



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Bayki Hussein Kassab

**BJcuL, Lectina do Veneno de *Bothrops jararacussu*:
Análise Estrutural do cDNA e Investigações
Preliminares do Efeito *in vitro* da Proteína Nativa sobre
Células Tumerais do Cólon.**

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Funcional e
Molecular, na área de **Bioquímica**.

Orientador: Prof. Dr. José Camillo Novello

Campinas
2004

UNIDADE	AL
Nº CHAMADA	K154b
V	EX
TOMBO BC/	61938
PROC.	16-86-05
C	☐
D	☒
PREÇO	14.00
DATA	04.02.05
Nº CPD	

Bibid 336687

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

K154b

Kassab, Bayki Hussein

BjcuL, lectina do veneno de *Bothrops jararacussu*: análise estrutural do cDNA e investigações preliminares do efeito da proteína nativa sobre células tumorais do cólon /Bayki Hussein Kassab.--
Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: José Camillo Novello

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas .

Instituto de Biologia.

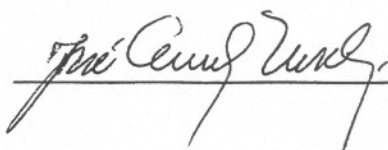
1. Expressão. 2. Cancer. 3. Veneno. 4. Clonagem molecular. 5. Lectinas.

I. Novello, José Camillo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

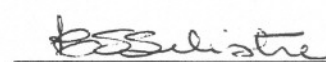
Data da Defesa: 02 / 06 / 2004

Banca Examinadora

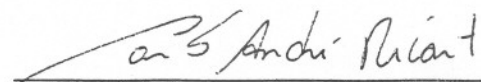
Prof. Dr. José Camillo Novello (Orientador)



Prof. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo



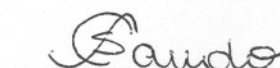
Prof. Dr. Carlos Andre Ornelas Ricart



Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira



Prof. Dra. Silvana Cristina Pando



Prof. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo

Prof. Dr. Fábio Trindade Maranhão Costa

*"A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido.
Não na vitória propriamente dita."*

M. Gandhi

*"A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido.
Não na vitória propriamente dita."*

M. Gandhi

Ao Vagner, grande amigo e cúmplice.

DEDICO.

*À formidável e excêntrica **Família Kassab**, para onde sempre
retornarei.*

OFEREÇO.

Agradecimentos

Ao prof. Dr. José Camillo Novello, pela amizade, confiança e orientação durante o doutorado. Ao prof. Dr. Gonçalo A. G. Pereira pela colaboração e oportunidade concedida para a realização deste trabalho.

Ao prof. Dr. Hervé Kovacic, pela orientação e acolhimento durante o estágio em Marseille, França e pelo auxílio nos testes celulares.

Aos profs. Drs. Hiroshi Aoyama, José Mauro Granjeiro e Fernanda R. Gadelha pela participação e sugestões no exame de qualificação.

À profa. Dra. Heloísa S. S. de Araújo e sua equipe, pela atenção, disponibilidade e apoio científico.

Ao Dr. Marcos A. de Oliveira (cientificamente conhecido como "*Scaff*") pela cômica e instrutiva convivência, e sobretudo pelos valiosos conhecimentos transmitidos.

À querida amiga e incentivadora Dra. Daniela D. de Carvalho, pela atenciosa amizade e pela grande ajuda nos experimentos e discussões científicas. Ao prof. Dr. Fábio Costa pelo apoio prático, porém filosófico.

Às inesquecíveis amigas: Aníssima, Lubnézia, Silklins; Japinha e Carlichia, pela adorável amizade, confiança e paciência. Aos meus queridos amigos: Zeca e Baldasso, pelo auxílio científico e técnico e pela amizade de tantos anos.

Aos companheiros da pós-graduação, em especial ao Smolka, Beghini, Java, Bruno, Flavinha, Vera, Gláucia, Peruano, Murango, Nonis, Odalys, Lilica, Anderson e Camila, pela boa convivência.

Às secretárias do Departamento de Bioquímica e do LGE: Andréa, Marina e Eliane, pela atenção, disponibilidade e facilidades burocráticas.

À CAPES, Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo auxílio financeiro da Bolsa de Doutorado e à FAPESP por financiar o projeto de pesquisa.

Por tantos anos compartilhados, pela amizade solidificada, pela cumplicidade fraterna e presença constante nos momentos difíceis, meus singelos agradecimentos ao **Vagner** e à **Bel**, amigos que juntos configuram meu porto seguro.

Aos meus queridos Pais, Irmão, Irmãs e Sobrinhos, pelo incentivo (mesmo distante) e por terem a sensibilidade e paciência em repartir o tempo de convívio da filha, irmã e tia com a Bioquímica.

E finalmente, mas jamais em último lugar, agradeço à **DEUS** por renovar todas as coisas...sempre.

Este trabalho foi realizado nos Laboratório de Química de Proteínas (LAQUIP) e Laboratório de Genética e Expressão (LGE) do Instituto de Biologia da UNICAMP; Laboratório de Biotecnologia do Instituto Butantã; e no Laboratoire de Biochimie, Université de la Méditerranée.

O trabalho foi financiado pela FAPESP (processo 01/08651-3) e CAPES, Brasil.

↓ **INTRODUÇÃO GERAL**

A riquíssima fauna de serpentes encontrada no Brasil, com aproximadamente 73 gêneros reunidos em 9 famílias, impulsiona especialistas no assunto a investigarem cada vez mais a biologia e as propriedades dos venenos ofídicos (Melgarejo, 2003).

Os venenos de serpentes são misturas complexas de proteínas e peptídeos que suem uma variedade de atividades biológicas. Essas moléculas compreendem cerca de 90 a 95% do peso seco do veneno, incluindo muitas enzimas, toxinas não-enzimáticas e proteínas não tóxicas. As frações não protéicas são compostas por cátions metálicos, carboidratos, nucleosídeos, aminas biogênicas e níveis menores de aminoácidos livres e lipídios. (Tu, 1988).

As serpentes peçonhentas secretam venenos ricos em substâncias farmacologicamente ativas e sua ação depende da natureza e da interação biológica destes compostos. Os venenos podem ser classificados em dois grupos: - grupo toxinas, que inclui proteínas com baixo peso molecular que se ligam a receptores, pelos quais possuem afinidade, presentes nas membranas das células-alvo e desencadeiam efeitos farmacológicos - e grupo enzimas, que apresentam atividade catalítica e os efeitos farmacológicos dependem mais do ciclo da reação do que da quantidade da enzima presente. (Chippaux e Goyffon, 1998).

A composição do veneno está diretamente relacionada com a variação geográfica e a fonte alimentar disponível em determinado local. Como a função primordial do veneno de serpentes é a imobilização e digestão de animais capturados, serpentes da mesma espécie diferem na composição do veneno devido à posição geográfica em que se encontram e à diversidade de animais disponíveis para sua alimentação (Daltry e cols., 1996).

As proteínas presentes nos venenos ofídicos, podem ser agrupadas em enzimáticas (fosfolipases, metaloproteases e serinoproteases) e não-enzimáticas (inibidores da agregação plaquetária, lectinas, desintegrinas e neurotoxinas). Todos esses componentes químicos, induzem ações biológicas que podem variar interfamílias, intergêneros e até interespécies. Uma mesma serpente pode expressar diferentes concentrações de proteínas e componentes orgânicos durante as estações do ano (variações sazonais) ou durante seu desenvolvimento (variações ontogenéticas) (Chippaux e cols, 1991, Matsui e cols., 2000).

A família Viperidae é o mais importante grupo de serpentes para a saúde pública no Brasil, pois são responsáveis pela maioria e os mais graves acidentes ofídicos registrados. Esta popularidade é atribuída, principalmente, às serpentes do gênero *Bothrops* (família Viperidae, sub-família Crotalidae) (Varanda & Giannini, 1994).

As serpentes que pertencem à família Viperidae, apresentam um potente veneno composto de proteínas que interferem no mecanismo homeostático e na adesão celular, afetando a coagulação sangüínea, funcionamento das plaquetas e causando hemorragia local (Bjarnason e Fox, 1994; Kamiguti e Sano-Martins, 1995).

O gênero *Bothrops* inclui muitas espécies, distribuídas desde o México até a Argentina e com populações significativas nas diversas regiões do Brasil (Schvartsman, 1992). As serpentes deste gênero são responsáveis por cerca de 90% dos 20.000 acidentes ofídicos anuais que o Brasil registra em regiões rurais e centros urbanos (Melgarejo, 2003).

As características fisiopatológicas produzidas pelo veneno bothrópico são conseqüências de suas ações proteolítica, hemorrágica e coagulante e podem induzir efeitos clinicamente importantes e de ação sistêmica (como a insuficiência renal, hemorragia, neurotoxicidade e choque cardiovascular)

(França e Fan, 1992; Gutierrez e Rucavado, 2000). É interessante ressaltar que entre as diferentes espécies do gênero *Bothrops*, há uma variabilidade destas três ações básicas do veneno.

A serpente ***Bothrops jararacussu***, tem uma ampla distribuição na América do Sul e Central. É talvez a espécie mais imponente do gênero, os espécimes são grandes, agressivos e vivem em áreas florestadas sendo encontrados na parte sudeste e sul do Brasil, que vai desde o sul da Bahia até o noroeste do Rio Grande do Sul (Barravieira e Pereira, 1994).

Dentre os vários componentes presentes nos venenos podemos citar, como característica comum nas serpentes, as diversas proteínas que afetam a homeostasia - metaloproteases, serinoproteases e proteínas não enzimáticas (desintegrinas e lectinas) (Markland, 1998).

As primeiras são endopeptidases que dependem da ligação, no sítio catalítico, de um metal (zinco) como cofator para sua atividade e são conhecidas como MDC composta de um domínio N-terminal **Metaloprotease**, um domínio tipo **Desintegrina** e um domínio **C-terminal** rico em cisteínas. Essas enzimas têm um potente efeito proteolítico nas proteínas da matriz extracelular. Nos venenos de serpentes são conhecidas como **svMPS** - Snake Venom Metalloproteases, responsáveis pela atividade hemorrágica. As svMPS foram organizadas em domínios, de acordo com seu potencial hemorrágico. Dentre as várias classes em que são divididas as metaloproteases, uma apresenta domínios adicionais de proteínas relacionadas com as lectinas (Figura 1)(Bjarnason & Fox, 1994; Jia e cols., 1996, Jia e cols, 1999).

As desintegrinas, são um grupo de proteínas, não enzimáticas, com baixo peso molecular, ricas em resíduos de cisteína. A maior parte das desintegrinas caracterizadas, contém uma sequência de aminoácidos Arg-Gly-Asp, reconhecida

pelas integrinas e inibem a interação do fibrinogênio com seus receptores, os complexos glicoproteicos IIb-IIIa (Gould e cols., 1990; Kamiguti e cols., 1998).

Vários pesquisadores têm proposto que as metaloproteases e as desintegrinas são derivadas da proteólise de um precursor comum (Kini e Evans, 1992; Paine e cols., 1994). Segundo Kini (1996), a hipótese de que as proteínas relacionadas com a lectinas dependentes de Ca^{2+} (CLPs) também são derivadas da região N-terminal desse precursor comum permitiu o desenvolvimento de um modelo precursor também com cinco domínios

As CLPs são grupos de proteínas estruturalmente homólogas, porém com distintas funções. Algumas exibem atividade tipo lectina por se ligarem a muitos carboidratos, induzirem a aglutinação de eritrócitos (Gartner & Ogilvie, 1984) e agregação plaquetária (Ogilvie e cols., 1989); outras induzem efeitos anticoagulantes por se ligarem a fatores X e IX ou com a trombina (Chen & Tsai, 1995).

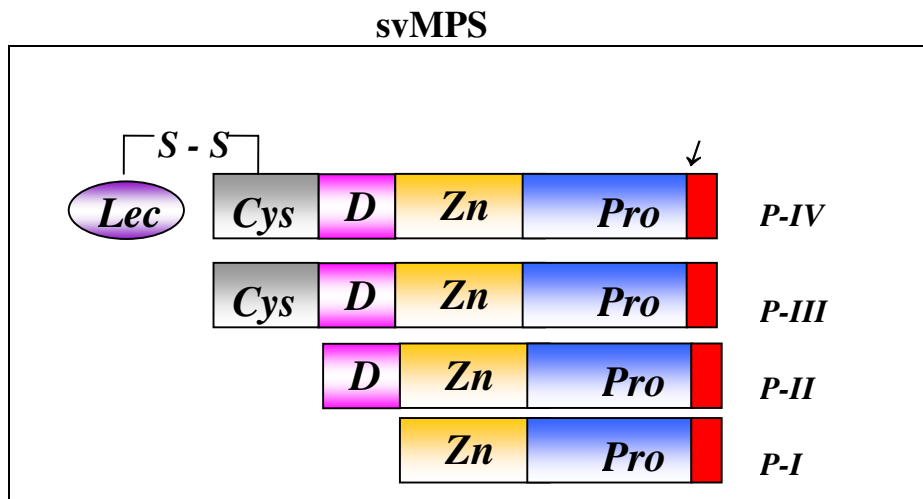


Figura 1: Representação da organização dos multidomínios das svMPS, que corresponde as 4 classes de metaloproteases. Peptídeo sinal (↓), pró-domínio (PRÓ), Metaloprotease (Zn), desintegrina (D), domínio rico em cisteínas (Cys), lectinas do tipo-C (Lec).

1- LECTINAS

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas estruturalmente diversas que possuem um ou mais centros moleculares que se ligam de forma não covalente e com considerável especificidade a carboidratos (Singh e cols, 1999).

Postula-se que as lectinas foram descritas pela primeira vez em vegetais, há mais de 120 anos por Stillmark (1888-1889 apud Etzler, 1985), e denominadas posteriormente de lectinas (Boyd e Shapleigh, 1954), do latim “lectus/legere”- meio de seleção ou escolha, referindo-se à capacidade de ligação seletiva destas proteínas com carboidratos.

O termo lectina foi generalizado para todas as proteínas que possuíam a capacidade de aglutinar células ou precipitar polissacarídeos e glicoproteínas, pelo fato de se ligarem específica e reversivelmente a determinados carboidratos, sejam eles açúcares simples ou carboidratos complexos (Sharon, 1972). As lectinas não possuem origem imune e podem ser encontradas em animais, vegetais e microorganismos (Sharon & Lis, 1993).

As lectinas vegetais foram consideradas o maior e mais bem caracterizado grupo dessas proteínas, englobando, por exemplo, a concanavalina A (Abe e cols., 1971) e a WGA de gérmen de trigo (Nagata & Burger, 1972).

Somente em 1974, Stocker e cols. descreveram, oficialmente, sobre a primeira lectina animal chamada "lectina hepática de mamíferos.

No entanto, para Kilpatrick (2002a) as lectinas animais foram descobertas quase 20 anos antes da primeira lectina descrita por Stillmark, pois no contexto da descoberta essas lectinas não foram associadas como proteínas ligantes de carboidratos. Um exemplo é a proteína CLCP (charcot-leyden crystals protein) descoberta em 1872, que se ligava a superfície dos eosinófilos formados durante

inflamações, (Leyden, 1872 apud Kilpatrick, 2002a).

Dessa forma concluiu-se que a primeira lectina descoberta foi de origem animal, e que a primeira atividade hemaglutinante dessas proteínas foi observada nos venenos de serpentes (in Kilpatrick e Green, 1992).

As lectinas de veneno de serpente foram reinvestigadas muito tempo depois e desde então muitas outras lectinas são purificadas e/ou clonadas e apresentam uma variedade de funções devido a interação proteína-carboidrato.

1.1- Classificação das Lectinas

A região molecular de ligação ao carboidrato é um domínio que reconhece uma sequência específica de resíduos de açúcares e é chamado de domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD Carbohydrate Recognition Domain) (Drickamer, 1988).

A comparação das seqüências dos CRDs permitiu a divisão das lectinas animais em 5 categorias principais, que são convencionalmente designadas como: tipo-C, tipo-S ou galectinas, tipo-I, Pentraxinas e tipo-P (Drickamer, 1995; Barondes e cols., 1994, Gabius, 1997).

Lectinas do tipo-C:

As lectinas presentes nesta categoria, requerem íons Ca^{2+} para sua atividade de ligação a carboidratos, apresentam solubilidade variável, estão localizadas principalmente no meio extracelular e possuem resíduos de cisteínas ligados formando pontes dissulfeto.

Lectinas do tipo-S:

Também conhecidas como galectinas, a segunda classe de lectinas animais, solúveis e que apresentam atividade independente de Ca^{2+} e possuem grupos tióis livres, pois a oxidação inibe sua atividade.

Lectinas do tipo-I:

Trata-se de um grupo de lectinas que desempenha função no sistema imune. Estão nesta categoria lectinas que se ligam ao ácido siálico, de maneira independente de Ca^{2+} e que, estruturalmente, pertencem à superfamília das imunoglobulinas.

Lectinas do tipo-P:

É um grupo de lectinas que inclui somente dois membros, com massa molecular de 46 e 300 kDa ligantes de glicoproteínas contendo manose-6-fosfato. O CRD destas lectinas ainda não foi estritamente definido.

Pentraxinas:

São proteínas plasmáticas que incluem, dentre outras, a proteína reativa C. Essas lectinas proliferam quando há algum processo de inflamação ou injúria tecidual no organismo e podem desempenhar funções como estimulação da fagocitose por leucócitos.

Cada subunidade da lectina animal possui pelo menos um CRD correspondente a uma das categorias acima citadas. Este domínio reconhece a seqüência específica de resíduos de açúcar, e determina diversas funções das lectinas (Lis & Sharon, 1986; Kishore e cols., 1997). A presença de um único sítio de ligação a carboidrato encontrado em algumas lectinas não lhes confere as características funcionais de lectinas, entretanto, não as exclui de pertencerem a este grupo. Estas interpretações permitem atribuir o termo lectina para moléculas que não foram, inicialmente, caracterizadas como tais (Harrison, 1991).

Aos poucos, esta divisão clássica vem sendo modificada e amplificada com a formação de subgrupos que incluem um grande número de proteínas-lectinas, as quais não apresentam homologia

estrutural primária com as categorias principais. Sabe-se que há muitas lectinas dependentes de Ca^{2+} que não possuem seqüências conservadas definidas nas lectinas tipo-C, e algumas lectinas do tipo-S não são sulfidril dependente (Gabiús e cols, 2002).

1.2- Estrutura das Lectinas

A capacidade das lectinas de se ligar a carboidratos é modulada por uma série de domínios adicionais presentes na molécula e que determinam muitas das suas funções. Esses domínios podem apresentar habilidade de ligar-se a estruturas de carboidratos via proteína-proteína, proteína-lipídio ou proteína-ácidos nucleicos. Tais características classificam as lectinas como moléculas bifuncionais (Barondes, 1998).

A formação do complexo carboidrato-proteína envolve o deslocamento de uma molécula de H_2O associada ao grupo polar da proteína e a formação de novas pontes de hidrogênio com os carboidratos altamente polares. Essas últimas ligações e forças de van der Waals são dominantes na estabilização do complexo carboidrato-proteína (Weis and Drickamer, 1996).

Estudos estruturais da superfamília de proteínas que contém o domínio das lectinas do tipo-C estão em constantes análises e, características evolucionárias e funcionais nessas proteínas vêm sendo cada vez mais discutidas e aprimoradas, (Drickamer, 1996).

Zelensky e Gready (2003), denominaram a superfamília de lectinas do tipo-C de CTLDs (C-type-lectin-like domain) e classificaram essas lectinas baseados na estrutura do CRD da proteína A ligante de manose (MBP-A) como descrito por Drickamer, (1999). Após detalhada análise estrutural, as CTLDs foram divididas em duas classes de acordo com os resíduos de aminoácidos conservados: (i) as que apresentam uma que forma um longo "loop", que está envolvido com ligação a carboidrato mediado por Ca^{2+} e (ii) as que apresentam esse "loop" de forma mais compacta e pode se ligar a carboidratos independente de Ca^{2+} .

Por outro lado, Ebener e cols. (2003) classificaram as lectinas que requerem cálcio para ligarem-se a carboidratos como CTLs (C-type lectins). Enquanto que as proteínas caracterizadas como lectinas do tipo-C que não apresentam essa capacidade de ligação, mesmo com alta identidade com o CRD das

lectinas, foram nomeadas CTLDs. Membros dessa família também estão envolvidos em diversas funções, principalmente no sistema imune. As proteínas heterodiméricas encontradas em veneno de algumas serpentes são incluídas nessa classe.

A caracterização molecular das lectinas animais, incluindo as lectinas dos venenos de serpentes encontra-se em recentes investigações. Análises das propriedades estruturais dessas proteínas através de estudos computacionais, dicroísmo circular e cristalografia, bem como de sua evolução funcional estão revelando particularidades promissoras na estrutura e função destas proteínas.

As lectinas se tornaram modelos experimentais importantes, pois são moléculas estáveis encontradas em vários tipos de organismos, apresentam alta especificidade para carboidratos e permitem modificação química e conjugação. Essas proteínas podem ser aplicadas como instrumento em várias áreas, como pesquisas sobre câncer, imunologia, estudos básicos de bioquímica e estrutura de membranas, purificação de glicoproteínas, identificação celular e histológica (Zatta & Cummings, 1991).

2 - LECTINAS DE VENENO DE SERPENTES

O interesse no estudo de lectinas de venenos de serpentes não se restringe unicamente ao fato dessas proteínas apresentarem dependência de Ca^{2+} e especificidade por carboidratos, mas sim porque essas lectinas parecem ter propriedades intermediárias entre os dois grupos de lectinas animais: as do tipo S e as do tipo C (Gabius, 1997).

As lectinas dos venenos de serpentes geralmente apresentam massa molecular de aproximadamente 14 kDa por subunidade, são solúveis e específicas para açúcares como os β -galactosídeos e requerem cálcio para sua atividade (Komoris e cols., 1999).

Várias proteínas heterodiméricas, presentes nos venenos ofídicos, apresentam um motivo de lectina tipo-C e são, desta forma, incluídas no grupo das proteínas relacionadas com as lectinas tipo-C, as CTLDs, proteínas estruturalmente homólogas, porém com funções distintas e sem afinidade a carboidratos (Ebener e cols., 2003).

As lectinas ligantes de β -galactosídeos, isoladas dos venenos de serpentes incluem-se no grupo das CTLs e análises da estrutura primária destas proteínas demonstrou que suas cadeias polipeptídicas correspondem à região molecular relativa ao CRD em outras proteínas ligantes de açúcares. Como as lectinas de venenos são o próprio domínio de ligação a carboidratos observados em outras lectinas podem ser caracterizadas como um CRD livre (Rini, 1995, Drickamer, 1999).

Estudos de purificação e seqüenciamento de aminoácidos das lectinas dos venenos de serpentes fornecem informações incompletas sobre a estrutura dessas proteínas. Análises das propriedades estruturais dessas proteínas através de estudos computacionais, dicroísmo circular e cristalografia, bem como de sua evolução funcional estão revelando particularidades na estrutura-função das lectinas.

Espectros de dicroísmo circular da lectina LmsL, mostraram 78% de estrutura β e 1% de estrutura α como característica de sua estrutura secundária. Ela possui 135 resíduos de aminoácidos, na maioria ácidos, e massa molecular calculado por subunidade de 16,2 kDa, (Aragón-Ortiz e cols., 1996).

A estrutura da RSL é composta de 135 resíduos em cada subunidade e não apresenta carboidratos na sua estrutura. O CRD desta lectina está localizado entre os resíduos 31 a 131, dentre os quais 8 são altamente conservados e encontrados na maioria das proteínas que contêm este tipo de CRD (Hirabayashi e cols., 1991).

Os resíduos conservados, encontrados nas moléculas pertencentes à superfamília das lectinas do Tipo-C, estão presentes na seqüência de aminoácidos de BJcuL, (Carvalho e cols., 1998). São eles Cys (posição 3), Gly (12), Cys (14), Trp (24), Cys(31), Glu (48), Trp(67), Ile (68), Gly (69), Leu (70), Trp (92), Pro (97), Glu (104), Cys (106), Gly (114), Trp (118), Asp (120), Cys(123) e Cys (131). Os resíduos de meia-cistina, estão bem conservados, e localizados nas posições correspondentes ao grupo VII de lectinas do tipo-C (Drickamer, 1993).

Dentre as atividades biológicas das lectinas dos venenos podemos citar: a capacidade de induzir aglutinação em eritrócitos (Kassab e cols, 2001; Carvalho e cols, 1998), estimulação na agregação de plaquetas (Olgivie e cols, 1989), mitogenicidade para linfócitos humanos do tipo T e B (Hembold e cols,

1986) e indução de liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático de músculo esquelético (Ohkura e cols, 1996).

Mais recentemente foi descrito por nosso grupo que BJcuL é citotóxica para linhagens de células de carcinoma humano pancreático e renal (Pereira-Bittencourt e cols, 1999). E ainda, BJcuL é capaz de se ligar a células tumorais de mama e ovário, influenciando sua proliferação numa maneira dose-dependente, assim como influencia o crescimento de gliomas e a proliferação de células endoteliais *in vitro* (de Carvalho e cols, 2001).

Apesar das inúmeras atividades descritas para este grupo de lectinas, o papel destas nos envenenamentos ainda permanece sem esclarecimento e vários estudos vêm sendo desenvolvidos levando em consideração as atividades biológicas destas moléculas ligantes de carboidratos.

O fato das lectinas dos venenos ofídicos serem moléculas sem domínios adicionais, com seqüências de aminoácidos altamente conservadas e funções interessantes, possibilita a caracterização destas moléculas desde o isolamento até sua estrutura terciária, por modelagem. Entretanto, não é possível afirmar que essas proteínas sejam fragmentos resultantes da proteólise de um precursor, se suas seqüências de cDNA não forem caracterizadas concomitantemente (Kini, 1996).

Nos trabalhos de Xu e cols (1999 e 2000) e Zeng e cols (1999), estão descritos avanços moleculares na caracterização de lectinas de venenos. Nestes trabalhos, a lectina, TSL, foi caracterizada a partir da seqüência do cDNA e clonagem, espectrometria de massa, degradação de Edman e dicroísmo circular da proteína expressa. A utilização de várias técnicas de bioquímica e biologia molecular possibilitou análises das modificações pós-traducionais, como a N-glicosilação encontrada no quinto resíduo amino terminal desta lectina. Estes resultados permitiram avanços nos estudos da estrutura terciária desta molécula.

A sequência do cDNA a partir das glândulas de duas serpentes da família Elapidae, permitiu a Zha e cols, (2001) determinarem a presença de três lectinas do tipo-C, até então apenas descritas na família Viperidae, a BFL-1 e BFL-2 em *Bungarus fasciatus* e a BML em *Bungarus multicinctus*. Após a análise da sequência do cDNA, foi observada uma alta identidade entre as três lectinas, entretanto, o tripeptídeo responsável pela afinidade a carboidratos caracterizou BFL-1 e BFL-2 como proteínas ligantes de galactose e manose, respectivamente.

A caracterização molecular das lectinas dos venenos de serpentes, a partir do cDNA, está sendo auxiliada por estudos mais avançados, desenvolvidos com outras proteínas de veneno como as metaloproteases, fosfolipases, desintegrinas e cardiotoxinas e podem colaborar para o entendimento global das particularidades estruturais das lectinas (Zha e cols, 2004).

Estudos comparativos do cDNA de CTLs e CTLDs, demonstraram que as regiões 5' e 3' não traduzidas são mais conservadas do que as regiões processadas que codificam proteínas. Essas similaridades entre as sequências do cDNA do peptideo sinal desses dois grupos de proteínas, podem estar diretamente relacionadas com um processo acelerado de evolução, o qual provavelmente, reflete diretamente na diversidade de suas funções (Chuman e cols, 2000; Tani e cols, 2002).

O clone *MT-d*, que codifica o precursor da metaloprotease da serpente *Agkistrodon halys brevicaudus*, foi expresso de duas formas diferentes em *E. coli*; a proteína *MT-d-I* que apresenta os domínios de metaloprotease e desintegrina e *MT-d-II* que tem apenas o domínio desintegrina. Os testes de atividade proteolítica, realizados com ambos os clones, sugeriram evidências diretas de que o domínio de desintegrina presente no precursor de metaloprotease, modula a função catalítica desta enzima (Jeon & Kim, 1999).

Para Jeyasselan e cols (1998), as variações nas atividades citolíticas observadas nas seis isoformas de cardiotoxinas de *Naja naja sputatrix*, obtidas pela sequência de

nucleotídeos, podem ser resultados de uma restrição evolucionária imposta pelo habitat e alimentação dessas serpentes.

Neste trabalho determinamos a seqüência completa do cDNA de BJcuL (GenBank accession No. AY388642) a partir do isolamento do mRNA da glândula de veneno de *Bothrops jararacussu*, clonagem e sequenciamento. Com base nos resultados obtidos, foi desenvolvido um sistema de expressão para a produção de BJcuL recombinante usando pET-15b como vetor. Foram sintetizados novos oligonucleotídeos com enzimas de restrição nas extremidades 5' e 3', a fim de aumentar a especificidade da ligação entre produto de clonagem e vetor de expressão. A expressão de BJcuL, ensaio da solubilidade, purificação e renaturação foram monitorados através de gel SDS-PAGE, western blot, espectrometria de massa, dicroísmo circular e atividade hemaglutinante e são descritas no capítulo I em detalhe.

Até o presente, foram desenvolvidos vários estudos a respeito das lectinas do tipo-C do veneno de serpente e, cada vez mais, estudos detalhados de caracterização molecular dessas lectinas por meio da clonagem do cDNA e expressão da proteína em modelos procariontes e eucariontes, estão sendo desenvolvidos no intuito de fornecer dados para o esclarecimento das particularidades estruturais das lectinas, bem como das interações proteína-carboidrato, já que essas interações participam da maioria das interações biológicas em vertebrados.

3- LECTINAS E CÉLULAS

Os mecanismos de controle da proliferação de células de mamíferos é um dos temas mais abrangentes e complexos da biologia celular e molecular, envolvendo uma série de fatores genéticos e bioquímicos ainda não compreendidos. Por outro lado, sabe-se que falhas nos processos de regulação

da proliferação celular levam a um crescimento desordenado característico de células cancerosas, onde a proliferação celular é super ativada enquanto a apoptose é inibida (Sahu, 1991).

Vários estudos sugerem que a interação lectina-carboidrato possui um importante papel no reconhecimento celular e nos mecanismos de comunicação entre as células do sistema imune, que apresentam carboidratos e lectinas de diferentes especificidades em sua superfície (Wada e cols, 1997; Kawabata e Iwanaga, 1999; Ogden e cols., 2001; Kilpatrick, 2002b).

De fato, as células cancerosas são mais suscetíveis à aglutinação por lectinas do que as células normais, e isto permitiu a descoberta de diferenças na distribuição e na natureza dos carboidratos de superfície celular entre células cancerosas e normais. Essas diferenças significativas nos receptores carboidratos de células tumorais, faz com que a possibilidade de ligação seletiva de lectinas nas células tumorais altere a viabilidade e/ou proliferação destas células (Kobata, 1998).

As selectinas, lectinas encontradas na superfície de células como os leucócitos e em células do endotélio, desempenham uma função importante no processo de migração dos leucócitos, promovendo a interação adesiva entre leucócitos e o endotélio das vênulas pós-capilares. Alguns estudos demonstraram que lectinas das células do endotélio são angiogênicas, comprovando uma ligação direta entre adesão de leucócitos e angiogêneses (Irijala e cols., 2001).

Algumas lectinas encontradas na membrana de macrófagos, como o receptor de manose estão envolvidas no reconhecimento de células tumorais, devido a interação dos receptores de membranas dos macrófagos com carboidratos dessas células (Yamamoto e cols., 1994).

Estudos mostraram que 5 μ g da lectina PNA (isolada da semente de amendoim) com afinidade por galactose- β 1 e 3-N-acetylgalactosamina estimularam a proliferação de células tumorais do cólon como HT29-D4, e não apresentou nenhum efeito sobre Caco-2. A presença de receptores glicoprotéicos

para essa lectina mostrou ser maior em Caco-2 que HT29-D4, marcando uma diferença entre essas duas linhagens celulares (Ryder e cols, 1994).

Ao compararem os efeitos de algumas lectinas vegetais sobre células tumorais, Wang e cols., 2000, concluíram que as lectinas apresentavam potenciais de atividades citotóxicas e antiproliferativa diferentes entre si, mesmo tendo afinidade pelo mesmo açúcar.

Esta habilidade pode ser atribuída pela especificidade de ligação entre a lectina-carboidrato (através do CRD) bem como por outras regiões desta molécula. A modulação de células tumorais na presença de lectinas já é bem estabelecida, entretanto os efeitos estarão relacionados ao tipo de célula e às características das lectinas (Mody e cols., 1995, Moshfegh e cols., 1998).

Efeitos sobre a adesão foram observados com Lebecetin, uma proteína isolada do veneno de *Macrovipera lebetina*, caracterizada como uma lectina do tipo-C que apresentou atividade inibitória na adesão de células cancerosas como HT-29D4 e IGR39 (Sarray e cols., 2001) e Rhodocetin, uma desintegrina que se caracteriza por não apresentar o domínio RGD, ter alta afinidade à integrina $\alpha 2 \beta 1$ e bloquear a adesão e migração de células HT1080 (fibrosarcoma) na presença de colágeno tipo-1, demonstrou ser uma ferramenta terapêutica importante contra a invasão do tumor (Eable e cols., 2002).

As lectinas de origem vegetal são bem caracterizadas quanto ao seu papel em influenciar no crescimento e na proliferação de células cancerosas, pode induzir apoptose e também a lise celular, como GS1B4 (*Griffonia simplicifolia* 1-B4), WGA (gérmen de trigo) e KML-C (*Viscum album coloratum*) (Kim e cols, 1993; Yoon e cols, 1999). A modulação da proliferação de linhagens tumorais de próstata por lectinas vegetais são bem descritas em Camby e cols, (1996).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) podem ser produzidas na cadeia respiratória, pela reação das xantinas oxidases e pela NADPH oxidase. A produção de ROS, ativada pelas GTPases Ras e Rac, é realizada em resposta a um agente invasor (fagócitos), ou em resposta a estímulos, como citocinas, e fatores de crescimento (Thannickal & Fanburg, 2000).

Evidências crescentes sugerem que ROS não são somente subprodutos que causam danos celulares, mas também participantes essenciais na sinalização e regulação celular. ROS está implicado na estimulação ou inibição da proliferação celular, apoptose e senescência celular (Chen, 2000).

O paradoxo existente nos papéis de ROS, como subprodutos tóxicos do metabolismo e como biomoléculas essenciais à regulação e sinalização celular, pode estar, em parte, relacionado às diferentes concentrações, e à localização celular, em que ROS é produzido.

Em células tumorais parece haver geração constitutiva de níveis relativamente altos de peróxido de hidrogênio, sugerindo uma relação entre excesso de ROS e proliferação desregulada (Szatrowski & Nathan, 1991).

A lectina vegetal, concanavalina A (con A) induz produção de ROS em células do timo, resultando na modulação da proliferação destas células (Pani e cols, 2000).

O papel da oxidação intracelular é um dos aspectos mais complexos na regulação da morte celular, sendo inicialmente proposta como um mediador da apoptose (Pervaiz e cols, 2001). De fato, a exposição ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou óxido nítrico (NO) induz apoptose em diferentes tipos de células, e por outro lado, a administração de doses baixas de H_2O_2 é suficiente para inibir a apoptose celular (Burdon, 1995).

Baseados nas atividades apresentadas por BJcuL em células tumorais, buscamos, com essa parte do trabalho, esclarecer aspectos envolvidos nos fenômenos de proliferação de células tumorais de cólon induzidos pela lectina do veneno da serpente *Bothrops jararacussu*. Entretanto investigações mais detalhadas a respeito do mecanismo intracelular, modulado pela ação de BJcuL, são necessárias para uma maior caracterização da atividade desta lectina.

Objetivos

Este projeto teve como objetivo:

4O isolamento e seqüenciamento do gene da lectina do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BJcuL).

4A expressão e purificação da lectina recombinante no modelo procarionte (bactéria).

4A análise do processo de renaturação da lectina recombinante e a ativação de sua atividade *in vitro*.

4A caracterização da atividade "*in vitro*" de BJcuL nativa, na proliferação de células tumorais de cólon HT29-D4 e Caco-2.

Capítulo 1

Clonagem, Expressão e Análise Estrutural da Proteína Recombinante BJcuL, a Lectina do tipo-C do veneno da serpente *Bothrops jararacussu*.

Artigo publicado na revista Protein, Expression and Purification

Bayki H. Kassab, Daniela D. de Carvalho , Marcos A. Oliveira, Gandhi R. Baptista, Gonçalo A.G. Pereira and José C. Novello. Cloning, Expression and Structural Analysis of Recombinant BJcuL, a C-type Lectin from the *Bothrops jararacussu* Snake Venom.

Cloning, Expression and Structural Analysis of Recombinant BJcuL, a C-type Lectin from the *Bothrops jararacussu* Snake Venom.

Bayki H. Kassab^{1*}, Daniela D. de Carvalho¹, Marcos A. Oliveira², Gandhi R. Baptista³, Gonçalo A.G. Pereira² and José C. Novello¹.

Departamento de Bioquímica¹, Departamento de Genética², Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, Campinas-SP, 13083-970, Brazil. Laboratório de Biotecnologia³, Instituto Butantã, São Paulo, Brazil.

*To whom correspondence should be addressed:
Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia.
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
CP 6109, Campinas, São Paulo.
13083-970, Brazil.
Phone/Fax: (55)(19) 3788 6133
E-mail: kassab@unicamp.br

FOOTNOTE

The nucleotide sequence data reported here has been submitted in the GenBank under accession

N°AY388642

Abbreviations: BJcuL: c-type lectin from *Bothrops jararacussu*, rBJcuL: recombinant c-type lectin from *Bothrops jararacussu*, CTLs: c-type lectins, CTLDs: c-type lectin-like domains, CRD: carbohydrate-recognition domain, IPTG: isopropyl thio- β -galactopyranoside, PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis, bp: base pair(s); UTR: untranslated region

Abstract

The lactose-binding lectin from *Bothrops jararacussu* venom (BJcuL) is a homodimer belonging to group VII of the c-type animal lectins. BJcuL has also been shown to serve as an interesting tool for combating tumor progression by inhibiting cancer and endothelial cell growth. However, detailed structural studies of BJcuL and its biological mechanisms of cytotoxicity are yet to be reported, perhaps because of the non-availability of recombinant proteins in necessary quantities. Intending to increase the present information about structural and consequently the understating of biological studies, the cDNA coding for BJcuL from a venom gland has been cloned and sequenced. The mature protein-coding region was amplified by PCR with specific oligonucleotides, and subcloned into the pET-15b vector to express the recombinant BJcuL in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The deduced amino acid sequence exhibits a high degree of sequence identity with c-type lectins (CTLs) and c-type lectin-like domains (CTLDs). An insoluble and inactive 18.5-kDa protein was overexpressed after 1.0 mM IPTG induction. The recombinant BJcuL was recovered and denatured in a buffer with 6 M urea and purified on a nickel-affinity column. Protein refolding was carried out on this column, during procedure purification, followed by dialysis against CTBS and then by gel filtration for separation of the active dimmer. The refolding process of rBJcuL and the analysis of its structure were confirmed by biological assay, circular dichroism and Maldi-Tof.

Key words: c-type lectin, cloning, expression, recombinant lectin, refolding, *Bothrops jararacussu*

Introduction.

The C-type lectins (CTLs) make up a large protein family, structurally homologous and functionally distinct. They consist of proteins that possess at least one carbohydrate recognition domain (CRD) per subunit, and of proteins that present a C-type lectin-like domain (CTLDs) which do not bind to carbohydrates or calcium [1,2].

According to the CRD sequence, C-type animal lectins may be classified into seven major groups [3]. Evidence indicates that snake venom lectins belonging to group VII of the C-type animal lectins, of which saccharide-binding molecules are interesting because of their molecular structure, consist entirely of free-standing CRDs, not linked to any other polypeptide segment [4].

Among a variety of proteins from Viperidae snake venoms, lectins come into view as being a group of nonenzymatic proteins, composed of two identical disulfide-linked subunits, each one containing a C-type carbohydrate-binding motif. These types of lectins induce agglutination of erythrocytes under *in vitro* assay [5]; showing mitogenic activity on lymphocytes [6], and inhibition of cancer cell proliferation [7], being cytotoxic to some tumors and endothelial cell lines [8].

Carbohydrate-binding lectins characterized from snake venom [9-11], exhibit high primary sequence identity with invariant amino acid residues, including conserved disulfide bond [1]. These similarities are also observed in other CTLD venom protein sequences, such as botrocetin, a von Willebrand factor-binding protein [12], bothrojaracin, a thrombin inhibitor protein [13] and IX/X-BP, a heterogeneous two-chain anticoagulant [14].

A growing number of C-type lectins from snake venoms have been isolated and characterized at protein level. Recently, studies involving molecular cloning were initiated with the report of the cDNA sequence and over expression of the TSL (a lectin from *Trimeresurus stejnegeri*) [15, 16]. Cloning and expression of proteins has been shown to be an interesting tool for the complete analysis of lectin structure. Several attempts have been made to clarify the molecular mechanism of the complex lectin and ligand, including the cloning of cDNAs that encode two different C-type lectins from the same venom glands in Elapidae snakes [17]. However, most of the studies about protein precursor, determination of the tertiary structure by x-ray, and analyses of the folding properties are restricted to CTLDs, not describing the lectin presenting a carbohydrate recognition domain [18-20].

In previous studies in our laboratory, the *Bothrops jararacussu* lectin (BJcuL) was characterized as a galactoside-specific protein [9]. BJcuL primary sequence determined by Edman degradation showed that this lectin displays the invariant amino acid residues characterized in C-type lectins, suggesting BJcuL structural similarity to CRD-containing proteins [21].

In order to achieve further insights into the structure-function relationships of CRD, the aim herewith is to characterize the primary structure of the BJcuL by molecular cloning and sequencing of the cDNA nucleotides. The CRD of BJcuL was over expressed as a mature protein using the pET-15b system in the BL21 (DE3) bacteria strain as the cell host. Recombinant protein was purified, refolded and analyzed by proteolytic peptides in Maldi-Tof, CD measurements and hemagglutination assay. The recombinant protein showed similarities when compared to the native BJcuL; this fact will provide useful tools for analyzing the three-dimensional structure of BJcuL with ligands. Thus, rBJcuL produced and effectively established is now useful for delineating structure-function relationships by crystallographic and investigations into intracellular mechanism action.

Materials and Methods.

Materials

The mRNA isolation kit and the UniZap XR Kit were purchased from Stratagene. pET-15b vector, *E. coli* strains and restriction endonucleases were from Novagen. PCR components, ligation reagents and synthetic oligonucleotides were from Invitrogen. His-Bind metal chelating resin and pGEM-T vector were purchased from Pharmacia. IPTG, imidazole, and urea were from Sigma. All other chemicals were of analytical grade. Native BJcuL was isolated from crude venom as described before [9].

Construction of a venom gland cDNA library

The cDNA phage library was constructed from venom glands of a single adult specimen of *B. jararacussu* provided by the Butantan Institute (São Paulo, Brazil). Poly (A⁺) RNA was obtained and prepared using an mRNA isolation kit. cDNA synthesis was accomplished using the UniZap XR Kit and was ligated into the UniZap XR Vector-a phage and packaged, following manufacture protocols. The library was propagated in *E. coli* XL1 blue.

cDNA amplification and Cloning

Synthetic oligonucleotides primer sense (5'-AAYTTRCANTGRCANAGRAANGC-3') and primer antisense (5'- AATAATTGTCCCCAGGATTGG- 3') were designed based on the conserved amino acid sequence in snake venom c-type lectins. PCR was performed in a thermal cycler (Perkin Elmer 9600) for 40 cycles, each consisting of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 48°C for 45 s, polymerization at 72°C for 1 min, after the initial cycle of 96°C for 4 min. At the end of all cycles samples were maintained a 72°C for 7 min and then at 4°C. The amplified PCR products were analyzed by electrophoresis in agarose-gel, isolated and then cloned onto a pGEM-T vector. *E. coli* host cells were transformed with the recombinant plasmids by electroporation.

cDNA sequencing

The cDNA segments were sequenced according to the dideoxy method with a BigDye™ Terminator (Perkin Elmer) and an automated ABI Prism 377 Sequencer (model Perkin Elmer Biosystems). The nucleotide sequence was aligned with the sequences available in the GenBank database (GenBank accession **No. AY388642**). Based on this information new oligonucleotides sets were then synthesized without the signal peptides to amplify the full-length for BJcuL.

Expression of recombinant BJcuL

The pGEM-T selected clone with 490bp coding region corresponding to the BJcuL, was amplified by PCR. Two synthetic primers were designed with a cohesive end 5' *Nde*I site and a frame initiating Met codon (5'-GGAATTCCATATGATGAATAATTGTCCCCAGGAT-3'), and a *Bam*HI site at the 3' end (5'-CGGGATCCAATTTACAGTGGCAGAGGAAGGC-3'). The PCR product was cleaved with the restriction enzymes (*Bam*HI and *Nde*I), purified and ligated with T4 DNA ligase into the large fragment of *Bam*HI/*Nde*I-cut pET15b vector. Competent *E. coli* DH5-α cells were transformed with the plasmids, and selected by antibiotic resistance. The sequence of the insert was confirmed by DNA sequencing.

E. coli BL21 (DE3) competent cells were transformed with plasmid pET-15b carrying the insert (rBJcuL). Cells were pre-cultured overnight at 37°C in 50 ml Luria-broth (LB) medium containing 50 µg/ml ampicillin, and then completed to 1l of LB medium at 20°C. When the OD₆₆₀ nm reached about 0.4 – 0.7 (2 h later) IPTG was added to a final concentration of 1 mM, to initiate over expression (about 4 h). The culture

was harvested and the cell pellet was suspended in 15 ml of resuspension buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0), cells were disrupted with sonication and centrifuged at 14,000 rpm for 10 min. This step was repeated twice with isolation buffer (2 M urea, 20 mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 10 mM imidazole, 1 mM 2-mercaptoethanol and pH 8.0).

The vector has a 39 amino acid residue-upstream sequence to recombinant BJcuL that includes an N-terminal His (6)-tag to facilitate isolation and purification of the recombinant protein.

Purification and refolding of the recombinant BJcuL

The pellet collected by centrifugation was resuspended in a solubilization buffer (6 M urea, 20 mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 10 mM imidazole, 1 mM 2-mercaptoethanol and pH 8.0), incubated by stirring for 60 min at room temperature and then centrifuged at 14,000 rpm. The supernatant was applied to a nickel affinity column equilibrated with the same buffer. Removal of contaminating proteins and initial refolding was carried out using a modification of the procedures described (22). Refolding was performed on the column by exchange to non-denaturing buffer conditions with a linear 6-0 M urea gradient before elution of the bound protein. The recombinant BJcuL was eluted with the non-denaturing buffer containing 0.5 M imidazole.

The appropriate fractions were pooled and dialyzed against CTBS buffer (0.15 M NaCl, 0.02 M Tris, 5mM CaCl₂, pH 7.4) centrifuged, and applied to Superdex G-75 column (Pharmacia) equilibrated with the same buffer. The column was eluted at a rate flow of 0.3 ml/min. The fractions I and II, were collected and submitted to SDS-PAGE (12.5%) under reducing and non-reducing conditions, Maldi-Tof, CD measurements and hemagglutination assay to verify refolding.

A further refolding process was developed according to a previously described method [23]. Briefly, after purification, recombinant protein was diluted with reduction buffer (6 M urea, 20 mM Tris-HCl, 10 mM DTT, pH 7.5), approximately 0.3 mg/ml, and incubated at room temperature for 30 min. The solution was then diluted again with oxidation buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM cysteine, 1 mM cystine, 5 mM D-lactose 5 mM CaCl₂ and 3 M Urea), approximately 0.06 mg/ml, and dialyzed against the same buffer with the several changes and slow removal of the denaturing agent. After the complete removal of urea, the solution was concentrated in a Centricon device and protein concentration was determined by Bradford assay (27) and submitted to hemagglutination assay.

Analysis of recombinant BJcuL by mass spectrometry (MALDI-TOF).

The native and recombinant BJcuL were excised from SDS-PAGE gel, and in-gel digested with endoproteinase ARG-C. The peptides desalted by ZipTipC 18™ pipette tips (Millipore, Bedford, MA, USA) and cocrystallized by adding one volume of the sample to one volume of saturated α -cyano-4-hydroxycinnamic acid prepared in 50% v/v acetonitrile. The samples were submitted to Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) Time-of-Flight (TOF) mass spectrometry analysis using a Voyager-DE PRO equipment (PerSeptive Biosystems) under the following conditions: accelerated voltage 25kV, laser fixed at 2890 μ J/cm², delay 300 ns, in the linear analysis mode. The molecular mass of the proteins was also analyzed by MALDI-TOF.

CD measurements

Circular dichroism spectra were recorded with a Jasco J-720 spectropolarimeter at 25°C and wavelength range of 198-250 nm on a millidegree ellipticity scale. The concentrations of samples were 5 μ M in 20 mM phosphate buffer and measurements were made in quartz 1 mm path length cuvettes. CD spectra were obtained by signal averaging 4 scans.

Hemagglutinating activity

The hemagglutinating assay for recombinant BJcuL was performed as previously described [9]. A recombinant protein was serially two-fold diluted on a 96-well microtiter U-shaped plate with an initial concentration of 0.1 mg/ml on a 2% suspension of trypsinized human erythrocytes (A groups). The agglutination was monitored visually after 30 min. at room temperature. The activity was expressed as the minimum concentration of protein that promoted visible hemagglutination.

Results and Discussion

cDNA Sequence and Protein Expression

Snake venom lectins are interesting lactoside-binding molecules because their molecular structure comprises the carbohydrate recognition domain characterized in other C-type animal lectins, being soluble oligomers of CRDs, and not linked to accessory domains [4].

In this study, cDNA-encoding BJcuL, the lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom, was obtained which in turn confirmed its amino acid sequence. To verify the lectin gene, cDNA phage library constructed from *B. jararacussu* venom glands were screened at high stringency, by a rapid PCR-based procedure. Some positive clones, which contained about 200-500 base pairs, were isolated and sequenced. The results in Figure 1 indicated the cDNA that encoded for BJcuL. The major PCR product of the 602 bp was sequenced. This cDNA sequence contained a 5' - untranslated region of 91 bp that included a peptide signal, an open reading frame of 470 bp and 3' - untranslated region with a stop codon (Fig. 1). The BJcuL nucleotide sequence was shown to be composed of 135 amino acid residues with delimitation based on the amino acid sequence alignment of native BJcuL [21]. The rBJcuL deduced sequence showed identity to various other related lectin cDNA sequences available in the GenBank database, differing in only a few nucleotides in the open reading frame, and in the sequence at 5' and 3'- untranslated regions (signal peptides).

It has been reported that the signal peptide-coding sequence conservation in CTLs/CTLDs proteins do not directly correspond to a high homology of the total deduced amino acid sequence of these proteins [24, 25]. For 5'- UTRs of rBJcuL, a higher level of sequence identities with CTLDs signal peptide sequence than the deduced amino acid (data not show) was observed. It could be considered that the functional diversities among CTLs and CTLDs proteins have been obtained by accelerated evolution [25].

According to Figure 2, the comparison of the deduced BJcuL sequence, showed that the mature 135-amino acid residues present about 90% of identity with TSL [15], around 60% with BFL-1 and BFL-2, *Bungarus fasciatus* lectins [17] and 40% with CTLDs proteins, such as Convulxin, from *Crotalus durissus terrificus* venom [26], anticoagulant IX/XBP from *Trimeresurus flavoviridis* [14], and AaACP a anticoagulant from *Agkistrodon actus* venom [24].

Previous descriptions of conserved residues in c-type lectins include two pairs of cysteines [3]. As observed in Fig.2, the eight half-cystine residues that form the known four intrachain patterns disulfide bridges in the C-type animal lectins, and the half-cystine residues (position 86) which form the interchain disulfide bridge, are observed in the deduced amino acid sequence of rBJcuL.

In Figure 2, it can also be noticed that highly conserved residues in c-type animal lectins, which include residues involved in carbohydrate-binding, were found in the deduced amino acid sequence of rBJcuL as follows: Cys³¹, Glu⁴⁸, Gly⁶⁹, Asp⁷², Trp⁹², Pro⁹⁷, Cys¹⁰⁶, Trp¹¹⁸, Asp¹²⁰, Cys¹²³ and Cys¹³¹. With

these eleven amino acid residues completely conserved, the CRD of rat manose-binding protein [28] showed a 29% similarity to BJcuL. However, this homology is not evident in CTLDs (Fig. 2), except for the residues of Cys, responsible for the formation of disulfide bridges. According to this fact, amino acid sequence of CTLDs put these proteins into the group of the c-type lectin, however their CRD does not present suitable amino acids for the binding of Ca^{2+} and carbohydrates, such as galactose or manose.

The evolutionary analysis of the members of c-type lectin/c-type-lectin-like domain super family was recently described [1], showing at the same time-shared and restrict functional characteristics of each family. In the CTLs, it was observed that the five residues responsible for calcium coordination, and those essential to carbohydrate binding are not conserved in the CTLDs [1].

The cDNA coding region for mature BJcuL was engineered by PCR in such a way so as to contain two specific *Bam*HI/*Nde*I restriction sites (as described in Methods) for the insertion into a bacterial pET15b expression vector. The recombinant plasmid was used to transform *E. coli* BL21 (DE3) cells, which were induced with IPTG. After cell disruption, both the supernatant and pellet were examined by SDS-PAGE. As shown in Fig. 3A, the 18.5 kDa rBJcuL was visible in the extracts of induced *E. coli* BL21-DE3 cells transformed with pET-15b-rBJcuL for 4h by IPTG. Due to the major expression protein level being present as inclusion bodies in the cells, it was solubilized by urea. The expected molecular weight of the native BJcuL is ≈ 16 kDa [21]; however, the recombinant BJcuL monomer showed an apparent molecular mass of ≈ 18.5 kDa. This can be explained by the existence of 20 additional residues at the N-terminal, including 6x HisTag described to pET-15b vector.

Based on results from Bradford assays [28], the yield of recombinant protein generated by this expression system was about 10 to 12 mg of purified monomer per liter of cell culture.

Purification and Refolding of rBJcuL

Due to the fact that lectins are active hemagglutinating proteins similar to homodimer or oligomers [10], several attempts to refold the monomers and put them into dimers were made. To forward an accurate intra- and inter disulfide bonds, the recombinant protein resuspended in the solubilization buffer was purified using a nickel affinity column. rBJcuL refolding assay, performed on the column by exchange to non-denaturing buffer conditions in urea gradient, was confirmed by western blot techniques.

In Fig. 3B, expressed recombinant protein refolding was analyzed by western blot. Under non-reducing SDS-PAGE, refolded recombinant BJcuL appeared with two main bands representing the homodimer (37 kDa) and monomer (18.5 kDa). In reduced SDS-PAGE, a single band is observed at 18.5 kDa. The refolded recombinant BJcuL partially aggregates in nonreducing conditions, as demonstrated before in techniques where *E. coli* is applied as host cells, and the protein is expressed in inclusion bodies [29]. In fact, formation of incorrect intramolecular disulfide links prevents a recombinant protein from attaining its native conformation, and the presence of minimum concentrations of reduction agents during the refolding procedure has been considered to be an efficient way of preventing unspecific disulfide bonds [22]. In the present work, urea removal from the rBJcuL on the column, following by dialysis, did not result in the formation of correct inter-chain disulfide bonds for all recombinant proteins, suggesting that this fact blocked the interactions responsible for monomer stabilization (18.5 kDa).

To obtain the active homodimer, the centrifugal supernatant from dialization was applied in a gel filtration Superdex G-75 column. The molecular exclusion result is shown in Fig. 4. The major peak (peak 1) corresponds to the rBJcuL homodimer, and peak 2 indicates the monomer, which probably did not present a correct refolding. The apparent molecular mass of the homodimer and monomer is 37 kDa and 18.5 kDa, respectively, confirmed by western blot (Fig. 4-inset). After this purification step, the homodimer rBJcuL was used for the biological activity assay and structural analysis.

Despite some proteins loss occurring due to precipitation after the urea removal, this procedure could grant about 2.5 – 3.0 mg/L of BL21 (DE3) cell culture in this last refolding preparation (Table 1). This amount can be considered satisfactory for a refolded protein. The data reported in literature with oxidizing/reducing buffer techniques show a lower, but efficient yield, compared to the rBJcuL [23].

Induction at lower temperatures and concentration of IPTG, as well as the expression as a fusion with thioredoxin in Origami (Novagen) bacterial host lacking both thioredoxin reductase and glutathione reductase, did not increase the solubility of the expressed protein (data not shown). Another refolding procedure described by [23, 30] was made by using a buffer containing the redox-pair 5 mM cysteine and 1 mM cystine in the absence or presence of lactose, however this technique increased protein precipitation and diminished the product.

To purify rBJcuL as an oligomer, Superdex G-75 column purification was applied to the separation of the homodimers. According to Figure 4, two peaks were obtained and submitted to SDS-PAGE and western

blot revealed with anti-histag. In addition, the purified protein band of ~37 kDa, as well as native BJcuL were *in gel* digested with endopeptidase Arg C and subject to Maldi-Tof MS analysis. The spectra obtained by the peptide mixtures produced by endopeptidase Arg C digestion of BJcuL and rBJcuL are shown in Figures 5A and 5B. As an alternative method for identification of the amino acids present in rBJcuL, the peptide mass values were compared between both lectins. The comparative analysis showed high identity in the predicted peptide mass obtained after 16 h of cleavages with endopeptidase Arg-C. Besides this result, peptide mass by theoretical cleavages with interpretation of the data available in [www http://prospector.ucsf.edu/](http://prospector.ucsf.edu/) was confirmed [31]. Native and recombinant BJcuLs have their molecular mass evaluated by mass spectrometry in reduced and alkylated form, both showing an increase of ≈ 500 Da compared to the apparent molecular mass determined by SDS-PAGE (data not show). These results could confirm the presence of 8 half-cystine residues already observed in deduced amino acid sequence, and are in agreement with other publications [15].

The major peak from Superdex G-75, corresponding to the homodimer, was submitted to CD measurements. CD spectrum of rBJcuL is shown in Fig. 6, where the refolding was characterized by two minimums at 208 nm and 218 nm and slight maximum in 230 nm and 198 nm [32]. This spectrum was carried out at a concentration of 2 μ M and indicates conformation similar to that of native BJcuL, as well as to other lectins such as TSL described by [16], and Bothrojaracin [33]. It is also compatible with a correct protein fold composed of different secondary structures.

The CD spectrum was performed to check the correct refolding of rBJcuL, and the intention was not to discriminate within different secondary structures which constitute rBJcuL. However as described by [34], the shape of this spectrum exhibited the typical indications of the presence of α -helical and β -sheet elements of secondary structure in native and recombinant BJcuL.

In the same way, hemagglutination activity was used to check the correct refolding. Refolded rBJcuL (0.1 mg/ml), before being submitted to Superdex G-75, did not show hemagglutinating activity on a 2% suspension of trypsinized human erythrocytes (group A). On the other hand, after purification of the homodimer in Superdex-G75, the ability of the recombinant BJcuL to agglutinate erythrocytes type A was confirmed. The minimum concentration of BJcuL that promoted visible hemagglutination was approximately 1.5 μ g/ml to rBJcuL and 0.24 μ g/ml to native BJcuL.

This assay demonstrates that the recombinant rBJcuL in homodimer conformation was able to agglutinate erythrocytes type A. The properties of this recombinant protein did not differ significantly from native BJcuL [9], however rBJcuL showed differences in hemagglutination titer. When compared to the native form of the lectin, rBJcuL hemagglutination activity showed itself to be six-times lower to type A erythrocytes. As expected, rBJcuL refolding in the presence of lactose did not show any activity on the hemagglutination.

According to literature [2,10], the lectins have one or more carbohydrate binding site(s) per subunit. The native homodimer BJcuL was found to be active only as a dimeric configuration with CRD structure not linked to accessory domains [21]. The results herewith suggest that the expressed molecule is a homodimer; where part of the recombinant protein is formed as two or more subunits paired through intermolecular disulfide bonds. The presence of the monomers without the formation of a correct inter-chain disulfide bond, as well as structural instability of dimer configuration may be avoiding favorable activity.

Based on the results, it was found that the refolding of rBJcuL in the presence of lactose inhibited its hemagglutinating activity, suggesting that this refolding process was efficient to make the carbohydrate recognition domain able for lactose binding. As observed for the lectin of *Abrus pulchellus* seeds, where several successful refolding processes have been carried out with ligand presence, which stabilizes its structure [32]. In the case of BJcuL, the CD spectrum measured could have been made to confirm the rBJcuL secondary structure in the presence of galactosides, which is an interesting step for further investigation of its three-dimensional structure.

Concerning the importance of having this active lectin in adequate quantities for future assays on the mechanism of cytotoxicity on cancer cells, and investigations related to the role of these molecules in envenomation, work is done to clone and express a recombinant active BJcuL. In conclusion, the recombinant product showed conserved structural features compared to native BJcuL, confirmed by proteolysis peptides in Maldi-Tof, CD measurements and hemagglutination assay. Therefore, in this study the expression, and purification and refolding of the recombinant BJcuL was established and could provide a reasonable amount of protein. Our future aim is to produce rBJcuL for crystallographic studies, comparing several biological functions between native and recombinant BJcuL.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazilian Agency). B. H. Kassab is supported by a fellowship from CAPES institution (Brazil). The authors would like to thank Dr. Heloisa Selistre Sobreiro de Araújo from the Universidade Federal de São Carlos for her contribution in refolding techniques, and Dr. Carlos Ramos from the Laboratório Nacional de Luz Sincrotron for dichroism circular facilities. We also would like to thank Paulo Baldasso and José Antonio da Silva for technical help in this work.

References

- [1] E. Sharon, N. Sharon and N. Ben-Tal, Evolutionary analysis reveals collective properties and specificity in the c-type lectin and lectin-like domain superfamily, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 52 (2003) 44-55.
- [2] R.B. Dodd, K. Drickamer, Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrates binding activity, *Glycobiology* 11 (2001) 71-79.
- [3] K., Drickamer, Evolution of Ca^{2+} -dependent animal lectins, *Prog. Nucl. Acid Res.* 45 (1993) 207-232.
- [4] J.M. Rini, Lectin Structure, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 24 (1995) 51-577.
- [5] B.H. Kassab, D.D.de Carvalho, S. Marangoni, and J.C. Novello, Characterization of a hemagglutinating glycoprotein isolated from *Bothrops moojeni* snake venom, *Prot. Pept. Letters* 8 (2001) 13-20.
- [6] A. M., Mastro, D. J. Hurley, R. K. Winning, R. Filipowski, M. L. Ogilvie and T. K. Gartner, Mitogenic activity of snake venom lectins, *Cell Tis. Kinet.* 19 (1986) 557-566.
- [7] M. Pereira-Bittencourt, D.D. Carvalho, A.R. Gagliardi and D.C. Collins, The effect of a lectin from the venom of the snake, *Bothrops jararacussu*, on tumor cells proliferation, *Anticancer Res.* 19 (1999) 4023-4025.
- [8] D.D. de Carvalho, S. Schimtmeyer, J.C. Novello and F.S. Markland, Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells, *Toxicon* 39 (2001) 1471-1476.
- [9] D.D. Carvalho, S. Marangoni, B. Oliveira and J.C. Novello, Purification and characterization of a new lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*, *Biochem. Mol. Biol. Inter.* 44 (1998) 933-938.

- [10] J. Hirabayashi, T. Kusunoki and K-I. Kasai, Complete primary structure of a galactose-specific lectin from the venom of the rattlesnake *Crotalus atrox*, J. Biol. Chem. 266 (1991) 2320-2326.
- [11] R.M. Kini, Are C-type lectin-related proteins derived by proteolysis of metalloproteinase/disintegrin precursor proteins? Toxicon 34 (1996) 1287-1294.
- [12] Y. Usami, Y. Fujimura, M. Suzuki, Y. Ozeki, K. Nishio, H. Fukui and K. Titani, Primary structure of two-chain bothrocetin, a von-Willebrand factor modulator purified from the venom of *Bothrops jararaca*, Proc. Natl.Acad.Sci. 90 (1993) 928-932.
- [13] V. Aroca, R.B. Zingali, M.C. Guillin, C. Bon and M. Jandrot-Perrus, Bothrojaracin: a potent two-site-directed thrombin inhibitor, Biochemistry 35 (1996). 9083-9089.
- [14] R. Matsuzaki, E. Yoshiara, M. Yamada, K. Shima, H. Atoda, and T. Morita, cDNA Cloning of IX/X-BP, a Heterogeneous Two-Chain Anticoagulant Protein from Snake Venom, Biochem. Biophys.Res.Com. 220: (1996) 382-387.
- [15] Q. Xu, X-F. Wu, Q-C. Xia and K-Y Wang, Cloning of a galactose-binding lectin from the venom of *Trimeresurus stejnegeri*, Biochem. J. 341 (1999) 33-737.
- [16] Q. Xu, R. Zeng, X-F. Wu and K-Y. Wang, Expression of isolated c-type carbohydrate recognition domains, Biochem. Biophys.Res.Comm. 271 (2000) 677-681.
- [17] H. -G. Zha, W. -H. Lee, and Y. Zhang, Cloning of cDNAs Encoding C-type Lectins from Elapidae Snakes *Bungarus fasciatus* and *Bungarus multicinctus*, Toxicon 39 (2001) 1887-1892.
- [18] H. Mizuno, Z. Fujimoto, M. Koizumi, H. Kano, H. Atoda and T. Morita, Crystal structure of coagulation factor IX-binding protein from Habu snake venom at 2.6 Å: implication of central loop swapping based on deletion in the linker region, J. Mol. Biol. 289 (1999) 103-112.
- [19] U. Sen, S. Vasudevan, G. Subbarao, R. A. McClintock, R. Celikel, Z. M. Ruggeri and K. I. Varughese, Crystal structure of the von Willebrand factor modulator botrocetin, Biochemistry 40 (2001) 345-352.
- [20] M.T Murakami, L. Watanabe, L.M. Gava, S.P. Zela, A.C.O. Cintra and R.K. Arni, Initial structural analysis of an alpha (4) beta (4) c-type lectin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, Acta Crystal Sect. D-Biologic. Cristallogr. 59 (2003) 1813-1815.
- [21] D.D. Carvalho, S. Marangoni, and J.C. Novello, Primary structure characterization of *Bothrops jararacussu* snake venom lectin, J. Prot. Chem 21 (2002) 43-50.

- [22] R. Colangeli, A. Heijbel, A.M. Williams, C. Manca, J. Chan, K. Lyashchenko and M.L. Gennaro, Three-step purification of lipopolysaccharide-free, polyhistidine-tagged recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis*, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 714 (1998) 223-35
- [23] H.S. Selistre-de-Araujo, E.L. Souza, L.M. Beltramini, C.L. Ownby, D.H. Souza, Expression, refolding, and activity of a recombinant nonhemorrhagic snake venom metalloprotease, *Protein Express. Purif.* 19 (2000) 41-47.
- [24] A. Tani, T. Ogawa, T. Nose, N. N. Nikandrov, M. Deshimaru, T. Chijiwa, C-C. Chang, Y. Fukumaki, and M. Ohno, Characterization, primary structure and molecular evolution of antioagulant protein from *Agkistrodon actus* venom, *Toxicon*, 40 (2002) 803-813.
- [25] R. A. Harrison, J. Oliver, S. S. Hasson, K. Bharati and R. D. G. Theakston, Novel sequences encoding venom c-type lectins are conserved in phylogenetically and geographically distinct *Echis* and *Bitis* viper species, *Gene* 315 (2003) 95-102.
- [26] M. Leduc and C. Bon, Cloning of subunits of convulxin, a collagen-like platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus* venom, *Biochem. J.* 333 (1998) 389-393.
- [27] K. Drickamer, M. S. Dordal and L. Reynolds, Mannose-binding proteins isolated from rat liver contain carbohydrate-recognition domains linked to collagenous tails, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 6878-6887.
- [28] M. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- [29] H. Lilie, E. Schwarz, R. Rudolph, Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*, *Curr. Opin. Biotechnol.* 9 (1998) 497-501.
- [30] P. T. Campana, D. I. Moraes, A.C.O. Monteiro-Moreira and L. M. Beltramini, Unfolding and refolding studies of frutalin, a tetrameric d-galactose binding lectin, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 5647-5652.
- [31] A. Sickmann, M. Mreyen and H. E. Meyer, Identification of modified proteins by mass spectrometry, *IUBMB Life* 54 (2002) 51-57.
- [32] L. S. Goto, L. M. Beltramini, D. I. de Moraes, R. A. Moreira and A. P. U. de Araújo, *Abrus pulchellus* type-2 RIP, pulchellin: heterologous expression and refolding of the sugar-binding B chain, *Prot. Expr. Purif.* 31 (2003) 12-18.

- [33] R. Q. Monteiro, D. Foguel, H.C. Castro and R. B. Zingali, Subunit, dissociation, unfolding, and inactivation of bothrojaracin, a c-type lectin-like protein from snake venom, *Biochemistry* 42(2) (2003)-509- 515.
- [34] S. M. Kelly and N. C. Price, The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding, *Biochim. Biophys. Acta* 1338 (1997) 161- 185.

LEGENDS

Table 1: Purification of Recombinant BJcuL lectin from 1 liter of *E. coli* BL21 (DE3) Cell Culture

Figure 1: cDNA sequence and deduced amino acid sequences of BJcuL. Numbering the nucleotides is in the 5' to 3' direction, and the putative signal peptide sequence is printed in *italics*. N-terminal position of peptides is boxed, the sequence of the predicted mature protein is in bold letters. The underlined nucleotide sequences correspond to primers used for PCR-based cDNA library screen. Start (ATG) and stop (TAA) codon are starred (*).

Figure 2: Comparison of the deduced amino acid sequences of BJcuL between snake venom CTLs and CTDs lectins. Alignments of sequence were made according to the half-cystine residues. The sequence is: TSL, the c-type lectin from *Trimeresurus stejnegeri* (15), BFL 1 and BFL 2, *Bungarus fasciatus* lectins (17), Convulxin, from *Crotalus durissus terrificus* (24), Anticoagulant IX/XBP from *Trimeresurus flavoviridis* (14), AaACP a anticoagulant from *Agkistrodon actus* venom (25) and rat mannose-binding protein (RMBP, residues 115-238) (27). The asterisk indicates identical residues with rBJcuL. Gaps were inserted to conserve homology. High-invariant residues between rBJcuL and other CRDs are boxed. The intrachain and interchain disulfide bridges are marked.

Figure 3: Analysis of recombinant BJcuL. Cell extract of BL21 (DE3) after transformation with pET-15b plus insert and induced by IPTG for 4 h, was submitted to SDS-PAGE and Western blot. (A) SDS-PAGE in a Coomassie brilliant blue-stained 12.5 % gel. Lane 1, molecular-mass marker (kDa); lane 2, recovered inclusion bodies, lane 3, soluble fraction (supernatant) after disruption, lane 4, purified fraction from Nickel column after 0.5 M imidazole. (B) Refolding analysis of CTBS dialyzed rBJcuL by SDS-PAGE in a Coomassie brilliant blue-stained 12.5 % gel, and Western Blot. Sample after refolding on the column without DTT (lane 1), and with 10 mM DTT (lane 2). Western blotting analysis of the sample transferred from the same SDS-PAGE conditions and probed with anti His-tag (lane 3).

Figure 4: Purification of rBJcuL dimer by molecular exclusion chromatography.. Refolded rBJcuL was applied to a Superdex G-75 column equilibrated with CTBS at a flow rate of 0.3 ml/min and eluted with the same buffer. Western blot analysis of the purified rBJcuL in superdex column (Inset). Lane 1 corresponds to peak 1 (dimeric forms) and lane 2, rBJcuL monomeric forms corresponds to peak 2.

Figure 5: Maldi-Tof peptide spectra of recombinant and native BJcuL. Comparative analysis of mass spectrometry spectra of rBJcuL and BJcuL peptides originated by endopeptidase Arg-C cleavage for 16 hours. (A) Mass spectrum of the rBJcuL peptides. (B) Mass spectrum of the BJcuL peptides.

Figure 6: Circular dichroism analysis. CD spectra of the refolding (solid line), native (dotted line) and unfolding (dashed line) rBJcuL, all at a concentration of 2 μ M. The spectra were recorded from 200 to 260 nm in a 1-mm path length cuvette using Jasco J-820 spectropolarimeter. Unfolding rBJcuL was recorded from 210 to 260 nm with 6 M urea in Tris-HCl, pH 7.4. Spectra were typically recorded as an average of 8 scans at 25°C.

Kassab et al, 2003 Table 1

	Total protein (mg)	Protein yield (%)
Inclusion body	250	100
rBJcuL from His-tag column	10.0 – 12.0	3.2 - 4
rBJcuL from Superdex G-75	2,5 - 3,5	1.0 – 1,4

Protein concentration was estimated by Bradford assay (28).

The inclusion body wet weight of the recovered after centrifugation.

Fig. 1 - Kassab et al., 2004.

1	CCAGGGAAGGAAGGNAAGNCCT
22	* ATG GGG CGA TTC CTT TTC GTG GCT AGT TCG GCT TGC TGG TTC GTG TTC CTC TCC CTG AGT GGN
-23	M G R F L F V A S S A C W F V L L S L S G
84	GCC AAN AAT AAT TGT CCC CAG GAT TGG CTC CCC ATG AAT GGG CTG TGC TAC AAG ATC TTC AAT
-2	A K <u>N N C P Q D W L P</u> M N G L C Y K I F N
147	GAA CTG AAG GCC TGG AAG GAT GCA GAG ATG TTC TGC AGG AAA TAC AAG CCA GGC TGC CAC CTC
20	E L K A W K D A E M F C R K Y K P G C H L
210	GCC TCC ATT CAC CTC TAT GGA GAA TCA CCT GAG ATT GCT GAG TAC ATA TCT GAC TAT CAC AAA
41	A S I H L Y G E S P E I A E Y I S D Y H K
273	GGT CAG AGC GAA GTT TGG ATC GGA CTG TGT GAT AAG AAG AAA GAC TTC TCC TGG GAG TGG ACC
61	G Q S E V W I G L C D K K K D F S W E W T
294	GAC AGA TCT TGC ACC GAC TAT CTA AGC TGG GAC AAA AAT CAG CCC GAT CAC TAC CAG AAC AAA
82	D R S C T D Y L S W D K N Q P D H Y Q N K
357	GAA TTC TGC GTT GAG CTT GTG TCC AAT ACA GGG TAT CGC CTG TGG AAT GAT CAG GTG TGC GAG
103	E F C V E L V S N T G Y R L W N D Q V C E
420	TCC AAG AAC <u>GCC TTC CTC TGC CAC TGT AAA TTG</u> GGTACGAGCTCNAAGGGNTAA * ACCATCTGAGGA
124	S K N A F L C H C K L
483	GAGCTGTGCGNCCGCCTGCAGGTAAACCATATGGGAGAGCTCCNAACGCGTTGGATGCATAGCGGAAGTTT
552	TCNAAGTGTCGGGNTTCAAGGT 579

Fig. 3 - Kassab *et al.*, 2004.

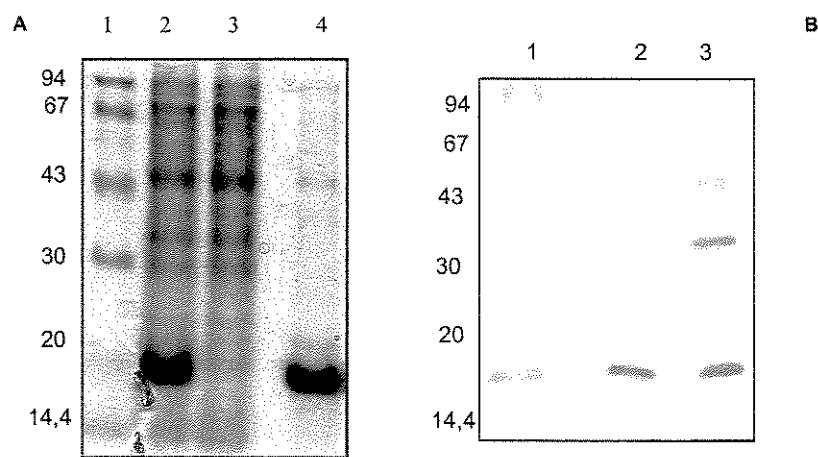


Fig. 4 - Kassab *et al.*, 2004.

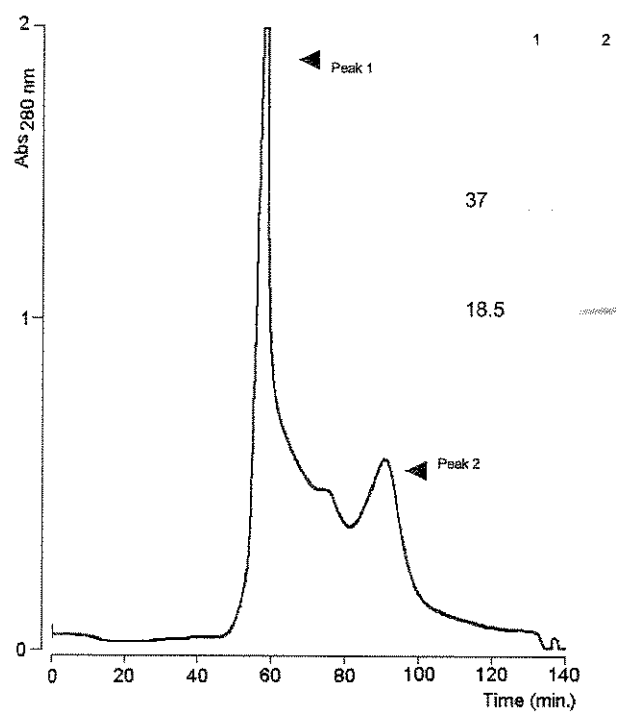


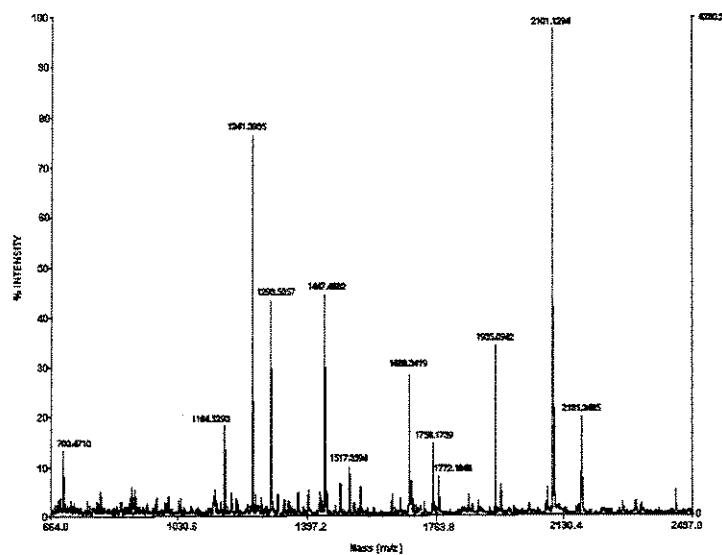
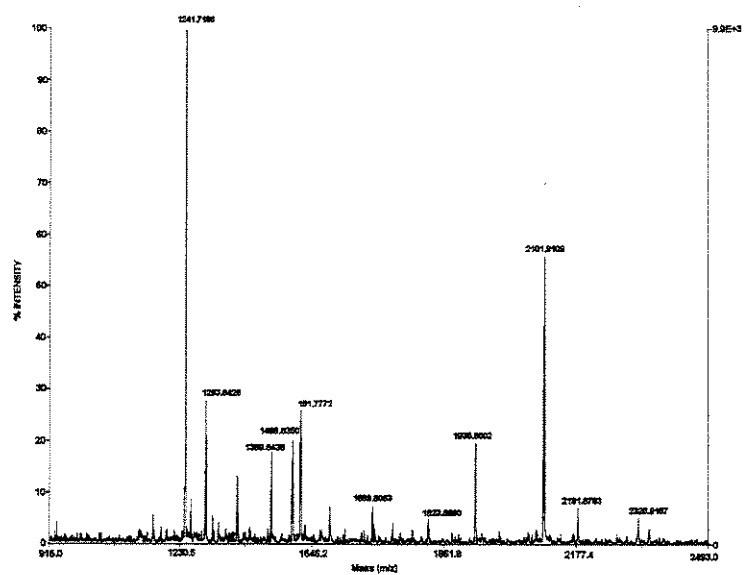
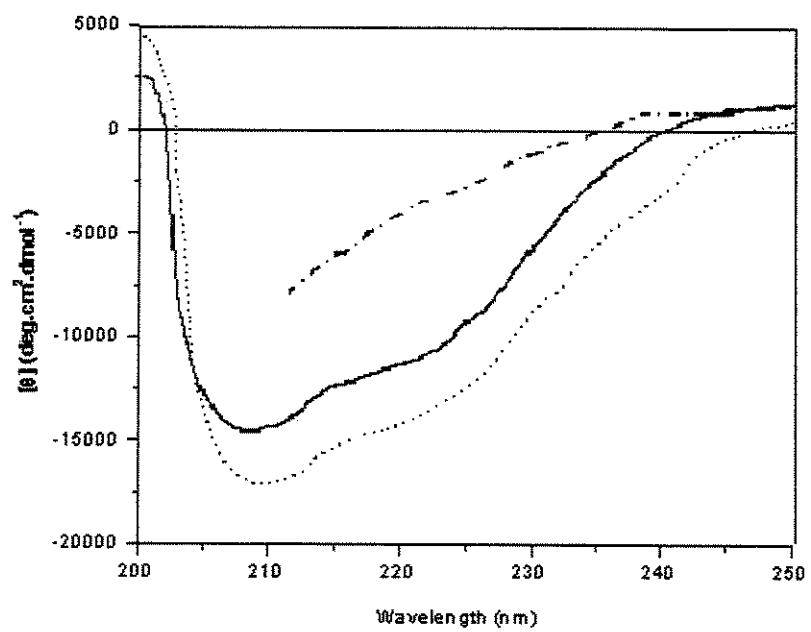
Fig. 5 - Kassab *et al.*, 2004.

Fig. 6 - Kassab *et al.*, 2004

Capítulo 2

Atividade de BJcuL (Lectina do Veneno da Serpente de *Bothrops Jararacussu*) sobre a Proliferação e Produção de Espécies Reativas de Oxigênio em Células Tumerais do Cólon

Short Communication submetido à publicação na revista Toxicon

Bayki H. Kassab, Daniela D. de Carvalho, José C. Novello and Hervé Kovacic. BJcuL (lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) activity on the proliferation and reactive oxygen species generation in colon cancer cells.

Short Communication

BJcuL (lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) activity on the proliferation and reactive oxygen species generation in colon cancer cells.

B. H. Kassab^{1*}, D. D. de Carvalho^{1,2}, J. C. Novello¹ and H. N. Kovacic².

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, Campinas-SP, 13083-970, Brazil.

²UMR 6032 - CNRS, Faculté de Pharmacie, Université de La Méditerranée, Marseille, France.

*To whom correspondence should be addressed:
Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
CP 6109, Campinas, São Paulo.
13083-970, Brazil.
Phone/Fax: (55)(19) 3788 6133
E-mail: kassab@unicamp.br

Abstract

Lectins are polyvalent carbohydrate-binding proteins of non-immune origin. These properties allow the use of certain lectins as probes to detect cell surface carbohydrates, glycoproteins and to identify tumorigenic cells. The aim of this study was to investigate the effect of BJcuL (i) on the proliferation and viability of colon cancer cells, (ii) on the production of the reactive oxygen species (ROS). HT29-D4 and CaCo-2 cell lines were incubated with BJcuL (0 - 10 μ M with 5% FBS) in various periods (24, 48 and 72h). Cell proliferation was assayed by *BrdU*-Cell Proliferation ELISA Kit, and ROS formation was measured using the oxidant-sensitive fluorescent probe DCFH-DA. MTT assay was performed to access BJcuL cytotoxicity. This study suggests that the lectin BJcuL have a functional effect on the growth of HT29-D4 and CaCo-2 cell lines by inhibiting tumor cell proliferation independent of ROS generation and mitochondrial viability. This lectin can be an interesting tool to slowing tumor progression by inhibiting DNA synthesis.

Short Communication

Lectins are proteins or glycoproteins of non-immune origin, with one or more specific carbohydrate-binding site(s) per subunit known as carbohydrate recognition domain (CRD). These proteins represent a structurally homologous and functionally distinct group of proteins (Rini, 1995). The specificity of lectins for carbohydrates has allowed their application in a variety of studies as tumor cell recognition, cell adhesion, mitogenic stimulation, cytotoxicity and apoptosis (Singh *et al.*, 1999).

The lectins are widely distributed in animals, plants and bacteria. Lectin-like proteins (CLPs) have also been found in the venom of snakes belonging to the families of Elapidae and Viperidae. These CLPs can bind to lactose moieties and exhibits different effects on agglutination of erythrocytes (Kassab *et al.*, 2001) and aggregation of platelets (Sarray *et al.*, 2003). Recently, a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu* (BJcuL) was purified and characterized in our laboratory. BJcuL has been identified as homodimer and show to have affinity for β -galactoside (Carvalho *et al.*, 1998). In addition, BJcuL has also been demonstrated to be a potent inhibitor of growth of some tumor cell lines and an endothelial cell line (Pereira-Bittencourt *et al.*, 1999; de Carvalho *et al.*, 2001).

The aim of the present study was to investigate the *in vitro* preliminary effect of the lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu* (BJcuL) on colon cancer cells (HT-29 D4 and CaCo-2) concerning the proliferation and reactive oxygen species (ROS) generation.

BJcuL was purified as previously described (Carvalho *et al.*, 1998), extensively dialyzed against distilled water and lyophilized. The CaCo-2 cell line used was obtained

from American Type Culture Collection (Rockville, MD) and HT-29 D4 clone originated from HT-29 colon adenocarcinoma cell line (Fantini *et al.*, 1986). HT-29 D4 and CaCo-2 cells were routinely grown in DMEM (Dulbecco minimum essential medium) supplemented with 2% L-glutamine, 1% sodium pyruvate and 10% fetal bovine serum (FBS). The cells were harvested and plated in 96-well flat microtiter plates to a density of 5×10^4 cells/ml. After 24h the cells were treated with BJcuL at concentration ranging from 0 - 10 μ M in medium containing 5% FBS and were incubated at 37°C with 5% CO₂ for 24, 48 and 72h. Proliferation assay was measured using BrdU DNA incorporation with *Cell Proliferation ELISA BrdU colorimetric* kit (Roche Diagnostics) with reading absorbance at 490 nm on a plate reader. Intracellular production of ROS by cells treated with BJcuL was measured by oxidation of DCFH-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) to the high fluorescent DCF and was analyzed by a fluorimetre *Fluoroskan Ascent FL* (Labsystems, France) with excitation at 488nm and emission at 530nm (Edwards, 1996). Mitochondrial viability assay was performed using phenol red-free DMEM containing 0,5mg/ml of MTT (3[4,(-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) as described by (van de Loosdrecht *et al.*, 1994).

Lectins find application in variety of cellular studies due their ability to bind selectively to cell surface glycoconjugates. This property has made them valuable tools in the characterization of normal and abnormal carbohydrate structure in human cells (Mody *et al.*, 1995).

The BJcuL, a c-type lectin with affinity to lactose, has showed an interesting inhibitor effect in colon cancer cells proliferation. As showed in Fig. 1, regarding BrdU incorporation in 24h and 48h, 2.5 μ M BJcuL was capable to reduce by $60\% \pm 4,4\%$ for

CaCo-2 and $25\% \pm 4.4\%$ for HT-29 D4. The BJcuL lectin decreases BrdU incorporation in a dose dependent manner.

In contrast to BJcuL effect, previous studies have showed that some lectins act as stimulators of growth on colon cancer cell. The peanut agglutinin–PNA (galactose- β 1, 3-N-acetylgalactosamine binding) has a stimulatory effect on HT-29 D4 cells, but had no effect on CaCo-2, (Ryder *et al.*, 1994). Otherwise, Wang *et al.* (2000) have reported the antiproliferative effect of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, melanoma and osteosarcoma. This study also demonstrates that various lectins with affinity to the same carbohydrate differ in their antitumor activity.

These findings suggest that the sugar-binding domain and others domains of the lectin are responsible for different mechanism of action against tumor cells. The lectin may either stimulate or inhibit cell growth, depending on the cell type target and concentration of lectin (Wang *et al.*, 2000; Camby *et al.*, 2000).

A c-type lectin from the venom of *Macrovipera lebetina*, Lebecetin, also demonstrate be able to strongly reduce IGR39 melanoma and HT29-D4 adenocarcinoma cells adhesion to fibrinogen and laminin (Sarray, 2001).

BJcuL have demonstrated to inhibit the growth of a number of human tumor cell lines (de Carvalho *et al.*, 2001) and we intended to investigate its intracellular mechanism of action with reactive oxygen species generation in tumor cells. Some plant lectins, such as Con A, induce reactive oxygen species (ROS) production in thymus cell proliferation, through an intracellular redox imbalance. This data suggest that the concentration of intracellular ROS might integrate positive and negative signals regulating cell proliferation (Pani *et al.*, 2000).

Our results suggest that BJcuL inhibitory effect on colon cancer cells proliferation may be not correlated to ROS production (Fig. 2). Evidence in the literature shows that intracellular redox imbalance may inhibits proliferation of CaCo-2 independent of ROS production (Noda *et al.*, 2001). According to figure 2, we could observe, when compared to the control, a slight cellular ROS variation in the cells incubated with BJcuL in different time. This substantial modification of ROS generation in CaCo-2, and more remarkable in HT-29 D4 cell lines, did not appear to have a direct effect on BJcuL antiproliferative activity. In fact, will be necessary a more detailed study of the ROS production and redox imbalance, through of others sensitive techniques to measure intracellular redox status.

Mitochondrial viability of colon cancer cells in the presence of the lectin was unaltered (Fig. 3). BJcuL at 2.5 μ M was not cytotoxic to HT29-D4 and CaCo-2 in 72h, it was already observed for CaCo-2 cells in previous publications by the group (Pereira-Bittencourt *et al.*, 1999).

The contradictory results between the observed with BrdU incorporation and mitochondrial viability indicate a possible BJcuL direct influence in DNA synthesis. Our results suggests that BJcuL could act inhibiting DNA synthesis, making cells evade the proliferation, but surviving to a condition of cell dormancy, where mitochondrial activity can be measured (Chen, 2000).

In this study we demonstrate that the lectin BJcuL can to cause change in colon tumor cell proliferation independent of ROS imbalance, furthermore, BJcuL showed a weak cytotoxic effect on these cell lines, since MTT assay to measure the mitochondrial activity, did not show any decrease in cell viability.

Based on BJcuL effect on the proliferation of cancer cells, we searched for molecular aspects that could help us to clarify mechanisms, which the lectin would act. Otherwise, detailed investigations of BJcuL mechanism in the modulation of cell proliferation will be necessary.

Acknowledgements

This work was supported by grants from CAPES (Brazil). The authors would like to thank Dr. C. Briand director of UMR CNRS 6032 from Université de la Méditerranée, for her contribution in this work.

References

- Camby, I.; Janssen, T.; Decker, R.; Petein, M.; Raviv, G.; Pasteels, J-L; Kiss, R. and Danguy, A. (1996) Lectin-induced alterations on the proliferation of three human prostatic cancer cell lines. *In Vitro Cell. Dev.Biol.-Animal*, **32**, 633-639.
- Carvalho, D.D., Marangoni, S., Oliveira, B. and Novello, J.C. (1998) Isolation and Characterization of A New Lectin From the Venom of the Snake *Bothrops Jararacussu*. *Biochem. Mol. Biol. Intl.* **44**, p. 933-938.
- Chen, Q.M. (2000). Replicative senescence and oxidant-induced premature senescence. Beyond the control of cell cycle checkpoints. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **908**,111-125.
- de Carvalho, D.D.; Schimtmeyer, S., Novello, J.C. and Markland, F.S. (2001). Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. *Toxicon* **39**, 1471-1476.
- Edwards, S.W. (1996) The O₂ Generating NADPH Oxidase of Phagocytes: Structure and Methods of Detection. *Method. Enzimol.* **9**, 563-577.
- Fantini, J.; Abadie, B.; Tiraid, A.; Remy, L.; Ripert, J. P.; el Battari, A. and Marvaldi, J. (1986). Spontaneous and induced dome formation by two clonal cell populations derived from adenocarcinoma cell line, HT-29 D4. *J. Cell. Sci* **83**, 235-249.
- Kassab, B. H. de Carvalho, D.D.; Marangoni, S.; and Novello, J.C. (2001). Characterization of a hemagglutinating glycoprotein isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Prot. Pep. Letters* **8**, 13-20.
- Mody, R., Joshi, S. and Chaney, W. (1995) Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *J. Pharmac. Toxicol. Methods* **33**, 1-10.
- Noda, T.; Iwakiri, R.; Fujimoto, K. and Aw, T. Y. (2001). Induction of mild intracellular redox imbalance inhibits proliferation of CaCo-2 cells. *FASEB J.* **15**, 2131-2139.
- Pani, G., Colavitti, R., Bedogni, B., Anzevino, R., Borellom S. and Galeotti, T. (2000) A redox signaling mechanism for density –dependent inhibition of cell growth. *J. Biol. Chem.* **275**, 38891-38899.
- Pereira-Bittencourt M.; Carvalho D.D.; Gagliardi A.R. and Collins D.C. (1999) The effect of a lectin from the venom of the snake, *Bothrops jararacussu*, on tumor cell proliferation. *Anticancer Res.* **19**, 4023-4025.
- Rini, J.M. (1995) Lectin structure. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**, 551-577.
- Ryder, S. D.; Smith, J.A.; Rhodes, E.G.H.; Parker, N. and Rhodes, J.M. (1994) Proliferative response of HT29 and Caco2 human colorectal cancer cell proliferation by b- galactoside specific lectins. *Gastroenterology* **106**, 85-93.
- Sarray, S.; Srairi, N.; Hatmi, M.; Luis, J.; Louzir, H.; Regaya, I.; Slema, H.; Marvaldi, J.; El Ayeb, M. and Marrakchi, N. (2003). Lebecetin, a potent antiplatelet c-type lectin from *Macrovipera lebetina* venom. *Bioch. Bioph. Acta* **1651**, 30-40.
- Sarray, S.; Srairi, N.; Luis, J.; Marvaldi, J.; El Ayeb, M. and Marrakchi, N. (2001). Lebecetin, a C-lectin protein from the venom of *Macrovipera lebetina* that inhibits platelet aggregation and adhesion of cancerous cells. *Haemostasis* **31**, 173-176.
- Singh, R. S.; Tiwary, A. K. and Kennedy, J. F. (1999). Lectins: sources, activities, and applications. *Crit. Rev. Biotech.* **19**, 145-178.
- Van de Loosdrecht, A.A. (1994) A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *J. Immunol. Methods* **174**, 311-320.

Wang, H.; Ng, T.B.; Ooi, V.E.C.; and Liu, W.K. (2000) Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 365-372.

LEGENDS

Figure 1. Effect of BJcuL on the HT29-D4 and Caco-2 cell proliferation. Cells (5×10^4 /ml) were treated with BJcuL at different concentrations (0-10 μ M) for 24 and 48h. BrdU incorporation of untreated cells was considered 100%. Data are mean $\pm$ sd from three experiments.

Figure 2. Production of reactive oxygen species (ROS) in colon cancer cells in the presence of BJcuL at 2.5 μ M. ROS were measured using oxidation of DCFH-DA to DCF in a fluorimetre *Fluoroskan Ascent FL* with excitation at 488nm and emission at 530nm. The untreated cells were considered as control. Data are mean $\pm$ sd from three experiments.

Figure 3. Effect of BJcuL on mitochondrial viability of colon cancer cells. The data are expressed as the relative mitochondrial viability of BJcuL treated cells in comparison with the untreated cells.

Figure 1 - Kassab *et al*; 2004

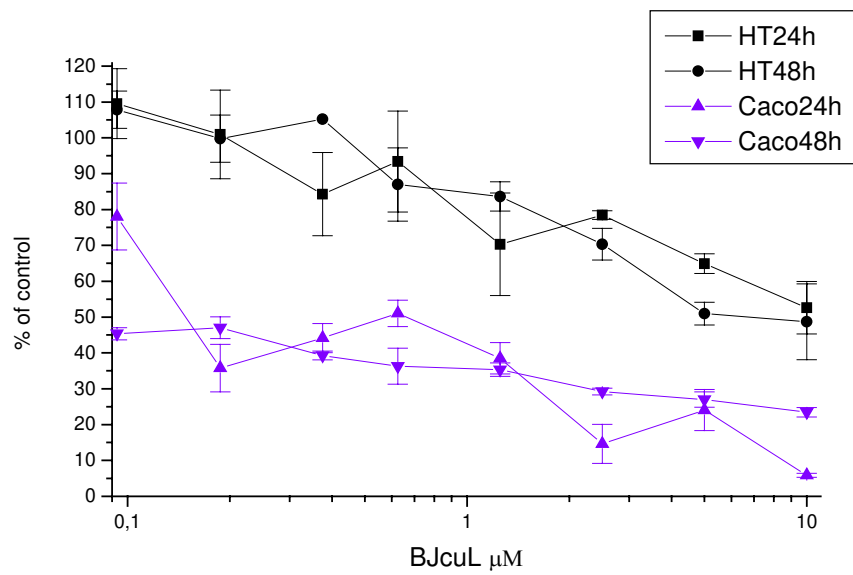


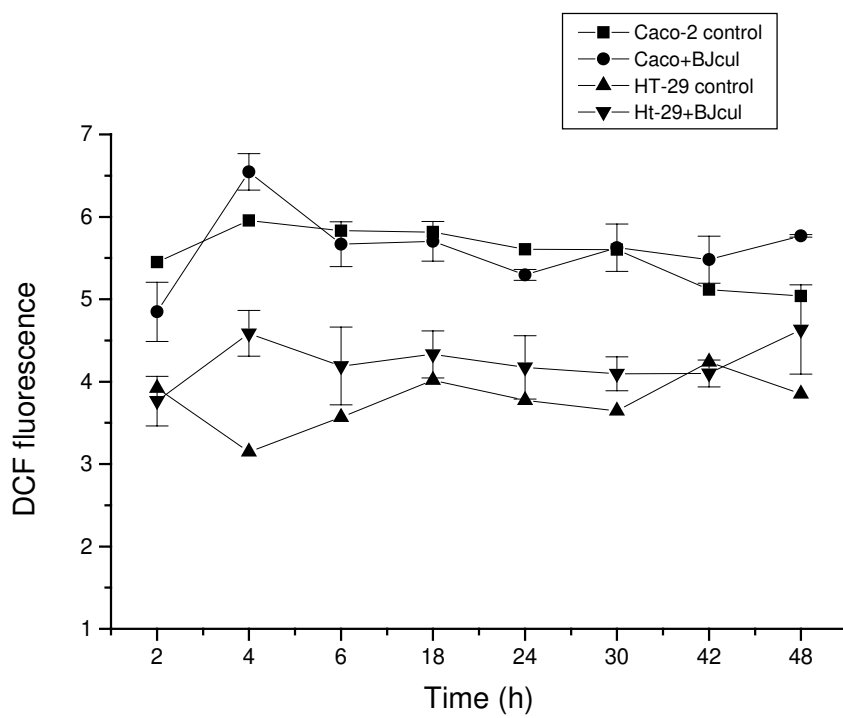
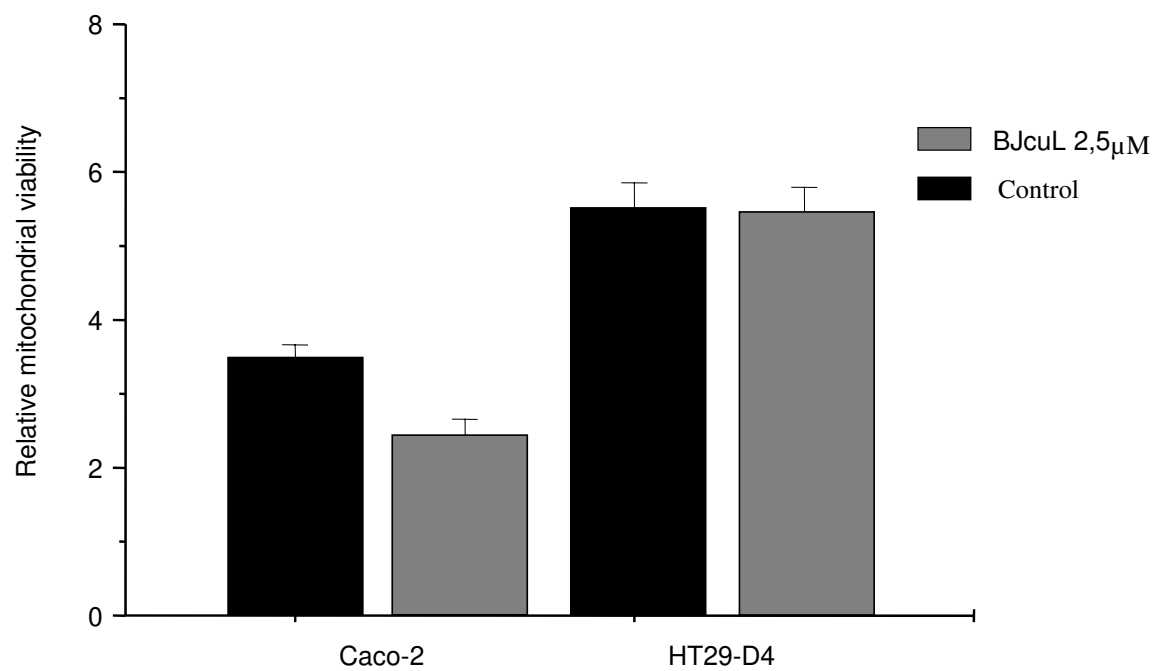
Figure 2 - Kassab *et al*; 2004

Figure 3 - Kassab *et al*; 2004

↓ **CONCLUSÕES GERAIS**

➤ Foi construída uma biblioteca de cDNA a partir da glândula de veneno da serpente de *Bothrops jararacussu*. A seqüência total do cDNA correspondente a BJcuL (cDNA-BJcuL), permitiu-nos deduzir a seqüência de aminoácidos da lectina do veneno da serpente *Bothrops jararacussu*. Entre os 622 pares de bases presentes na estrutura do cDNA-BJcuL, foi constatado que 470 pb formam a região codificadora de aminoácidos e 91 pb na direção 5'-3' não são traduzidos (peptídeo sinal altamente conservado em várias lectinas). Após o seqüenciamento do cDNA e submissão à análise em banco de dados (GenBank acesso **N°AY388642**), foi possível comprovar a identidade do cDNA-BJcuL, amplificado com outras lectinas de veneno de serpentes. Todos os resíduos altamente conservados encontrados nas moléculas pertencentes à superfamília das lectinas do Tipo-C, estão presentes na seqüência de aminoácidos deduzida para BJcuL. Os resíduos de meia-cistina, estão bem conservados e localizados nas posições correspondentes ao grupo VII de lectinas do tipo-C (Drickamer, 1993),

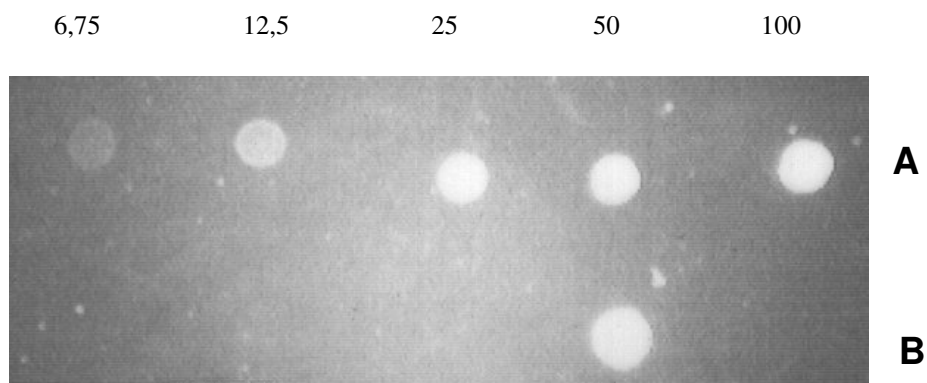
➤ O sistema de expressão para cDNA-BJcuL, foi adequadamente desenvolvido. O cDNA-BJcuL amplificado a partir de primers sintetizados com enzimas coesivas foi corretamente ligado ao vetor de expressão correspondente - pET-15b. A lectina recombinante (rBJcuL) foi expressa como corpos de inclusões em *E. coli* BL21DE3 e solubilizada em uréia. O rendimento da rBJcuL variou entre 10 a 12 mg de monômero por litro de cultura celular. O precipitado protéico foi purificado em coluna de afinidade de níquel, e as análises preliminares revelou-nos a presença de rBJcuL com

peso molecular aparente de 18,5 kDa, o qual corresponde ao peso molecular de BJcuL nativa (16 kDa), somados aos 20 aminoácidos adicionais (incluindo cauda de Histidina) presentes no vetor pET-15b. Processos seqüenciais de renaturação foram feitos, com o objetivo de obter a lectina rBJcuL como homodímero (forma ativa da proteína). Após análises em SDS-PAGE e western blot, foi possível visualizar a presença de duas bandas de 37 kDa e 18,5 kDa, correspondente à rBJcuL na forma dimérica e monomérica, respectivamente. O homodímero rBJcuL renaturado foi purificado em Superdex-G75 e apresentou um eficiente rendimento final de 3,0 mg/L.

➤ A proteína recombinante rBJcuL com peso molecular de 37 kDa foi corretamente renaturada. A conformação estrutural adquirida pela lectina após processos de renaturação foi analisada e comparada com a proteína nativa por dicroísmo circular, Maldi-Tof e ensaios da atividade hemaglutinante. Os resultados obtidos apontam semelhanças em relação aos aspectos estruturais (conformação estrutural, ligação dissulfeto, formação do CRD) de ambas lectinas. Estas semelhanças foram confirmadas nos ensaios de hemaglutinação. A concentração mínima de rBJcuL que promoveu hemaglutinação em eritrócitos do tipo A foi de 1.5 µg/ml e também foi inibida por lactose. Os dados mostrados confirmam a eficiência do sistema de expressão, purificação e renaturação desenvolvidos neste trabalho, para a produção da lectina recombinante do veneno da serpente *B. jararacussu*.

➤ Nesta parte do trabalho buscamos relacionar alguns fenômenos envolvidos na proliferação de células tumorais de cólon como HT29-D4 e CaCo-2 induzidos por BJcuL nativa, como ensaios com BrdU, medida de produção de ROS e viabilidade celular. A lectina BJcuL mostrou-se como um potente inibidor da proliferação de linhagens CaCo-2. BJcuL na concentração de 2,5µM promoveu a diminuição de $60\% \pm 4,4\%$ em 48h na incorporação de BrdU em CaCo-2. Enquanto que para as células HT29-D4 essa diminuição foi de aproximadamente $25\% \pm 4,4\%$. O efeito de BJcuL na diminuição da incorporação de BrdU, nas células CaCo-2 e HT-29 D4, foi dose dependente. A participação da lectina como um inibidor no crescimento de células tumorais de cólon parece não estar diretamente relacionada à produção de ROS, pois na presença da proteína BJcuL, foi observado um atenuado aumento de aproximadamente 20 a 30% na concentração relativa de ROS (H_2O_2) nestas células tumorais. Até o período de 48h, BJcuL não modulou a viabilidade mitocondrial das células HT 29-D4 e Caco-2. Resultados semelhantes foram descritos por (Carvalho e cols., 2001) em várias linhagens de células tumorais incubadas com BJcuL. Diferenças entre os resultados encontrados para BJcuL, na incorporação de BrdU e na viabilidade mitocondrial, nos remete a considerar uma possível modulação de BJcuL na síntese de DNA nestas células sem influenciar diretamente na atividade da mitocôndria.

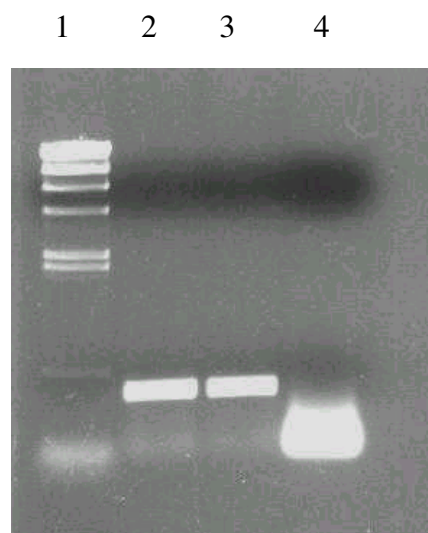
↓ **APÊNDICES**



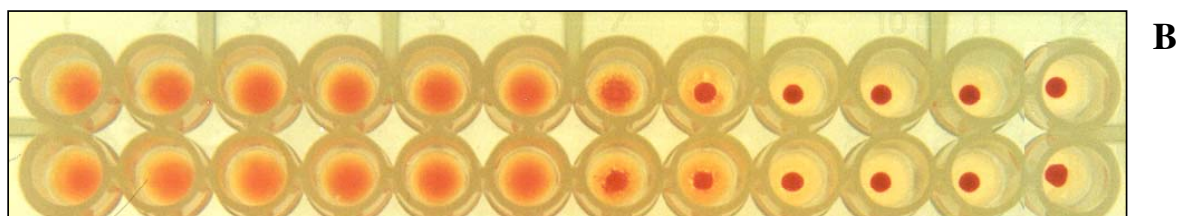
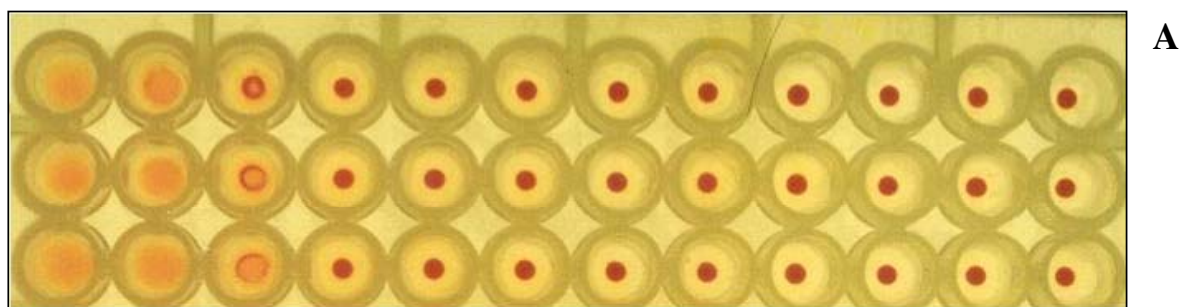
Quantificação do cDNA-BJ após a síntese da dupla fita. A: corresponde a concentrações (ng/ μ l) conhecidas de DNA λ hind. B: corresponde a 1 μ l do cDNA-BJ.

Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para amplificar BJcuL

Nome	5'	Sequência	3'
Lec-1		ACTCGCACACCTGATCAT	
T3universal		AATTAACCCTCACTAAAGGG	
T7promotor		TTAATACGACTCACTAT	
Lec 3		AAYTTRCANTGRCANAGRAANGC	
Lec 4		AATAATTGTCCCCAGGATTGG	
Lec 5- <i>Nde</i> I	GGAATTCCATATGATGAATAATTGTCCCCAGGAT		
Lec 6- <i>Bam</i> HI	CGGGATCCAATTTACAGTGGCAGAGGAAGGC		



Eletroforese em gel de agarose/TAE 0.7%. *Lane 1*, marcador de DNA λ /*HindIII*. *Lane 2* and *3* mostra o produto amplificado com TA= 55°C, usando Lec 3 e Lec 4 como óligos. *Lane 4*, controle da reação.



Ensaio de hemaglutinação após 2 horas de incubação. **A:** suspensão de eritrócitos humanos tipo A incubados com rBJcuL partindo da concentração de 4,5µg/ml (coluna 1) e diluídas serialmente. **B:** eritrócitos humanos tipo A incubados com BJcuL nativa com concentração inicial de 1,58 µg/mL. (Carvalho *et al*, 1998).

Abreviações para Lectinas

BJcuL	lectina de <i>Bothrops moojeni</i>
BmooL	lectina de <i>Bothrops moojeni</i>
BJL	lectina de <i>Bothrops jararaca</i>
BML	lectina de <i>Lachesis muta</i>
CML	lectina de <i>Ancistrodon piscivorous leukostoma</i>
CuHL	lectina de <i>Agkistrodon contortrix contortrix</i>
JML	lectina de <i>Dendroaspis jamesonii</i>
LmsL	lectina de <i>Lachesis muta stenophrys</i>
MBP	lectina de plasma de rato
MMGL	lectina de macrófagos de camundongo
Pal	lectina de <i>Bitis arietans</i>
RSL	lectina de <i>Crotalus atrox</i>
TL	lectina de <i>Bothrops atrox</i>
TSL	lectina de <i>Trimeresurus stejnegeri</i>
WGA	lectina de gérmen de trigo

Abreviações para Aminoácidos

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

Abreviações para Bases Nitrogenadas

Bases Nitrogenadas	Código
Adenina 6-aminopurina	A
Guanina 2-amino-6-oxipurina	G
Citosina 2-oxi-4aminopirimidinac	C
Timina 2,4-dioxi-5-metilpirimidina	T
Uracil 2-4-dioxipirimidina	U
Adenina ou Guanina	R
Adenina ou Timidina	W
Citosina ou Timidina	Y
Guanina ou Timidina	K
Uma das 4 bases	N

Comunicações em Congressos

KASSAB, B. H.; OLIVEIRA, M. A.; de CARVALHO, D. D.; BAPTISTA, G. R.; PEREIRA, G. A.G and NOVELLO, J. C. Cloning, Expression and Structural Analysis of Recombinant BJcuL, a c-type lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambú-MG. 2004.

de CARVALHO, D. D.; **KASSAB, B. H.;** REY, V.; ROGNONI, J. B. and KOVACIC, H. Characterization and signalizing of the Nox2 isoformes expression in the colon cancer cells lines. Trabalho a ser submetido para publicação.

KASSAB, B. H.; de CARVALHO, D. D.; KOVACIC, H.; NOVELLO, J. C. Investigation of the effect of BJcuL, a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*, on proliferation and reactive oxigen species generation in colon cancer cells. In: Reunião Anual da Federação da Sociedade de Biologia Experimental, Curitiba-PR. 2003.

KASSAB, B. H.; OLIVEIRA, M. A.; de CARVALHO, D. D.; PEREIRA, G. A. G.; NOVELLO, J.C. The cDNA cloning of BJcuL, a lectin from the venom of *Bothrops jararacussu*. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambú-MG. 2001.

KASSAB, B. H.; de CARVALHO, D. D.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C. Identification of a glycoprotein wich binds β -galactosides from the *Bothrops moojeni* venom. In: 18th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Birmingham, UK. 2000.

KASSAB, B. H.; de CARVALHO, D. D.; SMOLKA, M. B.; NOVELLO, J. C. Snake Venom Lectins: A Comparative study with BmooL (*Bothrops moojeni* Lectin) and BjcuL (*Bothrops jararacussu* Lectin). In: XXIXA REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambú-MG. 2000.

KASSAB, B. H.; de CARVALHO, D. D.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C. Characterization of BMooL: A C-type Lectin from *Bothrops moojeni* Venom. In: XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambú-MG. 1999.

ATIVIDADE DIDÁTICA

Estágios.

Programa de Estágio docente na Atividade Supervisionada de Apoio a Docência 2001.

Monitoria da disciplina a distância Bioquímica da Nutrição curso a distância via internet, oferecido aos alunos da USP, UNICAMP e EXTECAMP 1999-2002.

Auxílio Didático na disciplina Bioquímica Básica para Medicina, 2 ° semestre 1999.

Professora da Disciplina Bioquímica da Nutrição. Participação no planejamento da disciplina, através do curso Ensino de Bioquímica 1° semestre 1999.

Palestras.

Palestras ministradas ao curso de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular na disciplina Tópicos em Fisiologia:

1. Estrutura e Propriedades dos Aminoácidos
2. Estrutura de Proteínas
3. Modificações Pós-traducionais de Proteínas.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Participação do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior -PDEE.
CNRS-UMR 6032, Université de la Méditerranée, Laboratoire de l'Interaction entre Systèmes Protéiques et Différenciation dans la Cellule Tumorale – Marseille-France.

↓ **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abe, Y.; Iwabushi, M. and Ishi, S. I. (1971) Multiple Forms in the Subunit Structure of Concanavalin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, p. 1271-1278.
- Aragón-Ortiz, F.; Mentele, R. and Auerswald, E. A. (1996) Amino acid sequence of lectin-like protein from *Lachesis muta stenophrys* venom. *Toxicon*, **34**, p. 763-769.
- Barondes, S. H. (1998). Bifunctional Properties of Lectins: Lectins Redefined. *Trends Biochem. Sci.*, **13**, p. 480-482.
- Barondes, S. H.; Castronovo, V.; Cooper, D. N. W.; Cummings, R. D.; Drickamer, K.; Feizi, T.; Gitt, M. A.; Hirabayashi, J.; Hughes, C.; Kasai, K-I; Leffler, H.; Liu F-T; Lotan, R.; Mercúrio, A. M.; Monsigny, M.; Pillai, S.; Poirer, F.; Raz, A.; Rigby, P. W.J.; Rini, J. M. and Wang, J. L. (1994) Galectins: a Family of Animal β -Galactoside Binding Lectins. *Cell*, **79**, p. 597-598.
- Barravieira, B. and Pereira, P. C. M. (1994) Acidentes por Serpentes do Gênero *Bothrops* In: Barravieira, B. Venenos Animais 1. ed. Epuc. Rio De Janeiro Brasil.
- Bjarnason, J. B. and Fox, J. W. (1994) Hemorrhagic Metalloproteinases From Snake Venoms. *Pharmacol. and Therap.* **62**, p. 325-372.
- Boyd, W. C. and Shapleigh, E. (1954): Antigenic Relations of Blood Group Antigens as Suggested by Tests with Lectins. *J. Immunol.* **73**, p. 226-231.
- Burdon, R.H. (1995). Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Rad. Biol. Med.* **18**, 775-794.
- Camby, I.; Janssen, T.; Decker, R.; Petein, M.; Raviv, G.; Pasteels, J-L; Kiss, R. and Danguy, A. (1996) Lectin-induced alterations on the proliferation of three human prostatic cancer cell lines. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*, **32**, 633-639.

- Carvalho, D.D., Marangoni, S., Oliveira, B. and Novello, J.C. (1998) Isolation and Characterization of A New Lectin From the Venom of the Snake *Bothrops Jararacussu*. *Biochem. Mol. Biol. Intl.* **44**, p. 933-938.
- Chen, Q.M. (2000). Replicative senescence and oxidant-induced premature senescence. Beyond the control of cell cycle checkpoints. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **908**, 111-125.
- Chen, Y. L. and Tsai, I. H. (1995) Functional and Sequence Characterization of Agkicetin, A New Glicoprotein-Ib Antagonist Isolated from *Agkistrodon acutus* Venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **210**, p. 472-477.
- Chippaux, J. P.; Goyffon, M. (1998) Venoms, antivenoms and immuotherapy. *Toxicon*; **36**, p. 823-46.
- Chippaux, J. P.; Williams, V.; White J. (1991) Snake Venom Variability: Methods of Study, Results and Interpretation. *Toxicon*; **29**, p. 1279-1303.
- Chuman, Y.; Nobuhisa, I.; Ogawa, T.; Deshimaru, M.; Chijiwa, T.; Tan, N.; Fukumaki, Y.; Shimohigashi, Y.; Ducancel, F.; Boulain, J.; Ménez, A. and Ohno, M. (2000). Regional and accelerated molecular evolution in group I snake venom gland phospholipase A₂ isozymes. *Toxicon*, **38**, 449-462.
- Daltry, J. C.; Wiister, W. and Thorpe, R. S. (1996) Diet and Snake Venom Evolution. *Nature*, **379**, p. 537-540.
- de Carvalho, D.D., Marangoni and Novello, J.C. (2001) Primary Structure Characterization of *Bothrops Jararacussu* Snake Venom Lectin. *J.Prot.Chem.* **21**, 43-50.

- Drickamer, K. (1988) Two Distinct Classes of Carbohydrate Recognition Domains in Animal Lectins. *J. Biol. Chem.* **263**, p. 9557-9560.
- Drickamer, K. (1993). Evolution of Ca^{2+} -dependent animal lectins. *Prog. Nucl. Acid Res.* **45**, 207-232.
- Drickamer, K. (1995) Increasing Diversity of Animal Lectin Structure. *Curr.Opin. Struct. Biol.*, **5**, p. 612-616.
- Drickamer, K. and Taylor, M. E. (1999) C-type lectin-like domains. *Curr.Opin. Struct. Biol.*, **9**, p. 585-590.
- Eable, J.A.; Niland, S.; Dennes, A.; Schmidt-Hederich, A.; Bruckner, P. and Brunner, G. (2002). Rhodocetin antagonizes stromal tumor invasion in vitro and other $\alpha 2\beta 1$ integrin-mediated cell functions. *Matrix Biol* **21**, 547-558.
- Ebner, S.; Sharon, N. and Ben-Tal, N. (2003). Evolutionary Analysis Reveals Collective Properties and Specificity in the C-type Lectin and Lectin-Like Domain Superfamily. *Proteins* **52**, 44-55.
- Etzler, M. E. (1985) Plant Lectins: Molecular and Biological Aspects. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **36**, p. 209-234.
- França, F. O. S. and Fan, H. W. (1992) Acidente Botrópico. In: Schvartsman, S. Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos. Ed. Sarvier, 149 p. São Paulo.
- Gabius, H. J. (1997) Animal Lectins. *Eur. J. Biochem.*, **243**, p. 543-576.
- Gabius, H.-J.; Andre, S.; Kaltner, H. and Siebert, H.-C. (2002) The sugar code: functional lectinomics. *Biochim. Biophys. Acta*, **1572**, 165– 177.

- Gartner, T. K. and Ogilvie, M.L. (1984) Isolation and Characterization of Three Ca^{2+} – Dependent β -Galactoside-Specific Lectins from Snake Venoms. *Biochem. J.*, **224**, p. 301-307.
- Gould, R. J.; Polokoff, M. A.; Friedman, P. A.; Huang, T. F.; Holt, J.C.; Cook, J. J. and Niewiarowski, S. (1990) Disintegrins: A Family of Integrin Inhibitory Proteins from Viper Venoms (Minireview). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **195**, p. 168-171.
- Gutiérrez, M. J. and Rucavado, A. (2000) Snake Venom Metalloproteinases: Their role in the Pathogenesis of Local Tissue Damage. *Biochimie.*, **82**, 841-850.
- Harison, F. L. (1991) Soluble vertebrate Lectins: ubiquitous but inscrutable proteins. *J. Cell Sci.*, **100**, p 9-14.
- Hembold, W.; Fehres, J.; Prokop, O. and Uhlenbruck, G. (1986) B and T lymphocytes Mitogenic Properties in a Snake Venom. *Biomed. Biochim. Acta.*, **45**, p. 459-466.
- Hirabayashi, J.; Kusunoki, T. and Kasai K-I.(1991). Complete Primary Structure of a Galactose-Specific Lectin from the Venom of the Rattlesnake *Crotalus atrox*. *J. Biol. Chem.*, **266**, p. 2320-2326.
- Irjala, H.; Johansson, E.L.; Grenman, R.; Alanen, K.; Salmi, M. and Jalkanen, S. (2001) Mannose receptor is a novel ligand for L-selectin and mediates lymphocyte binding to lymphatic endothelium, *J. Exp. Med.* **194**, 1033– 1041.
- Jeon, O-H and Kim, D-H. (1999). Molecular cloning and functional characterization of a snake venom metalloprotease. *Eur. J. Biochem.*, **263**, 526-533.
- Jeyaseelan, K.; Armugan, A.; Lachumanan, R.; Tan, C. H. and Tan, N. H. (1998). Six isoforms of cardiotoxin in Malayan spitting cobra (*Naja naja sputatrix*) venom: cloning and characterization of cDNAs. *Bioch. Bioph. Acta*, **1380**, 209-222.

- Jia, L. G.; Bjarnason, J. B.; Shimokawa, K. I. and Fox, J. W. (1999) Inhibitor of Platelet Aggregation by the Recombinant Cysteine Rich Domain of the Hemorrhagic Snake Venom Metalloproteinases, Atrolysin A. *Arch. Biochem. Biophys.*, **373**, 281-286.
- Jia, L. G.; Shimokawa, K. I.; Bjarnason, J. B. and Fox, J. W. (1996) Snake Venom Metalloproteinases: Structure, Function and Relationship to the ADAMS Family of Proteins. *Toxicon*, **34**, p.1269-1276.
- Kamiguti, A. S. and Sano-Martins, I. S. (1995). South American Snake Venoms Affecting Haemostasis. *J. Toxicol. Toxin Rev.*, **14**, p.359-374.
- Kamiguti, A. S.; Zuze, M. and Theakston, R.G.D. (1998) Snake Venom Metalloproteinases and Disintegrins: Interactions with Cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **31**, p. 853-862.
- Kassab, B.H.; de Carvalho, D.D.; Marangoni, S. and Novello, J.C. (2001) Characterization of a hemagglutinating glycoprotein isolated from *Bothrops moojeni* snake venom, *Prot. Pept. Letters* **8** 13-20.
- Kawabata, S. Iwanaga, S. (1999) Role of lectins in the innate immunity of horseshoe crab, *Dev. Comp. Immunol.* **23**, 391– 400.
- Kilpatrick, D.C. (2002a) Mannan-binding lectin: clinical significance and applications, *Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 401– 413.
- Kilpatrick, D.C. (2002b) Mannan-binding lectin: clinical significance and applications, *Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 401– 413.
- Kilpatrick, D.C. and Green, C. (1992) Lectins as blood typing reagents, in: H. Franz (Ed.), *Advances in Lectin Research*, vol. 5, Ullstein Mosby, Berlin, , pp. 51–94.

- Kim, M.; Rao, M. V.; Tweardy, D.J.; Prakash, M.; Galili, U. and Gorelik, E. (1993). Lectin-induced apoptosis of tumor cells. *Glycobiology* **3**, 447-453
- Kini, R. N. (1996) Are C-Type Lectin-Related Proteins Derived By Proteolysis of Metalloproteinase/Disintegrin Precursor Proteins? *Toxicon*, **34**, p. 1287-1294.
- Kini, R. N. and Evans, H. J. (1992). Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and noenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. *Toxicon*, **30**, 265-293.
- Kishore, U.; Eggleton, P. and Reid, K. B. M. (1997) Modular Organization of Carbohydrate Recognition Domains in Animal Lectins. *Matrix Biol.*, **15**, p. 583-592.
- Kobata, A. (1998). A retrospective and prospective view of glycopathology. *Glycoconjugate J.*, **15**, 323-331.
- Komorís, Y.; Nikai, T.; Tohkai, T.; and Sugihara, R. (1999) Primary structure and biological activity of snake venom lectin (APL) from *Agkistrodon p. piscivorus* (eastern cottonmouth). *Toxicon*, **37**, 1053-1064.
- Lis, H. and Sharon, N. (1986) Lectins as Molecules and as Tools. *Annu. Rev. Biochem.*, **55**, p. 35-67.
- Markland, F. S. (1998) Snake Venoms and the Hemostatic System. *Toxicon*, **36**, p. 1749-1800.
- Matsui, T.; Fujimura, Y.; Titani, K. (2000) Snake Venom Proteases Affecting Hemostasis and Thrombosis. *Biochem. Biophys. Acta*; **1477**, p. 146-156.

- Melgarejo, A. R. (2003) Serpentes Peçonhentas do Brasil. in: Cardoso, J. L. C.; França, F. O. S.; Wen, F. H.; Málaque, C. M. S. e Haddad Jr., V. Animais Peçonhentos no Brasil, 1º ED. Sarvier, São Paulo, Brasil.
- Mody, R.; Joshi, S. and Chaney, W. (1995). Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *J. Pharmac. Toxicol. Methods*, **33**, 1-10.
- Moshfegh K.; Lengweiler, S.; Haner, M.; Aebi, U.; Steiner, B. and Beer, J.H. (1998). Fine structural and functional consequences of deglycosylation of the platelet adhesion receptor GPIb-IX (CD 42b). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **249**, 903-909.
- Nagata, Y and Burger, M. M. (1972) Wheat Germ Agglutinin. Isolation and Characterization. *J. Biol. Chem.*, **247**, p. 2248-2254.
- Ogden, C.A.; de Cathehneau, A.; Hoffmann, P.R.; Bratton, D.; Ghe-brehiwet, B.; Fadok, V.A. and Henson, P.M. (2001) C1q and mannose-binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macro-pinocytosis and uptake of apoptotic cells, *J. Exp. Med.* **194**, 781–795.
- Ogilvie, M. L; Byl, J. A.W. and Gartner, T.K. (1989) Platelet Aggregation is Stimulated By Lactose-Inhibitable Snake Venom Lectins. *Thromb. Haem.*, **62**, p. 704-707.
- Ohkura, M.; Miyashita, Y.; Nikai, T.; Suzuki, J.; Komori, Y.; Sugihara, H. and Ohizumi, Y.(1996) Properties of Ca^{++} Released Induced by Puff Adder Lectin, a Novel Lectin from the Snake *Bitis arietans*, in Sarcoplasmic Reticulum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **277**, p. 1043-1048
- Paine, M. J. I.; Moura-De-Silva, A. M.; Theakston, R. G. D. and Crampton, J. M. (1994) Cloning of Metalloproteinase Genes in the Carpet Viper (*Echis Pyramidum*

- Leakey). Further Members of the Metalloprotease/Disintegrin Gene Family. *Eur J. Biochem.*, **224**, p. 483-488.
- Pani, G., Colavitti, R., Bedogni, B., Anzevino, R., Borellom S. and Galeotti, T. (2000). A redox signaling mechanism for density –dependent inhibition of cell growth. *J. Biol. Chem.* **275**, 38891-38899.
- Pereira-Bittencourt M.; Carvalho D.D.; Gagliardi A.R. and Collins D.C. (1999). The effect of a lectin from the venom of the snake, *Bothrops jararacussu*, on tumor cell proliferation. *Anticancer Res.***19**, 4023-4025.
- Pervaiz, S., Cao, J., Chao, O.S., Chin, Y.Y. and Clement, M.V. (2001). Activation of the RacGTPase inhibits apoptosis in human tumor cells. *Oncogene* **20**, 6263-6268.
- Rádis-Baptista, G.; Oguiura, N.; Hayashi, M.A.F.; Camargo, M.E.; Grego, K.F.; Oliveira, E.B. and Yamane, T. (1999). Nucleotide s^equence of crotamine isoform precursors from a single South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Toxicon*, **37**, 973-984.
- Rini, J.M. (1995) Lectin structure. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **24**, 551-577.
- Ryder, S. D.; Smith, J.A.; Rhodes, E.G.H.; Parker, N. and Rhodes, J.M. (1994). Proliferative response of HT29 and Caco2 human colorectal cancer cell proliferation by b- galactoside specific lectins. *FASEB J.*, **4**, 2912-2918
- Sahu, S.C. (1991). Roles of oxygen free radicals in the molecular mechanisms of carcinogenesis: a review. *J. Environ. Sci. Health C* **9**, 83-112.
- Sarray, S.; Srairi, N.; Luis, J.; Marvaldi, J.; El Ayeb, M. and Marrakchi, N. (2001). Lebecetin, a C-lectin protein from the venom of *Macrovipera lebetina* that inhibits platelet aggregation and adhesion of cancerous cells. *Haemostasis* **31**, 173-176.

- Schvartsman, S. (1992) Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos- SARVIER- São Paulo.
- Sharon, N. (1972) Lectins: Cell-agglutinating and Sugar-specific Proteins. *Science*, **177**, p. 949-959.
- Sharon, N. (1993) Lectin-Carbohydrates Complexes of Plants and Animals. An Atomic View. *Trends Biochem. Sci.*, **18**, p. 221-226.
- Sharon, N. and Lis, H. (1993) Carbohydrates in Cell Recognition. *Sci. Am.*, **268**, 82-89.
- Shin, Y. and Morita, T. (1998) Rhodocytin, a functional novel Platelet Agonist belonging to the heterodimeric C-type Lectin Family, induces platelet aggregation independently of Glycoprotein Ib. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **245**, 741-5.
- Singh, R. S.; Tiwary, A. K. and Kennedy, J. F. (1999) Lectins: sources, activities, and applications. *Crit. Rev. Biotech.*, **19**, 145-178.
- Stockert, R.J., Morell, A.G. and Scheinberg, I.H. (1974) Mammalian hepatic lectin, *Science*, **186**, 365– 366.
- Szatrowski, T.P. and Nathan, C.F. (1991) Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* **51**, 794-798.
- Tani, A.; Ogawa, T.; Nose, T.; Nikandrov, N. N.; Deshimaru, M.; Chijiwa, T.; Chang, C-C.; Fukumaki, Y. and Ohno M. (2002) Characterization, Primary Structure and Molecular Evolution of Antioagulant Protein from *Agkistrodon actus* Venom. *Toxicon*, **40**, 803-813.

- Thannickal, V.J. and Fanburg, B.L. (2000). Reactive oxygens species and cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **279**, L1005-L1028.
- Tu, A. T. (1988) Overview of Snake Venom Chemistry. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **391**, p. 37-62.
- Varanda, E. A. and Giannini, M. J. S. (1994) Bioquímica dos Venenos de Serpentes. in: Barravieira, B. Venenos Animais, 1º Ed. Epuc, Rio De Janeiro, Brasil
- Wada, J.; Ota, K.; Kumar, A.; Wallner, E.I. and Kanwar, Y.S. (1997) Developmental regulation, expression and apoptotic potential of galectin-9, a beta-galactoside binding lectin, *J. Clin. Invest.* **99**, 2452– 2461.
- Wang, H.; Ng, T.B.; Ooi, V.E.C.; and Liu, W.K. (2000). Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 365-372.
- Weis, W.I. and Drickamer, K. (1996). Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Ann. Rev. Biochem.*, **65**, 441-473.
- Xu, Q.; Wu, X-F.; Xia, Q-C. and Wang, K-Y. (1999). Cloning of a Galactose-binding Lectin from the Venom of *Trimeresurus stejnegeri*. *Biochem. J.*, **341**, 33-737.
- Xu, Q.; Zeng, R. Wu, X-F. and Wang, K-Y. (2000). Expression of Isolated C-type Carbohydrate Recognition Domains. *Biochem. Biophys. Res. Com*, **271**, 677-681.
- Yamamoto, K.; Ishida, C.; Shinohara, Y.; Hasegawa, Y.; Konami, Y.; Osawa, T. and Irimura, T. (1994) Interaction of Immobilized Recombinant Mouse C-Type Macrophage Lectin with Glycopeptides and Oligosaccharides. *Biochemistry*, **33**, 8159-8166.

- Yoon, T.J.; Yoo, Y. C.; Kang T.B.; Shimazaki K-I; Song, S.K.; Lee,K. H.; Kin, S. H.; Park, C.H.; Azuma, I. and Kim, J.B. (1999). Lectins isolated from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) induce apoptosis in tumor cells. *Cancer Letters*, **136**, 33-40.
- Zatta, P.F. and Cummings, R.D. (1991). Lectins and their uses as Biotechnological Tools. *Biochem. Educ.*, **20**, p. 2-9.
- Zelensky, A.L. and Gready, J.E. (2003). Comparative Analysis of Structural Properties of the C-Type-Lectin Domain (CTLD) *Proteins*, **52**, 466-477.
- Zeng, R.; Xu, Q.; Shao, X-X.; Wang, K-Y and Xia Q-C. (1999). Characterization and Analysis of a Novel Glycoprotein from Snake Venom Using Liquid Chromatography-electrospray Mass Spectrometry and Edman Degradation *Eur. J. Biochem.*, **266**, 352-358.
- Zha, H.-G.; Lee, W.-H. and Zhang, Y. (2001). Cloning of cDNAs Encoding C-type Lectins from Elapidae Snakes *Bungarus fasciatus* and *Bungarus multicinctus*. *Toxicon* **39**, 1887-1892.
- Zha, X.-D.; Liu, J. and Xu, Kang-sen (2004). CDNA Cloning, Sequence Analysis, and Recombinant Expression of Akitonin beta, a C-type Lectin-like from *Agkistrodon acutus*. *Acta Pharmacol. Sin.* **25**, 372- 377.