

Ciclótidos: péptidos macrocíclicos presentes en plantas (Revisión)

Adriana M. Broussalis y Graciela E. Ferraro

Cátedra de Farmacognosia, IQUIMEFA (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Junín 956 (1113) Ciudad Autónoma de Buenos Aires. República Argentina. Correo electrónico: abrouss@ffyb.uba.ar

Resumen

En los últimos años, péptidos macrocíclicos, de 28 a 37 residuos de aminoácidos (ciclótidos) fueron aislados de tres familias de plantas: Rubiaceae, Violaceae y Cucurbitaceae. En la familia Violaceae parecen estar presentes en todos los géneros y especies. Los ciclótidos están conformados por un esqueleto cíclico, formado por una priodicidad continua de uniones peptídicas. Contienen 6 residuos de cisteína, que forman 3 puentes disulfuro que estabilizan la molécula. Sus propiedades físicas, que incluyen la resistencia a la degradación térmica y enzimática, pueden atribuirse a su esqueleto cíclico y a los puentes disulfuro que, al formar el arreglo estructural nudo de cistina cíclico, otorgan gran estabilidad a la molécula. La función natural de los ciclótidos en las plantas, teniendo en cuenta su actividad insecticida, es como moléculas de defensa, mientras que sus otras actividades biológicas (que incluyen las actividades uterotónica, anti-HIV, antitumoral y antimicrobiana) les otorgan un gran potencial como moléculas líderes para el desarrollo de nuevas drogas en las industrias farmacéutica y agroquímica. Es también de gran interés la potencial aplicación de los ciclótidos como moldes de péptidos para la introducción de un amplio rango de diferentes bioactividades.

Cyclotides: macrocyclic peptides found in plants (Review)

Summary

Over recent years, several macrocyclic peptides (28-37 aminoacids) have been isolated from the Rubiaceae, Violaceae and Cucurbitaceae plant families and they seem to be present in all genera and species of Violaceae examined. This cyclotide family is characterized by a circular proteine backbone and six conserved cysteine residues linked by three disulfide bonds. Their physical properties including resistance to thermal and enzymatic degradation can be attributed to this cyclic backbone and knotted arrangement of disulfide bonds, which conform a cyclic cystine knot. These features make cyclotides attractive templates for incorporating desired amino acid sequences, opening the possibility for future developments in drug design. They have a diverse range of biological activities (including uterotonic, anti HIV, antitumor and antimicrobial activities) which make them interesting targets for both pharmaceutical and agrochemical research. Insecticidal activity suggests that natural function of cyclotides is defending their host plants from pathogens and pests.

Palabras clave: ciclótidos - Violaceae. - Rubiaceae - Cucurbitaceae - CCK - actividades biológicas.

Key words: Cyclotides - Violaceae - Rubiaceae - Cucurbitaceae - CCK - biological activities.

Polipéptidos en plantas

Un vasto número de polipéptidos biológicamente activos como hormonas, neurotransmisores y veneno de serpientes fueron aislados de fuentes humanas y animales. Desde hace tiempo se conoce la existencia de péptidos en plantas —en la década de 1950 Samuelsson aisló las toxinas del muérdago—, sin embargo, hasta hoy, fueron informados solo un número limitado de polipéptidos de fuentes vegetales (Claeson y col., 1998).

El interés en las plantas como fuente de nuevos péptidos y proteínas biológicamente activos se incrementó en tiempos recientes y, consecuentemente, también la búsqueda de nuevas estructuras con potencial biomédico y biotecnológico a partir de la investigación de las distintas especies vegetales (Göransson y col., 2003).

Las plantas superiores producen una gran variedad de polipéptidos y de proteínas biológicamente activos de diferentes clases, por ejemplo, defensinas, ciclótidos, lectinas (Carlini y Grossi-de-Sá, 2002; Peumans y Van Damme, 1995) con actividades antimicrobiana, inmunomoduladora, anti HIV y antitumoral (O'Keefe, 2001); proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) con actividades RNA N-glicosidasa y polinucleótido adenosin glicosidasa (Peumans y col., 2001). Las RIPs se han propuesto como sustancias anticancerígenas por su toxicidad selectiva hacia las células tumorales y también en diversas aplicaciones, como inmunotoxinas (Sandvig y van Deurs, 2000), abortivos (Yeung y col., 1988) y agentes anti HIV (Mc Grath y col., 1989; Zarling y col., 1990).

A su vez, los péptidos antimicrobianos presentes en las plantas conforman otro gran grupo de compuestos bioactivos clasificados en distintas familias que incluyen las tioninas (O'Keefe, 2001), con actividad citotóxica (Li y col., 2002) y anticancerígena (Johansson y col., 2003); las defensinas (O'Keefe, 2001) con actividad antimicrobiana (Tang y col., 1999) y antiviral (Tam y Lu, 1998) y también algunas citotóxicas (Yu y col., 2000) y, finalmente, los ciclótidos, la mayor familia de proteínas circulares, descubierta en los últimos años (Trabi y Craik, 2002).

Péptidos cíclicos

Pequeños péptidos cíclicos, como los antibióticos

de origen microbiano, son comunes en la naturaleza. Tienen mayor estabilidad y actividad biológica que los no cíclicos y, en consecuencia, fueron ampliamente empleados en la industria farmacéutica, como la ciclosporina (Craik y col., 1999).

Estos péptidos cíclicos clásicos contienen menos de 15 residuos de aminoácidos, generalmente sin uniones disulfuro y sin una estructura tridimensional bien definida. Son típicamente sintetizados en microorganismos por enzimas. Se encuentran en hongos y en bacterias e incluyen la ciclosporina y la gramicidina (Jennings y col., 2001).

Ciclótidos

En los últimos años se aislaron péptidos cíclicos de mayor tamaño, de 30 residuos de aminoácidos, que tienen estructuras semejantes a las verdaderas proteínas (Craik y col., 1999). Entre ellos están: kalata B1, las circulinas, cyclopsychotride, varios péptidos de *Viola arvensis* Murray (Violaceae).

Originariamente, estos péptidos macrocíclicos fueron descubiertos en programas de *screening* al azar o mediante estudios etnofarmacológicos de especies nativas. En el caso de kalata B1 —el primer ciclótido descrito a principios de 1960— cabe señalar que las mujeres africanas de la tribu de Lulula usaban un extracto acuoso de *Oldenlandia affinis* (R et S) DC. (Rubiaceae) como agente uterotónico en los partos. En 1970 se descubrió que el principio activo era un péptido de 29 aminoácidos, (Gran, 1973b) y Saether y col. (1995) demostraron que era cíclico. Las circulinas, aisladas de *Chassalia parvifolia* Shumann (Rubiaceae), fueron descubiertas a partir de un programa de *screening* al azar sobre actividad anti-HIV (Gustafson y col., 1994). El cyclopsychotride A, presente en *Psychotria longipes* Muel. Arg. (Rubiaceae), fue descubierto a partir de un *screening* de inhibición de la unión de neurotensina a las membranas celulares en extractos vegetales (Witherup y col., 1994).

Varios péptidos de distintas especies de *Viola* (Claeson y col., 1998; Göransson y col., 1999) fueron hallados a partir de un *screening* de actividad hemolítica. Palicourein fue aislado de *Palicourea condensata* Standl (Rubiaceae) a partir de un *screening* de actividad anti-HIV (Bokesch y col., 2001).

Así, todos los péptidos macrocíclicos conocidos tienen distintas actividades biológicas. Tam y col.

(1999) informaron que kalata B1, cyclopsychotride A y circulinas A y B inhiben el crecimiento de microorganismos y, por su parte, Jennings y col. (2001), descubrieron la actividad insecticida de kalata B1.

Estas actividades sugieren que los ciclótidos intervienen en los mecanismos de defensa contra microorganismos y en la defensa de las plantas contra insectos (Jennings y col., 2005), dado que se encuentran en cantidades considerables en las especies vegetales que los contienen (más de 1 g/kg en hojas) (Craik y col., 1999). Todas sus actividades biológicas en los sistemas celulares de los mamíferos parecen estar relacionadas de una manera u otra con la interacción con las membranas, una característica común a las moléculas de defensa de las plantas (Felizmenio-Quimio y col., 2001).

Estructura de los ciclótidos

Los ciclótidos presentes en las plantas son péptidos macrocíclicos, de 28 a 37 aminoácidos, con esqueleto cíclico (de ahí el nombre ciclo-péptidos: ciclótidos), es decir, un ciclo continuo de uniones peptídicas (uniones amida) que conforman ese esqueleto. Contienen 6 residuos de cisteína (Cys), formando 3 puentes disulfuro que estabilizan la molécula (Craik y col., 1999). Debido a su estructura bien definida y a sus potentes actividades biológicas, estas moléculas pueden ser consideradas como miniproteínas (Felizmenio-Quimio y col., 2001).

Sus propiedades físicas, que incluyen la resistencia a la degradación térmica y enzimática (Colgrave y Craik, 2004), pueden atribuirse a su esqueleto cíclico y a los puentes disulfuro que, al formar el arreglo estructural nudo de cistina cíclico, otorgan gran estabilidad a la molécula (Daly y col., 1999b; Craik y col., 2002; Barry y col., 2003). Actualmente, el nudo de cistina cíclico (CCK) es un motivo estructural perfectamente establecido en un amplio rango de polipéptidos y proteínas, presentes en especies tan diversas como microorganismos, insectos, plantas y animales (Craik y col., 2001).

Secuencia y estructura 3D de los ciclótidos

Los ciclótidos conocidos se alinean en función de los 6 residuos de Cys conservados (nombrados de I

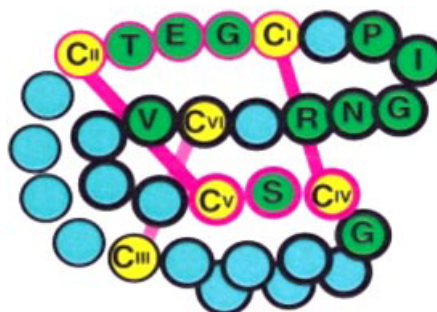
a VI). Los *loops* (vueltas o rulos) del esqueleto del ciclótido que corresponden a las regiones entre los residuos de Cys están numerados de 1 a 6.

En los *loops* están expuestas las cadenas de aminoácidos responsables de las diversas actividades de los ciclótidos. La excepcional estabilidad de la estructura del nudo de cistina cíclico lo convierte en una excelente plantilla sobre la cual podrían injertarse un amplio rango de actividades biológicas (Craik, 2001).

La mayoría de los ciclótidos descritos en plantas de las familias Violaceae y Rubiaceae tienen secuencias que les permiten su clasificación en dos subgrupos o familias principales, conocidas como brazaletes y Möebius. Como indican Craik y colaboradores (2002) esta nomenclatura se basa en la presencia o la ausencia de un residuo cis-prolina en el *loop* 5, que introduciría una torsión (*twist*) en el esqueleto circular del péptido, y constituyen así, el ciclótido Möebius (Rosengren y col., 2003). El ciclótido kalata B8, recientemente descubierto, parecería ser un híbrido de estas dos principales familias y presentaría flexibilidad conformacional en el nudo de cistina (Daly y col., 2006).

Un análisis de los residuos conservados y de las variables de los 6 *loops* de la secuencia de los ciclótidos da idea de las variaciones estructurales que podrían ser posibles en el diseño de nuevos ciclótidos con aplicaciones farmacéuticas (Craik y col., 2002).

Figura 1.- Esquema de los residuos variables y los conservados en los ciclótidos conocidos



Los residuos conservados están indicados por su letra abreviada; coloreados en amarillo para las 6 cisteínas conservadas y en verde, para los demás aminoácidos conservados. Los residuos variables están coloreados en azul y las uniones disulfuro, en rojo (Craik y col., 1999).

A semejanza de las proteínas, estos péptidos adoptan una compacta estructura tridimensional (3D) (Chen y col., 2006). La estructura 3D de cuatro miembros de la familia de los ciclótidos –kalata B1 (Saether y col., 1995), ciculina A (Daly y col., 1999a), cicloviolacina O1 (Craik y col., 1999) y MCoTI-II (Hernández y col., 2000; Felizmenio-Quimio y col., 2001)– fue determinada por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN). Estos estudios revelaron que los cuatro ciclótidos tienen plegamientos similares (Craik y col., 1999). En general, el interior del ciclótido está conservado en su estructura, y las mayores variaciones ocurren fuera de la región del nudo de cistina (Craik y col., 2002).

Distribución taxonómica

En la actualidad se han descripto más de 50 ciclótidos en solo tres familias de plantas: Rubiaceae, Violaceae y, más recientemente, Cucurbitaceae. En la familia Violaceae estos péptidos macrocíclicos parecen estar presentes en todos los géneros y las especies estudiados hasta ahora (Göransson y col., 2003; Svängård y col., 2003; Trabi y Craick, 2004; Trabi y col., 2005; Simonsen y col., 2005).

Flora argentina

Con respecto a la flora argentina, el estudio fitoquímico de *Hybanthus parviflorus* (Lf) Baill. (Violacea), condujo al aislamiento y a la determinación de la estructura primaria del ciclótido hypa A, descripto por primera vez por Broussalis y col. (2001). Por otra parte, se simplificó la metodología original para la extracción y la purificación de ciclótidos mediante una partición butanol/agua. Asimismo, es la primera vez que se describe un ciclótido en una especie vegetal argentina (Broussalis y col., 2001).

Por otra parte, se analizaron por HPLC y espectrometría de masa tándem –por medio de una nueva metodología para la secuenciación– los ciclótidos presentes en seis especies diferentes de *Viola*. Esta estrategia permitió secuenciar dos nuevos ciclótidos aislados de *Viola cotyledon* Ging., vico A y vico B (Göransson y col., 2003).

Figura 2.- Secuencia de aminoácidos del ciclótido hypa A



Flecha de trazo único: sitio de clivaje con endoproteinasa Glu-C® punto de partida arbitrario para la numeración de los aas. Flechas punteadas: sitios de clivaje con tripsina (Broussalis y col., 2001).

Actividades biológicas y farmacológicas registradas para ciclótidos

Los ciclótidos tienen un amplio rango de actividades biológicas, algunas de las cuales permiten clasificarlos como toxinas. Estas actividades incluyen la actividad uterotónica (Gran, 1973a; 1973b; Gran y col., 2000), antimicrobiana (Tam y col., 1999), insecticida (Jennings y col., 2001; 2005), anti-HIV (Gustafson y col., 1994; Daly y col., 1999a; Bokesch y col., 2001; Gustafson y col., 2004; Daly y col., 2004), antagonista de neurotensina (Witherup y col., 1994) e inhibitoria de la tripsina (Hernández y col., 2000), así como también hemolítica (Claeson y col., 1998; Göransson y col., 1999; Chen y col., 2006), anticáncer (Lindholm y col., 2002; Göransson y col., 2004b); Herrmann y col., 2006; Svängård y col., 2004) y cardiotóxica (Gran, 1973c).

Cycloviolacin O2 demostró un efecto potente –no tóxico y reversible– contra la incrustación de moluscos cirrópodos en las embarcaciones, lo que permitiría evitar graves problemas técnicos y económicos en la acuicultura y la navegación (Göransson y col., 2004a).

Todas estas actividades parecerían tener la característica común de estar asociadas con la desorganización de las membranas, aunque probablen-

te las membranas sean el sitio de acción de su función natural en las plantas como moléculas de defensa (Craig, 2001). Esto es consistente con los ensayos informados sobre la actividad antimicrobiana de los ciclótidos (Tam y col., 1999).

Uso potencial de los ciclótidos

Los ciclótidos presentan un amplio rango de actividades biológicas y tienen, debido a su estructura, una estabilidad excepcionalmente elevada. La aplicabilidad de los péptidos lineales, como drogas, es potencialmente limitada por su susceptibilidad al clivaje proteolítico y por su escasa biodisponibilidad. La estabilidad puede aumentarse, en principio, si se unen los extremos de los péptidos cuyos N- y C-terminales estén relativamente próximos. La industria farmacéutica aplica comúnmente la ciclación para estabilizar la conformación de pequeños péptidos lineales pero no, para polipéptidos y proteínas (Craig, 2001). Estas limitaciones podrían ser superadas con el empleo de la estructura de los ciclótidos como andamiaje para el desarrollo de nuevas drogas con diferentes actividades (Craig y col., 2002).

El amplio rango de actividades biológicas atribuidas a estas compactas moléculas sugiere que la estabilidad provista por el nudo de cistina cíclico (CCK) las convierte en modelos promisorios para nuevos agentes en las industrias farmacéutica (Hernández y col., 2000; Barry y col., 2004) y agrícola (Alexander, 2001). Por este motivo, se exploró en el diseño de estos polipéptidos cíclicos con el fin de desarrollar análogos sintéticos, metabólicamente estables, en los que se pueda disociar la acción farmacológica específica de la citotoxicidad para producir potenciales modelos terapéuticos (Tam y col., 2000). Sobre esta estructura podrían injertarse aminoácidos diferentes a los de la secuencia nativa para obtener nuevas funcionalidades y actividades (Craig, 2001; Simonsen y col., 2004; Craig y col., 2006).

Dado que los ciclótidos son potentes insecticidas y podrían servir de modelo para compuestos con potenciales aplicaciones en agricultura, tendrían también interesantes aplicaciones en agronomía (Jennings y col., 2001; 2005). Por otra parte, está abierta la posibilidad de emplear plantas transgénicas o microorganismos para fabricar péptidos cíclicos

con aplicaciones farmacéuticas o agrícolas (Baillie Gerritsen, 2002).

En resumen, si se tiene en cuenta su actividad insecticida, la función natural de los ciclótidos en las plantas probablemente sería como moléculas de defensa, mientras que sus otras actividades biológicas les otorgan un gran potencial como moléculas líderes para el desarrollo de nuevas drogas. De esta manera presenta un gran interés la potencial aplicación de los ciclótidos como moldes de péptidos para la introducción de un amplio rango de diferentes bioactividades.

El potencial de los ciclótidos –por sus características estructurales y a sus propiedades específicas– amplía en forma práctica la aplicación de los péptidos en la industria farmacéutica (Craig y col., 2002; Vogel y Chan, 2005; Clark y col., 2006).

Referencias bibliográficas

- Alexander, R. (2001). “Choking on a knot: insecticidal properties of cyclotides”. *Trends in Biochemical Sciences* 26(10): 588.
- Baillie Gerritsen, V. (2002). “The protein with a topological twist”. March, Issue 20, *Protein Spotlight*.
- Barry, D.G.; Daly, N.L.; Clark, R.J.; Sando, L. and Craig, D.J. (2003). “Linearization of a Naturally Occurring Circular Protein Maintains Structure but Eliminates Hemolytic Activity”. *Biochemistry* 42: 6688-6695.
- Barry, D.G.; Daly, N.L.; Bokesch, H.R.; Gustafson, K.R. and Craig, D.J. (2004). “Solution structure of the cyclotide palicourein: implications for the development of a pharmaceutical framework”. *Structure* 12: 85-89.
- Bokesch, H.R.; Pannell, L.K.; Cochran, P.K.; Sowder, R.C.; McKee, T.C. and Boyd, M.R. (2001). “A novel anti-HIV macrocyclic peptide from *Palicourea condensata*”. *Journal of Natural Products* 64: 249-250.
- Broussalis, A.M.; Göransson, U.; Coussio, J.D.; Ferraro, G.; Martino, V. and Claeson, P. (2001). “First cyclotide from *Hybanthus* (Violaceae)”. *Phytochemistry* 58: 47-51.
- Carlini, C.R. and Grossi-de-Sá, M.F. (2002). “Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides”. *Toxicon* 40: 1515-1539.

- Chen, B.; Colgrave, M.L.; Wang, C. and Craik, D.J. (2006). "Cycloviolacin H4, a Hydrophobic Cyclotide from *Viola hederaceae*". *Journal of Natural Products* 69: 23-28.
- Claeson, P.; Göransson, U.; Johansson, S.; Luijendijk T. and Bohlin, L. (1998). "Fractionation protocol for the isolation of polypeptides from plant biomass". *Journal of Natural Products* 61:77-81.
- Clark, R.J.; Daly, N.L. and Craik, D.J. (2006). "Structural plasticity of the cyclic-cystine- knot framework: implications for biological activity and drug design". *Biochemistry Journal* 394: 85-93.
- Colgrave, M.L. and Craik, D.J. (2004). "Thermal, Chemical, and Enzymatic Stability of the Cyclotide Kalata B1: The Importance of the Cyclic Cystine Knot". *Biochemistry* 43: 5965-5975.
- Craik, D.J. (2001). "Plant cyclotides: circular, knotted peptide toxins". *Toxicon* 39: 1809-1813.
- Craik, D.J.; Daly, N.L.; Bond, T. and Waine, C. (1999). "Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif". *J. Mol. Biol.* 294: 1327-1336.
- Craik, D.J.; Daly, N.L. and Waine, C. (2001). "The cystine knot motif in toxins and implications for drug design". *Toxicon* 39: 43-60.
- Craik, D.J.; Simonsen, S. and Daly, N.L. (2002). "The cyclotides: novel macrocyclic peptides as scaffolds in drug design". *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 5 (2): 251-260.
- Craik, D.J.; Cemazar, M. and Daly, N.L. (2006). "The cyclotides and related macrocyclic peptides as scaffolds in drug design". *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 9 (2): 251-260.
- Daly, N.L., Koltay, A.; Gustafson, K.R.; Boyd, M.R.; Casas-Finet, J.R. and Craik, D.J. (1999a). "Solution structure by NMR of circulin A: a macrocyclic knotted peptide having anti-HIV activity". *J. Mol. Biol.* 285: 333-345.
- Daly, N.L.; Love, S.; Alewood, P.F. and Craik, D.J. (1999b). "Chemical Synthesis and folding pathways of large cyclic polypeptides: Studies of the cystine knot polypeptide Kalata B1". *Biochemistry* 38: 10606-10614.
- Daly, N.L.; Gustafson, K.R. and Craik, D.J. (2004). "The role of the cyclic peptide backbone in the anti-HIV activity of the cyclotide kalata B1". *FEBS Letters* 574: 69-72.
- Daly, N.L.; Clark, J.; Plan, R. M. and Craik, D.J. (2006). "Kalata B8, a novel antiviral circular protein, exhibits conformational flexibility in the cystine knot motif". *Biochemistry Journal* 393: 619-626.
- Felizmenio-Quimio, M.E.; Daly, N.L. and Craik, D.J. (2001). "Circular proteins in plants. Solution structure of a novel macrocyclic trypsin inhibitor from *Momordica cochinchinensis*". *J. Biol. Chem.* 276(25): 22875-22882.
- Göransson, U.; Luijendijk, T.; Johansson, S.; Bohlin, L. and Claeson, P. (1999). "Seven novel macrocyclic polypeptides from *Viola arvensis*". *Journal of Natural Products* 62: 283-286.
- Göransson, U.; Broussalis, A.M. and Claeson, P. (2003). "Expression of *Viola* cyclotides by liquid chromatography - mass spectrometry and tandem mass spectrometry sequencing of intercysteine loops after introduction of charges and cleavage sites by aminoethylation". *Analytical Biochemistry* 318: 107-117.
- Göransson, U.; Sjögren, M.; Svängård, E.; Claeson, P. and Bohlin, L. (2004a). "Reversible Antifouling Effect of the Cyclotide Cycloviolacin O2 against Barnacles". *Journal of Natural Products* 67: 1287-1290.
- Göransson, U.; Svängård, E.; Claeson, P. and Bohlin, L. (2004b). "Novel strategies for isolation and characterization of cyclotides: the discovery of bioactive macrocyclic plant polypeptides in the Violaceae". *Cur. Protein Pept. Sci.* 5(5): 317-319.
- Gran, L. (1973a). "Oxytocic principles of *Oldenlandia affinis*". *Lloydia* 36: 174-178.
- Gran, L. (1973b). "On the effect of a polypeptide isolated from 'Kalata-kalata' (*Oldenlandia affinis* DC) on the oestrogen dominated uterus". *Acta Pharmacol. Toxicol.* 33: 400-408.
- Gran, L. (1973c). "The uteroactive principles of 'kalata-kalata' (*Oldenlandia affinis* DC.) Isolation, identification and pharmacodynamic evaluation of uteroactive principles found in a plant used in African folk medicine". Sxrtrykk av Meddelelser fra Norsk Farmaceutisk Selskap 35, 15. From the Institute of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, University of Oslo, Blindern, Oslo 3, Norway.
- Gran, L.; Sandberg, F. and Sletten, K. (2000). "*Oldenlandia affinis* (R&S) DC A plant containing uteroactive peptides used in African traditional me-

- dicine". *Journal of Ethnopharmacology* 70: 197-203.
- Gustafson, K.R.; Sowder, R.C.; Henderson, L.E.; Parsons, I.C.; Kashman, Y.; Cardellina, J.H.; McMahon, J.B.; Buckheit, R.W.; Pannell, L.K. and Boyd, M.R., (1994). "Circulin A and circulin B -novel HIV- inhibitory macrocyclic peptides from the tropical tree *Chassalia parvifolia*". *J. Am. Chem. Soc.* 116: 9337-9338.
- Gustafson, K.R.; Mc Kee, T.C. and Bokesch, H.R. (2004). "Anti-HIV cyclotides". *Curr. Protein Pept. Sci.* 5(5): 331-340.
- Hernández, J.F.; Gagnon, J.; Chiche, L.; Nguyen, T.M.; Andrieu, J.P.; Heitz, A.; Hong, T.T.; Pham, T.T.C. and Nguyen, D.L. (2000). "Squash trypsin inhibitors from *Momordica cochinchinensis* exhibit an atypical macrocyclic structure". *Biochemistry* 39: 5722-5730.
- Herrmann, A.; Svängård, E.; Claeson, P.; Gulbo, J.; Bohlin, L. and Göransson, U. (2006). "Key role of glutamic acid for the cytotoxic activity of the cyclotide cycloviolacin O2". *Cell Mol. Life Sci.* 63: 235-245.
- Jennings, C.; West, J.; Waine, C.; Craik, D. and Anderson, M. (2001). "Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: The cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis*". *PNAS* 98(19): 10614-10619.
- Jennings, C.; Rosengren, K.J.; Norelle, L.; Daly, L.; Plan, M.; Stevens, J.; Scanlon, M.J.; Waine, C.; Norman, D.G.; Anderson, M.A. and Craik, D.J. (2005). "Isolation, Solution and Insecticidal Activity of Kalata B2, a Circular Protein with a Twist: Do Möbius Strips Exist in Nature?" *Biochemistry* 44: 851-860.
- Johansson, S.; Gullbo, J.; Lindholm, P.; Ek, B.; Thunberg, E.; Samuelsson, G.; Larsson, R.; Bohlin, L. and Claeson, P. (2003). "Small, novel proteins from the mistletoe *Phoradendron tomentosum* exhibit highly selective cytotoxicity to human breast cancer cells". *Cell. Mol. Life Science* 60(1): 165-175.
- Li, S.S.; Gullbo, J.; Lindholm, P.; Larsson, R.; Thunberg, E.; Samuelsson, G.; Bohlin, L. and Claeson, P. (2002). "Ligatoxin B, a new cytotoxic protein with a novel helix-turn-helix DNA-binding domain from the mistletoe *Phoradendron liga*". *Biochemical Journal* 366: 505-513.
- Lindholm, P.; Göransson, U.; Johansson, S.; Claeson, P.; Gullbo, J.; Larsson, R.; Bohlin, L. and Backlund, A. (2002). "Cyclotides: A novel type of cytotoxic agents". *Molecular Cancer Therapeutics* 1(6): 365-369.
- Mc Grath, M.S.; Hwang, K.M.; Caldwell, S.E.; Gaston, I.; Luk, K.C.; Wu, P.; Ng, V.L.; Crowe, S.; Daniels, J. and Marsh, J. (1989). "GLQ223: an inhibitor of human immunodeficiency virus replication in acutely and chronically infected cells of lymphocyte and mononuclear phagocyte lineage". *PNAS* 86(8): 2844-2848.
- O'Keefe, B.R. (2001). "Biologically Active Proteins from Natural Product Extracts". *Journal of Natural Products* 64: 1373-1381.
- Peumans, W. J. and van Damme, E.J.M. (1995). "Lectins as plant defense proteins". *Plant Physiology* 109: 347-352.
- Peumans, W.J.; Hap, Q. and van Damme, E.J.M. (2001). "Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases?" *The FASEB Journal* 15: 1493-1506.
- Rosengren, K.J.; Daly, N.L.; Plan, M.R.; Waine, C. and Craik, D.J. (2003). "Twists, Knots and Rings in Proteins". *Journal of Biological Chemistry* 278: 8606-8616.
- Sæther, O.; Craik, D.; Campbell, I.D.; Sletten, K.; Juul, J. and Norman, D. (1995). "Elucidation of the Primary and Three Dimensional Structure of the Uterotonic Polypeptide Kalata B1". *Biochemistry* 34: 4147-4158.
- Sandvig, K. and Van Deurs, B. (2000). "Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives". *The EMBO Journal* 19(22): 5943-5950.
- Simonsen, S.M.; Daly, N.L. and Craik, D.J. (2004). "Capped acyclic permutants of the circular protein kalata B1". *FEBS Letters* 577: 399-402.
- Simonsen, S.M.; Sando, L.; Ireland, D.C.; Colgrave, M.L.; Bharathi, R.; Göransson, U. and Craik, D.J. (2005). "A continent of plant defense peptide diversity: cyclotides in Australian *Hybanthus* (Violaceae)". *Plant Cell* 17(11): 3176-3189.
- Svängård, E.; Göransson, U.; Smith, D.; Verma, C.; Backlund, A.; Bohlin, L. and Claeson, P. (2003). "Primary and 3D modeled structures of two cyclotides from *Viola odorata*". *Phytochemistry* 64: 135-142.
- Svängård, E.; Göransson, U.; Hocaoglu, Z.; Gulbo, J.; Larsson, R.; Claeson, P. and Bohlin, L. (2004). "Cytotoxic Cyclotides from *Viola tricolor*". *Journal of Natural Products* 67: 144-147.

- Tam, J.P. and Lu, Y.A. (1998). "A biomimetic strategy in the synthesis and fragmentation of cyclic protein". *Protein Science* 7: 1583-1592.
- Tam, J.P.; Lu, Y.A.; Yang, J.L. and Chiu, K.W. (1999). "An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides". *Biochemistry* 96: 8913-8918.
- Tam, J.P.; Lu, Y.A.; Yang, J.L. and Chiu, K.W. (2000). "Marked increase in membranolytic selectivity of novel cyclic tachyplesin constrained with an antiparallel two- β strand cystine knot framework". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 267: 783-790.
- Tang, Y.Q.; Yuan, J.; Ösapay, G.; Ösapay, K.; Tran, D.; Miller, C.J.; Ouellette, A.J. and Selsted, M.E. (1999). "A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated α -defensins". *Science* 286: 498-502.
- Trabi, M. and Craik, D.J. (2002). "Circular proteins-no end in sight". *Trends Biochem. Sci.* 27(3): 132-138.
- Trabi, M. and Craik, D.J. (2004). "Tissue-Specific Expression of Head-to-Tail Cyclized Miniproteins in Violaceae and Structure Determination of the Root Cyclotide *Viola hederacea* root cyclotide 1". *Plant Cell* 16: 2204-2216.
- Trabi, M.; Svängård, E.; Herrmann, A.; Göransson, U.; Claesson, P.; Craik, D.J. and Bohlin, L. (2004). "Variations in Cyclotide Expression in *Viola* Species". *Journal of Natural Products* 67: 806-810.
- Vogel, H. and Chan, D.I. (2005). "Circular Proteins: Ring around with NOESY". *Structure* 13: 688 - 690.
- Witherup, K.; Bogusky, M.; Anderson, P.S. and Ramjit, H. (1994). "Cyclopsychotride A, a biologically active, 31-residue cyclic peptide isolated from *Psychotria longipes*". *Journal of Natural Products* 57(12): 1619-1625.
- Yeung, H.W.; Li, W.W.; Feng, Z.; Barbieri, L. and Stirpe, F. (1988). "Trichosanthin, alpha-momorcharin and beta momorcharin: identity of abortifacient and ribosome inactivating proteins". *Int. J. Pept Protein Res.* 31(3): 265-268.
- Yu, Q.; Lehrer, R.I. and Tam, J.P. (2000). Engineered salt-insensitive α -defensins with end-to-end circularized structures. *The Journal of Biological Chemistry* 275(6): 3943-3947.
- Zarling, J.M., Moran, P.A., Haffar, O., Sias, J., Richman, D.D., Spina, C.A., Myers, D.E., Kuebelbeck, V., Ledbetter, J.A. and Uckum F.M. (1990). "Inhibition of HIV replication by pokeweed antiviral protein targeted to CD4+ cells by monoclonal antibodies". *Nature* 347(6288): 92-95.