac 1 que codifica a proteína repressora lac; um promotor T7 específico para a enzima T7 RNA polimerase; um operador lac responsável pelo bloqueio da transcrição; um sítio de policlonagem; uma origem de replicação e um gene de resistência a um antibiótico; além dessas características o vetor possui uma sequência de nucleotídeos que adicionará à proteína expressa uma sequência de histidinas consecutivas, que dará a proteína recombinante uma distinção entre as outras proteínas expressas, em uma forma de “etiqueta” que poderá facilitar o reconhecimento da mesma além de ser necessário para o processo de purificação por cromatografia em coluna de Ni-NTA, dada pela afinidade das histidinas ao íon metálico Ni. As proteínas recombinantes neste vetor são ainda fusionadas à tioredoxina, que ajuda na solubilidade da proteína recombinante e ajuda a evitar a formação de corpos de inclusão.

O sistema independente de clonagem (LIC) facilita ao processo de clonagem, pois não há a necessidade de digestão com enzima de restrição ou de reação de ligação. Para a clonagem no vetor pET foram desenhados manualmente os iniciadores, inserindo aos iniciadores previamente descritos (3.3.1) uma sequência de nucleotídeos necessária para a ligação do gene ao vetor pET. Foi realizado então um PCR afim de amplificar a região gênica de Ric c 1 contendo sequências em suas extremidades que facilitarão a ligação ao vetor pET. Suas temperaturas de anelamento, assim como sua capacidade de auto-complementaridade e porcentagem de C/G foram analisadas no sítio NCBI (*primer blast*) (Figura 9).



**Figura 8: Vetor pET-32EK/LIC. A) Mapa do vetor pET-32EK/LIC; B) Detalhamento da região do sítio de policlonação e expressão.**

**Ric c 1**

Senso (pET s)

5' **GACGACGACAAGATG***CCCAAGCCAGCAGGGGTG*3'

Tm: 69,73 °C, CG: 64%

Anti- senso (pET as)

3' GTTGGCTTACGGCCAAGATT**TGGCCCGAAGAGGAG**5'

Tm: 68,89 °C, CG: 58,33%

**Figura 9: Sequencia dos iniciadores usados para a ligação da sequencia codificante de Ric 1 c ao plamídio pET-32 EK/LIC.** Em negrito é mostrado em ambos os iniciadores a sequencia que anela com o vetor e em caixa normal é mostrada a sequencia que anela com a região codificante de Ric c 1. O ATG destacado em itálico e sublinhado no iniciador pET s foi adicionado como um requerimento para se clonar no vetor pET-32 EK/LIC. Abaixo de cada iniciador é mostrada a Tm e a porcentagem de CG.

A PCR foi feita do seguinte modo:

Tampão 10x [final]	dNTP [final]	sense [final]	Anti-sense [final]	DNA [final]	PFU [final]	MgCl <sub>2</sub> [final]	H <sub>2</sub> O volume	Total volume
1 x	1,25mM	10pmols/μl	10 pmols/μl	20ng/μl	0,03u/μl	1,0mM	8,24μl	20μl

Condição:

95°C	1 min	}	1X
95°C	30 s		
		}	40X
74°C	45 s		
72°C	3 min		
4°C	1 h	}	1X

Após a PCR foi feito o anelamento do produto amplificado com o vetor pET-32 EK/LIC da seguinte forma: 1 μg de produto de PCR foram incubados com tampão T4 DNA polimerase 1x, ATP 25mM, DTT 1 mM, T4 DNA polimerase 0,1u/μl e o volume de 10 μl foi completado com água ultrapura. Toda reação foi incubada a 22 °C por 30 min. e inativada a 72 °C por 20 min. Depois do tratamento com a T4 polimerase o fragmento encontra-se pronto para anelamento ao vetor. Para a reação de anelamento 12ng/μl do vetor pET-32 EK/LIC e 2 μL do produto de reação do fragmento tratado com a T4 polimerase equivalente a 100 ng/μl, foram

incubados por 5 min a 22 °C, em seguida adicionado 25mM EDTA, 1 µl de água ultrapura e uma nova incubação nas mesmas condições anteriores.

O vetor ligado ao fragmento gênico foi utilizado para transformar um sistema bacteriano (*E. coli* JM 109) para sua manutenção. A transformação e a extração do plasmídeo seguiram como descritas no item 3.2.6 e 3.2.7 respectivamente. Para verificar se o fragmento foi devidamente clonado, o plasmídeo extraído foi submetido a uma digestão com as enzimas *Bgl* II e *Eco* R I. Para tanto adicionou-se 0,5u/µl de cada enzima, tampão tango [2x], 0,5 µg/µl do plasmídeo extraído e 11 µl de água ultra pura até um volume final de 20 µl. A reação foi incubada a 37 °C por 1 h, e posteriormente a digestão foi visualizada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Após comprovar que o fragmento foi devidamente clonado, o plasmídeo extraído está pronto para transformar uma cepa de superexpressão.

### **3.4.2-TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA EM CEPA DE SUPEREXPRESSÃO – *E. Coli* linhagem Rosetta-gami2 (DE3) pLysS**

A célula hospedeira *E. coli* Rosetta gami2 (DE3) pLysS usada para expressão possui o gene da T7 RNA polimerase, e o operon lac em seu genoma. Desta forma, quando a molécula de IPTG (Isopropil-β-D-galactosídeo) está presente dentro da célula, a transcrição da T7 RNA polimerase é ativada. Adicionalmente esta linhagem possui um vetor (pRARE) que pode interferir no processo de produção recombinante por interrupção prematura da tradução. O processo de transformação seguiu como descrito anteriormente (3.3.5).

### **3.4.3- INDUÇÃO DA SUPEREXPRESSÃO DE RIC c 1r**

Primeiramente foram inoculados 3 colônias isoladas da Rosetta-gami transformada com o vetor pET em 5 ml de meio LB contendo ampicilina (100 µg/ml) e cloranfenicol (34 µg/ml). As cepas foram mantidas a 37 °C sob agitação de 200 rpm até atingir uma DO<sub>600</sub> de aproximadamente 0,5. Após o crescimento foi retirado 300 µl da cultura e adicionado 10 ml de meio LB contendo os antibióticos. As culturas foram igualmente divididas (5ml) e em uma da duplicata foi adicionado 1 mM IPTG (isopropil-β-D-galactosídeo) para ativar o processo de indução da tradução de Ric c 1r, e as culturas que não possuíam IPTG foram

avaliadas como controles. Todas as culturas foram agitadas a 200 rpm e mantidas a 37 °C por 16 h.

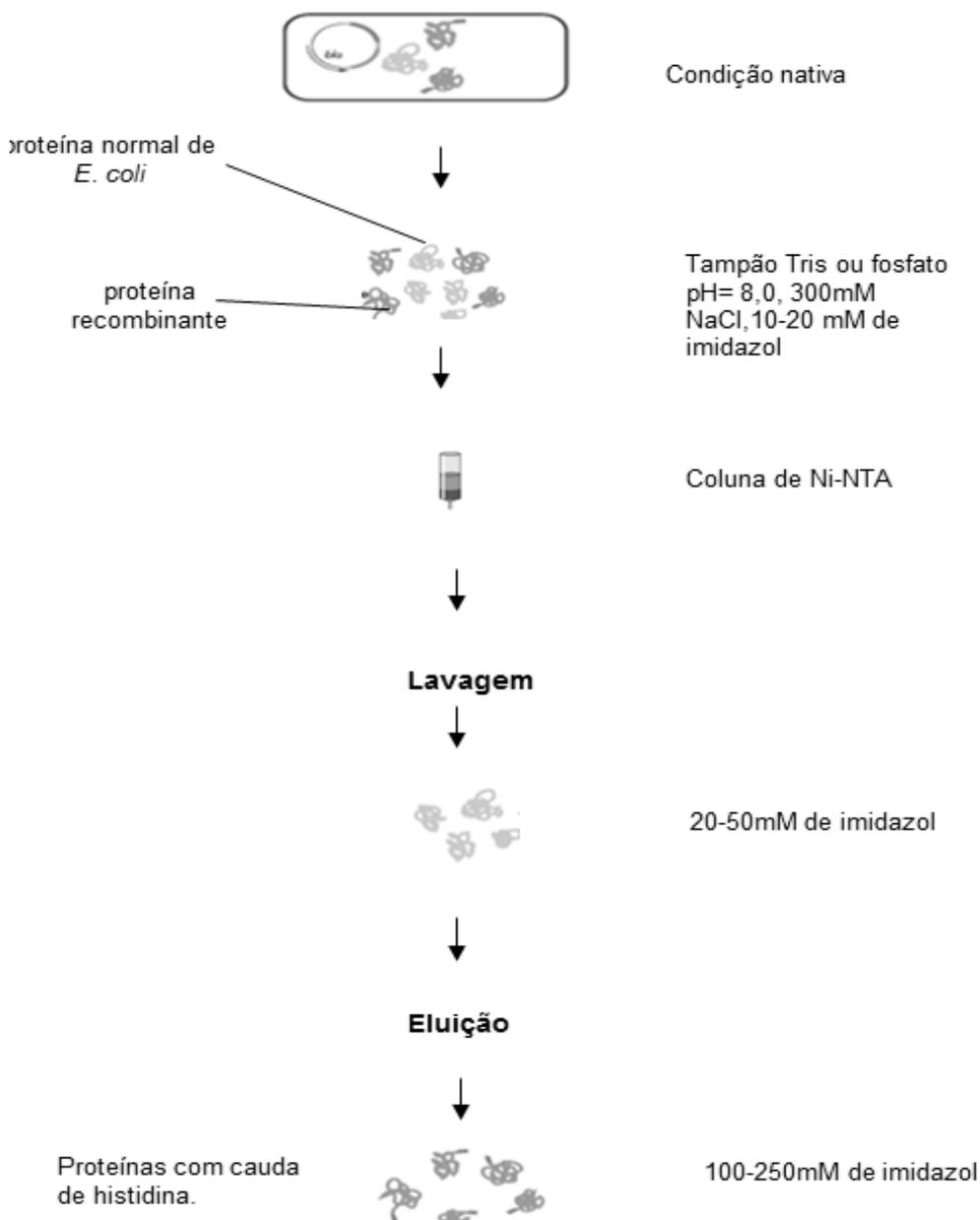
### **3.5- EXTRAÇÃO DE RIC c 1r E PADRONIZAÇÃO DE SUA PURIFICAÇÃO**

A extração da fração superexpressa recombinante (Ric c 1r) após a indução foi feita por sonicação em 5 pulsos de 30 s na potência máxima. Foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 min a 25° C. O sobrenadante foi submetido à purificação. Para a purificação Ric c 1r duas estratégias foram testadas: 1) Cromatografia de afinidade a Níquel em coluna de Ni-NTA- Agarose (ácido nitrotriacético) (20 cm x 1 cm) (Quiagen) (Figura 5 e 6) e 2) cromatografia de fase reversa em coluna  $\mu$ PPCC2/C18 ST 4.6/100.

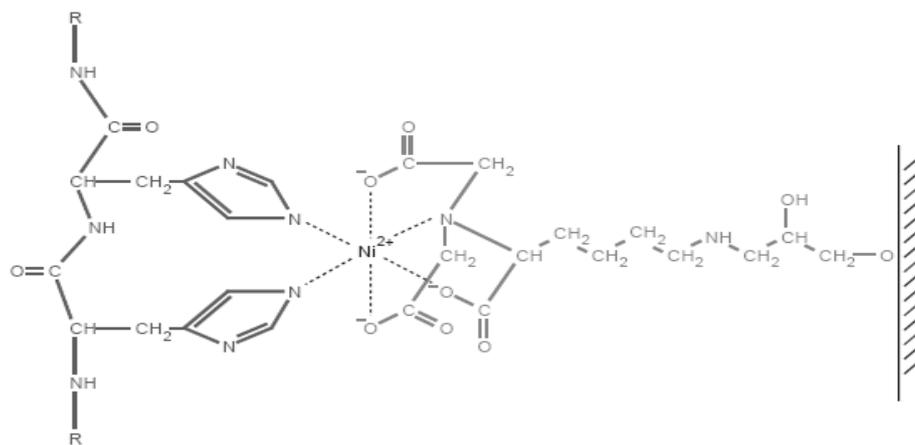
#### **3.5.1- CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE**

As proteínas recombinantes produzidas pelo sistema pET-32 EK/LIC possuem uma sequência de 6 histidinas (His) originadas do vetor de superexpressão que é inserida na posição C ou N-terminal da proteína de interesse. A etiqueta de His é pequena, não imunogênica e em pH= 8,0 não possui carga e, portanto, geralmente não afeta a secreção, compartimentalização ou enovelamento da proteína. As histidinas representam um marcador de afinidade que facilita a ligação com a coluna de Ni-NTA (Figura 5 e 6) e a sua vantagem é que a sequência de His torna a proteína imóvel em superfície metalquelante. Para a purificação empregando a cromatografia de afinidade, 5 ml da resina NI-NTA Agarose (Quiagen) foi lavada com 20 ml imidazol 50 mM para que as proteínas sem a cauda de histidina fossem eliminadas. Em seguida, a eluição do material retido foi feita empregando um gradiente de imidazol de 100-250 mM. O fluxo usado nesta cromatografia foi de 1 ml/min e foram coletados 32 frações de 2 ml. A eluição foi acompanhada por dosagem de proteínas no material eluído com o reagente Bradford. Para tanto 50  $\mu$ l de cada um dos 32 tubos foi incubada com 50  $\mu$ l de Bradford por 30 min ao abrigo da luz. O pico retido foi coletado e submetido à diálise em 2l de água por 3 dias com trocas periódicas de água 3 vezes ao dia. Após a diálise a amostra foi liofilizada e submetida a uma clivagem enzimática com endoproteinase enteroquinase (EK) a fim de separar a cauda de histidina da Ric c 1r. As amostras liofilizadas foram ressuspensas em tampão de

clivagem (Tris-HCl pH 8,0 5mM, NaCl 22,2 mM, Twen 20 0,1% e  $\text{CaCl}_2$  1mM) e então foi retirada uma alíquota imediatamente antes da adição de 0,02u/ $\mu\text{l}$  da EK, para servir de controle da clivagem. Estas amostras foram incubadas a 22 °C por 16 h sob leve agitação. Após a clivagem a amostra foi novamente submetida à cromatografia de afinidade, porém o pico de interesse agora seria o não retido (eluído com 50 mM de imidazol). As proteínas remanescentes, com afinidade ao Ni, foram eluidas com 20 mL da solução de imidazol 500 mM. A amostra coletada foi novamente dialisada e liofilizada nas mesmas condições descritas acima.



**Figura 10:** Esquema das etapas da cromatografia de afinidade em coluna de Ni-NTA, para purificação de proteínas contendo cauda de histidina.



**Figura 11: Esquema representando a interação entre a cauda de histidinas consecutivas de proteínas recombinantes produzidas pelo vetor pET-32 Ek/LIC ao Ni da coluna de Ni-NTA agarose.**

### 3.5.2 CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA

Como segunda estratégia, Para aperfeiçoar o processo de purificação de Ric c 1r foi realizada cromatografia de fase reversa em sistema HPLC em coluna  $\mu$ PPC C2/C18 ST 4.6/100. Inicialmente, amostras de Ric c 1 (não recombinante), isoladas como descrito no item 3.2 foram utilizadas para padronização da coluna. Os eluentes empregados foram a solução A: 2% de acetonitrila (ACN) contendo 0,1 % de ácido trifluor acético (TFA) e a solução B: ACN 80% contendo TFA 0,1%. O gradiente de eluição foi de 0 a 100% de solução B em 50 minutos e o fluxo foi de 0,7ml/min. Após a determinação do tempo de retenção de Ric c 1 (utilizando amostra padrão conhecida), 500 $\mu$ l do extrato total da indução foi submetido ao proceso cromatográfico e o fracionamento foi acompanhado por leituras de absorvância a 220 nm empregando um detector de feixe de iodios (Diodo array entre 200 a 300 nm).

O material resultante da indução contém a cauda de histidina e, portanto, deveria eluir com tempo de retenção diferente daquele isolado diretamente da semente. Foi feito um acompanhamento dos espectros de absorção dos picos obtidos e todos os picos protéicos foram coletados e analisados por SDS-PAGE. O pico majoritário foi coletado, concentrado por liofilização e submetido à clivagem enzimática com endoproteinase EK. Após a clivagem, 500 $\mu$ L deste hidrolisado foram novamente aplicados à coluna C2/C18 de fase reversa e o pico com o tempo de retenção correspondente ao do padrão de Ric c 1, foi coletado e liofilizado.

### **3.6-CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO RECOMBINANTE**

Para comprovarmos que a fração superexpressa que apresenta 29 kDa era a proteína de interesse deste trabalho, a Ric c 1r, foram realizadas análises diferentes para cada técnica de purificação aplicada. Como explanado acima, para este trabalho foram utilizadas duas técnicas de purificação da fração recombinante. A primeira técnica trata-se de cromatografia de afinidade em comuna de Ni-NAT e para analisar a fração recombinante desta técnica foram realizadas eletroforese em gel de acrilamida 15% e *Western Blotting* com anticorpo policlonal anti-albumina 2s. Já a segunda técnica de purificação, por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC com coluna C2/C18 foi realizado eletroforese em gel de acrilamida 15% e sequenciamento da região N-terminal da proteína superexpressa.

#### **3.6.1- AVALIAÇÃO DA HOMOGENEIDADE, DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR E IMUNODETECÇÃO**

Para analisar a fração recombinante superexpressa foi realizado eletroforese em gel de acrilamida SDS-PAGE 15% contendo 5 poços, conforme descrito por Laemmli (1970). A corrida foi realizada a 120 V e 400 mA. Para estabelecer um parâmetro comparativo foi aplicado ao gel uma alíquota de cada passo do processo de purificação. Dessa forma, o SDS-PAGE do processo de purificação por cromatografia de afinidade seguiu de seguinte modo: no primeiro poço foi aplicado 15µl do total da indução, ou seja o extrato total do lisado bacteriano, antes do processo de purificação, contendo tanto a proteína superexpressa quanto todas as proteínas da *E. coli*; no segundo poço foi aplicado 15µl de da fração coletada na cromatografia de afinidade eluída com 50 mM de imidazol (fração onde possivelmente estaria Ric c 1r ainda com a cauda de His); no terceiro poço 15µl da fração superexpressa recombinante (possivelmente Ric c 1r) pós clivagem enzimática com EK, e conseqüentemente livre da cauda de His; no quarto poço uma fração de albumina 2S (Ric c 1 + Ric c 3) de mamona, para comparar o peso molecular (12 kDa). Já o SDS-PAGE realizado para a purificação por cromatografia de fase reversa seguiu do seguinte modo: no primeiro poço o total da indução; no segundo poço a proteína recombinante superexpressa antes da clivagem enzimática (pico em 33 minutos); no terceiro

poço a proteína recombinante pós clivagem enzimática (pico em 26 min); no quarto poço albumina 2S (Ric c 1 + Ric c 3) de mamona.

Para confirmar a presença de Ric c 1r na primeira estratégia de purificação (cromatografia de afinidade), foi realizado um *Western Blotting* (Towben *et al.*, 1979). Inicialmente foi realizado um SDS-PAGE como descrito anteriormente e o mesmo foi transferido para uma membrana de nitrocelulose, a transferência foi realizada em sistema semi-seco em um “sanduiche” de papel de filtro embebido em tampão de transferência (Tris 20mM, glicina 145mM e metanol 20%) sob uma corrente de 1mA para cada cm<sup>3</sup> da membrana, por 2 h. Após a transferência a membrana foi embebida em tampão bloqueador (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M, NaCl 0,15 M e leite em pó desnatado 2%) por um período de 1 h. Posteriormente foi diluído no tampão bloqueador o anticorpo primário policlonal anti-albumina 2S de mamona gerado em coelho e incubado por 18 h a 4 °C. Em seguida a membrana foi lavada 10 vezes em PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M, NaCl 0,15 M), cada lavagem com duração de 5 min. Após foi encubado o anticorpo secundário anti-coelho conjugado a peroxidase diluído no tampão bloqueador.

### **3.6.2- DETERMINAÇÃO DA SEQUENCIA N-TERMINAL PARCIAL**

Foi realizado o sequenciamento da sequência N-terminal parcial de Ric c 1r após a clivagem enzimática com EK, purificada pela segunda estratégia de purificação (cromatografia de fase reversa). O sequenciamento foi realizado segundo a metodologia de Edman, a qual compreende ciclos de reação com 3 etapas: 1) Reação da proteína com PITC (Fenilisotiocianato), que se acopla ao grupo amino NH<sub>2</sub> livre do aminoácido 1; 2) Hidrólise ácida da proteína conjugada com PITC libera a feniltiohidantoína (PTH) do aminoácido 1 e o restante da proteína, tornando o aminoácido 2 o novo resíduo N-terminal e 3) Análise cromatográfica do PTH-aminoácido, e novo ciclo de reação com o novo N-terminal da proteína.

### **3.7- AVALIAÇÃO DA ALERGENICIDADE DA Ric 1 e Ric c 1r**

Para avaliação se Ric c 1r mantém sua atividade biológica após seu processo de produção recombinante, foi usado ensaios de degranulação de mastócitos obtidos de lavado peritoneal de rato. Este procedimento foi comparado com Ric c 1 obtida da semente de *R. communis*.

### **3.7.1-OBTENÇÃO DOS MASTÓCITOS DE RATO**

Ratos Wistar (não imunizados), de aproximadamente 250 g foram utilizados como fonte de mastócitos. Os ratos foram sacrificados por asfixia em CO<sub>2</sub> e a cavidade peritoneal foi lavada com 20 mL de DMEM contendo 12 u/ml de heparina. O lavado foi retirado do peritônio do animal (15 ml), e colocado em placa de Petri por 30 min a 37 °C para separação dos mastócitos dos macrófagos. Após este período, 2/3 do meio de cultura presente na placa de Petri foi retirado cuidadosamente e descartado. O líquido remanescente contendo os mastócitos foi dividido em alíquotas de 100 µl.

### **3.7.2- ENSAIO DE DESGRANULAÇÃO**

Alíquotas de 100 µl da preparação enriquecida em mastócitos foram incubadas com 1 µl de soro total anti-albumina 2S de mamona e 10 µl da amostra (Ric c 1r) na concentração final de 10 µg/ml foi incubada durante 1 h a 37 °C. Nos controles de ativação inespecífica, o soro foi omitido do ensaio.

Para avaliação da degranulação, uma alíquota de 10 µL foi retirada do meio e utilizada para contagem de mastócitos por microscopia ótica.

### **3.7.3- AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DE DESGRANULAÇÃO POR MICROSCOPIA ÓTICA**

A contagem diferencial das células íntegras e coradas foi realizada em câmara de Neubauer, nos quatro quadrantes, através da observação em microscópio óptico Zeiss Axioplan. A suspensão de células incubadas com Ric c 1r (5 µl), foi misturada com 5 µL de solução aquosa contendo azul de toluidina 0,1 %, formaldeído 10 % e ácido acético 1%, pH 2,8 para evidenciar a degranulação. Como controle negativo de sensibilização induzida, mastócitos sem tratamento prévio foram incubados com o corante nas mesmas condições citadas acima e foram observados em microscópio ótico para contagem das células íntegras e desgranuladas.

### **3.8.-DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE $\alpha$ -AMILÁSICA PELA Ric c 1r**

#### **3.8.1- OBTENÇÃO DAS $\alpha$ -AMILASES**

As larvas do besouro *Callosobruchus maculatus* foram dissecadas e seus intestinos, juntamente com o conteúdo luminal, extraídos. Os intestinos dos insetos foram macerados em salina e submetidos à centrifugação por 10 min a 12.000 x g a 25°C , e o sobrenadante contendo a  $\alpha$ -amilase foi reservado para as análises posteriores. A  $\alpha$ -amilase salivar humana foi obtida da Sigma. Para quantificação protéica de cada uma das amostras foi utilizada a metodologia de Bradford (1976).

#### **3.8.2- ENSAIOS DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA $\alpha$ -AMILASE SALIVAR HUMANA E INTESTINAL DO BESOURO *C. maculatus***

Ric c 1r na concentração de 4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  foi dissolvida em água ultra pura e incubada com 10  $\mu\text{l}$  de cada  $\alpha$ -amilase (salivar humana e intestinal de *C. maculatus*) e a mistura foi incubada em banho-maria a 37 °C por 15 min. Após este período foram adicionados 25  $\mu\text{L}$  de solução de amido 1 % e novamente as amostras foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 15 min ( $\alpha$ -amilase salivar) e por 30 min ( $\alpha$ -amilase intestinal). As amostras foram retiradas do banho e após o resfriamento foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  de 3,5 ácido dinitrossalicílico (DNS). O material foi então fervido por 5 min e 400  $\mu\text{L}$  de água foi adicionada a cada amostra. A hidrólise do substrato pela enzima foi determinada após leitura da absorvância a 540 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata. Uma unidade de  $\alpha$ -amilase foi definida como uma variação de 0,1 de ABS a 540 nm por 30 min de reação (Franco *et al.*,2000).

### **3.9- SINTESE DE Ric c 1r CONTENDO MUTAÇÕES**

As mutações em Ric c 1r, constituíram da troca de alguns resíduos de ácido glutâmico por resíduos de leucina. O gene sintético foi desenhado pela ferramenta GeneArt (Invitrogen). As mutações foram realizadas nos epitopos alergênicos como sugerido por modelagem molecular descrita por Nascimento (2009), onde apenas um dos dois resíduos de ácido glutâmico presente em cada epitopo envolvidos no processo alergênico seja alterado, e não alterando nenhum resíduo que esteja envolvido na inibição contra  $\alpha$ -amilase (Figura 12) (Nascimento

*et al.*, 2009). O gene sintético foi encomendado e sua síntese sequenciamento e clonagem no vetor de clonagem pMA foi um procedimento realizado pela Invitroge) (Figura 13). O vetor pMA contendo o gene sintético foi utilizado para transformar uma cepa de clonagem XL-10 a qual foi escolhida por ser uma cepa ultracompetente. O procedimento de transformação foi seguido como descrito anteriormente. O vetor pMA foi utilizado como molde para uma PCR afim de amplificar o gene mutante contendo as regiões necessárias para se ligar ao vetor de expressão pET e posteriormente foi realizada a transformação de uma cepa de expressão *Rosetta gami* como descrito anteriormente. Todos os processos de indução seguiram os protocolos já descritos ao longo deste trabalho

**A****Ric c 1 Natural e sua sequência gênica**

P S Q Q G C R G Q I Q **E** Q Q N L R Q C Q <sup>+</sup>**E** Y I K Q Q V S G Q  
 G P R R S D N Q E R S L R G C C D H L K Q M Q S Q C R C **E** G  
 L R Q A I **E** Q Q Q S Q G Q L Q G Q D V F E A F R T A A N L P  
 S M C G V S P T E C R F

5' CCAAGCCAGCAGGGGTGTCGTGGGCAGATTCAA**GAG**CAACAAAATCTCAGGCAATGCCAG**GAG**TATAT  
CAAAACAACAAGTTTCCGGACAGGGACCAAGAAGAAGTGACAATCAAGAACGGTCTCTTCGTGGGTGCTGTGAC  
 CATCTCAAGCAGATGCAGTCACAGTGCAGATGC**GAG**GGTCTGAGGCAGGCTATT**GAG**CAGCAACAGAGCC  
AGGGGCAACTTCAAGGTCAGGATGTTTTTGAGGCTTTCAGGACAGCTGCGAATTTGCCATCAATGTGCGGCGT  
 CTCACCAACCGAATGCCGGTTC3'

**B****Ric c 1 mutante e sua sequência gênica mutante (gene sintético)**

P S Q Q G C R G Q I Q **L** Q Q N L R Q C Q <sup>+</sup>**E** Y I K Q Q V S G Q  
 G P R R S D N Q E R S L R G C C D H L K Q M Q S Q C R C **E** G  
 L R Q A I **L** Q Q Q S Q G Q L Q G Q D V F E A F R T A A N L P  
 S M C G V S P T E C R F

5' CCAAGCCAGCAGGGGTGTCGTGGGCAGATTCAA**TTG**CAACAAAATCTCAGGCAATGCCAG**GAA**TATAT  
CAAAACAACAAGTTTCCGGACAGGGACCAAGAAGAAGTGACAATCAAGAACGGTCTCTTCGTGGGTGCTGTGAC  
 CATCTCAAGCAGATGCAGTCACAGTGCAGATGC**GAG**GGTCTGAGGCAGGCTATT**TTG**CAGCAACAGAGCC  
AGGGGCAACTTCAAGGTCAGGATGTTTTTGAGGCTTTCAGGACAGCTGCGAATTTGCCATCAATGTGCGGCGT  
 CTCACCAACCGAATGCCGGTTC3'

**Figura 12: Sequências proteicas e gênicas comparativas de Ric c 1 e Ric c 1 mutante. A)** Sequência de Ric c 1 e do gene natural sem mutações, destacando em negrito os resíduos de E, que estão dentro dos epitopos alergênicos, e com (+) o resíduo de E que interage com a  $\alpha$ -amilase em seu sítio ativo, inibindo-a. **B)** Sequência de Ric c 1 e do gene sintético destacado em negrito os resíduos mutados de E- L; destacados em negrito e itálico os resíduos de E preservados; destacado com (+) o resíduo de E que não pode ser alterado por está envolvidos na inibição de  $\alpha$ -amilase. Destacado por sublinhação os epitopos alergênicos e caixa cinza os resíduos de ligação preservados.

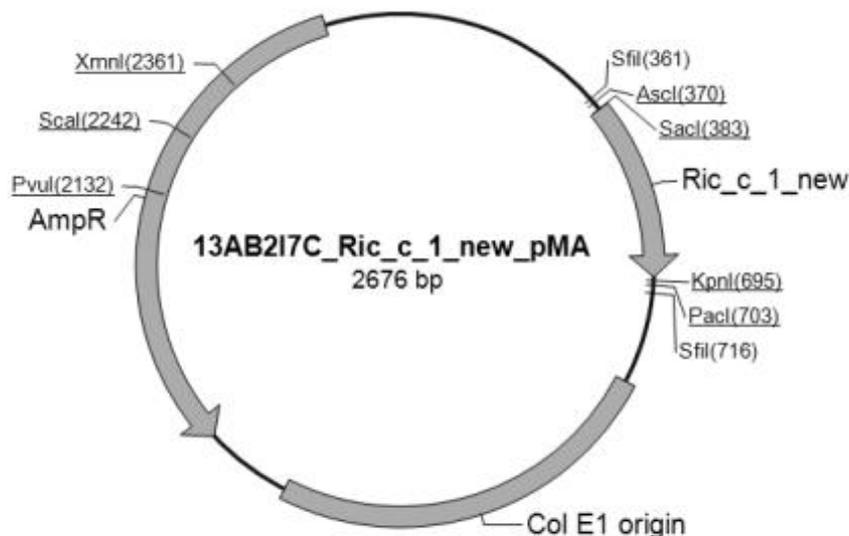


Figura 13: Mapa do vetor pMA fornecido pela Invitrogen.

#### 4- RESULTADOS

##### 4.1- OBTENÇÃO DAS ISOFORMAS DE Ric c 1 ALBUMINAS 2S DE SEMENTES DE MAMONA

A partir do extrato total de proteínas de mamona, as isoformas de albuminas 2S foram inicialmente isoladas por cromatografia de filtração em gel em resina Sephadex-G-50. A Figura 14 mostra o perfil do fracionamento obtido. Três picos foram obtidos e a fração II (tubos 33 a 57) corresponde às albuminas 2S. Esta fração foi submetida a uma cromatografia de fase reversa, uma coluna C2/C18 em sistema HPLC, onde foi possível obter as dois picos majoritários que correspondem às isoformas, Ric c 1 e Ric c 3, (Figura 15).

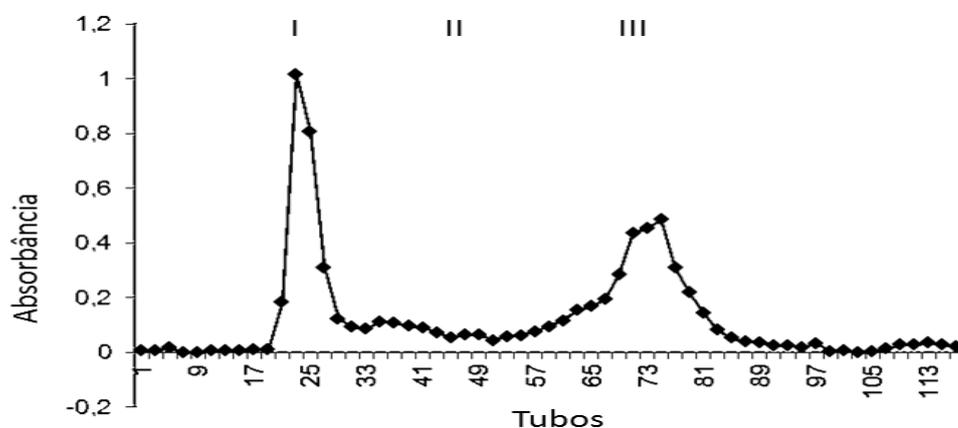
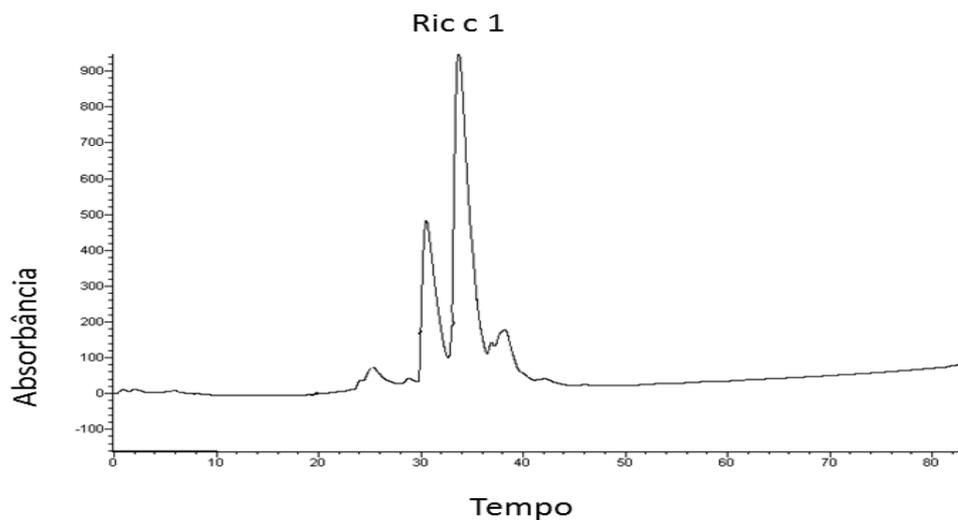


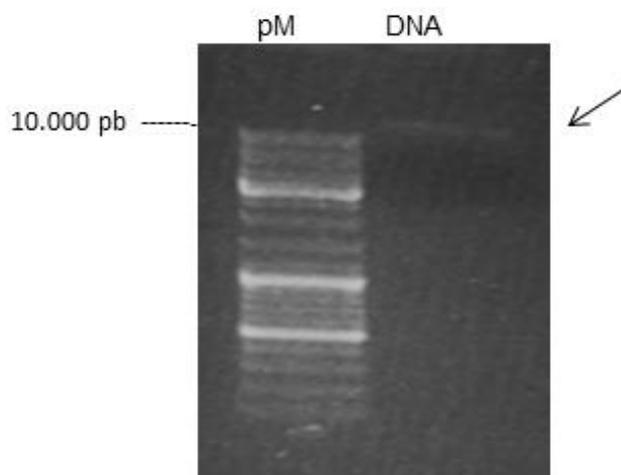
Figura 14: Cromatograma do extrato protéico de *R. communis*, após Sephadex G-50. Dimensões da coluna: Sephadex G-50 50 cm. Volume de extrato aplicado 5ml . Eluente TFA 0,1%; fluxo 0,7 mL/min; volume coletado /tubo 1 mL. I- fração rica em ricina; II- fração rica em albumina 2S e III- fração de baixo peso molecular



**Figura 15: Cromatograma de fase reversa em coluna C2/C18 da fração II da cromatografia de filtração em gel, rica em albumina 2S.** Eluição feita com solução A (ACN 2% em TFA 0,1%) e solução B (ACN 80% contendo 0,1% de TFA). O picos equivalentes a Ric c 1 encontra-se nomeado no gráfico

#### 4.2- EXTRAÇÃO DE DNA

Foi possível realizar a extração de DNA de folhas de *R. communis* utilizando o kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) (Figura 16)

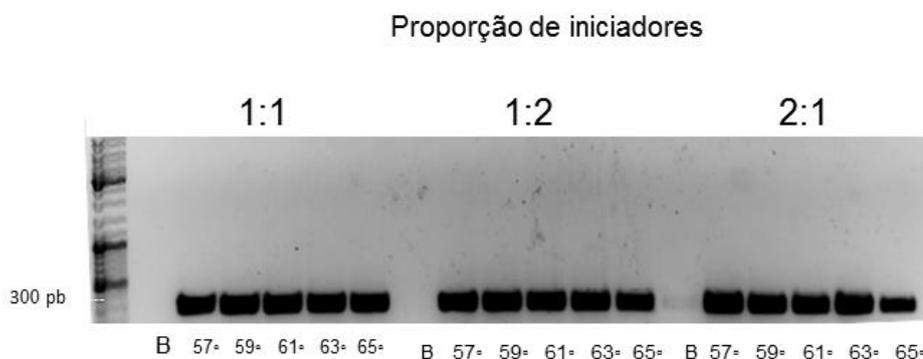


**Figura 16: Visualização eletroforética da extração de DNA de folhas de *R. communis*.** A extração de DNA da folha da mamona foi realizado com o kit “DNeasy Plant Mini Kit”. A seta indica a banda correspondente ao DNA extraído.

#### 4.3- PCR GRADIENTE PARA Ric c1

Para amplificar o gene *Ric c 1* foram realizadas PCRs em gradientes de temperatura e concentração de iniciadores, afim de identificar a melhor condição de amplificação (Figura 17). Em todas as condições ocorreu a amplificação de

uma única banda de aproximadamente 300 pb, com pequena variação na intensidade. A proporção de 1:1 de iniciadores e temperatura de 63 °C foram escolhidas como as melhores condições.

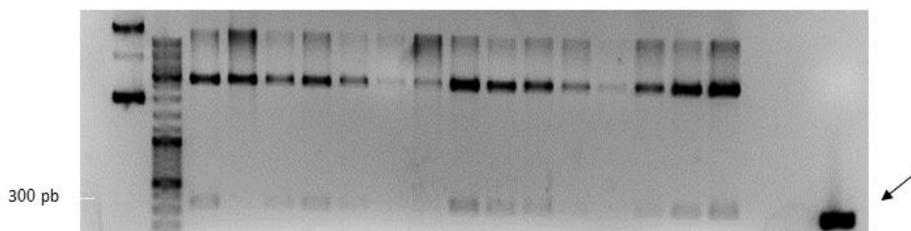


#### Temperatura de anelamento

**Figura 17: Visualização eletroforética das amostras amplificadas por PCR gradiente usando os iniciadores ric1s e ric1as específicos para a o gene *Ric c 1*.** As proporções de iniciadores, assim como as temperaturas de anelamento encontram-se destacadas na imagem; a letra B indica as amostras controles, sem DNA.

#### 4.4- EXTRAÇÃO E DIGESTÃO PLASMIDIAL DE *E. COLI* - JM109 TRANSFORMADA COM O GENE *RIC C 1*

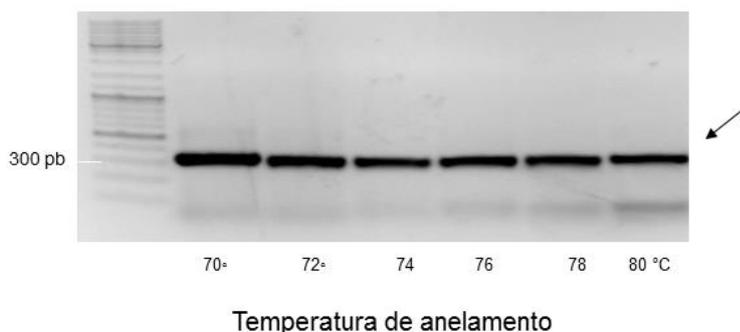
A partir das colônias de *E. coli* JM 109 transformadas com o vetor pJET contendo o gene *Ric c 1* foram extraídos os plasmídeos de 15 colônias. A Figura 12 mostra o perfil eletroforético dos produtos das digestões dos plasmídeos com a enzima *Bgl* II. A digestão dos fragmentos correspondentes ao gene de interesse (300 pb) indica que a inserção do gene *Ric c 1* ocorreu para todos os plasmídeos analisados . O produto da PCR pode também ser observado na última canaleta da figura 12, conforme indicado pela seta. Dessa forma podemos inferir que gene foi clonado no vetor, pois o produto da digestão (sequencia liberada com aproximadamente 300 pb) tem o mesmo tamanho do produto de PCR.



**Figura 18: Visualização eletroforética da digestão dos plasmídeos extraídos das colônias de JM 109 transformada com o vetor pJET contendo o gene *Ric c 1* e digeridos com enzima *Bgl* II.** Na primeira canaleta encontra-se o perfil do plasmídeo sem digerir; na segunda o padrão de peso molecular, seguindo dos 15 plasmídeos digeridos. Houve a liberação de um fragmento de aproximadamente 300 pb em vários plasmídeos. Na última canaleta encontra-se o produto de PCR (seta) para *Ric c 1*.

#### 4.5- PCR PARA CLONAR NO VETOR DE EXPRESSÃO PET-32 EK/LIC

A partir dos plasmídeos extraídos e confirmados, por digestão enzimática, a inserção da região codificante de *Ric c 1*, foi escolhido um plasmídeo aleatoriamente entre os que apresentaram fragmentos de 300 pb para ser o molde de DNA na realização da PCR para a amplificação da região codificante para clonar no vetor pET-32 Ek/LIC. Para tal, foi realizado uma PCR gradiente de temperatura (Figura 19), a fim de buscar a melhor condição de amplificação; a temperatura escolhida foi de 72 °C.

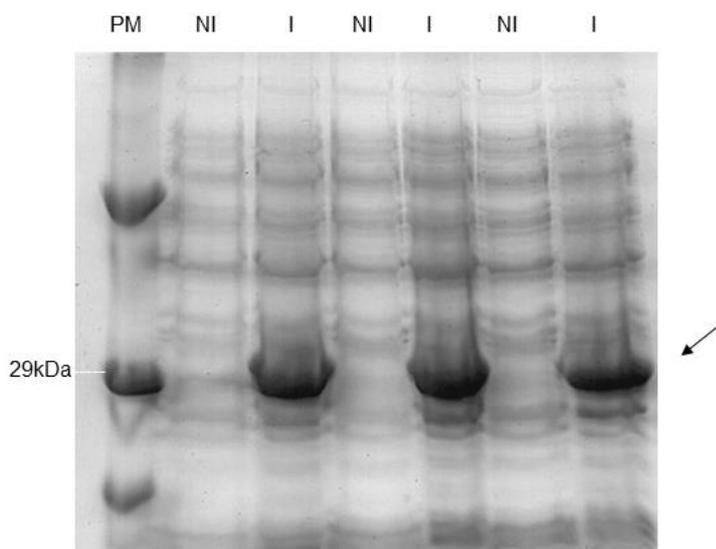


**Figura 19: PCR em gradiente de temperatura requerido como pré-requisito para ligar o fragmento gênico codante para *Ric c 1* ao vetor pET-32 EK/LIC.** As temperaturas de anelamento das amostras encontram-se identificadas.

#### 4.6- PADRONIZAÇÃO DA INDUÇÃO DA SUPEREXPRESSÃO DE *Ric c 1r*

A confirmação da clonagem do vetor pET-32 EK/LIC contendo a região codificante de *Ric c 1* foi feita diretamente testando a indução da expressão da

proteína recombinante Ric c 1r com 1 mM de IPTG (Figura 20). Na análise eletroforética destas amostras é possível observar que as células de *E. coli* Rosetta-gami submetidas a indução (I) apresentam uma banda de aproximadamente 29 kDa que não é visualizada nas células que não foram induzidas (NI)

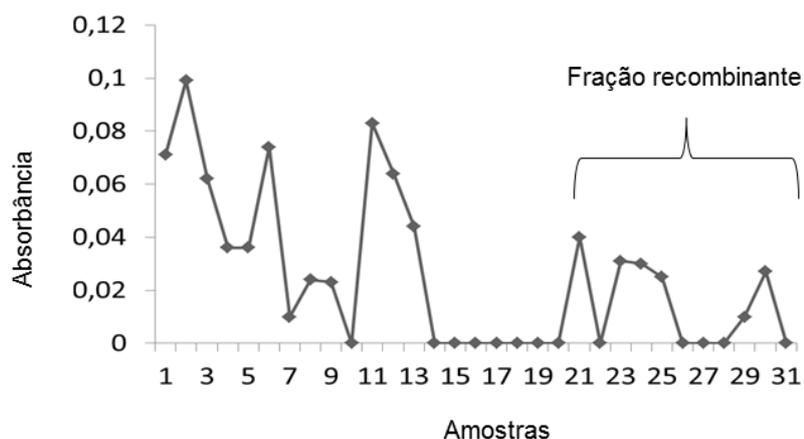


**Figura 20: Visualização eletroforética da indução da expressão da proteína recombinante Ric c 1 com 1 mM de IPTG.** Em I estão representadas as culturas induzidas. Em NI estão representadas as culturas não induzidas. PM representa o padrão de peso molecular. Nas amostras induzidas é possível visualizar uma banda de aproximadamente 29 kDa que não está presente nas amostras não induzidas.

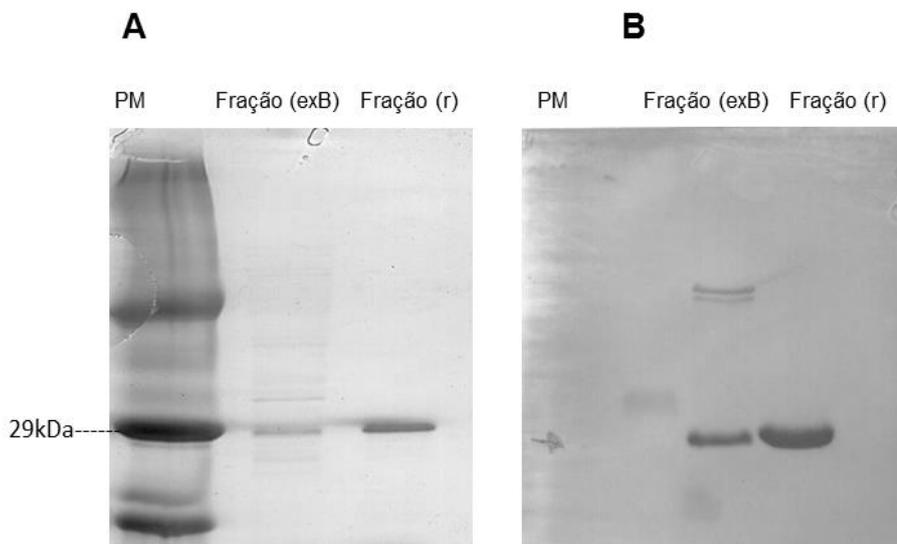
#### 4.7- PURIFICAÇÃO DE Ric c1r POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

O perfil de fracionamento do extrato bruto da indução obtido após cromatografia de afinidade em coluna de Ni-NTA é apresentado na Figura 21. As proteínas ligadas à resina foram eluídas com imidazol 500 mM e o fracionamento foi acompanhado por leitura de absorvância a 220 nm. As frações 20-26 foram coletadas e submetidas ao processo de diálise contra água. Após o processo de diálise para retirada das soluções salinas presentes no tampão de eluição a fração foi concentrada por liofilização e teve sua homogeneidade analisada por SDS-PAGE (Figura 22 A). Para acompanhar o processo de purificação o extrato bruto da indução foi analisado por SDS-PAGE. Para verificar se a proteína expressa e purificada era de fato Ric c 1r foi feito uma análise por *Western Blotting* com anticorpo primário anti- albumina 2S gerado em coelho (Figura 22 B).

Os resultados apresentados na Figura 16 B demonstram que o anticorpo anti-albumina 2S reconheceu a fração recombinante.



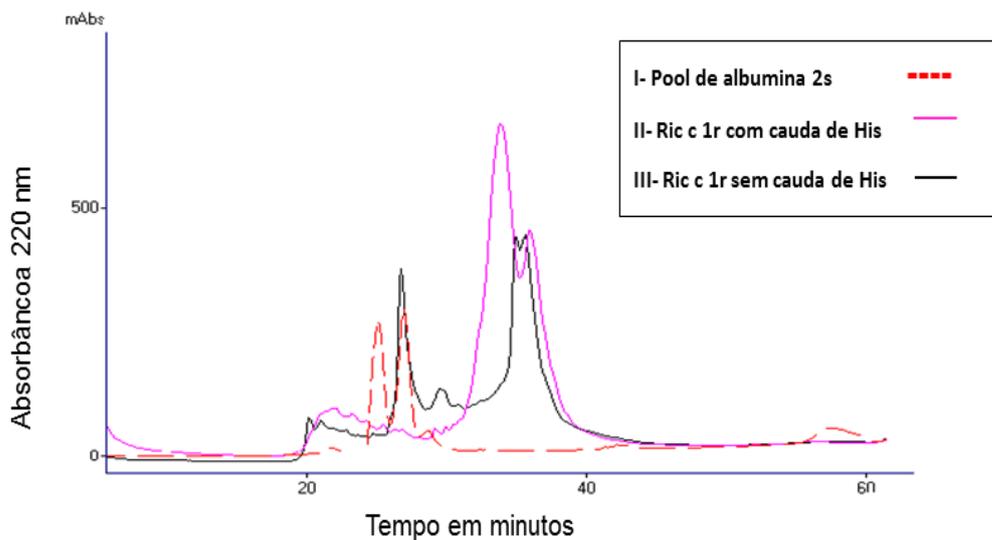
**Figura 21: Cromatográfico do estrato bruto induzido em coluna de afinidade Ni-NTA agarose.** Amostras 1-17 proteínas eluídas com 50 mM de imidazol. Amostras 18-31 proteínas eluídas com 500 mM de imidazol.



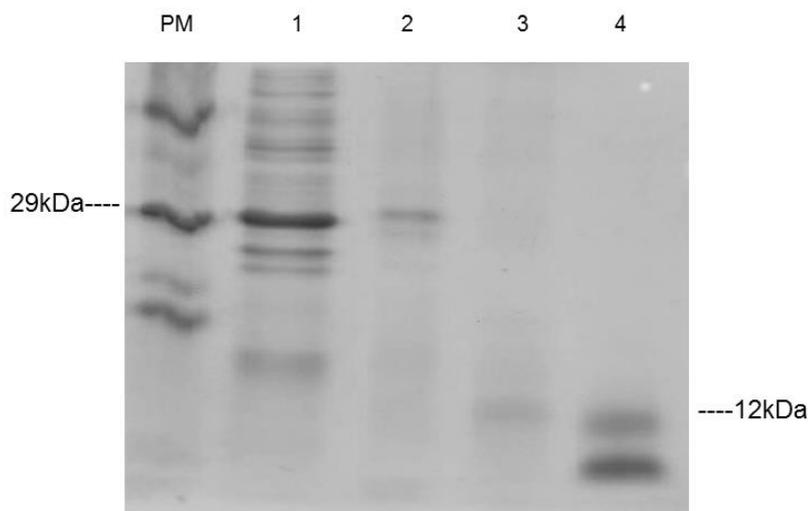
**Figura 22: SDS-PAGE corado com azul de comassie e Western Blotting da purificação de Ric c 1r por cromatografia de afinidade em coluna NI-NTA.** PM indica o padrão de peso molecular; Fração (exB) indica o extrato bacteriano obtido após a cromatografia de afinidade em coluna de Ni-NTA agarose; Fração (r) indica a fração recombinante originada pós indução obtida após purificação na coluna de NI-NAT. A) SDS-PAGE 12,5 % 20µl/raia. B) Western Blotting utilizando anticorpo primário anti- albumina 2S produzido em coelho.

#### **4.8- PURIFICAÇÃO DE Ric c 1r POR CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA**

Uma segunda metodologia para a purificação da fração recombinante, empregando a cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 em sistema HPLC foi utilizada. A padronização da coluna, empregando Ric c 1 e Ric c 3 isoladas de semente é apresentada na Figura 23. O tempo de retenção (TR) de Ric c 1 é 26 min (Figura 17, traçado vermelho); o perfil de eluição do extrato bruto de indução está também apresentado na Figura 23, no traçado em rosa, onde as proteínas bacterianas nativas foram eluídas entre 20 e 30 minutos, nesta mesma amostra (traçado rosa) foram observados dois picos majoritários, TR 33 e 36 minutos o que representam um contaminante bacteriano e a fração recombinante respectivamente. A fração recombinante (com cauda de Histidina) com o tempo de retenção de 36 minutos foi coletada e submetida à clivagem com EK. Após a clivagem enzimática para a liberação das caudas, esta amostra foi novamente aplicada na coluna e pode-se observar que a fração recombinante livre das caudas teve o mesmo tempo de retenção do padrão, Ric c 1 aplicado anteriormente (perfil de eluição preto) (Figura 23). A homogeneidade das frações foi investigada por SDS- PAGE e os resultados são apresentados na Figura 24,). A confirmação de que a proteína purificada era Ric c 1r foi feita por sequenciamento da proteína após clivagem usando a metodologia de Edman. Pode ser observado na comparação da sequências que os 15 resíduos da sequência N-terminal-parcial de Ric c 1r são idênticos ao de Ric c 1. A única exceção é a metionina que Ric c 1r possui, sendo este inserido como um requerimento para a clonagem no vetor pET-32 EK/LIC (Figura 25).



**Figura 23: Sobreposição dos cromatogramas de fase reversa em colunas C2/C8 em sistema HPLC.** Traçado vermelho: Ric c 1 e Ric c 3; traçado rosa: Ric c 1r antes da clivagem enzimática (com cauda de Histidina); traçado preto: fração recombinante após clivagem (sem cauda de Histidina)



**Figura 24: Visualização eletroforética dos picos obtidos da cromatografia de fase reversa em gel de poliacrilamida.** PM: padrão de peso molecular; 1) extrato bruto da indução aplicado à coluna C2/C18; 2) Fração recombinante com cauda de histidina referente ao pico coletado em 36 min com 29 kDa; 3) Fração recombinante sem cauda de histidina referente ao pico coletado em 26 min com 12 kDa. 4) albuminas 2S referentes aos picos de 24 e 26 min

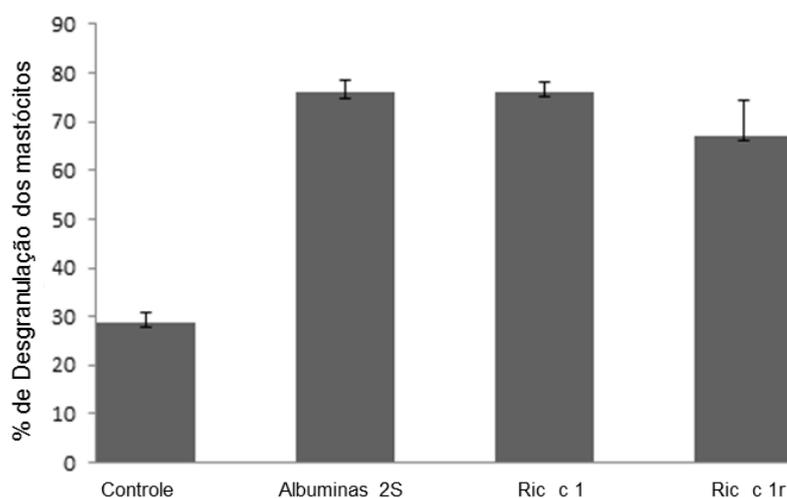
Ric c 1 r	1	M	P	S	Q	Q	G	C	R	G	Q	I	Q	E	Q	Q	N	16
Ric c 1	1	-	P	S	Q	Q	G	C	R	G	Q	I	Q	E	Q	Q	N	15

**Figura 25: Comparação da sequência N-terminal parcial de Ric c 1r, obtida por degradação de Edman da proteína superexpressa e purificada com Ric c 1, obtida do NCBI. O números que flanqueiam as seqüências indicam a posição dos aminoácidos a partir do resíduo N-terminal.**

#### 4.9-AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALERGÊNICA DE Ric c 1r RECOMBINANTE

Para verificarmos que a Ric c 1r tinha a sua atividade biológica preservada após o processo de produção recombinante, foram realizados testes alergênicos e de inibição da atividade de  $\alpha$ -amilase.

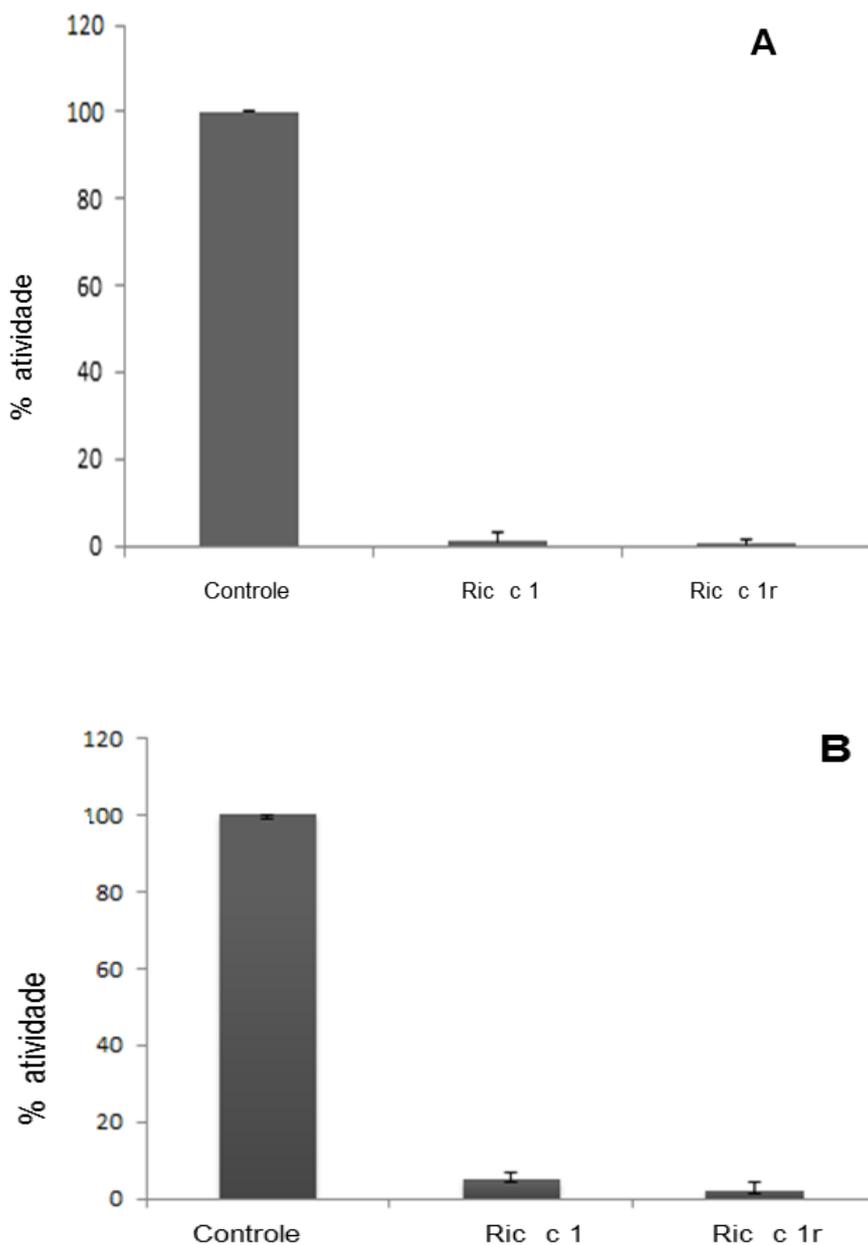
Inicialmente foi comparado o potencial de degranulação de mastócitos, tanto de Ric c 1 quanto de Ric c 1r, assim como foi feito um controle da reação na ausência do alérgeno (Figura 26). A partir deste ensaio foi possível observar que a Ric c 1r manteve potencial alergênico similar à Ric c 1 obtida da semente.



**Figura 26: Ensaio de desgranulação de mastócitos. I: controle negativo (mastócitos sem alérgenos; II: pool de albumina 2S (Ric c 1 e Ric c 3); III: Ric c 1 natural; IV: Ric c 1r**

#### 4.10- ENSAIO DE INIBIÇÃO CONTRA $\alpha$ -AMILASE PELA RIC C 1r

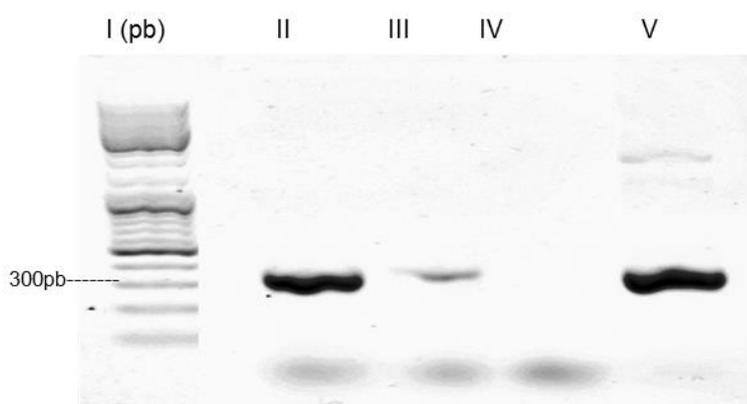
A ação inibitória da Ric c 1r contra a atividade da enzima  $\alpha$ -amilase foi analisada, a fim de verificar se a mesma mantinha essa importante função de defesa para a planta assim como a proteína natural. Foram analisados os potenciais de inibição contra  $\alpha$ -amilase salivar humana (Figura 27 A) e do intestino de *C. maculatus* (Figura 27 B).



**Figura 27: Ensaio de inibição da Ric c 1r contra atividade de  $\alpha$ -amilase. A)**  $\alpha$ -amilase salivar humana; **B)**  $\alpha$ -amilase intestinal de *C. maculatus*. Controle: reação sem inibidor; Ric c 1: reação com o inibidor natural obtido de semente de mamona; Ric c 1r: reação na presença de Ric c 1r gerado em um sistema bacteriano.

#### 4.11- PCR PARA CLONAR Ric c 1 RECOMBINANTE MUTADA (Ric c 1rm) NO VETOR DE EXPRESSÃO pET-32 EK/LIC

Foram realizadas mutações específicas, a fim de trocar resíduos envolvidos no processo alergênico por resíduos que não teriam esse potencial (Figura 12 item 3.9), para tanto foi encomendado genes sintéticos de Ric c 1, onde continham a troca dos resíduos de interesse. Após a obtenção dos genes sintéticos, foi necessário clona-lo no vetos de expressão pET-32 Ek/LIC, logo primeiramente foi realizado amplificação por PCR do gene sintético (Ric c 1rm) contendo as mutações . Para a PCR foi utilizado os iniciadores pETs e pETas (Figura 9) a reação obedeceu as condições já padronizadas anteriormente (item 3.4.1).

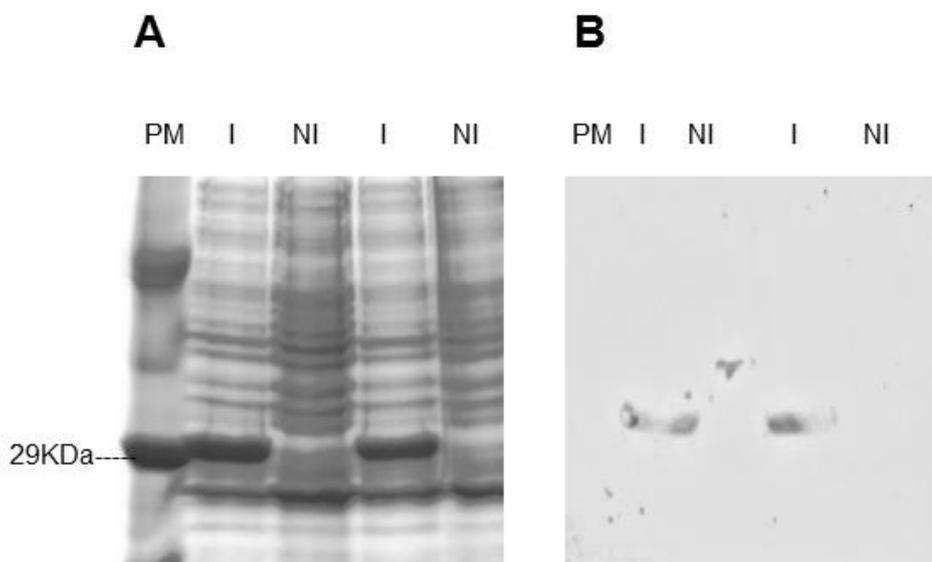


**Figura 28: Visualização eletroforética do produto da PRC feito com os iniciadores específicos para ligar Ric c 1rm ao vetor pET-32 EK/LIC. I: padrão de pares de base; II III, IV,V: repetição da reação de PCR.**

#### 4.12- INDUÇÃO DA SUPEREXPRESSÃO DE RIC C 1rm

O fragmento gênico codificante de Ric c 1m, amplificado com as sequencias necessárias para ligar ao pET-32 EK/LIC, foi ligado a este vetor e o mesmo usado para transformar *E. coli Rosetta-gami*. Foi realizada a indução da expressão da Ric c 1 m contendo as mutações específicas com 1 mM de IPTG. Sendo possível observar que as células de *E. coli Rosetta-gami* submetidas a indução (I) expressaram um perfil proteico com uma banda de aproximadamente 29 KDa não visualizada nas células que não foram induzidas (NI) (Figura 29 A). A

confirmação de que a proteína superexpressa se trata de Ric c 1rm, foi feita por *western blotting* com anticorpo primário anti-albumina 2S gerado em coelho (Figura 29 B).



**Figura 29: Visualização eletroforética das amostras induzidas e não induzidas de Ric c 1rm e da membrana de *Western Blotting* contendo as mesmas amostras visualizadas no gel. (A) Indução da expressão da proteína recombinante mutante (Ric c 1rm) com 1 mM de IPTG. (B) *Western Blotting* tendo como espelho o SDS-PAGE da indução. Em I estão representadas as culturas induzidas. Em NI estão representadas as culturas não induzidas. PM representa o padrão de peso molecular.**

## 5- DISCUSSÃO

A proposta deste trabalho foi fundamentada em uma linha de estudos envolvendo as isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3 de *R. communis*, os principais alérgenos dessa planta. Em 2008 Félix e colaboradores descobriram qual seria a sequência de aminoácidos, ou seja, os epitopos alergênicos que estariam envolvidos no processo da alergia. A partir destas análises, Oliveira e colaboradores em 2008 comprovaram que os resíduos de aminoácidos ácidos, especificamente ácidos glutâmicos, estão diretamente envolvidos na interação do epitopo alergênico e a IgE, imunoglobulina presente na membrana dos mastócitos e basófilos (Deus- de Oliveira *et al.*, 2011). Sabendo quais os resíduos específicos de aminoácidos que estariam envolvidos na resposta alergênica, Nascimento em 2009 propôs, por modelagem molecular, mutações teóricas, onde seriam substituídos os resíduos “alergênicos” por resíduos de aminoácidos que não fossem capaz de interagir com a IgE. Foi proposto então a troca de resíduos de ácido glutâmicos por resíduos de leucinas, por apresentarem volume molecular similares. Por outro lado, os resíduos de Leucina não possuem o grupamento carboxílico e, portanto, não teriam a capacidade de se ligar à IgE. O propósito do presente trabalho foi validar o modelo proposto por Nascimento e colaboradores em 2009. Para tanto inicialmente buscamos um sistema viável de superexpressão da proteína Ric c 1 de forma que ficasse preservada suas atividades biológicas (de atuar como alérgeno e de inibir  $\alpha$ -amilases), para então, a partir desse sistema confiável, propor a produção da mesma proteína só que mutada em resíduos de ácidos glutâmicos específicos. O modelo escolhido para iniciar este trabalho foi a isoforma Ric c 1 pois esta apresenta apenas 2 epitopos alergênicos e, portanto, dois resíduos de ácidos glutâmicos a serem trocados. Sendo Ric c 1 e Ric c 3 proteínas homólogas, o modelo desenvolvido para mutações em Ric c 1 poderia, em princípio, ser aplicado para Ric c 3. Trabalhos de super-expressão de Ric c 3 em um sistema bacteriano realizados por Fernandez e colaboradores em 2002 deram suporte aos nossos estudos, conforme descrito a seguir.

Para iniciar o trabalho, foi necessária a extração de DNA da folha da *R. communis*. Foi possível utilizar DNA tendo em vista que a região genômica de interesse referente a Ric c 1 não possui introns, não sendo necessário assim, a extração de RNA da semente, seguindo da realização de RT-PCR. esta abordagem seria mais elaborada e temporalmente desvantajosa. A partir do DNA

extraído da folha de mamona foi então realizado um PCR a fim de amplificar a região genômica correspondente a Ric c 1. Este gene foi clonado em um vetor de clonagem, o plasmídeo pJET, e utilizado para transformar um cepa de *E. coli* JM109 para a sua replicação e manutenção em um sistema biológico. Este sistema permite a multiplicação da sequência gênica clonada de forma melhor conservada do que pela técnica de PRC, já que a bactéria possui um sistema de reparo que permite corrigir mutações inseridas. O plasmídeo foi então extraído do sistema bacteriano e submetido a novo PRC, desta vez com a finalidade de inserir a região codificante de Ric c 1 uma sequência de nucleotídeos necessária para a ligação ao vetor de expressão, O vetor escolhido para esta etapa foi o pET-32 EK/LIC. A produção de proteínas recombinantes em bactérias às vezes é dificultada devido à insolubilidade e não formação de pontes dissulfeto na proteína recém sintetizada. Estes problemas geralmente levam à formação de agregados protéicos chamados de corpos de inclusão e também faz com que a proteína recombinante não apresente a atividade biológica da proteína naturalmente expressa. Outro problema apresentado é o uso de códons específicos em bactérias para alguns RNA transportadores que têm como efeito a não transcrição do RNA da proteína recombinante ou sua terminação prematura (Gräslund *et al.*, 2008). Para resolver estes problemas foi escolhido um sistema composto pelo vetor pET-32 EK/LIC que insere, na proteína recombinante, a tireoredoxina (Trx) que ajuda na solubilidade da proteína recombinante e contribuiu para a formação de pontes dissulfeto nas proteínas, no citoplasma. Estas alterações já mostraram ser eficientes em sistema bacteriano para produção de proteínas recombinantes (Baca *et al.*, 2000, Derman *et al.*, 1993, e por Souza *et al.*, 2013).

A princípio a técnica utilizada para a purificação da proteína recombinante foi por cromatografia de afinidade ao íon metálico Ni, em coluna de Ni-NTA. Porém apesar da técnica ser uma das mais aplicadas em trabalhos da área (Crowe *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 2014), nos nossos experimento ela apresentou um baixo rendimento de recuperação da proteína. Buscando métodos alternativos, empregamos a cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 em sistema HPLC. Para tanto foi necessário verificar o perfil cromatográfico da Ric c 1, observando principalmente o tempo de retenção, em seguida aplicada a amostra referente à Ric c1r, ainda contendo a cauda de histidina. Esta por sua

vez apresentou um tempo de retenção tardio quando comparado à Ric c 1; um perfil esperado já que a presença das caudas de tioredoxina e histidina inseridas à Ric c 1r pelo vetor pET muda a hidrofobicidade desta. Após a clivagem enzimática foi possível visualizar um pico com tempo de retenção de Ric c 1r igual ao da Ric c 1 (Figura 24). Assim, esta técnica, com um rendimento maior, passou a ser utilizada para os experimentos posteriores. Adicionalmente a quantificação da Ric c 1r pôde ser realizada a cada corrida cromatográfica, utilizando Ric c 1 como um padrão externo, sem a necessidade de utilizar técnicas de quantificação de proteínas destrutivas, como BCA ou Bradford. Após obtermos a proteína recombinante purificada, a mesma foi submetida ao *Western Blotting* e ao sequenciamento da região N-terminal pela metodologia de Edman. A certificação de que a proteína super-expressa era de fato Ric c 1 foi obtida pelo reconhecimento com o anticorpo anti-albumina 2S e por homologia com a proteína Ric c 1. Assim, a proteína isolada foi empregada nos ensaios biológicos de alergenicidade e inibição de  $\alpha$ -amilase.

Um fato importante a ser ressaltado é que naturalmente na planta, tanto Ric c 1 quanto Ric c 3 sofrem processamentos pós-traducionais, onde são liberados os peptídeos de ligação (Figura). Este fato, no entanto, não ocorre em um sistema bacteriano, portanto, como no caso dessas albuminas 2S, as proteínas expressas em sistema bacteriano são sintetizadas em uma única cadeia e não mais em duas cadeias (cadeia leve e cadeia pesada) como na planta. Logo seria necessário investigar se o peptídeo de ligação, mantido neste sistema de expressão, não iria influenciar nas atividades biológicas.

Para avaliarmos a atividade alergênica da Ric c 1r, investigamos a capacidade da mesma em degranular mastócitos. Neste teste foi possível comprovar que o potencial alergênico da Ric c 1r se manteve como o da Ric c 1 (Figura 26). Resultados similares foram obtidos por Bonura *et al.*, 2013. Estes pesquisadores demonstraram que foi possível clonar e superexpressar uma proteína alergênica do pólen de *Parietaria judaica* em *E. coli*. Eles observaram, por *immunoblotting*, usando o soro de pacientes alérgicos (rico em IgE) e anticorpo policlonal anti-IgE que, após o processo de superexpressão, a proteína recombinante manteve seu potencial alergênico (Bonura *et al.*, 2013).

Para analisar a preservação da atividade de defesa, em geral associada ao correto enovelamento da proteína, testes de inibição contra atividade da  $\alpha$ -

amilase salivar humana e do intestino de *C. maculatus* foram realizados. Para ambos os testes foi possível observar que Ric c 1r manteve sua característica inibitória da enzima  $\alpha$ -amilase. Nossos resultados se assemelham com outros trabalhos dispostos na literatura, que confirmam que a super-expressão em sistema bacteriano de inibidores de  $\alpha$ -amilase pode preservar a sua função inibitória (Dias *et al.*, 2005). Resultados similares também foram obtidos por Santos em 2010. Neste caso, uma defensina de *Vigna unguiculata*, expressa no mesmo sistema de expressão heterólogo aplicado no presente estudo manteve a atividade inibitória contra  $\alpha$ -amilase dos besouros *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*.

Uma vez que as condições de superexpressão foram estabelecidas e as atividades biológicas das proteínas isoladas foram confirmadas, iniciamos o processo de obtenção das proteínas modificadas. A realização das mutações se iniciou com o desenho da região gênica codificante de modo sintético o qual, por sua vez, foi desenhado trocando resíduos específicos de ácidos glutâmicos por resíduos de leucina (Figura 12). Dois resíduos de ácidos glutâmicos são característicos dos epitopos alergênicos de Ric c 1, pois são esses resíduos que interagem com as IgEs presentes nos mastócitos sensibilizados (Oliveira *et al.*, 2011). No entanto, foi trocado apenas um resíduo de ácido glutâmico dentro de cada um dos dois epitopos alergênicos de Ric c 1. Era de nosso entendimento que, se trocássemos apenas um resíduo de ácido glutâmico, o outro isolado não teria a capacidade de realizar a reação cruzada com a IgE e, portanto, não dispararia o processo da alergia.

Uma análise importante a ser observada neste processo de mutação da região gênica codificante de Ric c 1 é preservar os resíduos de ácidos glutâmicos que estão envolvidos no sítio de interação com a  $\alpha$ -amilase. Caso estes fossem trocados, possivelmente a proteína perderia sua atividade de defesa, ou seja, a atividade inibitória contra  $\alpha$ -amilase.

A região codificante foi então sintetizada comercialmente e toda etapa de clonagem, transformação, indução e purificação seguiu com já padronizado no modelo Ric c 1r, para desta forma não sofrer qualquer alteração de síntese por mudança em protocolo já estabelecido. A única modificação realizada foi referente à cepa de clonagem, que para Ric c 1rm foi utilizado a cepa XL-10, mais nova, adquirida pelo nosso laboratório, por se tratar de uma cepa ultracompetente. Foi

possível comprovar a super-expressão de Ric c 1rm pela técnica de *Western Blotting* (Figura 29).

A proteína superexpressa está em processo de isolamento. Mas acreditamos que, apoiados nos estudos de modelagem molecular (Nascimento *et al* 2011) e nos resultados de Garmatiuk *et al.*, 2013, possamos obter uma proteína hipoalergênica e com atividade de defesa. Estudos recentes demonstraram que mutações em resíduos de ácidos aspárticos nos alérgenos de *Brassica rapa* contribui para uma redução na ligação cruzada com a IgE, presente na membrana dos mastócitos sensibilizados, diminuindo o potencial alergênico desta proteína (Garmatiuk *et al.*, 2013).

Em síntese, acreditamos que este trabalho apresentou uma opção para estudos de outros alérgenos, que também sofrem processamento intramolecular pós-traducional, passando a ser constituído por duas cadeias polipeptídicas unidas por pontes de enxofre, um processo que ocorre para albuminas 2S de diversas fontes. Por outro lado, a obtenção de uma proteína hipoalergênica abre caminhos para novas abordagens terapêuticas de imunização para indivíduos que sofrem com os processos alérgicos.

## 6- CONCLUSÃO

Com o trabalho realizado podemos concluir que foi possível:

- Clonar e superexpressar Ric c 1, em forma de cadeia única, em um sistema bacteriano;
- Padronizar uma estratégia de purificação e quantificação de Ric c 1r utilizando cromatografia de fase reversa em sistema HPLC;
- Realizar testes de degranulação de mastócitos, demonstrando que Ric c 1r mantém sua característica alergênica, assim como Ric c 1;
- Realizar testes de inibição de  $\alpha$ -amilase salivar humana e intestinal de *C. maculatus*, comprovando que Ric c 1r mantém sua característica de defesa, ou seja, a capacidade de inibir a enzima  $\alpha$ -amilase assim como a Ric c 1;
- Desenhar e sintetizar o fragmento gênico correspondente a Ric c 1r contendo as mutações específicas (Ric c 1rm) visto que a Ric c 1r em sistema bacteriano de expressão mantém sua atividade biológica;
- Clonar e superexpressar Ric c 1rm em cadeia única em sistema bacteriano.

## 7- REFERÊNCIAS

Aboissa óleos vegetais. (2005). Disponível em <<http://www.aboissa.com.br/mamona/index.htm> >

Azevedo, D. M. P., Beltrão, N. E. M., editores técnicos. (2007). O agronegócio da mamona no Brasil. 2ª edição, Embrapa informação tecnológica.

Baca, A.M., Hol, W.G.J. (2000). Overcoming codon bias: a method for high-level overexpression of Plasmodium and other AT-rich parasite genes in *Escherichia coli*. *Int. J. Parasitol.* 30: 113–118.

Barciszewski, J., Szymanski, M., Haertlé, T. (2000). Minireview: analysis of rape seed napin structure and potential roles of the storage protein. *J. Protein Chem.* 19: 249–254.

Beyer, K., Bardina, L., Grishina, G., Sampson, H. A. (2002). Identification of sesame seed allergens by 2-dimensional proteomics and Edman sequencing: seed storage proteins as common food allergens. *J. Allergy Clin. Immun.* 110: 154–159.

Bonura A, Trapani A, Gulino L, Longo V, Valenta R, Asero R, Colombo P. (2013) Cloning, expression in *E. coli* and immunological characterization of Par j 3.0201, a Parietaria pollen profilin variant. *Mol Immunol.* 57: 220-5.:

Breiteneder, H., Mills, E. N. C. (2005). Plant food allergens-structural and functional aspects of allergenicity. *Biotechnol. Adv.* 23: 395–399

Brown, A., Mahajan P., Damerell, C., Gileadi, O., Gräslund S. (2014). Medium-Throughput Production of Recombinant Human Proteins: Protein Production in *E. coli*. *Methods in Molecular Biology.* 1091: 73-94

Crespo, M. C. R. (1999). Papel antifúngico de albuminas 2S e de polipeptídeos de baixo peso molecular de sementes de *Ricinus communis*. Monografia para

obtenção de graduação em Ciências biológicas. Universidade Estadual do Norte Fluminense *Phys.* 87: 255–260.

Crowe J., Dobeli H., Gentz R., Hochuli E., Stiiber D., Henco K. (1994). 6xHis-Ni-NTA Chromatography as a Superior Technique in Recombinant Protein Expression/Purification Methods in Molecular Biology. 31: 371-387

Da Silva, M. C. M., Grossi de Sá, M. F., Chrispeels, M. J., Togawa, R, C. and Neshich, G. (2000). Analysis of structural, physico-chemical parameter in binding of between different  $\alpha$ -amilase and their inhibitors. *Protein Eng.* 13: 167-177.

Derman, A., Prinz, W.A., Belin, D., Beckwith, J., 1993. Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science* 262: 1744–1747.

Deus-de-Oliveira N., Felix P.S., Carrielo-Gama C., Fernandes V.K., DaMatta A. R., Machado L.T.O. (2011) Identification of Critical Amino Acids in the IgE Epitopes of Ric c 1 and Ric c 3 and the Application of Glutamic Acid as an IgE Blocker. *PLoS ONE* 6(6): e21455

Dias, S., Franco, O., Magalhaes, Neto, C. Laumann, R., Figueira, E., Melo, F., Grossi-de-As., M. (2005) Molecular Cloning and Expression of  $\alpha$ -Amylase Inhibitor from Rye with Potential for Controlling Insect Pests. *Protein Journal.* 24: 1572-3887.

Farias, L. R., Costa, F. T., Souza, L. A., Pelegrini, P. B., Grossi-de-Sá, M. F., Neto, S. M., Bloch Jr., C., Laumann, R. A., Noronha, E. F., Franco, O. L. (2007). Isolation of a novel *Carica papaya*  $\alpha$ -amylase inhibitor with deleterious activity toward *Callosobruchus maculatus*. *Pestic. Biochem. Phys.* 87: 255–260.

Felix, S. P. (2007). Identificação de epitopos alérgênicos de albuminas 2S de *Ricinus communis* utilizando como modelos roedores e pacientes atópicos:reações cruzadas com alérgenos alimentares e inalantes e bloqueio

através da ocupação dos sítios de reconhecimento. Dissertação para a obtenção do título de mestre em Biociências e Biotecnologia pela Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Felix, S. P., Mayerhoffer, R. O., Damatta, R. A., Verícimo, M. A., Nascimento, V. V., Machado, O. L. T. (2008). *Peptides*. 29: 497-504.

Fornazieri Júnior, A. (1986). Mamona - Uma rica fonte de óleo e de divisas. Coleção Brasil agrícola. Editora Ícone

Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R., Bloch Jr, C., Silva, C. P., Grossi de Sá, M. F. (2000). Activity of wheat  $\alpha$ -amylase inhibitors towards bruchid  $\alpha$ -amylases and structural explanation of observed specificities. *Eur. J. Biochem.* 267 (8): 1466-1473

Garmatiuka. T., Swoboda, I., Twardosz-Kropfmüller, A., Dall'Antoniac, F., Keller, W., Singh, B., Bhalla, P., Okadad, T., Toriyama, K., Webera. M., Ghannadanf, M., Sper, W., Blatt, K., Valent, P., Klein, B., Niederbergger, V., M Curin, M., Balic, N., Spitzauer, S., Valenta, V. (2013). Characterization of mutants of a highly cross-reactive calcium-binding protein from Brassica pollen for allergen-specific immunotherapy. *Immunobiology* 218: 1155– 1165

Gatehouse, A. M. R., Gatehouse, J. A (1998). Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. *Pest. Sci.* 52: 165-175.

Gould, H. J., Sutton, B. J. (2008). IgE in allergy and asthma today. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 205 217

Gräslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Bray, J., Gileadi, O., Knapp, S., Oppermann, U., Arrowsmith, C., Hui, R., Ming, J., dhe-Paganon, S., Park, H.-W., Savchenk, A., Yee, A., Edwards, A., Vincentelli, R., Cambillau, C., Kim, R., Kim, S.-H., Rao, Z., Shi, Y., Terwilliger, T.C., Kim, C.-Y., Hung, L.-W., Waldo, G.S.,

Peleg, Y., Albeck, S., Unger, T., Dym, O., Prilusky, J., Sussman, J.L., Stevens, R.C., Lesley, S.A., Wilson, I.A.,

Joachimiak, A., Collart, F., Dementieva, I., Donnelly, M.I., Eschenfeldt, W.H., Kim, Y., Stols, L., Wu, R., Zhou, M., Burley, S.K., Emtage, J.S., Sauder, J.M., Thompson, D., Bain, K., Luz, J., Gheyi, T., Zhang, F., Atwell, S., Almo, S.C., Bonanno, J.B., Fiser, A., Swaminathan, S., Studier, F.W., Chance, M.R., Sali, A., Acton, T.B., Xiao, R., Zhao, L., Ma, L.C., Hunt, J.F., Tong, L., Cunningham, K., Inouye, M., Anderson, S., Janjua, H., Shastry, R., Ho, C.K., Wang, D., Wang, H., Jiang, M., Montelione, G.T., Stuart, D.I., Owens, R.J., Daenke, S., Schütz, A., Heinemann, U., Yokoyama, S., Büssow, K., Gunsalus, K.C. (2008). Protein production and purification. *Nat. Methods*. 5: 135–146.

Hagan, N. D., Upadhyaya, N., Tabe, L. M., Higgins, T. J. V. (2003). The redistribution of protein sulfur in transgenic rice expressing a gene for a foreign, sulfur-rich protein. *Plant J*. 34: 1-11.

Huang, W. Y., Tietz, N. W. (1982). Determinations of amylase isoenzymes in serum by of a selective inhibitor. *Clin. Chem*. 28 (7): 1525-1517

Kortt, A. A., Caldwell, J. B., Lilley, G. G., Higgins, T. J. V. (1991). Amino acid and cDNA sequences of a methionine-rich 2S albumin protein from sunflower seed (*Helianthus annus* L.). *Eur. J. Biochem*. 195: 329–334.

Nascimento V.V. (2009). Caracterização de Albuminas 2s de *Ricinus Communis* L. Como Inibidores de Alfa- Amilase e Relação Estrutura-Atividade de Suas Principais Isoformas, Ric c 1 e Ric c 3. Tese para obtenção de título de Doutor em Biociências e Biotecnologia pela Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Machado, O. L. T., Silva, J. G., Jr. (1992). An allergenic 2S storage protein from *Ricinus communis* seeds which is part of the albumin precursor predict by cDNA data. *Braz. J. Med. Biol. Press*. 25 (6): 567-582.

Mello, M. O., Silva-Filho, M. C. (2002). Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Braz. J. Plant Physiol.* 14(2): 71-81.

Mills, E. N. C., Madsen, C., Shewry, P. R., Wichers, H. J. (2003). Food allergens of plant origin - their molecular and evolutionary relationships. *Trends Food. Sci. Technol.* 14: 145-156

Nascimento V. V. Castro H. C. Abreu P. A., Oliveira A. E. A. Fernandez J. H., Araujo J. D. S. and Machado O. L. T. (2011). In Silico Structural Characteristics and  $\alpha$ -Amylase Inhibitory Properties of Ric c 1 and Ric c 3, Allergenic 2S Albumins from *Ricinus communis* Seeds. *J. Agric. Food Chem.* 59: 4814–4821

Odani, S., Koide, T., Ono, T., Ohnishi, K. (1983). Structural relationship between barley (*Hordeum vulgare*) trypsin inhibitor and castor-bean (*Ricinus communis*) storage protein. *Biochem. J.* 213 (2): 543-5.

O'Donnell, M. D., Fitzgerald, O., McGeeney, K. F. (1977). Differential serum amylase determination by use of an inhibitor and design of a routine procedure. *Clin. Chem.* 23 (3): 560-566.

Ogunniyi, D. S. (2006). Castor oil: A vital industrial raw material. *Bioresour. Technol.* 97: 1086-1091

Oliveira-Neto, O. B., Batista, J. A. N., Rigden, D. J., Franco, O. L., Falcão, R., Fragoso, R. R., Mello, L. V., Santos, R. C., Grossi-de-Sá, M. F. (2003). Molecular Cloning of  $\alpha$ -Amylases from Cotton Boll Weevil, *Anthonomus grandis* and Structural Relations to Plant Inhibitors: An Approach to Insect Resistance. *J. Protein Chem.* 22 (1): 77-87.

Parente, E. J. S. (2004). BIODIESEL: Uma Aventura Tecnológica num País Engraçado. CD ROM do minicurso apresentado no 1º Congresso Nacional de Mamona.

Payan, F. (2004). Structural basis for the inhibition of mammalian and insect  $\alpha$  amylase by plant protein inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta.* 1696: 171-180.

Sharief, F. S., Li, S. S. (1982). Amino acid sequence of small and large subunits of seed storage protein from *Ricinus communis*. *J. Biol. Chem.* 257: 14753-14759.

Santos, I., Carvalho, A., Souza-Filho, G., Nascimento, V., Machado, O., Gomes, V. (2010) Purification of a defensin isolated from *Vigna unguiculata* seeds, its functional expression in *Escherichia coli*, and assessment of its insect  $\alpha$ -amylase inhibitory activity. *Protein Expression and Purification.* 71: 8–15

Silva, J. G. Jr., Machado, O. L. T., Izumi, C., Padovan, J. C., Chait, B. T., Mirza, U. A., Greene, L. J. (1996). Amino acid sequence of a new 2S albumin from *Ricinus communis* which is part of a 29 kDa precursor protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 336: 10-18.

Sivakumar, S., Mohan, M., Franco, O. L., Thayumanavan, B. (2006). Inhibition of insect pest  $\alpha$ -amylases by little and finger millet inhibitors. *Pestic. Biochem. Phys.* 85: 155–160.

Spies, J. R. (1974). Allergens. *J. Agric. Food Chem.* 22: 30-36.

Svensson, B., Fukuda, K., Nielsen, P. K. and Bønsager, B. C. (2004). Proteinaceous  $\alpha$ -amylase inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins & Proteomics.* 1696 (2): 145-156.

Thorpe, S. C., Kemeny, D. M., Panzani, R. C., McGurl, B., Lord, J. M. (1988). Allergy to castor beanie – Identification of the major allergens in bean seeds. *J. Allergy Clin. Immunol.* 82: 67-72.

Turcotte, G. E., Nadeau, L., Forest, J. C., Douville, P., Leclerc, P., Bergeron, J., Laclos, B. F. (1994). A new rapid immunoinhibition pancreatic amylase assay: diagnostic value for pancreatitis. *Clin. Biochem.* 27 (2): 133-139.

Valência, A., Bustillo, A. E., Ossa, G. E., Chrispeels, M. J. (2000).  $\alpha$ -Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30: 207–213.

Youle, R. J., Huang, A. H. (1978). Evidence that castor bean allergens are albumin storage proteins in protein bodies of castor bean. *Plant Physiol.* 61: 13-16.

Zhi-Fei, Z., Ting-Ting, N., Zu-Min, X., Ge-Xin, Z., Yan-He, M. (2008). The crystal water affect in the linteraction between the *Tenebrio molitor*  $\alpha$ -amylase and Its inhibitor. *Bioinorganic Chemistry and Applications* 2008: 1-6.