

## EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE UMA NOVA LECTINA SINTÉTICA BASEADA NA LECTINA BANLEC DE *Musa accuminata*

LARISSA BRUSSA REIS<sup>1</sup>; CAROLINE RIZZI<sup>2</sup>; GUSTAVO MOREIRA<sup>2</sup>;  
FREDERICO SCHMITT KREMER<sup>2</sup>; AMANDA SOARES<sup>2</sup>;  
LUCIANO DA SILVA PINTO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, CDTec, Núcleo de Biotecnologia – laribrussa@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas, CDTec, Núcleo de Biotecnologia

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas, CDTec, Núcleo de Biotecnologia – ls\_pinto@hotmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

Uma importante classe de proteínas com específica afinidade por carboidratos tem ganhado destaque cada vez, devido ao seu envolvimento em inúmeros eventos biológicos. Trata-se das lectinas, proteínas que tem sido isoladas de diversos organismos e reconhecidas como importantes ferramentas em pesquisas científicas e desenvolvimento biotecnológico (LAM & NG, 2011). Devido a participação em inúmeros eventos celulares, como nas interações entre patógeno e hospedeiro, nos eventos de metástase em câncer, na embriogênese e no desenvolvimento de tecidos (SHARON & LIS, 1989), um maior detalhamento sobre os mecanismos moleculares da especificidade de ligação por carboidratos é essencial para aprimorar suas aplicações em medicina e biotecnologia.

Lectinas estão presentes em organismos com diversificados níveis de complexidade. Recentemente, uma família de lectinas relacionadas à Jacalina (JLR) têm sido descritos e estudados quanto sua estrutura e aplicação biológica. Estudos sobre as sequências e estruturas dos membros dessa família indicam que existem regiões altamente conservadas, principalmente nas estruturas de folhas- $\beta$ . Em contrapartida, os segmentos em *loop* que conectam esses elementos são altamente variáveis no comprimento de suas sequências, sendo coerente com seus diferentes papéis funcionais (RAVAL, 2004).

Uma das representantes de JLRs bem elucidada e que apresenta enorme aplicação biológica é a lectina isolada de frutos de *Musa acuminata*, conhecida popularmente como banana. Sua lectina mais estudada, a BanLec, mostra afinidade à glicoproteína de envelope gp120 do vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1), mostrando atividade contra sua replicação e impedindo sua internalização celular (SWANSON, 2010). Outros estudos reportam a capacidade desta lectina de gerar resposta mitogênica em esplenócitos murinos e indução da expressão de citocinas como interferon gama (IFN- $\gamma$ ), fator- $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-2 (IL-2) em esplenócitos (CHEUNG, 2009; WONG & NG, 2006) bem como a indução de atividade mitogênica em células T de murinos (PEUMANS, 2000). Além disso, a lectina de banana obtida por expressão heteróloga em *Escherichia coli* foi capaz de induzir uma acentuada proliferação de células CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> em células mononucleares de sangue periférico (GAVROVIC-JANKULOVIC, 2008).

Para investigar a influência das regiões conservadas da sequência depositada da lectina de banana BanLec), bem como os pontos de variação existentes em relação a outras lectinas JLR, nosso grupo criou uma sequência sintética com pontos de variação entre diferentes JLRs. O gene sintético foi expresso em *Escherichia coli*, com o objetivo final de construir uma nova lectina “BanLec-type” que englobe sítios conservados entre JLRs, visando o estudo de sua função e possíveis aplicações como insumo biotecnológico.

## 2. METODOLOGIA

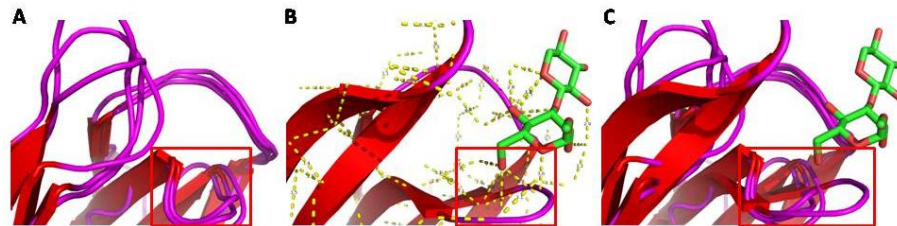
A sequência proteica da lectina BanLec foi obtida no GenBank (código: 71042656). Utilizando dados da literatura, essa sequência foi comparada com JRL de *Helianthus Tuberosus*, *Artocarpin*, *Artocarpus heterophyllus*, *Calystegia sepium*, *Ipomoelin*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa* e *Arabidopsis thaliana* (MEAGHER, 2005). Ao total, 11 aminoácidos foram trocados em posições que poderiam influenciar na atividade da proteína. A sequência alterada foi submetida ao servidor RaptorX (KÄLLBERG et al., 2012) para a predição de sua estrutura tridimensional. A avaliação dos modelos gerados foi realizada através dos programas SolvX (HOLM et al, 1992), RAMPAGE (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/>) e QMEAN6 (ARNOLD et al, 2006). O cálculo do RMSD (*Root Mean Square Deviation*) foi realizado com o software PyMOL (<http://www.pymol.org/>) entre a estrutura gerada e a estrutura de BanLec disponibilizada no Protein Data Bank (PDB, código: 2BMZ). As estruturas preditas foram alinhadas contra a estrutura 2BMZ para a identificação de possíveis alterações nos sítios de interação. A análise da sobreposição dos modelos e das estruturas do PDB foi realizado com o PyMOL.

Essa construção foi amplificada por PCR a partir do vetor pUC18-seq453, contendo a sequência da lectina sintética, utilizando o *primer for* 5' CGCGGATCCAGAATTACAAAATGAATGGT 3' e o *primer rev* 5' CTTGAACCTTAATCTAGAAAGCTTGGGT 3'. Após amplificação, o produto de PCR foi purificado, digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III (New England Biolabs). Em seguida, o produto da digestão foi purificado e ligado ao vetor pAE e o produto da ligação foi utilizado para transformar *Escherichia coli* TOP10 por eletroporação. Os clones recombinantes foram triados e, posteriormente, analisados por gel de agarose 1%. Os clones recombinantes foram transformados por choque térmico na cepa de expressão *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3), sendo testados quanto a sua expressão. O teste de expressão foi realizado em 200 mL de caldo LB suplementado com 100 µg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina. Na densidade óptica a 600 nm ficou entre 0,5 e 0,7 a expressão foi induzida com IPTG 1 mM por 4 horas a 37 °C. Foi realizada eletroforese SDS-PAGE 15%, para verificar a expressão. Após a lise celular por sonicação, a proteína recombinante foi purificada através cromatografia de afinidade ao Ni<sup>+2</sup>, utilizando imidazol como eluente, e posteriormente dialisada. A seguir, esta foi verificada por *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-Histidina e quantificada pelo kit BCA (Thermo Scientific).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises de qualidade das estruturas para os modelos gerados para a proteína sintética por homologia em relação às estruturas já cristalografadas de BanLec do PDB (2BMZ) revelam que a estrutura predita pelo servidor *RaptorX*, apesar de apresentar uma baixa pontuação de SolvX (pontuação solvatação = -14,0), apresentou uma maior similaridade de conformação em relação ao modelo já obtidos de BanLec (2BMZ), assim como maiores valores de QMEAN6 (0,765) e *Dfire* (-145,50). Além disso, porcentagem de aminoácidos em conformação favorável pelo *Ramachandram Plot* calculada pelo RAMPAGE, foi de 91,4%, mostrando-se superior aos percentuais obtidos usando outros servidores. Na comparação com a estrutura 2BMZ foi identificado uma pequena alteração em uma das regiões de *loop* pelos resíduos Gly-129, Lys-130 e Phe-131 da BanLec original, estruturalmente relacionada à um dos sítios de interação com o ligante em relação aos modelos gerados (Figura 1). Entretanto,

esta análise não é suficiente para se inferir alterações na capacidade de reconhecimento e interação de carboidrato.



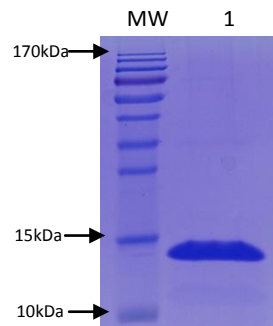
**Figura 1.** (A) Sobreposição da estrutura da BanLec-*type* modificada gerada pelo programa RaptorX com destaque para região compreendida pelos resíduos 129, 130 e 131 que apresentou divergência com a estrutura 2BMZ. (B) Indicação da região compreendida pelos resíduos 129, 130 e 131 na estrutura 2BMZ derivada do PDB, sendo indicadas as interações polares que coordenam a estrutura e a interação. (C) Indicação da região compreendida pelos resíduos 129, 130 e 131 na estrutura da BanLec-*type* modificada.

Para confirmação da atividade da proteína proposta, o gene sintético BanLec-*type* foi amplificado por PCR, seguido de digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III, confirmando a clonagem do inserto no vetor pAE. Após triagem e seleção dos clones recombinantes, um foi escolhido para ser expresso em *E. coli* Plyss (DE3) mediante transformação por choque térmico. A proteína foi expressa na massa molecular esperada, na fração solúvel (Figura 2).



**Figura 2:** *Western blot* confirmando a expressão da proteína BanLec-*type* no peso molecular esperado de 14 kDa; 1 e 2: fração solúvel sem  $\beta$ -mercaptoetanol; 3 e 4: fração insolúvel sem  $\beta$ -mercaptoetanol; 5: Marcador Molecular Full-Range Raibow G&E; 6 e 7: fração solúvel com  $\beta$ -mercaptoetanol; 8 e 9: fração insolúvel sem  $\beta$ -mercaptoetanol.

Desta maneira, após as etapas de clonagem e expressão, a proteína foi purificada por cromatografia de afinidade, seguindo-se de etapas de diálise em água ultra pura a fim de retirar contaminantes ainda presentes, como o imidazol (Figura 3). A partir de um litro de cultura celular foram obtidos 4,1 mg de BanLec-*type* purificada por litro de cultura, tendo sua identidade confirmada por *Western blot*.



**Figura 3:** SDS-Page 15% confirmando a purificação da proteína BanLec-*type*. MW: Marcador Molecular Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder; 1 BanLec-*type* purificada.

#### 4. CONCLUSÕES

A clonagem e expressão do gene *BanLec-type* foi realizada com sucesso, sendo que a identidade da proteína purificada foi confirmada por *Western blot*. Outros testes serão realizados com objetivo de verificar as atividades biológicas desta proteína, tais como testes em cultura de células e de vírus.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHEUNG, A. H. K.; WONG, J. H.; NG, T. B. Musa acuminate (Del Monte banana) lectin is a fructose-binding lectin with cytokine-inducing activity. **Phytomedicine**. China, v. 16, p. 594-600. 2009.

GAVROVIC-JANKULOVIC, M.; POULSEN, K.; BRCKALO, T.; BOBIC, S.; LINDNER, B.; PETERSEN, A. A novel recombinantly produced banana lectin isoform is a valuable tool for glycoproteomics and a potent modulator of the proliferation response in CD3+, CD4+ and CD8+ populations of human PBMCs. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. Serbia, v. 40, p. 929-941. 2008.

KÄLLBERG, M.; WANG, H.; WANG S.; PENG, J.; WANG, Z.; LU, H.; XU, J. *Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server*. **Nature Protocols**. v. 7, p. 1511–1522. 2012.

LAM, S.K.; NG, T.B. Lectins: Production and practical applications. **Applications Microbiology Biotechnology**. Japan, v. 89, p. 45-55. 2011.

SHARON, N. & LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**. USA, v. 246, p. 227–234. 1989

MEAGHER, J. L.; WINTER, H. C.; EZELL, P.; GOLDSTEIN, I. J.; STUCKEY, J. A. Crystal structure of banana lectin reveals a novel second binding site. **Glycobiology**. Michigan. v. 15, p. 1033-1042. 2005.

PEUMANS, W. J.; ZHANG, W.; BARRE, A.; ASTOUL, C. H.; BALINT-KURTI, P. J.; ROVIRA, P.; ROUGÉ, P.; MAY, G. D.; LEUVEN, F. V.; TRUFFA-BACHI, P.; VAN DAMME, E. J. M. Fruit-specific lectins from banana and plantain. **Planta**. Belgium, v. 211, p. 546–554. 2000

RAVAL, S.; GOWDA, S. B.; SINGH, D. D. and CHANDRA, N. R. A database analysis of jacalin-like lectins: sequence-structure-function relationships. **Glycobiology**. India, v. 14, n. 12, p. 1247-1263. 2004

WONG, J.H. & NG, T.B., Isolation and characterization of a glucose/mannose-specific lectin with stimulatory effect on nitric oxide production by macrophages from the emperor banana. **International Journal Biochemistry and Cell Biological**. v. 38, p. 234–243. 2006  
2006.

SWANSON, M. D.; WINTER, H. C.; GOLDSTEIN, I. J.; and MARKOVITZ, D. M. A Lectin Isolated from Bananas Is a Potent Inhibitor of HIV Replication. **The Journal of Biological Chemistry**. USA, v. 285, n. 12, p. 8646-8655. 2010.