

A lectina recombinante BanLec-like possui afinidade por diferentes carboidratos

RAFAEL CAGLIARI¹; ANDRÉ ALEX GRASSMANN²; MARA ANDRADE COLARES MAIA³; AMANDA SILVA HECKTHEUER⁴; LAURA JUNQUEIRA DE CAMARGO⁵; CAROLINE KRUSHARDT BERGMANN ROLIM⁶; ALAN JON ALEXANDER MCBRIDE⁷; LUCIANO DA SILVA PINTO³

¹Universidade Federal de Pelotas - rafael.cagliari22@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - grassmann.aa@gmail.com

laurajcamargo@gmail.com

maracamaia@hotmail.com

ckbrolim@hotmail.com

amandasheck@hotmail.com

alanmcb@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - ls_pinto@hotmail.com

1.INTRODUÇÃO

Lectinas são proteínas de origem não imune, frequentemente glicosiladas, que têm como principal propriedade a sua capacidade de ligação reversível a açúcares específicos. As especificidades dos sítios de ligação a carboidratos são usadas para classificá-las em diferentes famílias (LIU. Et. al, 2015). A presença de mais de um sítio de ligação por lectina, ou ainda oligomerização da mesma é responsável por outra característica marcante deste grupo de proteínas, sua ação hemaglutinante, isto é, capacidade de aglutinar eritrócitos (LAM. et. al, 2011).

Estas moléculas estão presentes nas mais diversas espécies desempenhando funções distintas. Lectinas possuem múltiplas aplicações em pesquisas biotecnológicas, tais como agentes inseticida, antifúngico, antiviral e antitumoral. (LAM. et. al, 2011). BanLec é uma lectina extraída da polpa madura da fruta de *Musa acuminata* (banana). Esta proteína tem afinidade pela manose e liga-se com menor intensidade a outros açúcares, forma dímeros com duas subunidades iguais de 15 kDa e pertence à família das jacalinas. As lectinas relacionadas a Jacalina (JRL) são um grupo caracterizado por sua capacidade de ligação à manose, com estrutura tridimensional e sítio de ligação altamente conservados entre espécies de plantas e acredita-se que exercendo papel de defesa nestas (LAM, et. al, 2011).

Testes *in vitro* mostram que a Banlec tem atividade anti-HIV devido à sua ligação à glicoproteína gp120 do vírus, responsável pela ancoragem do patógeno na célula impedindo a fixação e consequente infecção (SWANSON. et. al, 2010). Outro experimento sugeriu inibição do vírus do mosaico do tabaco pela ligação direta da lectina ao capsídeo do vírus (LIU. et. al, 2014). A principal desvantagem na utilização de BanLec nativa é o baixo rendimento da extração convencional diretamente do fruto por ácido acético, que rende 10 mg da proteína por kg de banana (PEUMAN. et. al, 2000). A obtenção de lectinas recombinantes por expressão heteróloga em *Escherichia coli*, possibilita rendimentos de 0,1 a 20 mg por litro de cultura. Apesar de não realizar mudanças pós-traducionais importantes como a glicosilação, *E. coli* é um sistema confiável e satisfatório, sendo o mais utilizado atualmente (OLIVEIRA. et. al, 2013).

Dada a variedade de possíveis aplicações da BanLec, extração complexa e baixo rendimento faz-se necessária uma nova abordagem na obtenção da molécula. Nosso grupo sintetizou uma lectina recombinante baseada na BanLec

nativa, a BanLec-Like, visando aumentar a gama de açúcares ligantes, alterando 11 aminoácidos com possível ligação a carboidratos. Neste estudo demonstramos a funcionalidade da proteína recombinante por teste de hemaglutinação, uma atividade característica das lectinas, bem como sua afinidade a diferentes carboidratos, podendo assim direcionar as possíveis aplicações biotecnológicas.

2. METODOLOGIA

O vetor recombinante para expressão em *E. coli* pAE/BanLec-like utilizado neste trabalho foi construído previamente. A sequência sintética de BanLec-like utilizada foi obtida após análise *in silico* tendo como objetivo otimizar a sequência de BanLec nativa, modificando 11 aminoácidos com possível ligação a carboidrato, baseado nas variações encontradas em diversas lectinas da Família das Jacalinas. O vetor recombinante pAE/BanLec-like foi utilizado para transformar *E. coli* BL21(DE3) Star por choque térmico, as células foram então cultivadas em LB líquido com ampicilina. Quando a cultura atingiu fase exponencial de crescimento a expressão das proteínas recombinantes foi induzida com 1 mM de IPTG. Após 3 h de expressão as células foram coletadas por centrifugação, solubilizadas em tampão de purificação de proteínas recombinantes e lisadas por sonicação. Após outra centrifugação em um tampão contendo ureia as proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade ao níquel no sistema automatizado AKTA (JUNQUEIRA. et. al, 2015), utilizando *refolding* na coluna. Após diálise contra água destilada a BanLec-like foi observada por SDS-PAGE e Western blot (WB) utilizando anticorpo monoclonal anti-6xHis. Curva de BSA em gel de poliacrilamida 15% foi usada para quantificar a proteína.

Sangue heparinizado de ratos (*Rattus norvegicus*) foi comercialmente obtido e os eritrócitos foram coletados por centrifugação a 3500 xg por 5 min, a 4 °C. Após 5 lavagens com tampão fosfato-salina (PBS), os eritrócitos foram ressuspendidos a 2% em PBS. O teste inicial de hemaglutinação foi realizado utilizando 50 ul de rBanLec-like, diluída em série, partindo de 5 uM a 0,0097 uM de proteína, seguido de adição de 50ul de eritrócitos de rato a 2%. A reação foi incubada a 37°C por 40 minutos. A leitura foi realizada visualmente, considerando positivo a aglutinação de mais da metade dos eritrócitos no poço. A fim de determinar a ligação da lectina a diferentes carboidratos, foi realizado um teste de Inibição de hemaglutinação por carboidratos. Para isso, foi adicionado à microplaca de titulação diferentes concentrações de carboidratos (70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 e 2,5 mM) em 37,5 uL totais, diluídas em PBS, seguido de adição de 12,5 uL de rBanLec-like por poço (1,25 uM). A placa foi incubada por 30 minutos a 37 °C, seguido de adição de 50 ul de hemácia de rato 2% e nova incubação por 40 min. A leitura da inibição de hemaglutinação foi realizada como descrito acima. Foram testados os seguintes carboidratos: manose, lactose, arabinose, galactose, sacarose, frutose, glicose, maltose, xilose, rafinose, metil- α -D-manopiranosídeo e ribose. O teste de inibição de hemaglutinação foi realizado em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento da produção da lectina recombinante por *E. coli* foi de 0.5 mg por litro de meio de cultura LB. Na FIGURA 2 é possível observar a presença de dímeros na proteína recombinante, assim como ocorre na nativa. Estes dímeros estão relacionados à capacidade de hemaglutinação das lectinas.

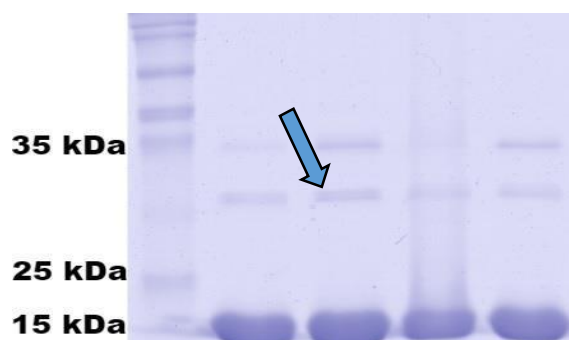


FIGURA 2: Resultado da purificação da BanLec-Like em SDS-PAGE 15%, apesar de ter sido desnaturada a amostra ainda apresenta alguns dímeros com cerca de 30 kDa.

A BanLec-like hemaglutinou eritrócitos de rato mesmo a concentrações tão baixas quanto 0,625 μ M. A Tabela 1 apresenta a concentração mínima observada de cada carboidrato que ainda inibiu a hemaglutinação por BanLec-like. Alguns carboidratos não inibiram a hemaglutinação, mesmo quando utilizado 70 mM destes, sugerindo que BanLec-like não seja capaz de ligar estes carboidratos. Este é o caso de galactose, arabinose, xilose, lactose, rafinose e ribose. Manose foi o açúcar capaz de ligar mais fortemente a rBanLec-like, uma vez que inibiu a hemaglutinação mesmo quando utilizado apenas 5 mM deste açúcar. Além da manose, o teste de inibição por carboidratos de hemaglutinação de eritrócitos de ratos por rBanLec-like sugere que esta lectina seja capaz de ligar os monossacarídeos glicose, frutose, metil- α -D-manopiranosídeo, e os dissacarídeos maltose e sacarose. Estes dissacarídeos contêm glicose em sua estrutura. Peuman e colaboradores (2000) avaliou a capacidade da BanLec nativa ligar diferentes carboidratos, e apesar de algumas diferenças metodológicas entre este trabalho e o presente (Peuman utilizou sangue de coelho), rBanLec-like e BanLec nativa ligam os mesmos carboidratos, ainda que BanLec nativa tenha uma ligação aparentemente mais fortes aos açúcares.

| Carboidratos | Concentração inibitória de aglutinação mínima. |
|--|---|
| Manose | 5 mM |
| Glicose | 20 mM |
| Galactose | >70 mM |
| Arabinose | >70 mM |
| Xilose | >70 mM |
| Lactose | >70 mM |
| Metil-α-D-manopiranosídeo | 10 mM |
| Maltose | 20 mM |
| Rafinose | >70 mM |
| Frutose | 20 mM |
| Sacarose | 20 mM |
| Ribose | >70 mM |

TABELA 1: Concentração mínima requerida de cada açúcar para inibir a atividade hemaglutinante da BanLec-like recombinante.

4. CONCLUSÕES

As modificações no sítio de ligação da BanLec-like recombinante parecem não ter afetado negativamente a capacidade de ligar carboidratos. A rBanLec-like liga os mesmos carboidratos que a BanLec nativa e o faz com intensidade semelhante.

Perspectivas futuras incluem a otimização dos protocolos de produção da proteína, visando aumentar o rendimento. Novos testes *in vitro* usando células de melanoma maligno cutâneo devem ser feitos para dar continuidade a um estudo já iniciado. Experimentos para testar os efeitos antiviral, antifúngico e inseticida da proteína recombinante são um caminho lógico a ser tomado visto que estas são algumas das principais aplicações de lectinas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAMARGO, L.J. Lectina rBanlec inibe o crescimento da linhagem celular A375 de melanoma maligno cutâneo. In: **CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA UFPEL 2015**, Pelotas, 2015. v. 1. p.1-4.

GABIUS, H.J; SIEBERT, H.C; BARBERO, J.J. Chemical Biology of the Sugar Code. **ChemBioChem**, v.5, n.6, p 740-764, 2004

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

LIU, Y; LIU, J; PANG, X. The Roles of Direct Recognition by Animal Lectins in 2015. Antiviral Immunity and Viral Pathogenesis. **Molecules**, v. 20, n.2, p. 2272-2295, OLIVEIRA, C; TEIXEIRA J.A; DOMINGUES, L. Recombinant lectins: an array of tailor-made glycan-interaction biosynthetic tools. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.33, n.1, p 6-80, 2013.

PEUMAN, W.J; ZHANG, W; BARRE, A. Fruit-specific lectins from banana and plantain. **Planta**, v.2011, n. 4, p. 546-554 , 2000.

SINGH, R.S; WALIA A.K; KANWARB J.R; Protozoa lectins and their role in hostpathogen interactions. **Biotechnology Advances**, Punjab, v.34, n.5, p. 10181029, 2016.

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

TAKAHASHI, K. Mannose-binding lectin and the balance between immune protection and complication. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v.9, n. 12, p 1179-1190, 2011.