

## Construção do gene sintético da lectina Heltuba de *Helianthus tuberosus* e expressão heteróloga em *Escherichia coli*

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

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – amaanda\_soares@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas

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

### 1. INTRODUÇÃO

Lectinas são encontradas em diversos organismos e são caracterizadas por serem um grupo heterogêneo de proteínas ou glicoproteínas, não imunogênicas, com capacidade de se ligar reversivelmente a carboidratos. Elas possuem uma ampla gama de aplicações dependendo das suas propriedades individuais, como a estrutura das proteínas e os carboidratos presentes em células opostas (LAM; NG, 2010). Dentre as diversas atividades biológicas atribuídas às lectinas, destacam-se a identificação de grupos sanguíneos, a caracterização de micro-organismos, a estimulação mitogênica de células imunes, a detecção e o isolamento de carboidratos em solução nas macromoléculas ou em superfície celular (SELL; COSTA, 2000).

Lectinas de várias fontes vem demonstrando atividade anti-tumoral e anti-carcinogênica. O interesse em lectinas está em suas milhares atividades biológicas, incluindo a habilidade de prender o ciclo celular nas fases G1 e G2/M. A ligação dessas lectinas com epítomos de oligossacarídeos de células tumorais pode ativar morte celular por apoptose (DAMODARAN et al, 2008).

As lectinas relacionadas às jacalinas (JRLs) apresentam domínios que se ligam a manose ou galactose, com dobramento beta-prisma consistindo de três cadeias de folha beta, com uma falsa simetria tridimensional interna. Algumas lectinas deste grupo estimulam a diferenciação das funções de células T e B, que irá se ligar aos antígenos T e atuar como aglutinina (VAN DAMME et al, 2002).

A *Helianthus tuberosus*, também conhecida como alcachofra de Jerusalém, Tupinambu e girassol batateiro, é uma planta nativa da América do Norte, e seus tubérculos apresentam valor nutricional (KAYS; NOTTINGHAM, 2008). A lectina isolada dos tubérculos da *Helianthus tuberosus* é chamada Heltuba. A Heltuba é uma proteína tetramérica citosólica com 15.5 kDa e exibe uma preferência para se ligar em oligômeros de manose, sendo um membro do domínio da família das JRLs (VAN DAMME et al, 1999).

### 2. METODOLOGIA

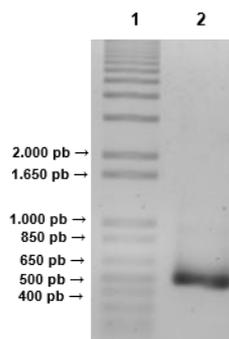
Um gene sintético inserido no plasmídeo pUC18 correspondente à região codificadora da lectina de *H. tuberosus* (474 pb) foi construído. Primers sintéticos para as extremidades 5' e 3' do gene sintético foram construídos usando o software Vector NTI. Estes primers continham sítios de restrição para *Bam*HI (f: 5' CGGGATCCAGAATTCACAAAATGGCTGC 3') e para *Hind*III (r: 5' ACCCAAGCTTTCTAGATTAAGGAACAACAA 3') e foram utilizados para a amplificação do gene sintético através da reação de PCR. O produto da PCR foi

purificado, digerido com *Bam*HI e *Hind*III e posteriormente ligado em vetor pAE, previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição. O produto da ligação foi transformado por eletroporação em células competentes de *Escherichia coli* TOP 10. As células transformadas foram selecionadas em meio LB Agar contendo ampicilina 100 µg/mL. O DNA plasmidial das colônias recombinantes foi extraído empregando o kit QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen). Para confirmar a clonagem do gene sintético, os vetores recombinantes foram digeridos com as enzimas de restrição empregadas na clonagem.

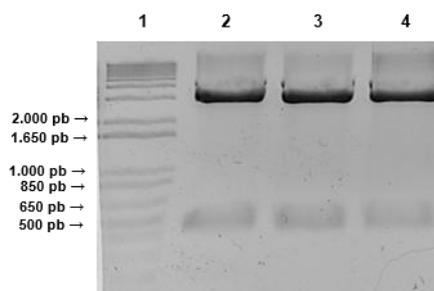
O vetor recombinante obtido, pAE::heltuba, foi transformado por choque térmico em *E. coli* pLysS (DE3) e a expressão da heltuba foi realizada cultivando-se as colônias recombinantes em meio LB na presença de 1 mM de IPTG. As células induzidas foram lisadas por sonicação e o padrão de expressão foi analisado em SDS-PAGE 15% e caracterizado através de *Western blot* empregando anticorpo monoclonal anti-cauda de histidina.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para contornar tentativas de clonagens frustradas empregando o gene codificador da lectina Heltuba obtido através da digestão direta do plasmídeo pUC18 com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III, empregamos a reação de PCR usando os primers construídos para amplificar o gene sintético a ser clonado. Desta maneira obtivemos um fragmento de aproximadamente 500 pb (Figura 1) que foi clonado com sucesso no vetor pAE. A digestão dos plasmídeos obtidos por triagem com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III confirmou a clonagem do inserto em pAE (Figura 2).

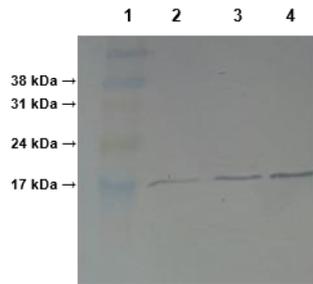


**FIGURA 1: Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando a amplificação por PCR do gene heltuba. Coluna 1:** Marcador de tamanho de cadeia para DNA 1Kb Plus Ladder (Invitrogen); **Coluna 2:** produto da amplificação (~500 pb).



**FIGURA 2: Digestão dos vetores recombinantes pAE::heltuba com BamHI e HindIII. Coluna 1:** Marcador de tamanho de cadeia para DNA 1Kb Plus Ladder (Invitrogen); **Colunas 2, 3 e 4:** clivagem de pAE::heltuba liberando o inserto de ~500 pb.

Quando o vetor recombinante foi transformado em *E. coli* pLysS (DE3), a Heltuba foi expressa na massa molecular esperada (15 kDa), na fração solúvel (Figura 3).



**FIGURA 3: Western Blot empregando anticorpos anti-histidina, confirmando a identidade da proteína recombinante. Coluna 1:** marcador de peso molecular *Full Range Rainbow* (G&E); **Coluna 2 a 4:** *E. coli* pLysS (DE3) + pAE::heltuba.

Proteínas recombinantes podem ser produzidas em células hospedeiras derivadas de *E. coli* (DE3), as quais são compatíveis com o sistema de expressão empregando promotor T7 e permitem altos níveis de expressão em curto espaço de tempo e a baixo custo. Além disso, este sistema de expressão permite a produção de proteínas fusionadas à cauda de histidina, a qual facilita a purificação e raramente afeta sua atividade biológica ou imunológica. A cepa *E. coli* pLysS (DE3) promove um controle mais rígido da expressão proteica, já que produz baixos níveis da lisozima de T7, um inibidor natural polimerase T7, que reduz a expressão basal de genes recombinantes inibindo níveis basais de RNA polimerase T7 (STRUCTURAL GENOMICS CONSORTIUM, 2008).

#### 4. CONCLUSÕES

A clonagem do gene sintético contendo a região codificadora da Heltuba foi realizada com sucesso, já que a proteína recombinante foi expressa na fração solúvel e com massa molecular esperada em *E. coli* pLysS (DE3). Os próximos passos serão a obtenção da proteína recombinante homogênea e ensaios in vivo em linhagens celulares neoplásicas para determinar seu potencial uso como fármacos antineoplásicos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DAMME, E. J. Characterization and molecular cloning of the lectin from *Helianthus tuberosus*. **European Journal of Biochemistry**. v. 259, n. 1-2, p. 135–142, 1999.

DAMODARAN, D. Cancer Lectin DB: a database of lectins relevant to cancer. **Glycoconjugate Journal**. v. 25, n. 3, p. 191-198, 2008.

KAYS, S. J. & NOTTINGHAM, S. F. **Biology and Chemistry of Jerusalem Artichoke**. New York: CRC Press, 2008.

LAM, S. K. & NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 1, p. 45-55, 2011.

SELL, A.M. & COSTA, C. P. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 2, p. 297-303, 2000.

STRUCTURAL GENOMICS CONSORTIUM. Protein production and purification. **Nature Methods**, v.5, n.2, p.135-146, 2008.

VAN DAMME, E. J. M. & HAUSE, B. Two Distinct Jacalin-Related Lectins with a Different Specificity and Subcellular Location Are Major Vegetative Storage Proteins in the Bark of the Black Mulberry Tree. **American Society of Plant Physiologists**. v.130, n.2, p.757-769, 2002.