



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

ANTÔNIA SÂMIA FERNANDES DO NASCIMENTO

**Lectinas recombinantes das algas marinhas vermelhas *Hypnea musciformis*
(Wulfen) J. V. Lamouroux e *Bryothamnion triquetrum* (S. G. Gmelin) M.
Howe: produção heteróloga e caracterização bioquímica**

Orientadores:

Dr. Benildo Sousa Cavada (UFC, Brasil)

Dra. Annabelle Varrot (CNRS-UJF, França)

FORTALEZA / CE

FEVEREIRO – 2014

ANTÔNIA SÂMIA FERNANDES DO NASCIMENTO

**Lectinas recombinantes das algas marinhas vermelhas *Hypnea musciformis*
(Wulfen) J. V. Lamouroux e *Bryothamnion triquetrum* (S. G. Gmelin) M.
Howe: produção heteróloga e caracterização bioquímica**

Tese em regime de co-tutela submetida ao programa de Pós-graduação em Bioquímica como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Bioquímica.

Orientadores: Dr. Benildo Sousa Cavada

Dra. Annabelle Varrot

Co-orientadora: Kyria Santiago do Nascimento

FORTALEZA / CE

FEVEREIRO – 2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- N1931 Nascimento, Antônia Sâmia Fernandes do.
Lectinas recombinantes das algas marinhas vermelhas *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamouroux e *Bryothamnion triquetrum* (S. G. Gmelin) M. Howe: produção heteróloga e caracterização bioquímica / Antônia Sâmia Fernandes do Nascimento. – 2014.
260 f. : il., color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Biologia Molecular.
Orientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada (UFC, Brasil) e Profa. Dra. Annabelle Varrot (França)
Coorientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento (Brasil) e Dra. Anne Imberty (França)
1. Lectinas recombinantes. 2. Algas marinhas vermelhas. 3. Clonagem. I. Título.

DEFESA DE TESE:

Lectinas recombinantes das algas marinhas vermelhas *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamouroux e *Bryothamnion triquetrum* (S. G. Gmelin) M. Howe: produção heteróloga e caracterização bioquímica

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Bioquímica

Antônia Sâmia Fernandes do Nascimento

Licenciada em Ciências Biológicas, Mestre em Biotecnologia


BANCA EXAMINADORA:



Professor Doutor Benildo Sousa Cavada (Orientador)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará (UFC)



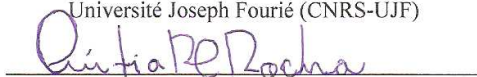
Doutora Annabelle Varrot (Orientadora)
Centre d'Étude et de Recherche sur les Macromolécules Végétales (CERMAV)
Université Joseph Fourié (CNRS-UJF)



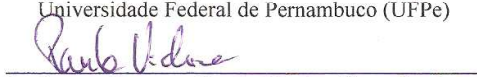
Professora Doutora Kyria Santiago do Nascimento (Examinadora)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Doutora Anne Imberty (Examinadora)
Centre d'Étude et de Recherche sur les Macromolécules Végétales (CERMAV)
Université Joseph Fourié (CNRS-UJF)



Professora Doutora Cintia Renata Costa Rocha (Examinadora)
Setor de Biologia Molecular
Universidade Federal de Pernambuco (UFPe)



Professora Doutora Paula Videira (Examinadora)
Centro de Estudos de Doenças Crônicas (CEDOC)
Universidade Nova de Lisboa

A Deus,
À minha família,
A meus amigos,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi realizado em regime de co-tutela entre a Universidade Federal do Ceará (Fortaleza) e a Universidade Jouseph Fourier de Grenoble (França).

Meus sinceros agradecimentos aos órgãos de fomento à pesquisa brasileira por tornarem possível o desenvolvimento desse trabalho.

Meu reconhecimento vai igualmente aos membros da banca examinadora, Dra. Paula Videira e Dra. Cintia Renata Costa Rocha. Obrigada pela disposição em corrigir essa tese.

Ao meu orientador Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada, pelo apoio, pelos ensinamentos, por estar sempre disposto a me orientar e pelas inúmeras oportunidades ofertadas.

As minhas orientadoras na França Dra. Annabelle Varrot e Dra. Anne Imberty, obrigada pela paciência, incentivo e ensinamentos.

A todos os professores que compõem o curso de Bioquímica pelos valiosos ensinamentos durante meu Doutorado, em especial aos professores biomolenses, Alexandre Holanda, Bruno Matias, Celso Nagano e Edson Teixeira. E de uma maneira mais que especial, a minha querida professora, orientadora e amiga *Mme Kyrie*, obrigada pela força, incentivo e pelo ombro amigo de sempre.

Aos Drs. Ana Ardá, Niels Reichardt, Carlo Unverzagt e Karine Begnin, por terem aberto as portas de seus respectivos laboratórios para os diferentes experimentos realizados durante essa tese.

A toda a equipe do BIOMOL (Quelzinha, Helton, Mayron, Alysson, Ito, Rafa, Júnior, Alfa, Fernando, Guilherme, Rômulo, Mayara T., Mayara Q, Julinha, Vanir, Batista, Jorge, Suzete, Cláudia, Davi, Clareane, Nágila, Thaty, Cleane, Ivanice, Gleiciane, Hilde, Winnie e Alexandra) pelas boas risadas que demos juntos, pelo aprendizado e principalmente pela amizade, em especial, aos companheiros de laboratório Aninha, Bruninho, Lulu (gata da galáxia), Renatinha, Rondy, Carolzinha e Larissa, indispensáveis na realização deste trabalho, obrigada pela força, apoio e incentivo, vocês moram no meu coração!

A toda a equipe de Glicobiologia Molecular: Christelle, Géraldine, Olivier, Émilie, Valou, Soorej, Doerty, Ayméric, Julie, Félix, Aline e Joana. Obrigada pelo carinho, suporte e grande ajuda nos momentos difíceis. Às belas amizades que conquistei durante o meu “*séjour*” na França: Ilham, Tamiris, Djamila, Guillaume, Yasmina, Tati e Anna vocês “ensolararam” minha estadia em Grenoble, muito obrigada por estarem lá por mim!

Às minhas queridas amigas de todo o sempre: Bébé, Melzinha, Manélica e Camilinha, sempre tão presentes (apesar de ausentes) e incentivadoras, muito obrigada por compartilharem comigo este momento e por tudo de bom que acrescentam em minha vida.

Aos meus colegas e amigos de longa data Eugênio, Liana, Paiva, Míriam, Antônio Maria e Samara é muito bom tê-los como amigos e partilhar momentos importantes da minha vida, vocês fazem toda a diferença!

A minha grandiosa família (meus irmãos, meus sobrinhos e minha amada mamãe), pelo amor incondicional e por todos os ensinamentos de vida que ajudaram a moldar o meu ser, e de forma mais que especial, à minha querida irmã Pauliana, sem a qual não imagino minha caminhada, sempre tão presente e incentivadora, muito obrigada por proporcionar este momento tão feliz em minha vida.

Ao meu querido Philippe Bourassa, por tornar a minha vida mais doce.

A Deus, por estar sempre ao meu lado e conceder-me a graça de viver esta vitória.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, faço de minha conquista uma forma de gratidão e de reconhecimento por tudo quanto recebi de vocês.....muito obrigada!

...Não sei se estou perto ou longe demais, se peguei o rumo certo ou errado. Sei apenas que sigo em frente, vivendo dias iguais de forma diferente. Já não caminho mais sozinha, levo comigo cada recordação, cada vivência, cada lição. E mesmo que tudo não ande da forma que eu gostaria, saber que já não sou a mesma de ontem me faz perceber que tudo valeu a pena... E, tudo vale a pena!

Autor desconhecido.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I : FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA -----	29
1. GLICOBIOLOGIA -----	31
1.1 Generalidades sobre glicobiologia e glicosilação-----	31
1.1.1 A <i>N</i> -glicosilação-----	33
1.1.2 A <i>O</i> -glicosilação-----	35
1.1.3 Fucosilação-----	37
2. ALGAS -----	39
2.1 Algas marinhas-----	39
2.2 Algas marinhas vermelhas -----	40
2.3 Potencialidade do estado do Ceará-----	41
2.4 Compostos bioativos de algas marinhas-----	41
3. LECTINAS -----	44
3.1 Generalidades sobre lectinas-----	44
3.2 Lectinas de microalgas-----	46
3.3 Lectinas de macroalgas-----	47
3.3.1 Funções endógenas de lectinas de algas-----	48
3.3.2 Aspectos estruturais de lectinas de macroalgas -----	50
3.3.3 Estudo de especificidade de lectinas de algas-----	55
3.3.4 Aplicações biotecnológicas de lectinas de algas-----	57
3.3.5 Lectinas de algas e câncer-----	59
3.4 Clonagem e expressão de lectinas de algas -----	60
3.5 Testes de toxicidade-----	64
3.6 Algas marinhas vermelhas <i>Hypnea musciformis</i> e <i>Bryothamnion triquetrum</i>	64
CAPÍTULO II: OBJETIVOS DO TRABALHO DE TESE -----	69
1.1 Objetivo geral-----	69
1.2 Objetivos específicos-----	69
CAPÍTULO III: MATERIAIS E MÉTODO -----	73
1. MATERIAL BIOLÓGICO -----	75
1.1 Algas marinhas vermelhas <i>Hypnea musciformis</i> e <i>Bryothamnion triquetrum</i>	75
1.2 Extração e purificação das lectinas selvagens de <i>H. musciformis</i> (HML) e <i>B. triquetrum</i> (BTL)-----	75
2. CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DAS LECTINAS HML E BTL EM SISTEMA PROCARIÓTICO DE <i>Escherichia coli</i> -----	76
2.1 Obtenção do gene sintético da HML e da BTL-----	76
2.2 Preparação de células competentes e transformação-----	81
2.3 Purificação e digestão enzimática dos plasmídeos recombinantes-----	82
2.4 Clonagens dos genes da HML e da BTL e transformação bacteriana-----	83
2.5 Ensaio para o estabelecimento da condição ótima de expressão da rHML e da rBTL-----	85
2.6 Extração de proteínas totais de <i>E. coli</i> recombinante-----	86

2.7 Purificação da rHML e da rBTL por cromatografia de afinidade -----	86
2.8 Ensaio de digestão da rHML e da rBTL-----	87
2.9 Purificação da rHML e da rBTL por cromatografia de exclusão molecular---	88
3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICOQUÍMICA DAS LECTINAS rHML E rBTL-	88
3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS-----	88
3.2 <i>Immunoblotting</i> para detecção da rHML e da rBTL com cauda de histidina---	89
3.3 Análise da rHML e da rBTL por DLS: Difusão dinâmica da luz-----	90
3.4 Análise da rHML e da rBTL por TSA: Deslocamento térmico da luz-----	91
4. FERRAMENTAS PARA O ESTUDO DE INTERAÇÃO LECTINA-	93
CARBOIDRATO -----	93
4.1 Atividade hemaglutinante das lectinas rHML e rBTL-----	93
4.2 Análise da especificidade da rHML e da rBTL por <i>glycan-array</i> -----	93
4.3 Análise da interação da BTL com um octassacarídeo por STD-RMN-----	95
5. ENSAIOS DE TOXICIDADE da HML, rHML, BTL e rBTL-----	96
5.1 Letalidade contra <i>Artemia sp.</i> -----	96
5.2 Cultura celular e ensaio colorimétrico MTT-----	97
6. ENSAIOS DE CRISTALOGRAFIA-----	98
6.1 Processo de cristalização da rHML e da rBTL-----	98
CAPÍTULO IV: RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	103
1. LECTINAS SELVAGENS DE <i>H. musciformis</i> e <i>B. triquetrum</i>-----	105
1.1 Extração e purificação-----	105
2. CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DAS LECTINAS rHML	106
E rBTL EM SISTEMA PROCARIÓTICO-----	106
2.1 Purificação e digestão enzimática dos plasmídeos recombinantes -----	106
2.2 Clonagens dos genes da HML e da BTL e transformação bacteriana-----	108
2.3 Ensaio para o estabelecimento da condição ótima de expressão da rHML e	109
da rBTL-----	109
2.4 Purificação da rHML e da rBTL por cromatografia de afinidade e de	115
exclusão molecular-----	115
3. FERRAMENTAS PARA O ESTUDO DE INTERAÇÃO LECTINA-	122
CARBOIDRATO-----	122
3.1 Atividade hemaglutinante da rHML e da rBTL-----	122
3.2 Análise da especificidade por <i>glycan-array</i> -----	124
3.3 Análise da interação da BTL com Fuc-Octa por STD-RMN-----	132
4. ENSAIOS DE TOXICIDADE da HML, rHML, BTL e rBTL-----	132
4.1 Letalidade contra <i>Artemia sp.</i> -----	132
4.2 Cultura celular e ensaio colorimétrico MTT-----	133
5. ENSAIOS DE CRISTALOGRAFIA-----	135
CAPÍTULO V: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS-----	137
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	145
ANEXO: RESUMO DO TRABALHO DE TESE EM FRANCÊS-----	161

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SIGLAS

AAL	Lectina de <i>Aleuria aurantia</i>
AFP-L3	α -fetoproteína fucosilada
AOL	Lectina de <i>Aspergillus aryzae</i>
Bambl	Lectina de <i>Burkholderia ambifaria</i>
BC2L-C	Lectina de <i>Burkholderia cenocepacia</i>
BCA	Lectina de <i>Boodlea coacta</i>
BPL	Lectina de <i>Bryopsis plumosa</i>
BSA	Albumina sérica bovina
BTL	Lectina de <i>Bryothamnion triquetrum</i>
cDNA	DNA complementar
CFG	<i>Consortium for Functional Glycomics</i>
ConA	Concanavalina A, lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
CV-N	cyanovirina-N
D.O_{600nm}	Densidade ótica a 600 nanômetros
DLS	Difusão dinâmica da luz
DMEM	Meio Modificado <i>Dulbecco</i>
DMF	Dimetilformamida
DTT	Ditiotreitol
EC₅₀	Concentração efetiva média
ESA	Lectina de <i>Eucheuma serra</i>
ESI-MS	Espectrometria de massas-Ionização por eletrospray
FAC	Cromatografia de afinidade frontal
Fuc-Octa	Octassacarídeo contendo o núcleo de fucosilação (α 1-6)
GalNAc	<i>N</i> -acetilgalactosamina
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglicosamina
GOL	Lectina de <i>Gracilaria ornata</i>
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro
GRFT	Lectina de <i>Griffithsia sp.</i>
HCV	Vírus da hepatite-C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HJA	Hypnina, lectina de <i>Hypnea japonica</i>
HML	Lectina de <i>Hypnea musciformis</i>
IMAC	Cromatografia de afinidade em metal imobilizado
IPTG	Isopropil- β -tiogalactosídeo
LCA-1	Lectina de <i>Lens culinaris</i>
LTA	Lectina de <i>Lotus tetragonolobus</i>

MAD	Difração anômala em múltiplos comprimentos de onda
MIR	<i>Multiple isomorphous replacement</i>
MBP	Proteína de ligação à maltose
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- brometo difeniltetrazólio)
Mut^s	Utilização de metanol lento
MVL	Lectina de <i>Microcystis viridis</i>
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccimidina
OAA	Lectina de <i>Oscillatoria agardii</i>
O-GlcNAcase	<i>O</i> - <i>N</i> -acetilglicosaminidase
OGT	<i>O</i> - <i>N</i> -acetilglicosaminiltransferase
PDB	Banco de dados de proteínas
PhoSL	Lectina de <i>Pholiota squarrosa</i>
ppGalNAcTs	Polipeptídeo <i>N</i> -acetilgalactosaminiltransferase
PSA	Lectina de <i>Pisum sativum</i>
PUFAs/AGPIs	Ácidos graxos poliinsaturados
rBTL	Lectina recombinante de <i>Bryothamnion triquetrum</i>
rHML	Lectina recombinante de <i>Hypnea musciformis</i>
RPM	Rotações por minuto
RSL	Lectina de <i>Ralstonia solanacearum</i>
SAD	Difração anômala em um único comprimento de onda
STD-RMN	Diferença de transferência de saturação por ressonância magnética nuclear
SBA	Lectina da soja
SBF	Soro bovino fetal
SVN	Scytovirina
TEV	Protease do vírus do tabaco
TFP	Ácido carboxílico – 2,3,5,6 tetrafluorofenil
Tm	Temperatura de fusão
TSA	Deslocamento térmico da luz
UEA-1	Lectina de <i>Ulex europeus</i> 1
UFC	Unidade formadora de colônia
UH	Unidades de hemaglutinação
ULL	Lectina de <i>Ulva limnetica</i>
UPL-1	Lectina de <i>Ulva pertusa</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1	Representação dos principais monossacarídeos de relevância biológica encontrados nos organismos vivos.	31
Figura I.2	Esquema de uma membrana celular apresentando a diversidade de glicoconjugados que formam o glicocálix celular.	32
Figura I.3	Diagrama esquemático representando a síntese de <i>N</i> -glicanos.	34
Figura I.4	<i>N</i> -glicanos encontrados em proteínas humanas maduras: rico em manose, complexo e híbrido.	34
Figura I.5	Núcleo da estrutura dos <i>O</i> -glicanos do tipo mucina.	36
Figura I.6	Modificações no núcleo de <i>N</i> -glicanos.	38
Figura I.7	Papéis dos oligossacarídeos na superfície das células.	45
Figura I.8	Representação do dímero da griffithsina baseado nas coordenadas da proteína recombinante fusionada a etiqueta de histidina.	54
Figura III.1	Representação das algas marinhas vermelhas <i>H. musciformis</i> e <i>B. triquetrum</i> , respectivamente.	75
Figura III.2	Representação esquemática da sequência primária das lectinas selvagens HML e BTL, respectivamente, e da sequência gênica otimizada com a preferência de códons para expressão em <i>E. coli</i> .	77
Figura III.3	Representação esquemática dos plasmídeos bacterianos e seus respectivos mapas de restrição utilizados na expressão da rHML e da rBTL.	80
Figura III.4	Representação esquemática da interação entre resíduos vizinhos da cauda de histidina (His-tag) e a matriz contendo níquel imobilizado.	87
Figura III.5	Esquema representativo do processo de espalhamento dinâmico da luz.	91
Figura III.6	Representação esquemática de um <i>glicochip</i> .	94
Figura III.7	Estrutura do Fuc-Octa utilizado nos ensaios de STD com a BTL.	96
Figura III.8	Representação esquemática do teste de toxicidade contra <i>Artemia sp.</i>	97
Figura III.9	Principais passos na resolução da estrutura de uma biomolécula por cristalografia de raios X.	99

Figura III.10	Representação de um diagrama de fases correlacionando a concentração de precipitante com a concentração de proteína para se atingir o estado de supersaturação.	99
Figura III.11	Representação esquemática dos métodos de difusão de vapor para cristalização de proteínas.	100
Figura IV.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% sob condições desnaturantes e redutoras da HML e da BTL.	106
Figura IV.2	Validação da transformação de células de <i>E. coli</i> com o plasmídeo pET32a-HML e pET32a-BTL.	107
Figura IV.3	SDS-PAGE 12% do extrato celular de <i>E. coli</i> Rosetta-gami 2 (DE3) após indução com 0,2 mM de IPTG e ruptura celular.	110
Figura IV.4	SDS-PAGE 12% do extrato celular de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) após indução da rBTL com 0,2 mM de IPTG e ruptura celular.	110
Figura IV.5	SDS-PAGE 12% do extrato celular de <i>E. coli</i> após indução a 16 °C e ruptura celular, seguido por recuperação das frações solúveis.	111
Figura IV.6	SDS-PAGE 12% do extrato celular de <i>E. coli</i> contendo o plasmídeo pMalp2-TEVNX após indução com 0,5 mM de IPTG a 16 °C por 16 horas.	113
Figura IV.7	SDS-PAGE 12% do extrato celular de <i>E. coli</i> auto-induzidas a 16 °C.	114
Figura IV.8	Cromatograma referente à aplicação da fração solúvel dos lisados de células de <i>E.coli</i> transformadas com os genes para a HML e a BTL, respectivamente A e B, em coluna de níquel imobilizado (Hisrap).	115
Figura IV.9	Perfil eletroforético das frações solúveis da rHML e da rBTL à partir de cromatografia de afinidade em níquel imobilizado.	116
Figura IV.10	<i>Western blot</i> de tioredoxina-His ₆ -rHML e tioredoxina-His ₆ -rBTL, respectivamente 1 e 2.	117
Figura IV.11	Perfil cromatográfico e eletroforético da rHML e da rBTL.	118
Figura IV.12	Perfil cromatográfico da rHML e da rBTL em coluna Superdex 75 e BioSuite 250, respectivamente.	119
Figura IV.13	Propriedades hemaglutinantes da rHML e da rBTL, respectivamente.	123
Figura IV.14	<i>Glycan array</i> da BTL e da rBTL.	126

Figura IV.15	<i>Glycan array</i> da HML.	128
Figura IV.16	Alinhamento de sequências polipeptídicas de lectinas de macroalgas vermelhas.	130
Figura IV.17	Espectro STD-RMN da BTL com Fuc-Octa.	132
Figura IV.18	Efeito da citotoxicidade de HML, rHML, BTL e rBTL contra células da linhagem (A549) investigados por ensaio de MTT.	134
Figura IV.19	Microcristal da proteína rBTL.	136

LISTA DE TABELAS

Tabela I.1:	Lectinas de macroalgas com sequência de aminoácidos determinada.	52
Tabela I.2:	Lectinas de macroalgas e microalgas produzidas de forma recombinante em sistema procariótico de <i>E. coli</i> .	63
Tabela III.1:	Principais plasmídeos bacterianos e cepas de <i>E. coli</i> utilizados.	78
Tabela III.2:	Representação das principais construções plasmídeais e bactérias utilizadas nesse estudo.	84
Tabela III.3:	Tampões utilizados nos testes de estabilidade térmica (TSA) para rHML e rBTL.	92
Tabela IV.1:	Tabela de purificação das lectinas HML e BTL, respectivamente.	105
Tabela IV.2:	Quantificação plasmídeal dos clones de HML e de BTL selecionados para transformação bacteriana. A (absorbância).	107
Tabela IV.3:	Tampões utilizados nos ensaios de termodesnaturação da rHML e da rBTL, respectivamente.	121

APRESENTAÇÃO

Os assuntos abordados nessa tese se situam dentro do domínio da Glicobiologia e da Biologia molecular. Esse trabalho foi desenvolvido em regime de co-tutela com dois grupos de pesquisa diferentes, a equipe do Biomol-Lab do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC) dirigida pelo professor Dr. Benildo Cavada e a equipe de Glicobiologia Molecular do CERMAV (UJF, França) dirigido pela Dra. Anne Imberty, sob orientação da Dra. Annabelle Varrot.

Esse trabalho pode ser dividido em cinco partes principais. O primeiro capítulo é uma introdução aos domínios abordados nesse trabalho e ao objeto de nosso estudo: lectinas de macroalgas. No segundo capítulo é abordado os objetivos do trabalho de tese. No terceiro capítulo, uma atenção particular é dada aos métodos experimentais utilizados, compreendendo técnicas de biologia molecular para clonagem e expressão de genes, caracterização da especificidade das lectinas das algas *Hypnea musciformis* e *Bryothamnion triquetrum* por *gyican array* e os métodos utilizados para a caracterização físico-química das proteínas, bem como os testes de toxicidade realizados. O quarto capítulo é dedicado aos principais resultados e discussão do trabalho de tese. Algumas conclusões e perspectivas são apresentadas no quinto capítulo e fecham a apresentação desse trabalho. Ao final, há um pequeno resumo de outros trabalhos desenvolvidos durante os quatro anos de doutorado, bem como uma apresentação dos trabalhos publicados.

Essa tese foi redigida em língua portuguesa, mas compreende um anexo: o resumo expandido do trabalho de tese em língua francesa.

RESUMO

Os genes sintéticos das lectinas das algas marinhas vermelhas *Hypnea musciformis* (HML) e *Bryothamnion triquetrum* (BTL) foram clonados em diferentes vetores e transformados em diferentes células bacterianas de expressão. As lectinas recombinantes foram obtidas a partir da fração solúvel das culturas bacterianas de *Escherichia coli* Rosetta-gami 2 (DE3) para rHML e BL21 (DE3) para rBTL. Os testes de hemaglutinação mostraram que rHML e rBTL são capazes de aglutinar eritrócitos de coelho tratados com diferentes enzimas proteolíticas. As propriedades hemaglutinantes de rHML e de rBTL confirmam o enovelamento correto e o estado funcional das proteínas. A caracterização da especificidade de ligação a carboidratos da HML, BTL e da rBTL por *glycan array* mostrou uma especificidade restrita por oligossacarídeos complexos contendo o núcleo de fucosilação (α 1-6), com uma preferência particular por *N*-glicanos não bisectados, bi e tri-antenados de cadeia curta. A presença de ácido siálico na extremidade não-redutora dos glicanos favorece o reconhecimento. Essa foi a primeira caracterização de lectinas de algas vermelhas por *glycan array*. Experimentos de STD-RMN com a BTL mostraram uma interação com um octassacarídeo contendo o núcleo de fucosilação (α 1-6). A atividade tóxica das lectinas selvagens e recombinantes foi avaliada contra *Artemia sp.* e contra células de adenocarcinoma de pulmão (A549). Nos ensaios de citotoxicidade, HML, rHML, BTL e rBTL não mostraram nenhuma toxicidade contra *Artemia sp.* e somente HML e rHML mostraram uma baixa toxicidade contra células de adenocarcinoma de pulmão (A549). O primeiro cristal de rBTL foi obtido a um nível de microescala com a ajuda de um robô de cristalização e difratou a 15 Å de resolução.

Palavras-chave: Lectinas recombinantes; algas vermelhas e *N*-glicano fucosilado.

ABSTRACT

Synthetic genes from the red marine algae *Hypnea musciformis* (HML) and *Bryothamnion triquetrum* (rBTL) were cloned into different vectors and transformed into several bacterial expression strains. The recombinant lectins were obtained from the soluble fraction of bacterial cultures using *Escherichia coli* Rosetta-gami 2 (DE3) strain for rHML and *E. coli* BL21 (DE3) strain for rBTL. Haemagglutination tests showed that rHML and rBTL are able to agglutinate rabbit erythrocytes with strong haemagglutination activity only after treatment with papain and trypsin indicating that their ligands are not directly accessible at the cell surface. The haemagglutinating properties of rHML and rBTL confirm the correct folding and functional state of the proteins. A study of the specificity of these lectins by glycan array was conducted. HML, BTL and rBTL showed a restricted specificity for complex *N*-glycans with core (α 1-6) fucose. A more detailed analysis of the specificity of these lectins showed a preference for non-bisecting *N*-glycans, bi- and tri-antennary branching sugars with short chains. Addition of Sialic acid at the non-reducing end of *N*-glycans favors their recognition by the lectins. This is the first characterization of lectins from red algae by glycan array. An interaction between BTL and a core (α 1-6) fucosylated octasaccharides was also observed by STD-NMR. The toxic activity of wild and recombinant lectins were evaluated against *Artemia sp.* and the human lung adenocarcinoma cell line (A549). In cytotoxicity assays, HML, rHML, BTL and rBTL showed no toxicity against *Artemia sp.* Only HML and rHML showed a low cytotoxic activity against cell line (A549). The first crystal of rBTL was obtained in micro-scale level using a robot and diffracted at 15 Å.

Keywords: Recombinant lectin; Red Algae; fucosylated *N*-glycan.

CAPÍTULO I:
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

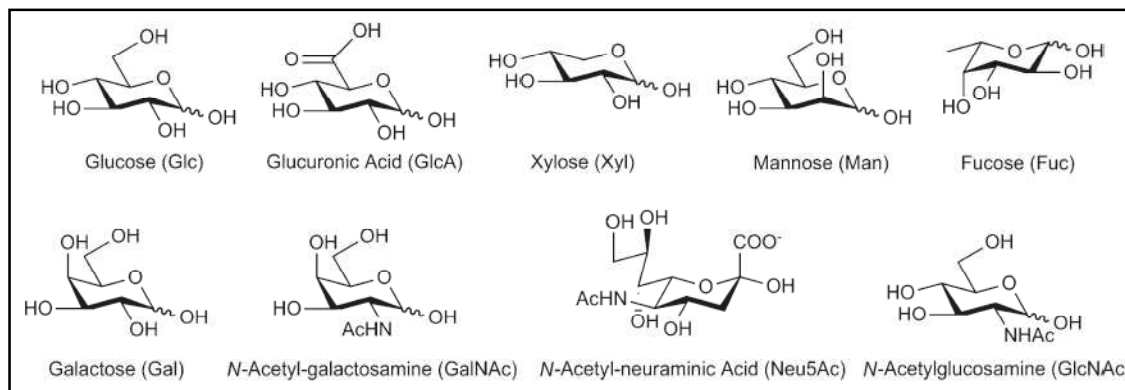
1. GLICOBIOLOGIA

1.1 Generalidades sobre glicobiologia e glicosilação

O termo glicobiologia foi cunhado em 1988 para descrever uma nova fronteira na biologia molecular, envolvida no estudo da estrutura, biossíntese, metabolismo e funções biológicas de carboidratos simples, bem como de todas as outras classes de biomoléculas (proteínas, lipídios e nucleotídeos) que interagem com eles. A descoberta de que essas moléculas podiam desencadear diversos processos foi de fundamental importância para que os carboidratos passassem a ser tratados de meras moléculas estruturais e de reserva para importantes moléculas de informação, nascendo assim a glicobiologia (TAYLOR; DRICKAMER, 2003).

As propriedades físico-químicas dos monômeros dos carboidratos, como o fato de poderem ser D- ou L-enantiômeros, serem furanosídeos ou piranosídeos, se ligarem um ao outro por ligações α - ou β -glicosídica, seu potencial em formar glicoconjugados (glicoproteínas, proteoglicanas e glicolipídeos), além da sua capacidade de incluir pontos de ramificação a partir de monômeros simples, permite que eles se associem em oligossacarídeos ou polissacarídeos, codificando informações bastante complexas. A informação contida nos oligossacarídeos ligados a outras moléculas é conhecida como glicocódigo ou código dos glicanos (BLOMME *et al.*, 2009; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2009). A figura I.1 representa as unidades monossacarídicas relevantes biologicamente.

Figura I.1: Representação dos principais monossacarídeos de relevância biológica encontrados nos organismos vivos.



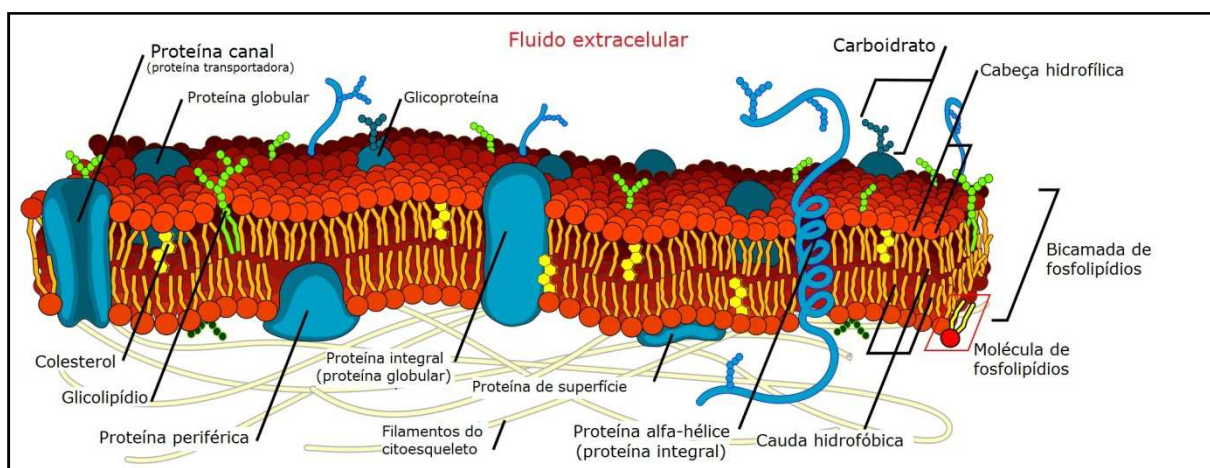
Fonte: SCHMALTZ *et al.*, 2011.

Funções biológicas associadas a glicocódigos de glicoconjugados são numerosas, e cada vez mais torna-se claro que as células utilizam oligossacarídeos específicos para codificar importantes informações sobre o destino de proteínas, interações célula-célula, diferenciação celular, desenvolvimento de tecidos, receptação de hormônios, coagulação sanguínea, fertilização e embriogênese, além de os utilizar como sinais extracelulares (revisado por WIEDERSCHAIN, 2013).

Sabe-se que a superfície das células é coberta por carboidratos complexos, os quais conferem uma identidade molecular única a cada tipo celular, tecido ou órgão. Esses açúcares, conhecidos individualmente como glicano e coletivamente como glicocálix, são biossinteticamente construídos à partir de monossacarídeos simples, gerando um espectro diversificado de oligo-, polissacarídeos e glicoconjugados.

O glicocálix está envolvido na coesão celular e na proteção da célula contra choques físicos e contra o ataque de micro-organismos. Ligado ao papel de reconhecimento molecular, os oligossacarídeos presentes no glicocálix estão envolvidos em muitos fenômenos do tipo receptor-ligante envolvendo lectinas, e muitos estudos confirmam papéis na comunicação entre células (VARKI, 1993; DENNIS *et al.*, 1999) (Figura I.2).

Figura I.2: Esquema de uma membrana celular apresentando a diversidade de glicoconjugados que formam o glicocálix celular.



Glicosilação de proteínas é a modificação pós-traducional mais comum entre os seres vivos, influencia fortemente muitos outros aspectos funcionais, incluindo localização celular, degradação e controle da qualidade de proteínas (ARNOLD *et al.*, 2007). A glicosilação tem uma variedade de papéis importantes em muitos eventos celulares como

estrutural, de sinalização e de reconhecimento (DENNIS *et al.*, 1999). A chave para o entendimento dessas funções é o conhecimento da estrutura primária dos glicoconjugados.

Foi demonstrado que anomalias no padrão de glicosilação frequentemente acompanham condições anormais fisiológicas ou patológicas, como o câncer. Este objeto de estudo está recebendo atualmente muita atenção e estudos têm sido realizados a fim de elucidar as complexas estruturas e papéis desses glicanos (DENNIS *et al.*, 1999).

Glicoproteínas possuem um ou alguns oligossacarídeos de complexidade variada covalentemente unidos a proteínas. A porção oligossacarídica da proteína é muito heterogênea e rica em informações, formando locais extremamente específicos para o reconhecimento e a ligação de alta afinidade por proteínas ligantes de carboidratos, chamadas lectinas. É estimado que, em média, 70% das proteínas eucarióticas sejam glicosiladas (APWEILER *et al.*, 1999).

Dois grandes famílias de glicoproteínas podem ser definidas segundo a natureza de ligação covalente estabelecida entre os glicanos e a parte peptídica: as *N*- e as *O*-glicoproteínas. Esses dois tipos de glicosilações podem ser encontrados simultaneamente em uma mesma proteína.

1.1.1 A *N*-glicosilação

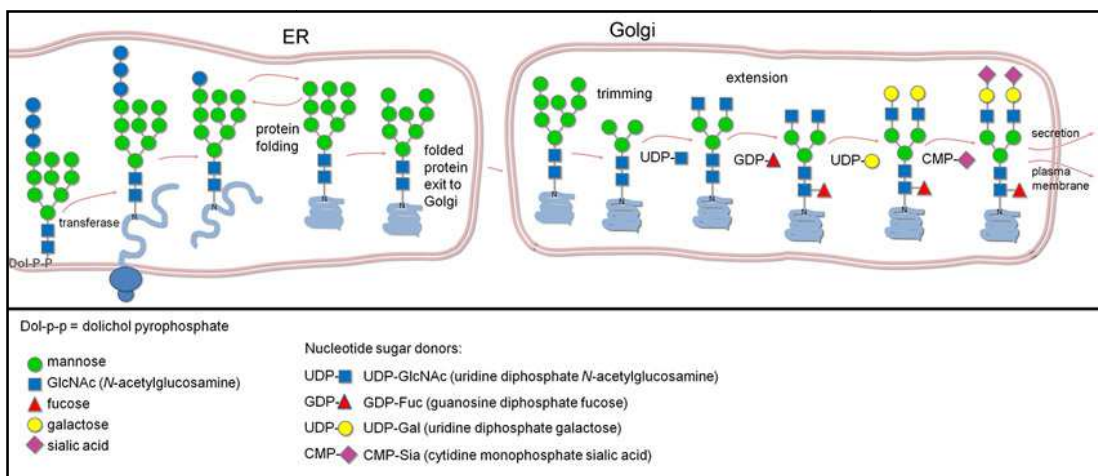
Em *N*-glicosilação, um resíduo de *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) é ligado por uma ligação amida a um resíduo de asparagina pertencente a uma sequência consenso Asn-X-Ser/Thr, onde X pode ser qualquer aminoácido com exceção da prolina. A presença da sequência consenso é requerida para *N*-glicosilações. Entretanto, a ocupação do sítio em potencial não é obrigatória. Por isso, uma glicoproteína pode conter um número de sítios de *N*-glicosilação em potencial, cada qual podendo ou não estar glicosilado (SCHMALTZ *et al.*, 2011).

Os *N*-glicanos são constituídos de uma estrutura pentassacarídica comum, formada por dois resíduos de GlcNAc e três resíduos de manose (Man): Man₃GlcNAc₂, chamado de núcleo ou *core*. Esse núcleo é em seguida utilizado como substrato para a diversificação dos *N*-glicanos no complexo de Golgi (MOLINARI, 2007).

Durante a síntese dos *N*-glicanos, quando a proteína nascente entra no retículo endoplasmático, um bloco de açúcares (Glc₃Man₉GlcNAc₂) é transportado via um precursor lipídico (dolicolpifosfato) e transferido para o grupo amino na cadeia lateral da asparagina

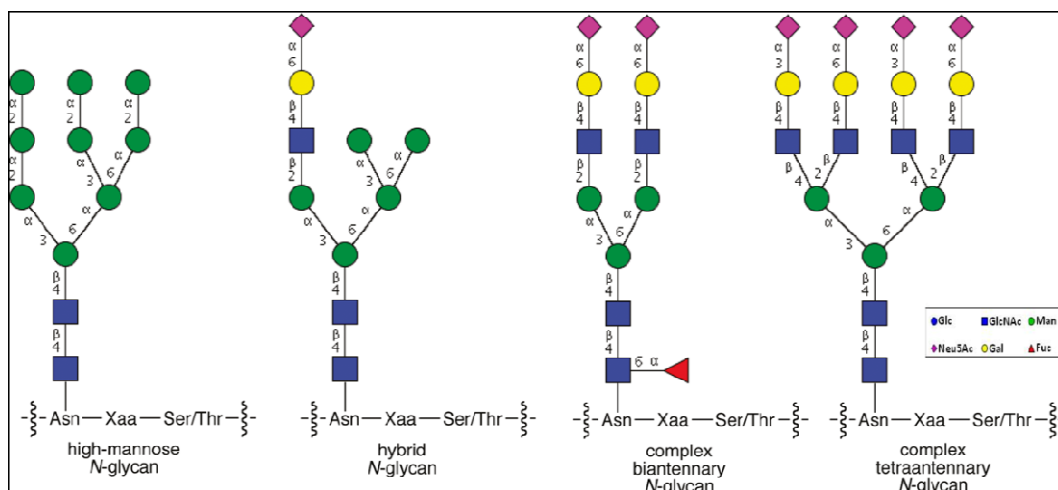
estabelecendo uma ligação *N*-glicosídica. O glicano é posteriormente processado e modificado por enzimas no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, gerando três tipos de *N*-glicanos encontrados em proteínas humanas maduras: rico em manose, complexo e híbrido (NILSSON; VON HEIJNE, 1993). As estruturas complexas podem ainda ser categorizadas em bi-, tri- e tetra-antenadas, dependendo do número de ramos de carboidratos originados a partir do núcleo do trimanosídeo (Figuras I.3 e I.4).

Figura I.3: Diagrama esquemático representando a síntese de *N*-glicanos.



Um glicano pré-montado (Glc₃Man₉GlcNAc₂) é transferido de um transportador lipídico, dolicolpirofosfato (Dol-P-P), para um grupo amino da asparagina de uma proteína nascente, estabelecendo uma ligação *N*-glicosídica. O glicano é cortado e, em seguida, estendido no complexo de Golgi, onde glicosiltransferases e glicosidases modificam a estrutura do carboidrato durante a sua maturação. Glicosiltransferases usam açúcares ativados (nucleotídeos-açúcares) como doadores para as reações de extensão (SCHMALTZ *et al.*, 2011).

Figura I.4: *N*-glicanos encontrados em proteínas humanas maduras.



Legenda da figura I.4: Rico em manose, híbrido e complexo. As estruturas complexas podem ainda ser categorizadas em bi-, tri- e tetra-antenadas, dependendo do número de ramos de carboidratos originados do núcleo do trimanosídeo (SCHMALTZ *et al.*, 2011).

1.1.2 A *O*-glicosilação

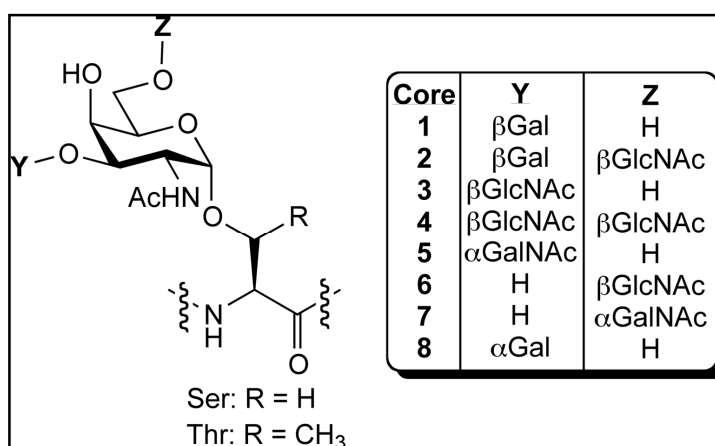
A *O*-glicosilação é uma modificação pós-traducional que consiste na formação de uma ligação glicosídica entre o carbono anomérico de um carboidrato com a hidroxila de um resíduo de serina ou treonina de uma proteína, já na sua conformação ativa. Glicosilações do tipo *O*-glicano são extremamente diversas em composição química e nenhuma sequência consenso tem sido observada (SCHMALTZ *et al.*, 2011).

O primeiro passo na síntese de *O*-glicanos consiste na transferência de um resíduo GalNAc por uma *N*-acetil-galactosaminiltransferase para um resíduo de serina ou treonina de uma proteína ou lipídeo, este GalNAc gera várias estruturas de núcleos diferentes que podem ser alongados e modificados por sialilação, sulfatação, acetilação, fucosilação e extensão de polilactosaminas. Se a alongação não ocorre (como é o caso particular de células transformadas) o antígeno Tn (GalNAc α 1-Ser/Thr) é gerado, e pode ser modificado para sialil-Tn por uma sialilação (α 2-6). Posteriormente, a adição de galactose e/ou GlcNAc por glicosiltransferases específicas, levam à formação de estruturas comuns de *O*-glicanos (STEEN *et al.*, 1998).

O açúcar mais abundante *O*-ligado é o *O*-GalNAc de mucinas, podendo citar também o *O*-Fucose, encontrado no fator de crescimento epidérmico, o *O*-Xilose que ancora glicosaminoglicanos, e a modificação de proteínas citosólicas por *O*-GlcNAc (SCHMALTZ *et al.*, 2011).

No caso das mucinas (glicoproteínas que podem conter inúmeras cadeias de oligossacarídeos *O*-ligados), a biossíntese é controlada por uma família de ppGalNAcTs (polipeptídeo *N*-acetil-galactosaminiltransferase), que cataliza a adição de UDP-GalNAc para um resíduo de Ser/Thr com uma região peptídica que caracteriza uma mucina. Existem oito núcleos de estrutura de mucina que são construídos por GTases, representados na figura I.5 (SCHMALTZ *et al.*, 2011).

Figura I.5: Núcleo da estrutura dos *O*-glicanos do tipo mucina.



A expressão de mucinas, secretadas ou ligadas à membrana, é particularmente abundante nas células epiteliais, especializadas na produção de muco, que funciona como barreira de proteção. Elas participam igualmente do controle da antigenicidade do sistema imune e podem estar relacionadas aos fenômenos de adesão celular (SCHMALTZ *et al.*, 2011).

A glicosilação do tipo *O*-GlcNAc consiste na adição de um resíduo único de GlcNAc a uma serina ou treonina à cadeia polipeptídica. Essa glicosilação é regulada pela enzima *O*-*N*-acetilglicosaminiltransferase (OGT) que transfere o GlcNAc para a proteína a partir de um UDP-GlcNAc, em seguida a *O*-*N*-acetilglicosaminidase (*O*-GlcNAcase) cataliza a hidrólise. Essa glicosilação participa de diversos processos celulares, como a regulação da transcrição e da tradução, a proteção de proteínas contra degradação, o tráfego intracelular, entre outros (GOLKS; GUERINI, 2008).

O fator de crescimento epidérmico (EGF para *E*pidermal *G*rowth *F*actor) possui motivos estruturais que podem ser *O*-glicosilados e *O*-fucosilados. A adição de uma glicose a um resíduo de serina que pertença à sequência consenso Cys-X-Ser-X-Pro-Cys é catalisada por uma *O*-glicosiltransferase do retículo endoplasmático. Já a *O*-fucosilação começa pela transferência de um resíduo de fucose a uma serina ou treonina localizada na sequência Cys-X3-5-Ser/Thr-Cys, também no retículo endoplasmático, por uma *O*-fucosiltransferase. As cadeias podem então ser estendidas no complexo de Golgi (WOPEREIS *et al.*, 2006).

Esses dois últimos tipos de glicosilação são particularmente importantes na via de sinalização chamada *Notch*. Esta via de sinalização está presente na maioria dos organismos

multicelulares, é uma via fundamental na comunicação celular a nível de desenvolvimento neuronal e embriogênico (LUTHER; HALTIWANGER, 2009).

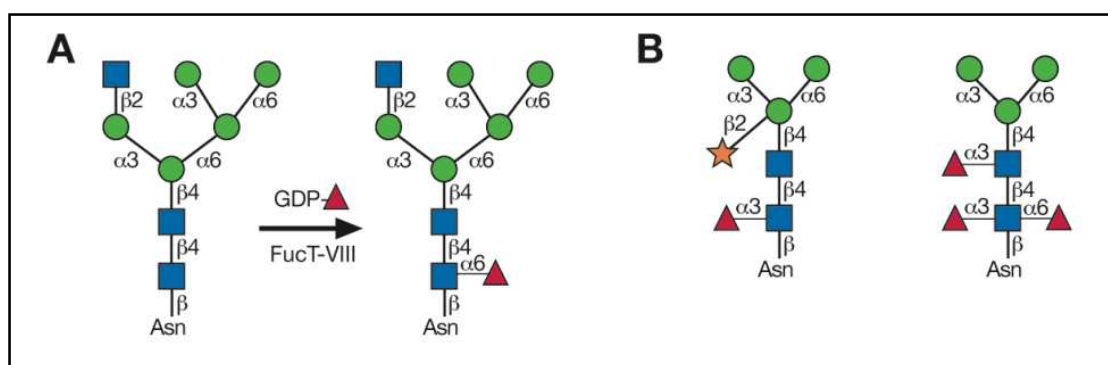
1.1.3 Fucosilação

Fucose é um monossacarídeo encontrado em glicoproteínas e glicolípídeos de invertebrados, vertebrados, plantas e micro-organismos. Essas unidades são largamente presentes na superfície das células. Elas, geralmente, estão ligadas às cadeias dos açúcares e exercem um papel importante em inúmeros eventos biológicos. Esse açúcar constitui ainda uma parte importante de antígenos, como o antígeno H do grupo sanguíneo e antígenos específicos do estágio embrionário. Aumentados níveis de unidades de fucose e mudanças no padrão de fucosilação, como resultado de diferentes níveis de expressão de várias fucosiltransferases, agem como marcadores específicos para o desenvolvimento de antígenos, particularmente em processos inflamatórios e em vários tipos de câncer.

A fucosilação compreende a ligação de um resíduo de fucose a um *N*-glicano, *O*-glicano ou glicolípídeo e é uma das modificações mais comuns envolvendo oligossacarídeos em glicoproteínas e glicolípídeos (VARKI *et al.*, 2009). Ela pode ser dividida dentro de vários tipos, incluindo (α 1-2), (α 1-3) (α 1-4) e (α 1-6). Em *N*-glicanos presentes em vertebrados, a principal modificação no núcleo é a adição de uma fucose (ligação α 1-6) a uma unidade de *N*-acetilglicosamina adjacente a asparagina do núcleo de fucosilação. Fucosilação em glicoproteínas de invertebrados também ocorre nessa *N*-acetilglicosamina, mas a fucose pode ser adicionada numa ligação (α 1-3) e/ou (α 1-6), podendo ainda estar presente nos dois GlcNAc do núcleo. Em plantas a fucose é transferida para a asparagina do GlcNAc apenas pela ligação (α 1-3) (Figura I.6). Fucosiltransferases são as enzimas responsáveis pela transferência da fucose ao GlcNAc do núcleo (VARKI *et al.*, 2009).

A regulação da fucosilação depende do tipo de célula ou órgão envolvido. Basicamente, fucosiltransferases, GDP-fucose e transportadores de GDP-fucose estão envolvidos nas vias de fucosilação. Existem 11 diferentes tipos de fucosiltransferases (Fut) conhecidas e elas estão divididas em quatro grupos. Fut1 e Fut2 estão envolvidos na síntese de fucose (α 1-2), Fut3, -4, -5, -6, -7 e -9 na síntese de fucose (α 1-3/ α 1-4) que estão envolvidos na síntese dos antígenos de *Lewis*. Fut8 participa da síntese de fucose (α 1-6), núcleo de fucosilação de *N*-glicanos. Porém, a atividade de Fut10 e Fut11 ainda não é bem entendida (MIYOSHI *et al.*, 2008).

Figura I.6: Modificações no núcleo de *N*-glicanos.



(A) Em mamíferos a principal modificação é a adição de uma fucose (ligação $\alpha 1-6$) a uma unidade de GlcNAc; (B) em plantas a fucose é transferida para a asparagina do GlcNAc apenas pela ligação ($\alpha 1-3$) e em invertebrados a fucose pode ser adicionada numa ligação ($\alpha 1-3$) e/ou ($\alpha 1-6$), podendo ainda estar presente nos dois GlcNAc do núcleo. A representação dos açúcares pelas formas geométricas segue a mesma legenda da figura I.3.

O aumento dos níveis de fucosilação tem sido reportado em algumas condições patológicas, incluindo inflamação e câncer. Certos tipos de glicoproteínas fucosiladas e vários tipos de anticorpos, que reconhecem oligossacarídeos fucosilados como sialyl Lewis a/x, têm sido utilizados como marcadores de tumores. A alfa-fetoproteína (AFP), por exemplo, é um bem-conhecido marcador de tumor para hepatocarcinoma celular. Todavia, por vezes, tem seu nível aumentado em doenças de fígado benignas, como hepatite crônica e cirrose. Em contraste, AFP com o núcleo de fucosilação ($\alpha 1-6$), denominada AFP-L3, é um marcador muito específico para hepatocarcinoma celular. Dessa forma, a fucosilação de glicoproteínas regula a função biológica dessas moléculas. Mudanças na fucosilação e moléculas que possam reconhecer essas mudanças podem fornecer uma nova estratégia na terapia do câncer (MIYOSHI *et al.*, 2008).

Para todas as glicofomas de uma proteína, sua variação estrutural e de complexidade, define no fim sua função e atividade. Processos chave como enovelamento protéico, estabilidade e localização são definidos pela glicosilação das proteínas (VISEUX *et al.*, 2001). Adicionalmente, comunicação celular, como interações célula-célula, célula-matriz, proteína-proteína e açúcar-açúcar, são controlados através de interações específicas entre um glicano e sua(s) proteína(s) alvo (ZACHARA; HART, 2002).

A modulação da glicosilação de proteínas por variações na ocupação de sítios na cadeia polipeptídica ou a variação das estruturas oligossacarídicas ocupando um sítio particular de glicosilação na proteína, modula a atividade biológica de glicoproteínas.

Glicosilações anormais de glicoconjugados têm sido identificadas em muitas doenças em mamíferos, incluindo desordens hereditárias, imunodeficiências, doenças cardiovasculares e câncer (WARREN, 1999; LOWE; MARTH, 2003).

Recentemente, o foco de muitas iniciativas em pesquisas médicas direciona-se no desenvolvimento de ferramentas analíticas que permitam o monitoramento sutil dessas mudanças significativamente biológicas em glicosilações de modo a auxiliar no diagnóstico e prognóstico dessas doenças e para melhor entendê-las, a um nível molecular, auxiliando no desenvolvimento de drogas efetivas (LOWE; MARTH, 2003; POCHEC *et al.*, 2003; ZACHARA; HART, 2002; HAKOMORI, 2002). Com esse objetivo em mente, a análise de glicanos tem se tornado um primeiro passo essencial para o melhor entendimento do papel biológico de glicoproteínas.

Em algas, muitas lectinas são glicosiladas como as das espécies de *Caulerpa cupressoides* (VANDERLEI *et al.*, 2010), *Ulva pertusa* (FREITAS *et al.*, 1997), *Gracilaria cornea* (LIMA *et al.*, 2005), *G. ornata* (LEITE *et al.*, 2005) e *Tichocarpus crinitus* (MOLCHANOVA *et al.*, 2010). Porém, a estrutura e o papel biológico desses glicanos ainda são pouco entendidos.

2. ALGAS

2.1 Algas marinhas

As algas são organismos autotróficos pertencentes ao Reino Protista e de grande valor ecológico, sendo encontradas tanto na forma de seres unicelulares como multicelulares (eucarióticos e procarióticos), apresentando assim uma variação morfológica extremamente diversa. Não possuem tecidos especializados nem vasos condutores, sendo a clorofila “a” o principal pigmento fotossintético (RAVEN *et al.*, 2007).

Na natureza, as algas estão amplamente distribuídas, sendo encontradas em ambientes marinhos, de água doce ou terrestre. Elas são capazes de habitar praticamente qualquer ambiente provido de luz e umidade suficiente que possibilitem a extração dos nutrientes essenciais à sua sobrevivência. Sua distribuição está relacionada com a temperatura e salinidade da água, disponibilidade de luz solar, correntes dos oceanos e das condições físicas e químicas ambientais (RAVEN *et al.*, 2007).

Esses organismos podem fixar-se em rochas, substratos rochosos ou calcários, conchas de moluscos e até sobre outras algas. Além disso, podem ocupar zonas extremas, por exemplo, regiões de altas e baixas temperaturas, como é o caso das algas termófilas e psicrófilas, respectivamente, e também, regiões de elevado e baixo pH, representadas pelas algas alcalífilas e acidófilas (RAVEN *et al.*, 2007).

As algas são os organismos que mais contribuem para a produtividade dos ecossistemas, desempenhando um papel ecológico comparável ao das plantas nos *habitats* terrestres. Estes organismos representam a base da cadeia alimentar nos oceanos e são responsáveis por quase metade da fotossíntese que acontece no planeta, além do seu papel na renovação da maior parte do oxigênio para o ar atmosférico (DAY *et al.*, 1999).

Vale ressaltar a importância das algas como fonte de diversos compostos bioativos. Algumas espécies são utilizadas na área nutracêutica e cultivadas como fonte de compostos de interesse comercial, atuando como um meio de subsistência para algumas comunidades e contribuindo com a geração de emprego e renda (CARDOZO *et al.*, 2007).

As macroalgas estão inseridas em três principais filos, *Rhodophyta*, representado pelas algas vermelhas, *Phaeophyta*, pelas algas marrons ou pardas e o filo *Chlorophyta*, pelas algas verdes.

2.2 Algas marinhas vermelhas

As algas marinhas vermelhas representam um grupo com grande diversidade de espécies (4.000 a 6.000) sendo a grande maioria de *habitat* marinho. Elas apresentam frequentemente coloração avermelhada, devido à presença de ficoeritrina, pigmento fotossintético acessório presente no interior dos cloroplastos, sendo também encontrados, em menor quantidade, os pigmentos ficocianina e aloficocianina (RAVEN *et al.*, 2007).

As algas vermelhas possuem as clorofilas “a” e “d” e o polissacarídeo conhecido como “amido das florídeas” é o principal material de reserva. São predominantemente dotadas de uma estrutura multicelular, filamentosa ou pseudoparenquimatosa, com ou sem ramos, podendo ser encontradas na forma cilíndrica, comprida ou foliácea (RAVEN *et al.*, 2007).

Alguns países como o Japão, a China e as Filipinas utilizam as algas vermelhas, como as dos gêneros *Eucheuma*, *Hypnea*, *Porphyra* e *Gracilaria*, na sua dieta alimentar, como também na extração de seus ficocolóides, onde as propriedades funcionais, físicas e

biológicas desses compostos lhes agregam grande valor comercial (CAMPO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2010a).

2.3. Potencialidade do estado do Ceará

No Brasil, a região costeira compreendida entre o estado do Ceará e o norte do estado do Rio de Janeiro abriga a flora algal mais diversificada do país (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

A extensa área costeira do litoral cearense e a diversidade de espécies encontradas nesta região (principalmente de algas multicelulares) constituem fontes de grande potencialidade para a descoberta de novos insumos, com potencial aplicação em diversas áreas da biotecnologia. Do total de 32.000 espécies bentônicas conhecidas de *Chlorophyta*, *Phaeophyta* e *Rhodophyta*, cerca de 250 táxons são conhecidos na costa do Estado do Ceará, a maioria ainda pouco explorados (disponível em: <www.ib.usp.br/algamare-br/>, acesso em 06/01/2014). O Estado do Ceará desponta como um dos estados brasileiros que mais tem apresentado desenvolvimento de tecnologias para o cultivo de recursos pesqueiros no Brasil, dentre eles o de algas marinhas. Os compostos extraídos desses organismos possuem uma grande aplicabilidade e alguns produtos comerciais envolvendo algas já estão presentes no mercado.

2.4 Compostos bioativos de algas marinhas

As algas marinhas constituem uma rica reserva de diversas substâncias naturais, muitas delas de imenso interesse biotecnológico. Isso, provavelmente, é devido à necessidade de se desenvolver em um ambiente altamente competitivo, e da necessidade do emprego de estratégias de autodefesa contra os predadores existentes nos ecossistemas em que se encontram, bem como, atuarem em situações de estresse causadas pelas variações ecológicas, o que resulta em um significativo nível de diversidade química e estrutural de diferentes compostos (CARDOZO *et al.*, 2007).

Em muitos países, a indústria alimentícia consome uma grande quantidade de algas, que são bem conhecidas por apresentarem um alto conteúdo de fibras, minerais, vitaminas, enzimas, diferentes antioxidantes e peptídeos bioativos (WIJESEKARA *et al.*, 2011). Nas últimas décadas, uma ênfase maior tem sido dada ao cultivo controlado de algas

para produção em larga escala de produtos de interesse comercial, dentre esses produtos alguns merecem destaque, como os ácidos graxos poliinsaturados, os carotenóides, os ficocolóides e as lectinas.

- Ácidos graxos poliinsaturados

Os ácidos graxos poliinsaturados, comumente conhecidos como PUFAs ou AGPIs, fazem parte da gama de compostos bioativos extraídos de algas. Essas moléculas são essenciais no funcionamento normal das próprias células, atuando na regulação da fluidez da membrana celular, no transporte de elétrons e oxigênio e adaptando as algas a diversas variações térmicas ambientais (FUNK, 2001).

Os AGPIs são importantes tanto na área nutracêutica quanto na área biomédica. São fontes de ômega-3, essenciais para a saúde e nutrição humana. Quando ingeridos, esses AGPIs podem ser convertidos particularmente em γ -linolenato, eicosatrienoato e aracdonato. Esse último é um precursor essencial dos eicosanóides, lipídios reguladores envolvidos na inflamação, na febre, na sensação de dor e em uma variedade de outros processos importantes para os seres humanos, o que torna as algas marinhas uma fonte rica em ácidos graxos poliinsaturados de interesse farmacológico (GILL; VALIVETY, 2011).

A produção em larga escala de ácidos graxos ainda é ineficiente. Algas transgênicas projetadas para produção de AGPIs poderiam fornecer uma fonte alternativa sustentável para o consumo humano. Entretanto, devido ao fato de organismos transgênicos serem ainda pouco aceitos no mercado, uma alternativa seria utilizar ácidos graxos poliinsaturados de algas transgênicas como fonte de alimento na aquicultura. Desta maneira, os benefícios dos ácidos graxos poderiam ser transferidos a dieta humana, sem a necessidade de ingestão direta de alimentos modificados geneticamente (HOEK *et al.*, 1998).

- Carotenóides

Os carotenóides são pigmentos naturais derivados de unidades de isopreno de cinco átomos de carbonos que são enzimaticamente polimerizados para formar uma estrutura altamente regular de 40 átomos de carbono conjugados.

Os carotenóides estão envolvidos na captação da luz solar nas algas marinhas, são os constituintes essenciais do aparato fotossintético, onde eles agem como: pigmentos

acessórios no processo de captação da luz, estabilizadores estruturais nos complexos protéicos dos fotossistemas e como inibidores de processos oxidativos (radicais livres) provocados em decorrência de exposições prolongadas à luz (ZHANG *et al.*, 1999).

Os carotenóides apresentam um grande benefício à saúde humana, pelo fato de serem uma fonte natural de provitamina A. A deficiência de vitamina A em seres humanos, além de muitas doenças relacionadas à visão, pode levar à morte. Muitas das experimentações médicas especulam que a atividade antioxidante dos carotenóides poderia ser o fator chave em reduzir a incidência de muitas doenças, especialmente àquelas mediadas pela luz. Além disso, existe uma evidência considerável que demonstra que uma dieta elevada em carotenóides pode ocasionar uma diminuição nos riscos de certos cânceres como o de próstata, através do uso de licopeno (um precursor do γ -caroteno e δ -caroteno), encontrado em diversos vegetais como o tomate e também em algas marinhas (CANTRELL *et al.*, 2003).

- **Ficocolóides**

Os ficocolóides são polissacarídeos de alto peso molecular, compostos de polímeros de unidades de açúcar. Eles são os principais polissacarídeos presentes na parede celular das algas e estão envolvidos em mecanismos de reconhecimento entre algas e patógenos (POTIN *et al.*, 1999). Os principais ficocolóides extraídos de algas são o ágar, a carragenana e o alginato, devido ao seu extensivo uso na indústria alimentícia e coméstica.

- **Ágar:** Ágar é o nome dado para as galactanas sulfatadas extraídas de algas marinhas vermelhas que contêm resíduos de (α 1-4)-3,6-anidro-L-galactose e (β 1-3)-D-galactose. Ele é usado em produtos alimentícios e também em meios de cultura biológicos. São importantes na área farmacêutica sendo usados em cápsulas de medicamentos e como agentes laxantes e anticoagulantes. No meio científico é utilizado em processos de separação de moléculas nas técnicas de eletroforese, imunodifusão, cromatografias, etc (CHEN *et al.*, 2004).

- **Carragenana:** A carragenana é o nome genérico para a família de galactanas sulfatadas extraídas de algas marinhas vermelhas solúveis em água, e consiste de um esqueleto alternado de (α 1-4)-3,6-anidro-D-galactose e (β 1-3)-D-galactose. As carragenanas são mais frequentemente utilizadas que o ágar como agentes emulsificantes em diferentes alimentos.

As propriedades farmacêuticas das carragenanas, incluindo atividade antitumoral, antiviral e anticoagulante, vêm sendo descritas (MAYER; HAMANN, 2004).

- **Alginato:** O alginato é o nome comum dado também à família de polissacarídeos sulfatados lineares, encontrado em algas marinhas pardas, compostos de resíduos de ácidos β -D-manurônico e α -L-gulurônico. É utilizado na indústria têxtil como cola em fios de algodão e sua principal propriedade na indústria alimentícia é gelificante em função da sua alta viscosidade. Seu potencial uso farmacêutico tem contribuído para o desenvolvimento de novas drogas com função antitumoral, anticoagulante, antiviral, dentre outras (HALLEGRAEFF *et al.*, 2003).

Além desses compostos, as algas marinhas apresentam uma gama de outras moléculas que, embora em menor quantidade, apresentam propriedades biológicas interessantes, principalmente do ponto de vista biotecnológico, dentre estes compostos, destacamos os aminoácidos do tipo micosporinas, envolvidos na proteção dos organismos contra a radiação solar e bastante utilizados na indústria de cosméticos para produção de protetor solar (WHITEHEAD; HEDGES, 2005). Vale destacar também, em especial, as moléculas protéicas conhecidas como lectinas.

3. LECTINAS

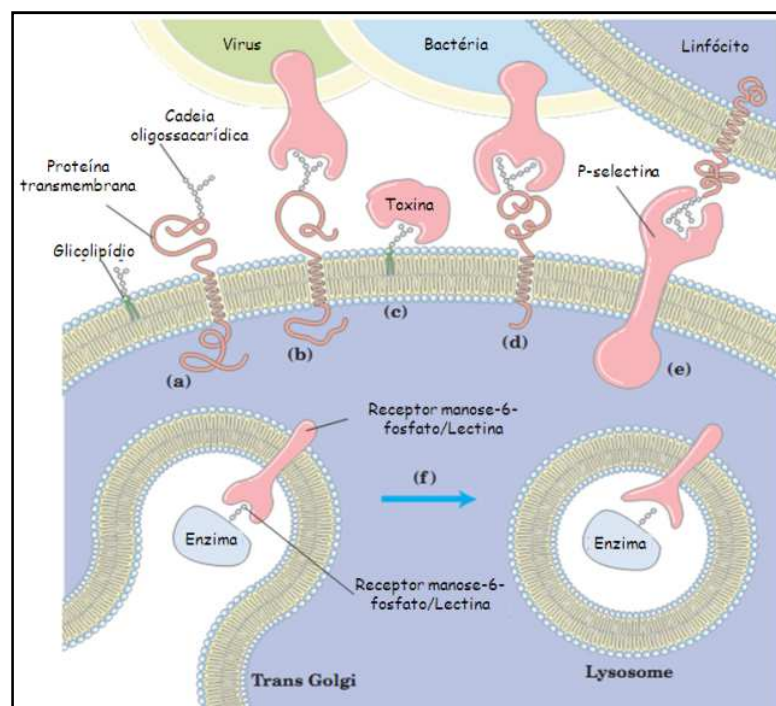
3.1 Generalidades sobre lectinas

Lectinas são proteínas de origem não imune que possuem pelo menos um domínio não-catalítico e a capacidade de se ligar de forma específica e reversível a mono e oligossacarídeos sem modificá-los (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Também são chamadas de aglutininas aquelas capazes de aglutinar células (eritrócitos, por exemplo) e glicoconjugados. Esta característica é devido ao fato destas proteínas serem geralmente multivalentes. São moléculas ubíquas na natureza, sendo encontradas em todos os seres vivos.

Um dos maiores motivos que hoje incentiva a pesquisa sobre lectinas, provavelmente, está relacionado à sua capacidade única de "ler" as informações biológicas que são codificadas na estrutura tridimensional de açúcares. Lectinas são, de fato, os receptores para as interações proteína-açúcar, tendo um papel fundamental em vários processos de reconhecimento molecular e sinalização celular (AMBROSI *et al.*, 2005).

Essas moléculas exibem as mais diversas funções nos organismos onde são encontradas. Em vegetais, por exemplo, atuam como moléculas de defesa, de reserva energética, de controle da homeostase, e participam da simbiose de plantas com bactérias nitrificantes, entre outras funções. Em animais, atuam principalmente no processo de reconhecimento celular, na citotoxicidade em células e organismo, adesão celular, interações célula-matriz, indução de apoptose, aglutinação de células e bactérias, entre outras (DANGUY *et al.*, 2002) (Figura I.7).

Figura I.7: Papéis dos oligossacarídeos na superfície das células.



(a) Oligossacarídeos de uma variedade de glicoconjugados na superfície da membrana plasmática, interagem com elevada especificidade com lectinas do meio extracelular. (b) Vírus que infectam células animais se ligam a glicoproteínas da superfície celular como primeiro passo para a infecção. (c) Toxinas bacterianas se ligam a um glicolipídeo de superfície antes de entrar em uma célula. (d) Algumas bactérias aderem à célula e depois as colonizam ou infectam. (e) Selectinas de certas células mediam interações célula-célula, como as de linfócitos T com as células endoteliais da parede capilar em um sítio de infecção. (f) O receptor de manose 6-P se liga ao oligossacarídeo de enzimas lisossomais, orientando-as para a transferência ao lisossomo (Adaptado de NELSON; COX, 2009).

Lectinas surgiram no cenário científico em 1860 com Weir Mitchell, que durante seus estudos, observou o fenômeno de hemaglutinação de eritrócitos quando associados ao veneno de cascavel (*Crotalus durissus*) (MITCHELL, 1860). O primeiro relato sobre lectinas

de origem vegetal veio em 1888 durante estudos realizados por Stillmark sobre o princípio tóxico de extratos de sementes de mamona (*Ricinus comunis*), em que ele observou que tais extratos apresentavam a capacidade de aglutinar eritrócitos de diferentes animais (STILLMARK, 1888).

De Weir Mitchell e Stillmark até os dias atuais, inúmeras moléculas biológicas já foram identificadas e caracterizadas como lectinas. Mas, somente a partir da década de 70, essas moléculas passaram a ser tema de investigação em vários grupos de pesquisa. Apenas em 1966 houve o primeiro registro de lectina de algas, onde Boyd e colaboradores verificaram a atividade hemaglutinante de extratos de algas marinhas utilizando eritrócitos humanos (BOYD *et al.*, 1966).

3.2 Lectinas de microalgas

A maioria dos estudos prévios em lectinas de algas tem sido focada em macroalgas marinhas. Por outro lado, os trabalhos relacionados às lectinas de microalgas são escassos e, portanto, o conhecimento dessas proteínas e suas características são limitados. Na última década, a presença de hemaglutininas em microalgas vem despertando o interesse dos pesquisadores, principalmente porque esses organismos podem ser facilmente manipulados e cultivados, apontando como uma excelente fonte de obtenção de lectinas para fins biotecnológicos.

A primeira lectina de microalga isolada e caracterizada foi a de *Chlamydomonas reinhardtii*. Na literatura existem trabalhos descrevendo as lectinas de *Nostoc ellipsosporum* (BOYD *et al.*, 1997), *Microcystis aeruginosa* cepa M228 (YAMAGUCHI *et al.*, 1998), *M. aeruginosa* cepa PCC7806 (KEHR *et al.*, 2006), *Microcystis viridis* (YAMAGUCHI *et al.*, 1999; BEWLEY *et al.*, 2004), *Oscillatoria agardi* (SATO *et al.*, 2000), *Scytonema varium* (BOKESCH *et al.*, 2003), *Chlorella pyrenoidosa* (CHU; HUANG; LIN, 2006), entre outros.

Algumas características especiais de aglutininas de microalgas foram relatadas, como por exemplo, a expressão da lectina de *M. viridis* que é inibida em condições de cultivo aeróbio, não depende de cátions divalentes para exibir atividade hemaglutinante, apresenta alta homologia interna e características importantes relacionadas a galectinas animais e lectinas de leguminosas (YAMAGUCHI *et al.*, 1999; BEWLEY *et al.*, 2004). A lectina da cepa M228 de *M. aeruginosa* apresenta alta homologia interna e é dependente de cálcio para manter a atividade hemaglutinante; enquanto que a expressão da lectina da cepa PCC7806 de *M.*

aeruginosa está relacionada com a expressão da toxina microcistina (YAMAGUCHI *et al.*, 1999, KEHR *et al.*, 2006).

Com exceção das lectinas da cepa M228 *M. aeruginosa* e de *Chlorella pyrenoidosa*, as lectinas isoladas de microalgas apresentam forte atividade anti-HIV (BALZARINI, 2007). A potencialidade da aplicação dessas moléculas na prevenção e disseminação do vírus HIV impulsionou a busca de novas lectinas com potenciais biotecnológicos, através de levantamentos da atividade hemaglutinante, bem como no entendimento do modo de ação dessas moléculas, mediante diversos estudos estruturais (ZIÓŁKOWSKA; WLODAWER, 2006).

Os dados estruturais disponíveis até agora, apontam para algumas características em comum, como multiplicação interna de seqüências de aminoácidos, como é o caso das lectinas que exibem atividade anti-HIV: CV-N (BEWLEY *et al.*, 1998), scytovirina (BOKESCH *et al.*, 2003), MVL (YAMAGUCHI *et al.*, 1999) e OAA (SATO *et al.*, 2007). A estrutura tridimensional dessas lectinas mostra características de troca de domínios, entretanto elas são completamente distintas uma das outras quanto à seqüência de aminoácidos (ZIÓŁKOWSKA; WLODAWER, 2006).

Também vale destacar que, apesar de ter sido relatado o isolamento de uma lectina em uma espécie de microalga, isso não exclui a possibilidade de se isolar aglutininas diferentes na mesma espécie. Por exemplo, as lectinas isoladas das cepas M228 e PCC7806 de *M. aeruginosa* são diferentes em estrutura e atividades biológicas.

3.3 Lectinas de macroalgas

Embora os trabalhos com lectinas de algas estivessem aumentando no mundo, desde os primeiros relatos levantados por Boyd em 1966; no Brasil, somente se relataram aglutininas isoladas desses organismos em 1991, por meio de estudos feitos com espécies de macroalgas marinhas coletadas no estado do Ceará (AINOUZ; SAMPAIO, 1991).

Todavia, ainda são poucos os trabalhos de detecção e isolamento de aglutininas em algas quando comparados aos estudos realizados em plantas ou até mesmo em animais, devido, principalmente, ao fato de serem produzidas em baixa quantidade em seus sistemas primários (fontes onde são encontradas) e da relativa dificuldade em se obter material (NAGANO *et al.*, 2005a).

Quando comparadas às de plantas, as lectinas presentes em algas possuem a característica de exercer determinada ação biológica em concentrações muito inferiores, devido a sua maior potência. Além disso, devido ao seu baixo peso molecular, podem apresentar-se menos antigênicas do que as lectinas de alto peso molecular, como as encontradas em plantas e animais (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Muitas lectinas de algas, especialmente de algas vermelhas, dividem algumas características em comum, a grande maioria é monomérica, o ponto isoelétrico está entre os pHs 4-6 e a atividade hemaglutinante dessas moléculas não é inibida por monossacarídeos simples, e sim, por glicoproteínas e/ou açúcares complexos. Lectinas de algas que se ligam a monossacarídeos tem sido recentemente reportada para várias espécies de algas verdes pertencentes ao gênero *Enteromorpha*, *Ulva* e *Codium* (AMBROSIO *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2004; ALVAREZ-HERNANDEZ *et al.*, 1999). Algumas espécies de macroalgas possuem lectinas que não dependem de cátions divalentes para exibir atividade hemaglutinante, no entanto, outros trabalhos já demonstraram a dependência desses íons (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+}), como as do gênero *Codium* e *Ptilota*. Essas moléculas apresentam a capacidade de aglutinar eritrócitos mesmo depois de serem submetidas a altas temperaturas ou a extremos de pH (ZIÓLKOWSKA; WLODAWER, 2006).

Mesmo com o aumento significativo no número de trabalhos referentes às lectinas de macroalgas marinhas, as informações bioquímicas e estruturais são escassas, e as informações estruturais já existentes apontam para uma grande variedade de famílias de lectinas nas diferentes espécies de macroalgas marinhas (CALVETE *et al.*, 2000).

3.3.1 Funções endógenas de lectinas de algas

Desde sua descoberta, as lectinas têm gerado polêmica com relação a suas possíveis funções. Mesmo para lectinas com grande homologia, torna-se difícil atribuir uma função em comum, tendo em vista que as mesmas podem apresentar variações em relação à especificidade, à localização intracelular e ao período de síntese (RUDIGER; GABIUS, 2001). Até o momento, poucos trabalhos relatam o papel endógeno de lectinas de algas.

Para a alga verde *Bryopsis plumosa* foi verificado que quando o organismo sofre injúria celular, os componentes celulares são expelidos para fora da célula e ocorre um fenômeno de agregação dessas organelas para formar um protoplasto. A agregação é mediada pela lectina bryohealina presente na alga e específica por glicanos do tipo *N*-acetil-D-

glicosamina e *N*-acetil-D-galactosamina. As organelas se agregam rapidamente e tornam-se cobertas por um envelope gelatinoso que é aproveitado para formar novos protoplastos. Os estudos citoquímicos revelam que o envelope preliminar é composto inicialmente de polissacarídeos e lipídios, além de apresentar características de uma membrana semi-permeável e de transporte seletivo de materiais (KIM *et al.*, 2005; GROSSMAN, 2005).

Em estudos posteriores foi verificado que a lectina bryohealina poderia executar duas funções: agregação de organelas celulares em água do mar e também proteção de qualquer contaminação bacteriana durante a regeneração de protoplastos (YONN *et al.*, 2008).

Lectinas de algas reconhecem e ajudam na aderência dos gametas sexuais durante a reprodução. Alguns estudos, por meio de microscopia confocal, mostram a ligação do isotiocianato de fluoresceína (FITC) a lectinas conjugadas aos gametas da alga marinha vermelha filamentosa *Aglaothamnion oosumiense*, durante as etapas de fertilização (KIM; KIM 1999). Para essa lectina, denominada AOL-1, foi evidenciado um mecanismo de reconhecimento célula-célula no processo de fertilização (HAN *et al.*, 2012). Porém, a maioria dos estudos usa evidências indiretas de experiências de inibição usando carboidratos ou lectinas de outros organismos (principalmente de origem vegetal), como agentes de bloqueio ligados aos gametas.

Vários sistemas complementares lectina-carboidratos têm sido relatados para o reconhecimento de gametas de algas marinhas (SCHMID, 1993; KIM; FRITZ, 1993; KIM; LEE; FRITZ, 1996).

Outra atividade biológica e ecológica de lectina de alga é o seu possível envolvimento na simbiose e defesa, como exibido por lectinas de plantas terrestres e outros invertebrados marinhos (KILPATRICK, 2000). Há evidências para um mecanismo de reconhecimento, no início da simbiose entre larvas do coral *Fungia scutaria* e algas dinoflageladas unicelulares endossimbióticas, onde os glicanos da parede celular das algas reconheceriam as lectinas presentes nas larvas do coral. Esta etapa de reconhecimento ocorre durante o contato celular inicial entre os parceiros simbióticos através de uma interação lectina-glicanos. No entanto, para a maioria das simbioses, pouco é conhecido sobre os mecanismos envolvidos no reconhecimento e especificidade (WOOD-CHARLSON *et al.*, 2006).

Segundo Medina-Ramires *et al.* (2007) as lectinas de algas marinhas de alguma forma estariam envolvidas no processo de colonização. De acordo com os autores, as algas poderiam expor suas lectinas no ambiente circundante e suas propriedades seriam prejudiciais para o crescimento de outros organismos marinhos competindo assim, pelo mesmo espaço e nutrientes.

O mecanismo de adaptação ou tolerância à água doce das espécies de *Ulva limnetica* foi investigado utilizando técnicas de biologia molecular. O estudo revelou que *U. limnetica* acumula uma proteína (lectina-ULL) quando cultivada em condições de baixa salinidade. Porém, não foi possível detectar a causa do aumento da expressão da ULL nestas condições (ICHIHARA *et al.*, 2009).

3.3.2. Aspectos estruturais de lectinas de macroalgas

Até o momento, há poucas lectinas de algas caracterizadas com informações sobre estrutura primária ou terciária. Porém, mesmo com poucas informações sobre a estrutura primária dessas moléculas, os resultados que têm sido obtidos vêm apontando diferentes famílias nas várias espécies estudadas (TEIXEIRA *et al.*, 2012). Baseado então na estrutura primária de lectinas de algas disponível, essas aglutininas poderiam ser agrupadas em algumas famílias.

Em algas marinhas vermelhas, a lectina de *Bryothamnion triquetrum* (BTL) foi a primeira a ter a estrutura primária determinada (CALVETE *et al.*, 2000). No mesmo ano, Hori *et al.* relataram a estrutura primária de aglutininas de *Hypnea japonica* (HJA) (HORI *et al.*, 2000). Ambos os trabalhos mostraram a presença de lectinas específicas para *N*-glicanos complexos.

As comparações de sequências das estruturas primárias da BTL e das HJAs (1, 2 e 3) revelaram similaridades entre si e também com as isoformas das lectinas de *Bryothamnion seaforthii* (BSL2, BSL3 e BSL4), isoladas da Costa do Brasil, e as lectinas de *B. seaforthii* (BSHV1, BSHV2, BSHV3 e BSHV4), isoladas da Costa da Venezuela (CALVETE *et al.*, 2000; HORI *et al.*, 2000; NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012, MEDINA-RAMIREZ *et al.*, 2006). Estas lectinas apontam características que permitem serem agrupadas em uma mesma família.

Em contrapartida, foram relatadas diferenças estruturais entre lectinas das macroalgas marinhas vermelhas *H. cervicornis* e *H. musciformis*, encontradas na Costa do

Brasil, e as lectinas da alga *H. japonica*, encontrada na Costa do Japão, evidenciando que pode existir uma variedade de lectinas entre espécies do mesmo gênero que habitam ecossistemas distintos (NAGANO *et al.*, 2005b).

Com base na identidade entre as lectinas de *Hypnea cervicornis* e *H. musciformis* (HCA e HML) e nas diferenças apresentadas nas sequências de aminoácidos em comparação com BTL/HJAs/BSLs, Nagano *et al.* (2005b) sugeriram que HCA e HML constituiriam uma nova família de lectina de algas marinhas.

As lectinas isoladas a partir das algas vermelhas *Eucheuma serra*, *E. amakusaensis* e *E. cottonii* exibiram características semelhantes e apresentaram semelhanças quanto a sequência N-terminal. Esses dados sugerem que as lectinas de espécies do gênero *Eucheuma* podem ser agrupadas em uma terceira família de lectinas de algas (KAWAKUBO *et al.*, 1999).

Já para a lectina GRFT, da alga vermelha *Griffithsia sp.*, sua sequência de aminoácidos apresentou similaridade com a lectina de planta terrestre *Artocarpus integrifolia* (MORI *et al.*, 2005).

Nas algas marinhas verdes, a primeira estrutura primária determinada foi a da lectina de *Ulva pertusa* (UPL-1), através da clonagem do cDNA (WANG *et al.*, 2004). A lectina ULL de *Ulva limnetica* também foi identificada e sequenciada através de clonagem de cDNA, mostrando identidade de 30% com a UPL-1 (ISHIHARA *et al.*, 2009).

Em outro grupo podemos incluir a estrutura primária de bryohealina (YOON *et al.*, 2008) e da lectina de *B. hypnoides* (NIU *et al.*, 2009), elas não apresentaram similaridade com lectinas de plantas, mas se assemelhavam com lectinas animais que possuem domínios característicos de ligação à fucose.

A alga verde *B. plumosa* possui outras três lectinas descritas. A lectina específica a manose (BPL-2) foi caracterizada e os autores não encontraram homologia dela com outras lectinas nos bancos de dados de proteínas. A BPL-3 possui especificidade para GlcNAc e GalNAc, mesma especificidade que a bryohealina. No entanto, na comparação das estruturas primárias de bryohealina e BPL-3 ficou evidente que são proteínas completamente diferentes. A análise da sequência da BPL-3 mostrou que ela pertence ao grupo de lectinas do tipo H de caracóis da espécie de *Helix pomatia*. A quarta lectina descrita, denominada BPL-4, também específica para GlcNAc/GalNAc, apresentou 60% de similaridade de sequência primária com a BPL-3 (HAN *et al.*, 2011, 2012).

Em outro trabalho, a sequência de aminoácidos da lectina isolada da alga marinha verde *Boodlea coacta* (BCA) foi determinada através de degradação de Edman e de clonagem de cDNA. A proteína consiste em 3 domínios repetidos internos, cada domínio contendo um motivo de sequência semelhante ao sítio de ligação a carboidratos da lectina da planta terrestre *Galanthus nivalis* (SATO *et al.* 2011).

A sequência primária de *Codium barbatum* (CBA) foi determinada por cDNA em associação com ESI-MS e degradação de Edman e não apresentou similaridade com outras lectinas, e nem características relevantes com outras lectinas isoladas do mesmo gênero. Os ensaios de inibição da atividade hemaglutinante, mostraram que CBA tem preferência para *N*-glicanos do tipo complexo e nenhuma afinidade por monossacarídeos, diferente de outras lectinas do gênero *Codium*, específicas para GalNAc (PRASEPTIANGGA *et al.*, 2012).

Embora o número de trabalhos de caracterização estrutural de lectinas de macroalgas marinhas tenha aumentado, ainda há dificuldades na classificação funcional e filogenética destas proteínas, pois as informações existentes estão restritas a poucas espécies sendo mais concentradas nas algas vermelhas (ZIÓŁKOWSKA; WLODAWER, 2006).

A tabela I.1 mostra um resumo das lectinas de algas com estrutura primária determinada.

Tabela I.1: Lectinas de macroalgas com sequência de aminoácidos determinada.

Lectina	Alga de origem	Especificidade	Referência
BTL	<i>Bryothamnion triquetrum</i>	Fetuína e mucina	Calvete <i>et al.</i> , 2000
BSL2 BSL3 BSL4	<i>Bryothamnion seaforthii</i>	Fetuína, avidina e mucina	Nascimento-Neto <i>et al.</i> , 2012
BSHV1 BSHV2 BSHV3 BSHV4	<i>Bryothamnion seaforthii</i>	Fetuína e mucina	Medina-Ramirez <i>et al.</i> , 2006
Hypnin A-1 Hypnin A-2 Hypnin A-3	<i>Hypnea japonica</i>	Core (α 1-6) fucosilado	Hori <i>et al.</i> , 2000, Okuyama <i>et al.</i> , 2009
HML	<i>Hypnea musciformis</i>	Mucina	Nagano <i>et al.</i> , 2005b
HCA	<i>Hypnea cervicornis</i>	Mucina e GalNAc	Nagano <i>et al.</i> , 2005 b

ESA-1 ESA-2 ESA-3	<i>Eucheuma serra</i>	Mannose N-ligados	Hori <i>et al.</i> , 2007
GRFT	<i>Grifthisin sp.</i>	Mannose e GlcNAc	Mori <i>et al.</i> , 2005
ULP1	<i>Ulva pertusa</i>	GlcNAc e tiroglobulina	Wang <i>et al.</i> , 2004
ULL	<i>Ulva liminotica</i>	Mucina, fucose	Ishihara; Shimada, 2009
Bryohealina BPL-2 BPL-3 BPL-4	<i>Bryopsis plumosa</i>	N-acetil D-galactosamina Manose N-acetil-D-glicosamine	Yoon <i>et al.</i> , 2008 Han <i>et al.</i> , 2010, 2011, 2012
BP	<i>Bryopsis hypnoides</i>	N-acetil galactosamina, N-acetil glicosamina, Mucina	Niu <i>et al.</i> , 2011
EPL-1 EPL-2	<i>Enteromorpha prolifera</i>	L-fucose	Ambrosio <i>et al.</i> , 2003
CBA	<i>Codium barbatum</i>	N-glicanos complexos tiroglobulina de porco (PTG) e asialo-PTG	Praseptangga <i>et al.</i> , 2012
BCA	<i>Boodlea coacta</i>	N-glicanos com alto conteúdo de (α 1-2) manose	Sato <i>et al.</i> , 2011

Técnicas como degradação de Edman, espectrometria de massas e clonagem de cDNA fornecem informações estruturais de estrutura primária que apontam a existência de uma grande variedade de famílias de lectinas nas diferentes espécies de macroalgas marinhas investigadas.

Para resolução de estruturas tridimensionais de proteínas, as técnicas mais utilizadas são a cristalografia de raios X, utilizando fonte de luz Síncrotron, e a ressonância magnética nuclear. Essas técnicas desempenham um papel fundamental na bioquímica moderna e na biologia molecular, mais especificamente na elucidação das bases estruturais da funcionalidade das macromoléculas.

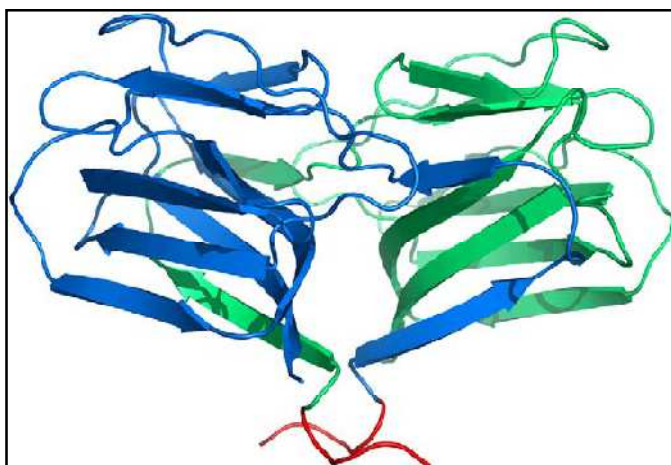
Uma importância na determinação estrutural de lectinas e lectina/ligante pode ser bem compreendida quando esses estudos estão correlacionados com a atividade biológica dessas proteínas. Um exemplo bastante esclarecedor pode ser dado com algumas lectinas de microalgas como: cyanovirina-N (CV-N) (BOYD *et al.*, 1997; BARRIENTOS *et al.*, 2003; HELLE *et al.*, 2006), scytovirina (SVN) (BOKESCH *et al.*, 2003), *Microcystis viridis* lectin

(MVL) (BEWLEY *et al.*, 2004) e da macroalga *Griffithsia sp.* (GRFT) (MORI *et al.*, 2005; ZIÓŁKOWSKA *et al.*, 2006) que apresentam significativa atividade contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV), mas com diferentes potenciais de inibição do vírus. A justificativa da potencialidade dessas proteínas pode ser analisada quando se tem sua estrutura.

Um banco de dados está disponível com a estrutura de lectinas de diferentes origens em *3D lectin database*: <http://www.cermav.cnrs.fr/databank/lectine/>.

A estrutura tridimensional da GRFT, a única lectina de macroalga com estrutura tridimensional até agora determinada, foi resolvida e refinada a 1.3 Å de resolução através da técnica de SAD (*Single-wavelength Anomalous Diffraction*) com a proteína produzida de forma recombinante em *Escherichia coli* e marcada com selenometionina. O enovelamento da GRFT corresponde a um motivo estrutural denominado beta-prisma que consiste em três repetições de quatro fitas beta anti-paralelas que formam um prisma triangular. Diferente de outros membros da mesma família, GRFT forma um domínio com dímeros trocados onde as duas primeiras fitas betas da primeira cadeia estão associadas com dez fitas da outra cadeia e vice versa. A estrutura de cada monômero possui semelhanças com as lectinas relacionadas à jacalina, mas a sua estrutura dimérica é única (ZIÓŁKOWSKA *et al.*, 2006) (Figura I.8).

Figura I.8: Representação do dímero da grifithsina (GRFT) baseado nas coordenadas da proteína recombinante fusionada à etiqueta de histidina.



Monômeros nas cores verde e azul. A extensão N-terminal da proteína, resultado do processo de clonagem, está colorido em vermelho (código PDB: 2GTY).

A estrutura cristalográfica da GRFT complexada com diferentes monossacarídeos e dissacarídeos como: manose (PDB: 2GUC e 2GUD), oligomanose (PDB: 3LL2), glicose (PDB: 2NUO), *N*-acetilglicosamina (PDB: 2GUE), (α -1,6) mannobose (PDB: 2HYQ) e maltose (PDB: 2HYR) também já foi resolvida (ZIÓŁKOWSKA *et al.*, 2006; 2007; MOULAEI *et al.*, 2010).

3.3.3 Estudo de especificidade de lectinas de algas

O perfil de ligação a carboidratos pode ser investigado por várias técnicas, entre elas podemos citar: ensaios de inibição da atividade hemaglutinante, cromatografias em colunas imobilizadas com lectinas ou carboidratos, ultrafiltração por centrifugação acoplada a HPLC, *glycan array*, *lectina array*, entre outras.

As características de ligação a carboidratos de lectinas de algas têm sido estudadas, porém, detalhes da especificidade fina de ligação a glicanos ainda são escassos. Baseado então nas propriedades de ligação a carboidratos, lectinas de algas podem ser categorizadas em três principais tipos, as lectinas que se ligam a *N*-glicanos do tipo complexo, as que se ligam a *N*-glicanos com alto conteúdo de manose e as específicas para ambos os tipos de *N*-glicanos, os complexos e com alto conteúdo de manose (HORI *et al.*, 1990).

BCA, lectina da alga verde *Boodlea coacta*, teve sua especificidade de ligação a carboidratos investigada pelo método de ultrafiltração por centrifugação acoplada a HPLC com oligossacarídeos piridilaminados. BCA se liga a *N*-glicanos com alto conteúdo de manose, mas não a tipos complexos, tipo híbrido, núcleo de *N*-glicanos ou oligossacarídeos de glicolipídeos. Essa lectina tem especificidade exclusiva por manose ligada ao terminal não redutor de *N*-glicanos em ligação (α 1-2), e grupos desses resíduos aumentam a afinidade da lectina pelo carboidrato. Outras lectinas com especificidade relatada para *N*-glicanos com alto conteúdo de manose, também já foram descritas para lectinas de algas, como é o caso das lectinas CV-N, OAA e ESA-2. BCA não divide similaridade de sequência com essas lectinas (SATO *et al.*, 2011).

ESA-2, lectina da alga vermelha *Eucheuma serra*, teve sua especificidade investigada pelo mesmo método de ultrafiltração centrífuga acoplada a HPLC com oligossacarídeos piridilaminados, e em coluna imobilizada com a lectina. ESA-2 mostrou ser estritamente específica para *N*-glicanos com alto conteúdo de manose com uma estrutura mínima contendo o pentassacarídeo $\text{Man}(\alpha 1-3)\text{Man}(\alpha 1-6)\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$.

ESA-2 não se liga ao núcleo pentassacarídico, porém requer o terminal redutor do resíduo GlcNAc para ligação. ESA-2 é estruturalmente e evolutivamente relacionada a OAA, lectina de *Oscillatoria agardi*, ambas possuem uma especificidade restrita para *N*-glicanos com alto conteúdo de manose com ligação (α 1-3) (HORI *et al.*, 2007).

Algumas lectinas de plantas com especificidade para *N*-glicanos com alto conteúdo de manose exibem uma forte atividade anti-HIV, mas outros são fracos ou não apresentam nenhuma atividade contra o vírus (BARRE *et al.*, 1996; FOUQUAERT *et al.*, 2009). Para lectinas de algas com especificidade para esses *N*-glicanos a atividade anti-HIV também já foi relatada, elas são também as lectinas estudadas mais potentes contra o vírus por inibirem a replicação do HIV com uma EC₅₀ na faixa de nano- e picomolar (ZIOLKOWSKA; WLODAWER, 2006).

As lectinas de *Hypnea japonica* (HJAs) tiveram sua especificidade de ligação a carboidrato investigada por cromatografia de afinidade frontal com oligossacarídeos piridilaminados. Essas moléculas mostraram uma especificidade de ligação a *N*-glicanos complexos contendo o núcleo de fucosilação (α 1-6). Essa especificidade foi afetada pela existência de resíduos de GlcNAc bisectados e tetra-antenados. A sialilação no terminal não redutor também comprometeu a especificidade da lectina pelo açúcar (OKUYAMA *et al.*, 2009).

É conhecido que o núcleo de fucosilação (α 1-6) é alterado em determinados tipos de câncer e que afeta a eficiência da citotoxicidade celular dependente de anticorpo. Lectinas com a capacidade de reconhecer especificamente essas estruturas são valiosas ferramentas no diagnóstico do câncer e no controle de qualidade de anticorpos medicinais (OKUYAMA *et al.*, 2009).

Para a elucidação das interações de carboidratos de diferentes estruturas a diferentes moléculas, a técnica de *Glycan array*, desenvolvida pelo *Consortium for Functional Glycomics* (CFG), vem se tornando uma poderosa ferramenta, inclusive na análise da especificidade fina de ligação lectina-carboidrato. Esse método realiza a análise em paralelo sobre uma grande diversidade de açúcares de forma minorizada e rápida, permitindo determinar a especificidade de proteínas. Porém, até o presente, nenhuma lectina de alga teve sua especificidade fina de ligação a carboidrato investigada por essa técnica.

Estudos da especificidade fina de ligação de lectinas por carboidratos dão maior importância a essas proteínas, como ferramentas interessantes no campo da glicômica,

funcionando como sondas específicas na investigação da estrutura dos carboidratos, pela capacidade de discriminar diferenças na estrutura dessas moléculas.

3.3.4 Aplicações biotecnológicas de lectinas de algas

Lectinas exibem diversas potenciais aplicações no campo da biotecnologia, e muitas dessas aplicações já foram relatadas para lectinas isoladas de algas (HELLE *et al.*, 2006; NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2007; BITENCOURT *et al.*, 2008; NEVES *et al.*, 2007; VIEIRA *et al.*, 2004; VANDERLEI *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010b).

Estudos de utilização popular de algas marinhas para tratar distúrbios como o câncer, a fístula e a gota, dentre muitos outros, favoreceram as pesquisas de atividade biológica para esses organismos, bem como para suas moléculas isoladas.

Lectinas de algas parecem ser especialmente interessantes para aplicações biológicas, porque elas são moléculas pequenas, induzem menor imunogenicidade nas células hospedeiras, possuem grande estabilidade devido às várias pontes dissulfeto e mostram uma alta especificidade por glicoconjugados complexos, como os presentes na superfície das células (revisado por PINTO *et al.*, 2009).

Lectinas de algas são potentes moléculas contra o vírus da imunodeficiência humana (BOYD *et al.*, 1997; BEWLEY *et al.*, 2004; SOWDER *et al.*, 2005; SATO *et al.*, 2011). Vale ressaltar que a lectina cyanovirina-N (CV-N) além de inibir a entrada do vírus HIV em células hospedeiras, apresenta potencialidade de inibição de outros vírus como Influenza, Ebola, Hepatite-C e Herpes (BARRIENTOS *et al.*, 2003; O'KEEFE *et al.*, 2003; HELLE *et al.*, 2006). BCA mostrou uma potente atividade contra o vírus influenza ao se ligar diretamente ao envelope viral (SATO *et al.*, 2011). GRFT foi capaz de bloquear a ligação da glicoproteína gp120 do envelope viral a células expressando o receptor CD4, e se ligou às proteínas gp120, gp41 e gp160 do envelope viral (MORI *et al.*, 2005).

GRFT e SCV, ambas recombinantes, também foram capazes de inibir o HCV em culturas celulares em baixas concentrações (TAKEBE, 2013).

As algas marinhas vermelhas coletadas no litoral do Ceará *Bryothamnion seaforthii*, *B. triquetrum*, *Hypnea musciformis* e *H. cervicornis*, dentre outras, apresentam lectinas com propriedades biológicas importantes e bastante diversificadas, como indução e

inibição linfocitária (LIMA *et al.*, 1998), atividade antifúngica (MELO *et al.*, 1997), indução da migração de neutrófilo (NEVES *et al.*, 2001), atividade anti-inflamatória (SILVA *et al.*, 2010b), relaxação do músculo de aorta (LIMA *et al.*, 2004), efeito cicatrizante (NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012), etc.

Lectinas de algas marinhas também podem ser úteis nos estudos de composição de glicoconjugados presentes nas membranas de células plaquetárias e na formulação de novos inibidores de agregação, o que é sugerido a partir dos experimentos realizados com as lectinas isoladas de *H. japonica*, *Boodleia coacta*, *Solieria robusta* e *Carpopellis flabellata*. Estas lectinas foram ativas em inibir a agregação de plaquetas sanguíneas humanas. Os autores sugerem que essas proteínas seriam um novo grupo de inibidores na formação de plaquetas (MATSUBARA *et al.*, 1996).

Lectinas de algas também apresentam alto potencial na área odontológica. A inibição da formação de placa bacteriana por *Streptococcus mutans*, o principal responsável pelo estabelecimento e desenvolvimento da cárie dentária, foi observada com as lectinas isoladas das algas vermelhas *B. triquetrum* (BTL) e *B. seaforthii* (BSL) (TEIXEIRA *et al.*, 2007).

Diversas lectinas podem ainda apresentar aplicações terapêuticas, podendo ser utilizadas no combate de diferentes patógenos. A lectina isolada da alga vermelha *Solieria filiformis* foi eficiente ao inibir o crescimento das bactérias gram-negativas *Serratia marcescens*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus sp.* e *Pseudomonas aeruginosa* (HOLANDA *et al.*, 2005).

Significativos efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos também têm sido demonstrados por lectinas isoladas de algumas espécies de algas marinhas, tais como a *H. cervicornis* (BITENCOURT *et al.*, 2008), *Amansia multifida* (NEVES *et al.*, 2007), *B. triquetrum*, *B. seaforthii* (VIANA *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2004), *Caulerpa cupressoides* (VANDERLEI *et al.*, 2010) e *Pterocladia capillacea* (SILVA *et al.*, 2010b).

Outra potencial utilização foi sugerida para a lectina da alga marinha vermelha *Gracilaria ornata* (GOL). GOL quando incorporada em sementes artificiais afeta significativamente o desenvolvimento de larvas de *Callosobruchus maculatus*, indicando a possibilidade de utilizar essa lectina como uma estratégia biotecnológica para o manejo de insetos presentes em sementes armazenadas (LEITE *et al.*, 2005).

A lectina purificada a partir da alga *G. cornea* exibiu atividade biológica contra fêmeas do carrapato bovino (*Boophilus microplus*) reduzindo a nutrição, a massa dos ovos, período de oviposição e eclosão, além do tempo médio de sobrevivência das larvas (LIMA *et al.*, 2005).

Esses estudos sugerem que as algas são fonte importante de lectinas com potenciais aplicações nas mais diversas áreas da biotecnologia. Vale salientar que muitas empresas de biotecnologia utilizam lectinas como produtos comerciais. A empresa Quiagen (Alemanha), por exemplo, comercializa lectinas para isolamento de glicoproteínas para estudos de glicoproteômica; a empresa Sigma Aldrich (EUA) comercializa dezenas de lectinas vegetais e uma lectina de alga, já a empresa Aethlon Medical (EUA) comercializa um filtro a base de lectinas para reduzir a carga viral de pacientes em hemodiálise, infectados com o vírus HIV e Hepatite C, e uma pomada vaginal que previne a infecção contra o vírus HIV. Esses exemplos demonstram o potencial biotecnológico dessas moléculas.

3.3.5 Lectinas de algas e câncer

O câncer pode ser definido como um conjunto de mais de 100 doenças que tem em comum o crescimento celular descontrolado, invadem tecidos e órgãos e podem se espalhar por outras regiões do corpo. Tanto os processos de mutação celular, que afetam as células neoplásicas, quanto a metástase envolvem uma série de mudanças genéticas que culminam em modificações no padrão de vários receptores e moléculas de sinalização presentes na superfície das células (revisado por TEIXEIRA *et al.*, 2012).

Mudanças em glicanos são uma das modificações mais recorrentes nessa condição patológica e elas podem ser consideradas tumor-específico, estabelecendo uma correlação entre o estágio da doença e o prognóstico da mesma. Devido à característica peculiar de lectinas em reconhecer carboidratos, elas tem sido utilizadas como ferramentas na identificação desses glicanos celulares. Lectinas de algas se tornam ainda mais promissoras, por serem (na sua grande maioria) moléculas pequenas, estáveis devido às várias pontes dissulfeto, induzirem baixa imunogenicidade e por mostrarem alta especificidade por glicoconjugados complexos, como os presentes na superfície das células. Essas moléculas podem ser utilizadas na oncologia como sondas de diagnóstico e como modificadores da resposta biológica (SINGH *et al.*, 2013).

Na área de cancerologia, extratos lectínicos de várias algas marinhas exibiram a capacidade de aglutinar fortemente células tumorais de camundongo do tipo FM3A, em concentrações mínimas, inferiores àquelas exigidas pelas lectinas de plantas, sugerindo que as lectinas de algas poderiam ser excelentes ferramentas para os estudos e pesquisas do câncer (TAKAMINE *et al.*, 2002).

Foi observado que a lectina isolada da alga marinha vermelha *Eucheuma serra* (ESA) mostrou ser fortemente supressora do desenvolvimento de células cancerígenas de cólon em camundongos, onde ela induziu a morte celular de maneira dose-dependente via apoptose (FUKUDA *et al.*, 2006). ESA também induziu a morte celular através da indução da atividade da caspase-3 e fragmentação do DNA em células de adenocarcinoma de cólon humano (Colo201) (SUGAHARA *et al.*, 2001). A aplicação da lectina de *E. serra* também foi evidenciada como uma ferramenta para a liberação direcionada de drogas, usando vesículas lipídicas para o combate de células cancerosas, o que diminuiu a viabilidade de células de câncer de cólon (Colo201) *in vitro* e não afetou o crescimento das células normais (OMOKAWA *et al.*, 2010).

Lectinas das algas marinhas *B. triquetrum* e *B. seaforthii* reconhecem fortemente variantes de células cancerígenas de cólon humano, o que foi verificado através da combinação de citometria de fluxo e microscopia confocal. A diferenciação foi, provavelmente, em função de glicoreceptores presentes na membrana celular, sugerindo que essas lectinas podem ser uma valiosa ferramenta para o diagnóstico precoce desse tipo de câncer. Adicionalmente, tem sido mostrado que a ligação de ambas as lectinas a células de carcinoma resultam na sua internalização, o que é uma propriedade interessante que pode ser explorada em aplicações futuras, como por exemplo, em sistema direcionado de liberação de drogas (*drug delivery*) (PINTO, 2009).

3.4 Clonagem e expressão de lectinas de algas

O procedimento de produção de lectinas recombinantes já é bem estudado e desenvolvido. Características bioquímicas e estruturais destas lectinas, do ponto de vista da viabilidade de atividades biológicas, indicam que elas são moléculas altamente promissoras para o desenvolvimento de novas drogas.

O primeiro sistema utilizado para a expressão recombinante de proteínas foi o modelo procariótico de *Escherichia coli*. Esse organismo foi inicialmente escolhido em

decorrência do conhecimento aprofundado sobre o seu metabolismo, além disso, esse modelo oferece diversas rotas alternativas para a expressão de proteínas, algumas das quais já foram utilizadas na produção recombinante de lectinas de algas (XIONG *et al.*, 2006; GAO *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011).

Para a expressão de proteínas recombinantes, é necessário inicialmente subclonar o cDNA de interesse em um plasmídeo específico de expressão, o qual estará sob o controle de um promotor induzível.

Um dos sistemas de expressão mais populares em procariotos é o sistema pET que engloba uma família de plasmídeos detentores do promotor T7. Esse promotor normalmente não é reconhecido pela RNA polimerase da *E.coli*, sendo necessária para a expressão do gene, sob o seu controle, a presença de uma RNA polimerase adequada. Uma vez subclonado, o plasmídeo é transferido para uma cepa apropriada de *E.coli*, a qual contém uma cópia cromossômica do gene para a T7 RNA polimerase sob o controle do promotor *lac*. Dessa forma, a produção da T7 RNA polimerase pode ser promovida pelo acréscimo do indutor isopropil- β -tiogalactosídeo (IPTG), promovendo altos níveis de expressão da lectina recombinante (SØRENSEN; MORTENSEN, 2005).

A levedura *P. pastoris* tem sido utilizada também como um importante sistema de expressão, pois possui tanto as vantagens do sistema procariótico, como fácil manipulação, crescimento rápido, genética molecular bem caracterizada, além de ser considerada como GRAS (Generally Recognition as Safe), como de eucariotos, capacidade de realizar processamento e modificações pós-traducionais típicos desses organismos. Vale ressaltar que, dentre os sistemas de expressão heteróloga em eucariotos, é o sistema mais rápido, fácil, de baixo custo e que, geralmente, produz altos níveis de proteína recombinante.

Diversos vetores têm sido desenvolvidos para expressão heteróloga em *P. pastoris*. Os principais plasmídeos de expressão na levedura são baseados no promotor dos genes *AOX1* e *AOX2* que codificam para as enzimas álcool oxidase 1 e 2 responsáveis pela oxidação do metanol a formaldeído, gerando peróxido de hidrogênio. *AOX1* e *AOX2* são promotores fortes e induzíveis com metanol (Manual invitrogen).

Uma das razões mais comuns do insucesso na expressão de proteínas recombinantes é a presença de códons “raros” presentes no mRNA alvo. Muitas proteínas de origem eucariótica possuem sequências de mRNA que incluem códons que raramente são

usados pelo organismo hospedeiro, assim esses códons podem comprometer o nível de expressão da proteína de interesse, além da possibilidade de gerar uma proteína truncada.

Para contornar esse problema, genes sintéticos podem ser construídos de forma a otimizar os códons do mRNA da proteína de interesse com os códons de preferência do organismo hospedeiro, aumentando, dessa forma, as chances de sucesso na produção da proteína recombinante (FRANCIS; PAGE, 2010).

O passo final na purificação da proteína heteróloga de interesse, geralmente consiste em processos cromatográficos. Uma das estratégias para facilitar esse processo, consiste na expressão de proteínas de fusão. Para isso, o gene para a lectina é ligado ao gene de outra proteína que apresente propriedades de interesse. Dentre esses parceiros podemos citar a tioredoxina, caudas de histidina, MBP (*Maltose binding protein*) entre inúmeras outras (SØRENSEN; MORTENSEN, 2005).

Uma das características das lectinas de algas marinhas é seu baixo rendimento, bem como a presença de isoformas, o que torna necessário a utilização de ferramentas de biologia molecular, tais como clonagem e expressão gênica em sistemas heterólogos, que proporcionem um maior progresso na produção de proteínas de interesse, livre de isoformas, tornando, então, mais viáveis os estudos estruturais e de aplicações biológicas dessas moléculas.

A biologia molecular possui inúmeras ferramentas para identificar, extrair, amplificar e expressar um determinado gene de interesse, permitindo a produção em larga escala de proteínas recombinantes. Essas ferramentas podem ser utilizadas para produção heteróloga de lectinas de algas, o que ameniza a necessidade de coleta dos organismos e, assim, evita danos e modificações no ambiente onde elas se encontram.

Métodos de obtenção de proteínas recombinantes foram utilizados para produzir lectinas presentes em diversas algas (Tabela I.2), mostrando que as ferramentas de biologia molecular já são bastante utilizadas para produção dessas moléculas em *E. coli*. Isso viabiliza (devido à maior disponibilidade de proteína) estudos aprofundados de propriedades bioquímicas, estruturais e de atividades biológicas de lectinas de algas.

Tabela 1.2: Lectinas de macroalgas e microalgas produzidas de forma recombinante em sistema procariótico de *E. coli*.

Espécie	Lectina	Identificação	Especificidade	Referência
<i>Griffithia sp.</i>	GRFT	Alga vermelha	Mannose e GlcNAc	Giomarelli <i>et al.</i> , 2006.
<i>Gelidium amansii</i>	Ga_lectin	Alga vermelha	ND	Massi; Ahmad, 2012.
<i>Scytonema varium</i>	SVN	Cianobactéria, alga verde-azul	N-glicanos com alto conteúdo de manose	Xiong <i>et al.</i> , 2006.
<i>Microcystis viridins</i>	MVL	Cianobactéria, alga verde-azul	Manose	Li <i>et al.</i> , 2011.
<i>Nostoc ellipsoforum</i>	CVN	Cianobactéria, alga verde-azul	N-glicanos com alto conteúdo de manose	Gao <i>et al.</i> , 2010.

Esses trabalhos mostraram que as propriedades das lectinas recombinantes produzidas em *E. coli* tem sido idênticas às proteínas selvagens.

Investigações foram feitas sobre a atividade antimicobacteriana da lectina isolada a partir da alga vermelha *Gelidium amansii* (Ga_Lectin). Os resultados revelaram que a lectina recombinante não mostrou efeito inibitório sobre o crescimento de *Micobacterium tuberculosis*, mas poderia aumentar a sensibilidade do patógeno à droga estreptomicina. Estas pesquisas sugerem que Ga_Lectin, em combinação com estreptomicina, pode desempenhar um importante papel na defesa do hospedeiro contra a cepa de *M. tuberculosis* H37Rv (MASSI; AHMAD, 2012).

Para a lectina recombinante da alga vermelha *Griffithia sp.* (His-GRFT), a proteína potencialmente inibiu a citopaticidade induzida pelo HIV com uma EC₅₀ similar ao mensurado para a lectina selvagem. Dessa forma, a atividade anti-HIV e as características de ligação à gp120 foram essencialmente idênticas entre a His-GRFT recombinante e a GRFT selvagem (GIOMARELLI *et al.*, 2006). Em outro trabalho, a GRFT recombinante foi capaz de inibir a infectividade viral do HCV se ligando às glicoproteínas E1 e E2 do envelope do vírus e bloqueando a sua ligação aos hepatócitos humanos (TAKEBE *et al.*, 2013).

3.5 Testes de toxicidade

Artemia sp. é um microcústáceo de fácil aquisição, cultivo e manutenção em laboratório e ainda é sensível a várias classes de contaminantes. Esses fatores fazem da artêmia um organismo muito utilizado e bem difundido em ensaios de toxicidade (VEIGA; VITAL, 2002; NUNES *et al.*, 2006).

Em testes de toxicidade aguda, geralmente procura-se fazer uma estimativa da concentração-teste de uma substância que cause a mortalidade de 50% da população de artemias expostas, durante um período determinado de tempo. Tal concentração corresponde à CE (Concentração Efetiva) ou CL₅₀ (Concentração Letal mediana), obtidas a partir de dados quantais, como número de organismos vivos e mortos (BURATINI *et al.*, 2004). Diferentes substâncias são avaliadas por meio desses testes (PIMENTEL *et al.*, 2009), como extratos de nim utilizados na medicina, cosmética e agricultura (BEVILACQUA *et al.*, 2008), agentes terapêuticos (NUNES *et al.*, 2006), lectinas de plantas (SANTOS *et al.*, 2009), etc. Esses trabalhos mostram que *Artemia sp.* é um organismo bem difundido na utilização para testes de toxicidade.

Estudos mostram que as lectinas das algas marinhas vermelhas *H. musciformis* e *B. triquetrum* possuem vários efeitos biológicos interessantes (descritos no próximo tópico). Considerando essa informação é interessante investigar o nível de toxicidade dessas lectinas, bem como da sua contraparte recombinante.

3.6 Algas marinhas vermelhas *Hypnea musciformis* e *Bryothamnion triquetrum*

A alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamouroux pertence à ordem *Gigartinales* e a família *Hypneaceae*. Possui tamanho geral entre 3 e 30 cm com ramos cilíndricos e cartilagosos, é altamente ramificada, com sua ramificação variável e irregular identificada facilmente pelas extremidades enroladas (ganchos) de seus ramos.

A espécie ocorre em costas, estuários e *habitats* marinhos. É comum encontrá-las em marés calmas e rasas, mais frequentemente em recifes, bancadas, rochas ou epifitando *Sargassum* e outras algas. No estágio de florescimento, pode ser encontrada flutuando livremente. Está amplamente distribuída pelos oceanos e seu provável sucesso de dispersão deve-se a sua rápida taxa de crescimento, sua capacidade de epifitar outras algas e sua fácil fragmentação, além disso, essa disseminação pode ser reforçada através de viagens quando presas em cascos de barcos. *H. musciformis* constitui uma das fontes de alimento de seres

herbívoros marinho, dentre estes, tornou-se parte significativa da dieta alimentar da tartaruga verde, *Chelonia mydas*, considerada uma espécie ameaçada de extinção (disponível em: <<http://www.algaebase.org/search/species/detail/>> acesso em 06/01/2014).

A partir de extratos protéicos de *H. musciformis* foi isolada uma lectina denominada HML. A purificação se deu a partir de métodos cromatográficos em coluna de DEAE celulose e sua estrutura primária foi determinada pela combinação das técnicas de espectrometria de massas sequencial e degradação de Edman (NAGANO *et al.*, 2002; 2005b).

A HML reconhece especificamente a estrutura Tn (Ser/Thr-GalNAc), um antígeno expresso seletivamente em diferentes tipos de tumores. As lectinas específicas para o antígeno Tn podem ser excelentes ferramentas biotecnológicas para a detecção precoce de células cancerosas.

A análise da HML por espectrometria de massas mostrou que esta proteína é composta de uma cadeia polipeptídica simples contendo 90 resíduos de aminoácidos, possuindo sete pontes dissulfeto intracadeia. O alinhamento da sequência de aminoácidos da HML revelou a existência de duplicação interna de domínios, com os resíduos 1-47 e 48-90 correspondendo aos domínios N- e C-terminal, respectivamente (NAGANO *et al.*, 2005a). A estrutura terciária da HML ainda não foi resolvida, apesar da disponibilidade de dados obtidos a partir do cristal difratado por raios X (NAGANO *et al.*, 2005b), a produção da proteína recombinante seria então uma alternativa para contornar esse problema, pela possibilidade de incorporação de metais pesados a sua sequência protéica.

A alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum* (S. G. Gmelin) M. Howe pertence à ordem Ceramiales, família Rhodomelaceae. É uma alga de cor verde vermelho-vinácea, com ramos principais irregularmente ramificados, râmulos espinescentes curtos e dispostos em três fileiras longitudinais, dando a alga um aspecto triangular.

B. triquetrum habita o litoral de calcário irregular na direção do mar, em áreas protegidas e outras superfícies duras com até cinco metros de profundidade. Apresenta uma ampla distribuição geográfica pelo mundo, como as Ilhas do Atlântico (Cabo Verde), América do Norte (Flórida, México), América Central (Costa Rica, Panamá), Ilhas do Caribe (Bahamas, Barbados, Cuba, Antilhas Hispaniola, Jamaica, Antilhas, Porto Rico, Ilhas Virgens) América do Sul (Brasil, Venezuela) e África (Angola, São Tomé e Príncipe) (disponível em: <<http://www.algaebase.org/search/species/detail/>> acesso em 06/01/2014).

Trabalhos realizados com *B. triquetrum* demonstraram que a alga apresenta ação antioxidante, tendo sido eficiente no sequestro do radical DPPH, além de inibição da peroxidação lipídica, com uma atividade comparável ao ácido ascórbico e ao α -tocoferol (disponível em: <<http://www.algaebase.org/search/species/detail/>> acesso em 06/01/2014).

A partir de extratos protéicos de *B. triquetrum* foi isolada uma lectina denominada BTL. A purificação se deu a partir de métodos cromatográficos em coluna de DEAE celulose e foi a primeira lectina de alga a ter sua estrutura primária determinada através das técnicas de degradação de Edman e espectrometria de massas (CALVETE *et al.*, 2000).

A BTL não reconhece monossacarídeos e sua atividade hemaglutinante foi inibida apenas pelas glicoproteínas fetuína, mucina e avidina (AINOUZ, 1995). A análise da BTL por espectrometria de massas mostrou que esta proteína é composta de uma cadeia polipeptídica simples contendo 91 resíduos de aminoácidos, possuindo quatro resíduos de cisteína que formam duas pontes dissulfeto intracadeia (Cys⁵-Cys¹² e Cys⁶²-Cys⁹⁰). Uma dessas cisteínas pode interagir com a cisteína presente na outra cadeia polipeptídica e eventualmente formar um dímero. A BTL apresentou ainda a presença de isoformas e de multímeros da proteína (CALVETE *et al.*, 2000).

Experimentalmente, duas isoformas da BTL foram detectadas a partir da BTL obtida por cromatografia em coluna de DEAE celulose. BTL foi recromatografada em coluna de troca iônica HPLC (*Protein Pack SP 5PW*), seguida por fase reversa. Dois picos foram obtidos e denominados BTL-1 e BTL-2, onde BTL-2 foi a isoforma mais abundante. O sequenciamento N-terminal de ambas (BTL-1 e BTL-2) foi deduzido e mostrou alta homologia com a BTL e as hypininas de *H. japonica*. Ensaio de dicroísmo circular com BTL-2 revelaram a presença majoritária de estruturas aleatórias e um baixo conteúdo de hélices α e folhas β (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

BTL-2 mostrou ser capaz de inibir 98% do crescimento de bactérias Gram-positivas (*Clavibacter michiganensis subs. michiganensis*), mas somente 9,8% do crescimento de bactérias Gram-negativas (*Xanthomonas axonopodis pv passiflorae*). BTL-2, injetada na pata de ratos, não induziu uma inflamação evidente e seu efeito edematogênico foi similar ao do controle negativo. BTL-2 também foi capaz de formar um complexo estável com PLA2 de *Crotalus durissus cascavella* que teve sua atividade farmacológica afetada pela lectina (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Um estudo mostrou que a BTL é capaz de causar um efeito relaxante em isolados de anéis de aorta de rato via interação específica do sítio de ligação a açúcar ao endotélio, resultando na liberação de óxido nítrico (LIMA *et al.*, 2004). BTL também apresentou uma potencial utilidade na área odontológica com capacidade de inibir a formação de placa bacteriana por *Streptococcus mutans*, o principal responsável pelo estabelecimento e desenvolvimento da cárie dentária (TEIXEIRA *et al.*, 2007). Em outros experimentos, BTL foi capaz de induzir a migração de neutrófilos *in vitro* e *in vivo* na cavidade peritoneal, ou bolsa de ar dorsal de ratos e camundongos (NEVES *et al.*, 2001). Na área da cancerologia BTL foi capaz de diferenciar variantes celulares de carcinoma de colon humano, os autores sugerem que essa diferenciação se deu com respeito aos seus glicoreceptores de membrana. A BTL é internalizada e é sugerido seu uso como um carreador na terapia do câncer (PINTO *et al.*, 2009).

Lectinas também foram isoladas da espécie de *B. triquetrum* coletada na costa da Venezuela. A alga mostrou a presença de isoformas de lectinas, denominadas BTHVs (-1, -2, -3 e -4) que apresentaram microheterogeneidades com as isoformas das BTLs isoladas da Costa do Brasil, mostrando que a diferença na localização geográfica da espécie pode influenciar na composição das hemaglutininas (MEDINA-RAMIREZ *et al.*, 2007).

Estudos da potencialidade biotecnológica da HML e da BTL ainda estão por ser explorados. O principal fator limitante para estudos estruturais e de aplicação biológica é a baixa quantidade em massa das proteínas, produzida por métodos clássicos de bioquímica, a presença de isoformas, a relativa pequena quantidade da alga encontrada na natureza e a falta de um modelo estrutural para resolução da estrutura tridimensional dessas moléculas. Uma estratégia para contornar parte desses problemas é a produção da lectina recombinante em sistema heterólogo, que providencie a produção em larga escala das proteínas de interesse, livre de isoformas, amenize o extrativismo das algas e possibilite a produção da proteína recombinante marcada com selenometionina e, dessa forma, viabilize tanto estudos estruturais quanto funcionais com a HML e a BTL.

CAPÍTULO II:
OBJETIVOS DO TRABALHO DE TESE

1. OBJETIVO

1.1 Objetivo geral

Obter de forma recombinante as lectinas das algas marinhas vermelhas *Hypnea musciformis* (rHML) e *Bryothamnion triquetrum* (rBTL) em sistema heterólogo de *Escherichia coli*, bem como determinar sua especificidade fina por oligossacarídeos complexos, além de avaliar seu potencial tóxico contra *Artemias sp.* e contra adenocarcinoma de pulmão (A549).

1.2 Objetivos específicos

Objetivo 1: Obter diferentes clones positivos de *E. coli* transformados com os genes sintéticos que codificam para a rHML e para a rBTL.

Objetivo 2: Expressar e purificar as proteínas recombinantes rHML e rBTL.

Objetivo 3: Determinar a atividade hemaglutinante de rHML e de rBTL.

Objetivo 4: Determinar, por ensaios de desnaturação térmica, os pontos de preferência das proteínas rHML e rBTL, onde uma maior estabilidade é obtida para essas lectinas.

Objetivo 5: Avaliar a especificidade das lectinas selvagens (HML e BTL) e recombinantes (rHML e rBTL) para diferentes oligossacarídeos em experimentos de *glycan array*.

Objetivo 6: Analisar a interação da BTL com um octassacarídeo fucosilado por STD-RMN.

Objetivo 7: Avaliar a citotoxicidade da HML, rHML, BTL e rBTL contra *Artemia sp.*

Objetivo 8: Avaliar a citotoxicidade da HML, rHML, BTL e rBTL contra a linhagem celular A549 utilizando o teste de MTT.

Objetivo 9: Obter cristais de rHML e de rBTL passíveis de difração

A dificuldade de separação das diferentes isoformas das lectinas das algas vermelhas *Hypnea musciformis* e *Bryothamnion triquetrum* por técnicas cromatográficas convencionais tem levado a definição de propriedades funcionais e atividades biológicas para uma mistura de proteínas, impedindo um estudo detalhado das propriedades de muitas dessas

moléculas. A expressão de lectinas de algas em sistema heterólogo de *E. coli* demonstra ser um meio de seleção satisfatório para o estudo isolado de cada isoforma. Essa estratégia oferece uma alternativa de se produzir a proteína de interesse com sequência definida de aminoácidos e permite que se trace uma relação específica entre sequência e função.

O estudo das lectinas recombinantes rHML e rBTL e sua caracterização bioquímica fornece informações sobre as interações proteína-açúcar necessárias para compreender os mecanismos de ação, o reconhecimento e a especificidade a oligossacarídeos complexos em termos moleculares. A longo prazo, estas lectinas produzidas na forma recombinante poderão ser testadas na sua capacidade de reconhecer glicanos envolvidos em eventos biológicos interessantes, desde a investigação de sua função no organismo de origem, como em aplicações biotecnológicas.

CAPÍTULO III:
MATERIAIS E MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1 Algas marinhas vermelhas *Hypnea musciformis* e *Bryothamnion triquetrum*

As algas marinhas vermelhas *H. musciformis* e *B. triquetrum* (Figura III.1) foram coletadas do meso-litoral, durante as marés de sizígia, na praia do Pacheco no Estado do Ceará, Brasil. As algas foram transportadas em sacos plásticos para o laboratório, lavadas com água destilada, separadas de epífitas e mantidas a -20 °C até utilização.

Figura III.1. Representação das algas marinhas vermelhas *H. musciformis* e *B. triquetrum*, respectivamente.



1.2 Extração e purificação das lectinas selvagens de *H. musciformis* (HML) e *B. triquetrum* (BTL)

A extração e purificação das lectinas de *H. musciformis* (HML) e *B. triquetrum* (BTL) seguiram o procedimento descrito por Nagano *et al.*, 2002 e Ainouz *et al.*, 1995, respectivamente. As algas foram trituradas na presença de nitrogênio líquido em um moinho, até a obtenção de um pó fino. O material foi suspenso em uma solução tampão de 20 mM de fosfato de sódio pH 7,0 contendo 150 mM de NaCl (PBS) na proporção de 1:5 p/v e submetido à agitação constante por 18 horas a 4 °C. A suspensão foi filtrada em tecido de nylon e o filtrado foi centrifugado a 15.000 x g por 30 minutos a 4 °C. O precipitado foi então descartado e o sobrenadante foi denominado extrato total. Para a purificação da BTL, o extrato total foi acidificado a pH 1,0 com HCl e mantido a 4 °C por 5 horas. O material precipitado foi separado das proteínas solúveis mediante centrifugação e o pH do

sobrenadante foi ajustado para 7,0 com 1 M de NaOH. Em seguida, ambos os extratos foram, separadamente, submetidos à precipitação protéica (70% de saturação com sulfato de amônio para HML e 60% de saturação para BTL). O material ficou em repouso por 18 horas à temperatura ambiente, em seguida, foi submetido à centrifugação (7.000 x g por 30 minutos à 4 °C). O precipitado foi ressuspensão em PBS seguido por diálise contra 20 mM de tampão fosfato de sódio pH 7,0 e submetido a cromatografia de troca aniônica em coluna de DEAE-celulose (1,5 X 15,0 cm).

A coluna foi previamente equilibrada com tampão de diálise (mesmo tampão de equilíbrio) a um fluxo de 30 mL/h e eluída a um gradiente de 0-2 M de NaCl no mesmo tampão. Frações de aproximadamente 1,5 mL foram coletadas manualmente, sendo o fluxo obtido por gravidade. As frações obtidas foram monitoradas se medido a absorvância a 280 nm.

A atividade hemaglutinante foi determinada utilizando eritrócitos tripsinizados de coelho. As frações ativas foram dialisadas contra água destilada e em seguida liofilizadas.

2. CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DAS LECTINAS HML E BTL EM SISTEMA PROCARIÓTICO DE *Escherichia coli*

2.1 Obtenção do gene sintético da HML e da BTL

O gene sintético, que codifica a lectina isolada da alga marinha vermelha *H. musciformis* (HML) e *B. triquetrum* (BTL), foi comercialmente adquirido pela empresa EpochBiolabs. A sequência gênica sintetizada partiu da informação da sequência primária das lectinas selvagens, tendo otimizado a preferência de códons para a bactéria *Escherichia coli*. A otimização de códons basicamente envolve alterações de códons raros no gene alvo que o deixem mais próximo aos códons de uso do hospedeiro, sem modificar a sequência de aminoácidos da proteína. Essa estratégia foi utilizada para aumentar a produção da proteína recombinante de interesse no sistema em apreciação, contribuindo, dessa forma, com as chances de sucesso na produção da proteína recombinante (Figura III.2).

Figura III.2: Representação esquemática da estrutura primária das lectinas selvagens HML e BTL, respectivamente, e da sequencia gênica otimizada com a preferência de códons para expressão em *E. coli*.

H. musciformis

```

aaaattttgcaccctggatattgcgccggtgtgctgccagattgtgattggcggcgccatg
  K F C T L D I A P V C C Q I V I G G G M
tataccgctggcaacgcgtgcatgtgcgaaggctttgtgagcggcgtggcgcgtgcgaa
  Y T A G N A C M C E G F V S G V G R C E
aaccgaaagaatgcccgtagcccgcaagcgcagattccgagctgctgcagcagccgc
  N P K E C P C T R E A Q I P S C C S S R
tggggcctggtgagcgtgaccggcaaatgcgcgtgagattgcctgggcccaccgtggcg
  W G L V S V T G K C A C D C L G G T V A
tttccggaaccgtgcccagcccgtattaac
  F P E P C P S P Y -

```

B. triquetrum

```

ggctgatccgatttgcggtagcagcgggttagctgcaccaccccgccgattctgaccccg
  A D P I C G S S G Y S C T T P A I L T P
aaaagccccggcagctttccgagcggctatagcaaagtgatcgtgaccgggtgtgggtggt
  K S P G S F P S G Y S K V I V T G V G G
agctatagcgtgtatattcatcgcccggatggctttaaagtgtataaagcagcgaagggc
  S Y S V Y I H R P D G F K V Y K A S E G
ggctgctgagcgtttggcagctatagcgggtggcggcaacagcgaagtgggcaaatatggc
  G C A S F G S Y S G G G N S E V G K Y G
agcggcggcaccgtggtggcgggtggcgtgtaaataac
  S G G T V V A V A C K -

```

Acesso à sequência da HML (UniProt: LEC1_HYPMC) e da BTL (CALVETE *et al.*, 2000), isoforma mais abundante.

Os genes sintéticos foram adquiridos subclonados ao vetor de expressão pET32a dentro dos sítios de clivagem para as enzimas de restrição *NcoI/XhoI*.

O plasmídeo pET32a foi desenhado para facilitar a expressão de proteínas heterólogas em sistema procariótico, utilizando como hospedeiro a bactéria *E.coli*. O vetor possui um forte promotor transcricional denominado T7, que confere altos níveis de expressão protéica em *E.coli*. Esse sistema de expressão possui ainda um gene que confere resistência à ampicilina, e origina uma proteína de fusão formada pela proteína alvo, acrescida de uma etiqueta de histidina (histag – 6 X histidina) e da proteína tioredoxina que, além de ajudar na solubilidade da proteína heteróloga, contribui com a formação de pontes dissulfeto no citoplasma bacteriano (FRANCIS; PAGE, 2010).

Os vetores adquiridos (pET32a-HML e pET32a-BTL) foram utilizados para transformação bacteriana nas cepas de expressão BL21(DE3) e Origami (DE3) e para transformação bacteriana nas cepas de clonagem DH5 α e XL1 *Blue*. As cepas de clonagem foram utilizadas para propagação dos plasmídeos para subsequentes clonagens em outros vetores (descrito na seção 2.2). Segue uma tabela simplificada dos principais plasmídeos e bactérias utilizados nesse estudo (Tabela III.1).

Tabela III.1: Principais plasmídeos bacterianos e cepas de *E. coli* utilizados.

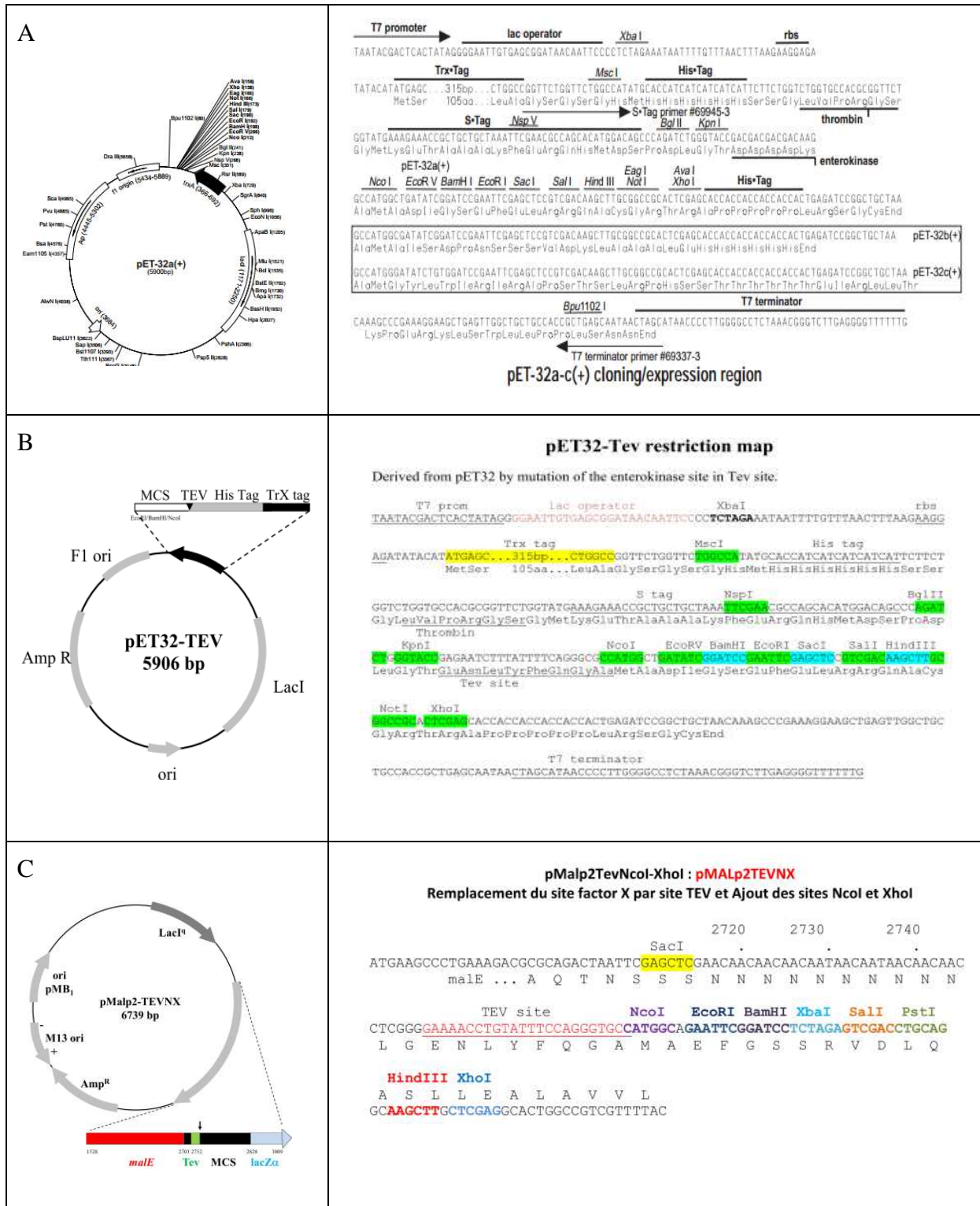
Cepa ou plasmídeo	Particularidade	Referência
Cepas de <i>E. Coli</i>		
XL1 <i>blue</i>	Célula resistente à tetraciclina e tratada quimicamente para ser competente à transformação. É endonuclease (<i>endA</i>) deficiente, o que favorece a qualidade do DNA advindo de minipreps, sendo ainda deficiente no gene <i>recA</i> , o que promove a estabilidade do inserto.	Stratagene
DH5 α	Célula tratada quimicamente para ser competente à transformação. Demonstra uma alta eficiência de transformação $>1 \times 10^8$ ufc/ μ g de DNA plasmideal.	Life technologies
BL 21 (DE3)	Célula de referência utilizada para expressão de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i> , tem a vantagem de ser deficiente nas proteases <i>lon</i> e <i>ompT</i> . A designação (DE3) faz referência a uma cópia cromossomal da <i>T7 RNA Polimerase</i> sob controle do promotor <i>lacUV5</i> induzível com IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo).	Novagen
Rosetta-gami 2 (DE3)	Combina as características das cepas Rosetta e Origami facilitando a produção de proteínas com pontes dissulfeto, e ao mesmo tempo com códons raros. Expressam sete tRNA raros AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA e CGG. Resistente à tetraciclina, estreptomicina e clorafenicol.	Novagen
Origami (DE3)	Esta cepa contém mutações nos genes que codificam para a tioredoxina redutase (<i>trxB</i>) e a glutatona redutase (<i>gor</i>) que geram duas proteínas responsáveis por manter um ambiente altamente redutor no citoplasma bacteriano, dessa forma, essa cepa ajuda na formação de pontes dissulfeto presentes nas proteínas a serem expressas. Possuem ainda resistência à kanamicina e à tetraciclina.	Nogaven

Tabela III.1: Continuação

Cepa ou plasmídeo	Particularidade	Referência
Origami B (DE3)	Cepa resistente à kanamicina e à tetraciclina, ajuda na formação de pontes dissulfeto devido a mutações nos genes <i>trxB</i> e <i>gor</i> . Uma mutação no gene da permease lac favorece uma entrada uniforme do IPTG na célula, o que permite uma regulação fina na expressão protéica em função da concentração do indutor.	Nogaven
Plasmídeos		
PET32a	Vetor contendo o promotor T7 induzível com IPTG, contém um gene de resistência à ampicilina. Seguindo uma estratégia de clonagem, a proteína recombinante pode ser expressa com uma cauda de histidina, uma etiqueta S e a proteína de fusão tioredoxina na região N-terminal, cliváveis com enteroquinase.	Novagen
PET32a-TEV	Derivado do vetor pET32a por uma mutação no sítio da enteroquinase por um sítio da TEV (<i>Tobacco Etch Virus</i>).	Glicobiologia Molecular, UJF
pMalp2-TEVNX	Derivado do vetor pMalp2, substituição do sítio do fator X pelo sítio da TEV e acréscimo dos sítios de restrição para as enzimas <i>NcoI</i> e <i>XhoI</i> . Altos níveis de expressão são atingidos devido ao forte promotor “tac” e aos sinais de iniciação da tradução do gene <i>malE</i> que codifica para uma proteína de fusão MBP (<i>Maltose binding protein</i>). A proteína de interesse é expressa no periplasma o que ajuda na formação das pontes dissulfeto.	Glicobiologia Molecular, UJF

Os detalhes do mapa de restrição dos diferentes vetores utilizados e suas respectivas representações estão apresentados na Figura III.3.

Figura III. 3: Representação esquemática dos plasmídeos bacterianos e seus respectivos mapas de restrição utilizados na expressão da rHML e da rBTL.



A (pET32a), B (pET32a-TEV), C (pMalp2-TEVNX).

2.2 Preparação de células competentes e transformação

Uma bactéria competente é uma célula que está apta a receber DNA exógeno. A competência pode ocorrer naturalmente ou pode ser produzida através de diferentes técnicas, que envolvem tratamento com soluções, como cloreto de cálcio, e mudanças bruscas de temperatura. Os íons de metal e as mudanças bruscas de temperatura alteram a permeabilidade da parede celular, fazendo com que estas células permitam a entrada de DNA exógeno através da membrana plasmática.

As células de *E. coli* não são naturalmente competentes. A penetração do DNA pode ser possível, por exemplo, graças à sensibilidade da membrana plasmática celular pelos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} . Estes cátions divalentes reduzem a repulsão eletrostática entre as moléculas de DNA e a superfície celular da bactéria, deixando-a competente à introdução de DNA. Durante o choque de calor, abrem-se poros na membrana do hospedeiro, permitindo a passagem de DNA. Quando as células são rapidamente resfriadas, fecham-se os poros, prendendo o DNA introduzido nas células.

A preparação de células competentes para este trabalho foi realizada de acordo com o método modificado de Hanahan, conforme descrito por Sambrook (2002), ou método de cloreto de cálcio, conforme descrito abaixo:

1. Um pré-inóculo de células de *E. coli* foi preparado em 5 mL de meio líquido LB (**L**uria-**B**ertani) Broth e incubado a 37 °C durante 16 horas, sob agitação constante.
2. A cultura foi diluída (1/100) em 500 mL de LB líquido e incubada novamente a 37 °C até atingir $\text{D.O}_{600\text{nm}} = 0,4-0,6$. Após isso, foi incubada em banho de gelo por 5 minutos.
3. As células foram centrifugadas a $1.600 \times g$ a 4 °C por 10 minutos e o concentrado celular suspenso cuidadosamente em 50 mL de 100 mM MgCl_2 gelado.
4. A ressuspensão foi incubada em banho de gelo por 30-45 min e então centrifugada a $1.600 \times g$ a 4 °C por 10 minutos, descartando o sobrenadante.
5. O concentrado celular foi cuidadosamente suspenso em 10 mL de tampão 100 mM CaCl_2 gelado e incubado em banho de gelo por 90-120 min.
6. Foram adicionados 2 mL de glicerol (15-20% final) e distribuiu-se rapidamente a suspensão de células em tubos de microcentrífuga em alíquotas de 100 μL . Os tubos foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e estocados em freezer -80 °C.

A transformação é a introdução de moléculas de DNA em uma célula hospedeira (bactérias ou células eucarióticas, incluindo células vegetais e animais). Este procedimento permite a entrada do vetor plasmideal para o interior de células de *E. coli*, que por sua vez, tem o intuito de propagar o material genético de interesse.

A reação de transformação consistiu na mistura de 2 μL de vetor (pET32a-HML ou pET32a-BTL) com 100 μL de células competentes de *E. coli* (DH5 α ou XL1 *Blue*), em seguida as células ficaram em repouso em banho de gelo por 20 min, seguidas por um choque térmico em banho-maria à 42 °C por 45 segundos, logo depois foram deixadas em repouso por mais 2 minutos no gelo. Finalmente as células foram incubadas a 37 °C por 1 hora em meio LB-Broth (SAMBROOK, 2002).

Para validação da transformação, uma alíquota da suspensão de células transformadas foi transferida para placas de Petri contendo LB ágar, (LB acrescentado de ágar 1,6%, pH 7,5) e 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina. Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas. Os clones crescidos foram então selecionados para extração plasmideal.

2.3 Purificação e digestão enzimática dos plasmídeos recombinantes

Purificações de DNA plasmideal em pequena escala, mais conhecido como minipreps, são comumente utilizados em procedimentos de biologia molecular. Para esta etapa foi utilizado o kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA purification System* (Quick protocol, Promega). O procedimento foi executado de acordo com o manual do fabricante.

Cada colônia positiva, crescida em meio LB ágar contendo ampicilina, foi inoculada em 10 mL de meio líquido LB Broth a 37 °C, 16 h, 180 rpm. As células foram então precipitadas por centrifugação a 1.000 x g por 5 min em tubos de microcentrifugação e o sobrenadante foi descartado. O concentrado celular final foi ressuspensão em 250 μL de solução de ressuspensão celular, homogeneizado, e então foi adicionado 250 μL de solução de lise. Ao homogeneizado, acrescentou-se 10 μL de solução alcalina deixando em incubação à temperatura ambiente. Ao fim de 5 minutos, 350 μL de solução de neutralização foram adicionados, homogeneizados e submetidos a uma nova centrifugação a 13.000 x g por 10 minutos. O lisado clarificado, correspondente ao sobrenadante, foi então aplicado em uma coluna de sílica, centrifugando-a em um tubo coletor a 13.000 x g por 1 min. Após isso, 750 μL e depois 250 μL de solução de lavagem foram aplicados na coluna, intercalados por centrifugação a 13.000 x g por 1 min. Em um tubo de microcentrifugação limpo, o DNA

plasmídeo purificado foi então eluído da coluna com a adição de 50 µL de água livre de nucleases, e analisado qualitativa e quantitativamente através da relação das absorbâncias a 260 nm e 280 nm e através de gel de agarose 1%, corados com brometo de etídeo a 5 mg/mL e visualizados sob iluminação ultravioleta.

Depois de purificados, uma amostra dos plasmídeos sofreu digestão enzimática pelas enzimas *XhoI* e *NcoI* (10 u de cada enzima/µg DNA plasmídeo) a 37 °C por 180 min. Em seguida, os produtos da digestão foram separados em gel de agarose 0,8%. Os fragmentos correspondentes aos genes de interesse da HML e da BTL foram purificados com base nos seus respectivos pesos moleculares. O procedimento foi realizado por meio do kit *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), seguindo todas as recomendações do fabricante.

Brevemente, 300 µL do tampão de captura foram adicionado a 300 mg de gel de agarose contendo o inserto de interesse, produto da digestão anterior. Em seguida, a agarose foi completamente dissolvida a 60 °C em banho-maria, o material foi então filtrado nas microcolunas fornecidas pelo Kit e deixado em repouso por 60 segundos à temperatura ambiente, o material foi então centrifugado a 16.000 x g por 30 segundos. O material não retido na coluna foi descartado e as colunas foram transferidas para um novo tubo de microcentrífuga, em seguida foram adicionados 500 µL do tampão de lavagem e o material foi centrifugado 16.000 x g. A microcoluna foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga, os insertos de interesse foram então eluídos com 20 µL do tampão de eluição e utilizados para clonagem nos diferentes vetores utilizados.

Em seguida, os vetores pET32a-TEV e o pMalp2-TEV NK, também foram submetidos à uma digestão enzimática com as enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI* com a finalidade de deixar as mesmas extremidades coesivas para ambos, inserto e vetor.

2.4 Clonagens dos genes da HML e da BTL e transformação bacteriana

O processo de clonagem dos genes de interesse foi realizado com o auxílio do *DNA ligation KIT* (TAKARA). Para isso, foi utilizado um tampão de ligação contendo a enzima *Takara ligase* (ligation mix) e uma proporção 25:25~250 fmol vetor/inserto. O procedimento foi executado a 25 °C por 5 minutos de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, os vetores recombinantes foram utilizados para transformar células competentes de clonagem (*DH5α* ou *XL1 Blue*), seguidas por miniprep e sequenciamento

para confirmação dos clones recombinantes. Os clones positivos foram então utilizados para transformação em diferentes cepas bacterianas de expressão (BL 21 (DE3), Origami (DE3), Origami B (DE3) e Rosetta-gami 2 (DE3)). As características das cepas utilizadas estão resumidas na Tabela III.1. A Tabela III.2 resume as construções utilizadas nesse estudo.

Tabela III.2: Representação das principais construções plasmídeais e bactérias utilizadas nesse estudo.

Construção	Bactéria de expressão (DE3)	Antibiótico de seleção
pET32a-HML	BL21	Amp.
pET32a-BTL	BL21	Amp.
pET32a-HML	Origami	Amp, Kan e Tet.
pET32a-BTL	Origami	Amp, Kan e Tet.
pET32aTEV-HML	BL21	Amp.
pET32aTEV-BTL	BL21	Amp.
pET32aTEV-HML	Rosetta-gami 2	Amp, Tet, Cam.
pET32aTEV-BTL	Rosetta-gami 2	Amp, Tet, Cam.
pET32aTEV-HML	Origami	Amp, Kan e Tet.
pET32aTEV-BTL	Origami	Amp, Kan e Tet.
pET32a-HML	Origami B	Amp, Tet, Kan.
pET32a-HML	Origami B	Amp, Tet, Kan.
pMalp2-TEVnk-HML	Rosetta-gami 2	Amp, Tet, Cam.
pMalp2-TEVnk-BTL	Rosetta-gami 2	Amp, Tet, Cam.

Os antibióticos foram utilizados na concentração final de 100 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL e 30 µg/mL, respectivamente para Amp (ampicilina), Tet (tetraciclina), Cam (clorafenicol) e Kan (kanamicina).

Para a transformação, 10 μL do produto clonado nos vetores citados foram adicionados a 100 μL de células competentes de *E. coli* (indicadas acima). Em seguida, as células sofreram um choque térmico (descrito no tópico 2.2 dessa seção). Finalmente a transformação foi validada em placas de Petri contendo LB ágar com os respectivos antibióticos. As colônias positivas foram então submetidas a sequenciamento, para então prosseguir-se com os experimentos de indução das proteínas recombinantes.

2.5 Ensaios para o estabelecimento da condição ótima de expressão da rHML e da rBTL

Após confirmação de clones positivos de *E. coli*, transformados com os plasmídeos contendo a sequência correta para a HML e a BTL, foi realizado um experimento piloto de expressão mediante SDS-PAGE (LAEMLLI, 1970), com uma comparação dos lisados celulares, para a escolha da melhor condição de indução.

As bactérias transformadas foram pré-cultivadas em 10 mL de meio líquido LB – Broth na presença do antibiótico adequado a 37 °C, sob agitação constante (180 rpm), por um período de 16 horas. Em seguida, o material foi totalmente inoculado em 100 mL de meio LB, também na presença de antibiótico, até ser atingida uma $D.O_{600\text{nm}}$ entre 0,6-0,8, quando então foi adicionado ao meio o indutor de expressão isopropil- β -tiogalactosídeo (IPTG) nas concentrações de 0,2 mM, 0,5 mM, 1,0 mM e 1,5 mM, sob diferentes tempos (1 h, 2 h, 4 h, 6 h e 16 horas) e sob diferentes temperaturas (16 °C, 20 °C, 25 °C e 30 °C). Após esse procedimento, uma alíquota de 1 mL foi retirada após cada condição de indução para se verificar a eficiência de expressão das proteínas através de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. A máxima expressão da rHML e da rBTL foi utilizada para os procedimentos de expressão em volumes maiores.

Paralelamente, foram feitos ensaios de auto-indução em substituição à indução com IPTG. Para isso, Rosetta-gami 2 (DE3) contendo o pET32a-TEV-HML e BL21 (DE3) contendo o pET32a-TEV-BTL foram pré-inoculadas, separadamente, em 2 mL de meio ZYP-0.8G, adicionado do antibiótico adequado. Em seguida, as células foram incubadas a 37 °C sob agitação por um período de 6 a 8 horas. Após isso, 200 μL da cultura foram crescidos em 400 mL de meio ZYP-5052 também na presença de antibiótico. A cultura foi incubada por mais 6 horas a 16 °C sob agitação. Logo em seguida, os frascos de cultura foram colocados em banho de gelo antes de concentrar as células por centrifugação (4.000 x g por 10min) (STUDIER, 2005).

Para a HML, que contém dois resíduos de metionina (posições 20 e 28), Rosetta-gami 2 (DE3) contendo o pET32a-TEV-HML foi cultivada em meio mínimo incorporado com selenometionina. As bactérias foram crescidas em meio LB até atingir uma $D.O_{600}=0.6$, em seguida, foram centrifugadas a $4.000 \times g$. O concentrado de bactérias obtido foi lavado duas vezes com meio mínimo M9 (1 g de NH_4Cl , 3 g de KH_2PO_4 , 6g de Na_2HPO_4 , 4 g de glicose e 1 mL de 1 M de $MgSO_4/L$), em seguida, foi feito um pré-inóculo dessas células em 20 mL de meio M9 e incubado por 16 horas a $37^\circ C$. Subsequentemente, essas células foram inoculadas em 1 L de meio M9 e crescidas até uma $D.O_{600}=0.6-0.8$. Ao meio foram adicionados então, os aminoácidos (100 mg/mL de lisina, fenilalanina e treonina; 50 mg/mL de isoleucina, leucina, valina e L-selenometionina). As bactérias foram então incubadas por 15 minutos e induzidas com 0,2 mM de IPTG a $16^\circ C$ por 16 horas (DOUBLIE, 1997).

2.6 Extração de proteínas totais de *E. coli* recombinante

Posteriormente, as células foram sedimentadas por centrifugação a $4.000 \times g$ durante 10 minutos a $4^\circ C$. Cada 1,0 g de pellete celular foi ressuspenso em 5,0 mL tampão PBS (20 mM de fosfato de sódio contendo 150 mM de cloreto de sódio, pH 7,4) e lisadas por sonicação ou por disrupção mecânica. Para a sonicação, foram utilizados pulsos de 50 W por 20 segundos, durante 15 ciclos (40 segundos de intervalo entre cada ciclo) em um sonicador Bandelin *Sonopuls* HD2070. Para a disrupção mecânica, foi utilizado pressão de 1700 bars em um aparelho *One Shot Cell Disrupter* (Constant System).

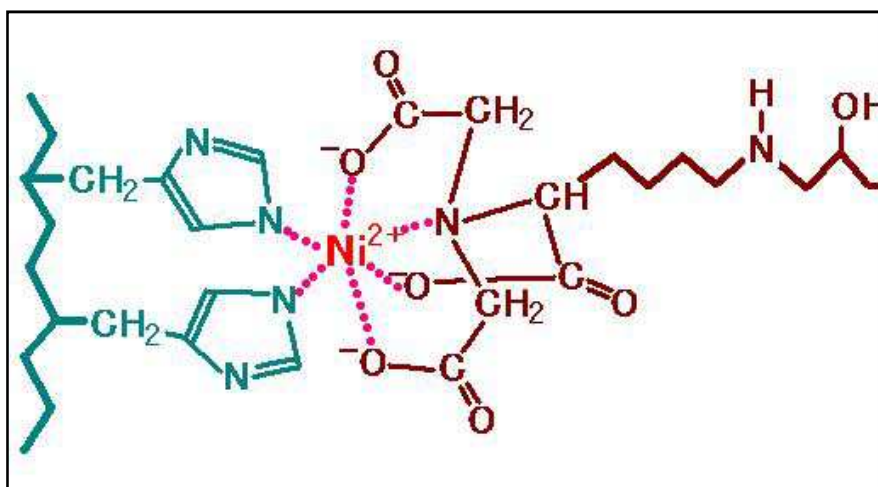
A separação das frações solúvel e insolúvel foi realizada mediante centrifugação a $12.000 \times g$ por 30 minutos a $4^\circ C$. O sobrenadante (fração solúvel) e o sedimento (fração insolúvel) foram coletados para análise por SDS-PAGE 12%. Após as avaliações iniciais, foram eleitas as condições ótimas de expressão da rHML e da rBTL, à partir daí, foram feitas induções em volumes maiores para purificação em larga escala das proteínas.

2.7 Purificação da rHML e da rBTL por cromatografia de afinidade em coluna de níquel

As proteínas de fusão (tioredoxina- His_6 -rHML e tioredoxina- His_6 -rBTL), expressas pelo plasmídeo pET32a-TEV, foram purificadas à partir dos lisados celulares dos clones positivos de *E.coli* através de cromatografia de afinidade em um sistema Äkta Basic (Amersham Biosciences).

A presença da cauda de polihistidina, na posição N-terminal da rHML e da rBTL, permitiu a sua purificação por cromatografia de afinidade em metal imobilizado de tipo IMAC (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*). O princípio dessa cromatografia se baseia na interação iônica que se forma entre o anel imidazólico dos resíduos de histidina da proteína e a carga positiva dos íons de níquel da resina (Figura III.4). A proteína é em seguida eluída por um mecanismo competitivo envolvendo uma quantidade crescente de imidazol.

Figura III.4: Representação esquemática da interação entre resíduos vizinhos da cauda de histidina (His-tag) e a matriz contendo níquel imobilizado.



Os sítios livres na esfera de interação do níquel interagem com os anéis de imidazol da proteína recombinante (azul).

A coluna His-trap™ (GE Healthcare) foi previamente equilibrada com tampão PBS pH 7,4 contendo 10 mM de imidazol (tampão de equilíbrio). As frações protéicas solúveis foram filtradas (membrana com poro de 0,45 µm) e aplicadas a um fluxo constante de 1 mL/minuto. Em seguida, a coluna foi lavada com cinco volumes de tampão de equilíbrio e eluída com um gradiente linear de imidazol 10-500 mM durante 15 minutos a um fluxo de 1 mL/minuto.

2.8 Ensaio de Digestão da rHML e da rBTL

Detectada as proteínas de fusão (tioredoxina-His₆-rHML ou tioredoxina-His₆-rBTL), as frações retidas na coluna de HisTrap foram dialisadas contra tampão 20 mM de Hepes contendo 150 mM de NaCl, pH 7,5. O material foi então concentrado com filtros

Amicon (Millipore) com poros de 10 kDa ou filtros vivaspin (Vivaproducts) a 1 mg/mL e submetido a uma reação de digestão para a remoção da cauda de fusão.

A etiqueta de polihistidina pode ser eliminada por clivagem com a protease TEV (produzida de forma recombinante) também fusionada a uma etiqueta de histidina. A proteína de interesse foi incubada por 16 horas à 20 °C com a protease TEV diluída 1/20 com 2 mM de DTT. Em seguida, a mistura foi recromatografada em coluna de níquel a fim de separar as proteínas clivadas das não clivadas.

Dessa vez, a fração não retida contendo a proteína de interesse (rHML ou rBTL) foi recuperada. As proteínas não digeridas, a proteína de fusão e a protease TEV ficaram retidas à coluna, graças à presença da etiqueta de histidina. Em seguida, o material foi concentrado em filtros Amicon com poros de 3 kDa, à partir do qual as proteínas foram utilizadas para caracterização físicoquímica (descrita nas próximas seções) ou submetidas a uma cromatografia de exclusão molecular, antes dos testes de cristalografia.

2.9 Purificação da rHML e da rBTL por cromatografia de exclusão molecular

Para obter as proteínas de interesse rHML e rBTL, livre de contaminantes e de agregados, o material foi submetido a uma cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 75 para a rHML, e Biosuite 250 para rBTL. Um volume de 500 µl de amostra a 2 mg/mL foi aplicado à coluna a um fluxo de 0,5 mL/min. A coluna foi equilibrada e eluída isocriticamente em tampão 20 mM de Hepes contendo 150 mM de NaCl, pH 7,5.

3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS rHML e rBTL

3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

A massa molecular aparente da rHML e da rBTL durante as diferentes etapas de purificação foi acompanhada através de eletroforese em gel de poliacrilamida. A técnica desenvolvida por LAEMMLI (1970) se baseia na migração de proteínas carregadas em um campo elétrico, onde a migração é afetada pela forma e tamanho das moléculas.

Alíquotas das frações de interesse foram ressuspensas em tampão de amostra contendo 62,5 mM de Tris-HCl pH 6,8, glicerol 10%, SDS 2%, DTT 0,1 M e azul de bromofenol 0,01%, que desnatura e carrega negativamente as proteínas de maneira homogênea. Para os testes em condições redutoras, as mesmas foram acondicionadas em

tampão contendo β -mercaptoetanol à concentração final de 5%. Antes da aplicação das amostras ao gel, as mesmas foram aquecidas a 100 °C por 5 minutos.

As proteínas podem igualmente ser precipitadas com TCA 100% a fim de concentrá-las. Para isso, à amostra foi adicionado 1/10 do volume final de TCA 100% gelado, em seguida o material foi incubado por 15 minutos a 4 °C, seguido por centrifugação a 13.000 x g a 4 °C por 15 minutos. O pellet proteico foi então ressuspenso no tampão de amostra. Um microlitro de 1 M de NaOH foi adicionado para aumentar o pH a fim de manter a coloração azul da solução.

As amostras foram então depositadas no gel de poliacrilamida formado por um gel de concentração (5% de acrilamida, pH 6,8) e um gel de separação, no qual a porcentagem de acrilamida varia em função do peso molecular das proteínas a serem separadas. Em seguida, as amostras foram diretamente coradas pela solução *InstantBlue* (Euromedex) por 15 minutos sob agitação.

3.2 Immunoblotting para detecção da rHML e da rBTL fusionadas com cauda de histidina

Para a detecção da rHML e da rBTL fusionadas com cauda de histidina, as amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% e em seguida transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare). Foi utilizado 25 mM Tris-HCl, pH 8,3, 192 mM glicina e metanol 20% (v/v) como tampão de transferência. Para isto, foi utilizada uma voltagem constante de 25 V, amperagem de 300 mA, temperatura ambiente no período de 2 horas, usando o sistema de eletroforese Mini VE Blot Module Apparatus (GE Healthcare).

Os sítios inespecíficos foram bloqueados com incubação do gel por 16 h a 4 °C, ao tampão de bloqueio TTBS (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl e 1% de Tween 20) foi adicionado leite desnatado (Molico/Nestle) a concentração de 5% (p/v).

Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo monoclonal anti-poli-histidina clone HIS-1 (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:1.500 (v/v) e diluído no tampão de bloqueio, seguido de incubação por 3 horas à temperatura ambiente. Após três lavagens da membrana, foi adicionado o anticorpo conjugado (*anti-rabbit alkaline phosphatase conjugate*) diluído no tampão de bloqueio na proporção de 1:5.000 seguido de incubação por 1 hora à temperatura ambiente.

Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com TTBS e uma vez com TBS (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl). A rHML e a rBTL foram visualizadas adicionando o substrato NBT/BCIP para fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich), sendo a reação parada com água destilada.

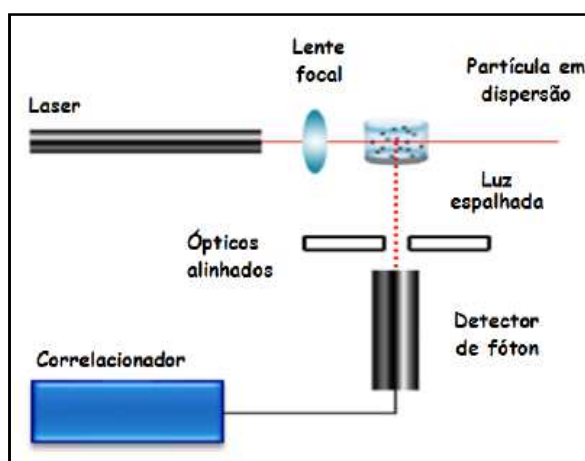
3.3 Análise da rHML e da rBTL por DLS: Difusão dinâmica da luz

A difusão dinâmica da luz DLS (*D*ynamic *L*ight *S*cattering) é uma técnica utilizada para determinar o tamanho das partículas em uma solução. Ela também fornece informações sobre a presença de agregados, a dispersidade da amostra e a homogeneidade da solução. É uma técnica rápida e fácil de utilizar e possui como principal vantagem o fato de não ser destrutiva. As amostras analisadas podem então ser recuperadas ao final do experimento.

Cada partícula em solução segue um movimento aleatório chamado de Movimento Browniano em função do seu tamanho. Quanto mais uma molécula é volumosa, menos ela se movimenta em solução. Incidida por uma luz laser monocromática com um comprimento de onda de 633 nm, as partículas em movimento vão interagir com os feixes de luz e dispersá-lo em todas as direções. A Análise da luz dispersa é detectada por um detector que permite deduzir o raio hidrodinâmico da partícula que é diretamente proporcional ao seu tamanho em solução. Os resultados são apresentados sob a forma de uma curva de intensidade relativa da luz difundida em função do raio hidrodinâmico das partículas. O aparelho utilizado nessa técnica foi o Zetasizer nano series (Malvern Instrument) (Figura III.5).

As amostras de rHML e rBTL foram solubilizadas em tampão 20 mM de HEPES, pH 7,5 contendo 150 mM de NaCl, a diferentes concentrações, e verificadas quanto a formação de agregados, a dispersidade da amostra e a homogeneidade da solução. As medições foram realizadas com 50 µL da solução de proteína em uma cubeta de quartzo (Hellma).

Figura III.5: Esquema representativo do processo de espalhamento dinâmico da luz.



Esta técnica convencionalmente utiliza um laser monocromático. A luz é espalhada pelas partículas em todos os ângulos. As flutuações de intensidade da luz espalhada são convertidas em pulsos elétricos, os quais são alimentados a um correlacionador digital. Este gera uma função de autocorrelação, a partir do qual se relaciona com o coeficiente de difusão das partículas, e este, por sua vez, com o tamanho das partículas.

3.4 Análise da rHML e da rBTL por TSA: Deslocamento térmico da luz

O TSA (*Thermal Shift Assay*) é um ensaio de termodesnaturação que monitora a estabilidade termal das proteínas e investiga os fatores que afetam a sua estabilidade, como pH, concentração de sais, tampão, ligantes, entre outros. É uma técnica rápida e simples e o monitoramento é feito através de sinais de fluorescência. Os dados do sinal de fluorescência são plotados em função da temperatura e apresentados como uma curva sigmoideal. O ponto de inflexão da curva é referido como temperatura de fusão (T_m) onde 50% das proteínas estão desnaturadas. As condições mais favoráveis à estabilização da proteína apresentam uma T_m mais elevada. O ensaio é feito adicionando um corante fluorescente sensível, sypro-orange (Sigma-Aldrich), à solução protéica, uma vez que a temperatura aumenta a proteína começa a desnaturar e expõe seus resíduos hidrofóbicos, no qual o sypro tem uma forte afinidade e fluoresce. A utilização de um fluoróforo capaz de fluorescer somente em um ambiente hidrofóbico permite a obtenção de uma cinética de desnaturação da proteína bem como a determinação da T_m da proteína.

Os ensaios para a rHML e a rBTL foram feitos em uma placa de 96 poços com um aparelho QRT-PCR (Mini-Opticon, Biorad). A placa foi aquecida de 25 a 100 °C com uma taxa de aquecimento de 1 °C/min. A intensidade da fluorescência foi então mensurada. Diferentes tampões foram analisados (Tabela III.3).

Tabela III.3: Tampões utilizados nos testes de estabilidade térmica (TSA) para rHML e rBTL.

Tampão (20 mM)	pH	NaCl
Acetato	5,0	150 mM
Citrato	5,0	150 mM
Malonato	5,0	150 mM
Cacodilato	5,5	150 mM
Bis-Tris	5,5	150 mM
MES	5,5	150 mM
Malonato	5,5	150 mM
Malonato	6,0	150 mM
MES	6,0	150 mM
Bis-Tris	6,5	150 mM
MES	6,5	150 mM
Hepes	7,0	150 mM
Tris-HCl	7,0	150 mM
Hepes	7,5	150 mM
Tris-HCl	7,5	150 mM
Tris-HCl	8,0	150 mM
Hepes	8,0	150 mM
Tris-HCl	8,5	150 mM
Bicina	8,5	150 mM
Bicina	9,0	150 mM
Caps	9,0	150 mM
Caps	9,5	150 mM
Caps	10,0	150 mM

4. FERRAMENTAS PARA O ESTUDO DE INTERAÇÃO LECTINA-CARBOIDRATO

4.1 Atividade hemaglutinante das lectinas rHML e rBTL

Essa técnica se baseia na capacidade das lectinas em formar uma malha com os eritrócitos por interação com os seus glicoconjugados de superfície. A determinação da atividade hemaglutinante, foi feita segundo Moreira e Perrone (1977), com algumas modificações descritas a seguir.

O ensaio de atividade hemaglutinante das lectinas rHML e rBTL foi realizado através de diluições (50 µL) seriadas, em duplicatas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, etc.), em placas de microtitulação com fundo em V, contendo 50 µL de 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM de NaCl. A 50 µL de cada diluição foi adicionado igual volume de uma suspensão de eritrócitos de coelho a 2% em solução salina a 150 mM NaCl tratados ou não tratados com enzimas proteolíticas (tripsina ou papaína). A placa foi levemente agitada e incubada a 37 °C por 30 minutos.

Para os tratamentos enzimáticos, aos eritrócitos de coelho a 2% foram adicionados 0,01 mg/L das enzimas tripsina ou papaína, a mistura foi deixada em repouso por 30 minutos a 37 °C. Em seguida, os eritrócitos foram centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellete foi lavado 6 vezes com 150 mM de NaCl para remoção das enzimas. Em seguida, foram feitos os testes de hemaglutinação com os eritrócitos tratados com as enzimas proteolíticas, seguindo o mesmo protocolo descrito acima.

A aglutinação foi observada macroscopicamente. A menor concentração protéica que apresentou hemaglutinação visível foi considerada a concentração correspondente a uma unidade de hemaglutinação (UH), sendo o título expresso em unidades de hemaglutinação por mililitro (UH/mL).

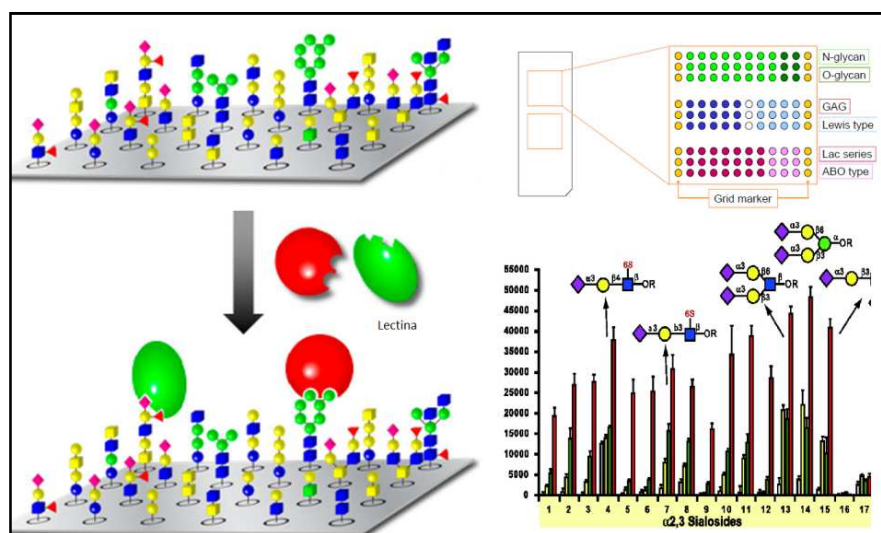
4.2 Análise da especificidade da rHML e da rBTL por *glycan-array*

Glycan arrays tornaram-se uma poderosa ferramenta para a elucidação do alto nível das interações de carboidratos de diferentes estruturas, com uma grande variedade de alvos biológicos, incluindo anticorpos, proteínas, vírus e células. Esta técnica é especialmente adequada para estudos glicômicos, pois as matrizes apresentam ligantes de carboidratos de uma maneira que imita as interfaces de interações célula-célula (LIANG; WU, 2009).

O *glycan-array* é baseado no princípio de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Os primeiros testes compreendiam uma gama de oligossacarídeos biotinilados fixados por um braço espaçador em placas de 96 a 384 poços, recobertos por estreptavidina, permitindo realizar a análise em paralelo sobre uma grande diversidade de açúcares de forma minorizada e rápida. Para ensaios com lectinas, as amostras devem ser marcadas por um composto fluorescente, ou serem fornecidas com um anticorpo (BLITX *et al.*, 2004).

Métodos mais recentes propostos pelo CFG (*Consortium for Functional Glycomics* (<http://www.functionalglycomics.org>) e por outros laboratórios baseiam-se no princípio de “*glicochips*” ou *Printed Covalent Glycan Array*. Nesses ensaios, utilizam-se placas de vidro comercial funcionalizadas com *N*-hidroxisuccimidina (NHS), que é capaz de ligar-se covalentemente a glicanos ou glicoconjugados, desde que sejam acoplados a um grupo amina (BLIXT *et al.*, 2004). Esse método realiza a análise em paralelo sobre uma grande diversidade de açúcares de forma minorizada e rápida, permitindo determinar a especificidade de proteínas (Figura III.6).

Figura III.6: Representação esquemática de um glicochip.



Ligantes naturais ou sintéticos são covalentemente ligados a uma placa de vidro funcionalizada com NHS (*N*-hidroxisuccimidina). A interação da lectina com seu açúcar específico é revelada pelo uso de um anticorpo fluorescente, ou diretamente através da marcação da lectina por Alexa Fluor®-488. As intensidades de fluorescência são processadas por um computador e representadas sob a forma de um histograma baseado nos açúcares testados.

Para realização dos ensaios, a rHML e a rBTL foram, separadamente, marcadas pelo composto fluoroiscenado Alexa Fluor® 488 – TFP (ácido carboxílico – 2,3,5,6 tetrafluorofenil), segundo recomendações do fabricante (Invitrogen). As amostras foram preparadas numa concentração de 4 mg/mL em tampão 100 mM de bicarbonato de sódio pH 9,0. O composto TFP foi solubilizado em DMF (dimetilformamida) numa concentração de 10 mg/mL instantes antes de sua utilização. A mistura na proporção 1:10 TFP/proteína foi incubada uma hora em temperatura ambiente sob agitação. A proteína foi finalmente separada do reagente residual por dessalinização em uma coluna de poliacrilamida D-saltTM (Pierce) pré-equilibrada com 20 mM de HEPES pH 7,5 contendo 150 mM de NaCl. Após a marcação, as amostras foram enviadas para o CFG, core H, Printed Array, chip de mamíferos versão 5.1 e foram testadas nas concentrações de 0,2 µg/mL, 2,0 µg/mL, 20,0 µg/mL e 200,0 µg/mL.

4.3 Análise da interação da BTL com um octassacarídeo fucosilado por STD-RMN

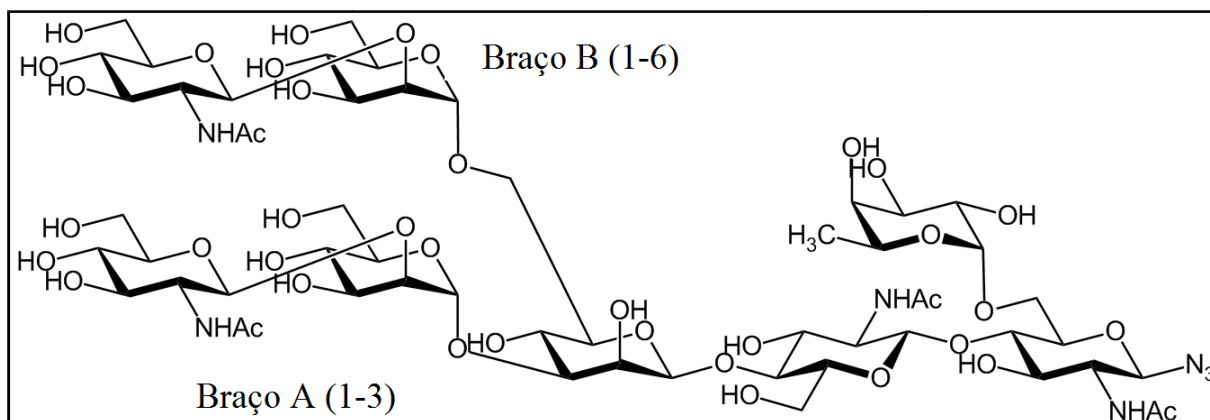
STD-RMN (*Saturation Transfer Difference*) ou diferença de transferência de saturação é uma técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear utilizada para obter informação sobre a interação de pequenos ligantes com macromoléculas relevantes biologicamente.

Os experimentos de STD-RMN são baseados na observação dos sinais de ressonância do ligante. Basicamente, envolve a subtração do espectro no qual a proteína foi seletivamente saturada com um ligante, do espectro no qual a proteína encontra-se livre do ligante. Somente os sinais do ligante que receberam a transferência de saturação da proteína irão compor o STD. Para uma molécula que se liga a um receptor, somente os sinais dos hidrogênios que estão próximos ao contato com a proteína e recebem a transferência de magnetização irão aparecer no espectro de diferença. Essa transferência de saturação constitui uma indicação de ligação. Dessa forma, por STD-RMN é possível caracterizar os hidrogênios do ligante que estão mais próximos à região de ligação da proteína (VIEGAS *et al.*, 2011).

Para os experimentos de STD-RMN, um octassacarídeo com o núcleo de fucosilação (α 1-6), chamado Fuc-Octa, selecionado pelos ensaios de *glycan array*, foi sintetizado pela equipe do nosso colaborador Dr. Carlo Unverzagt (Universidade de Bayruth, Alemanha). BTL foi preparada a 0,100 mM e o octassacarídeo foi preparado 25 vezes mais concentrado que a proteína. Ambas as amostras foram solubilizadas em 20 mM de tampão

Tris-HCl pH 7,4 em D₂O (Figura III.7). Um STD-RMN controle foi realizado em 99,96% D₂O usando as mesmas condições experimentais, porém na ausência da BTL.

Figura III.7: Estrutura do Fuc-Octa utilizado nos ensaios de STD com a BTL.



5. ENSAIOS DE TOXICIDADE da HML, rHML, BTL e rBTL

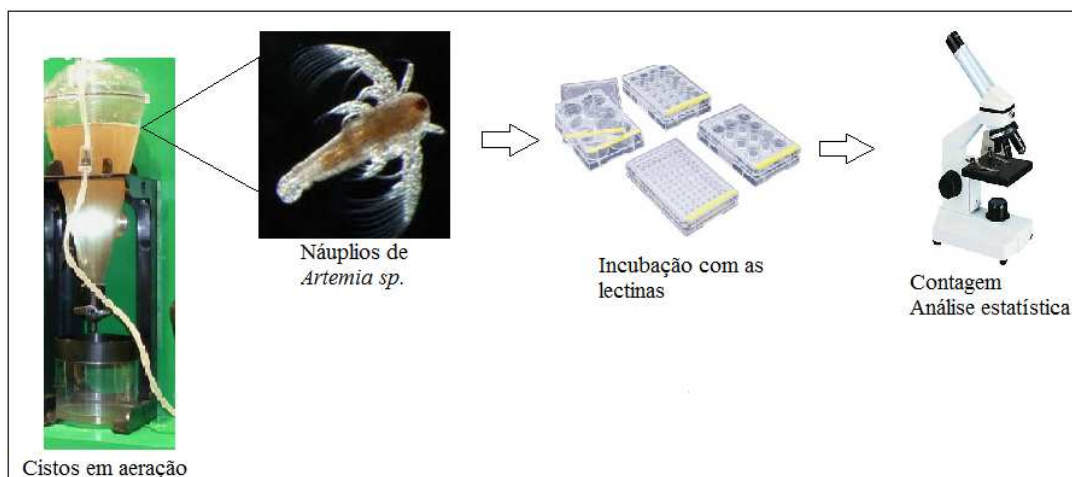
5.1 Letalidade contra *Artemia sp.*

O efeito da HML, rHML, BTL e da rBTL sobre náuplios de *Artemia sp.* foi avaliado mediante o método descrito por Carneiro *et al.*, 2013. Cistos de *Artemia sp.* foram eclodidos em água do mar artificial a 28 °C sob iluminação e aeração constantes. Os cistos foram incubados em um tubo cilindro cônico de polietileno a uma concentração de 1,0 g/L. Essa condição de eclosão simula o ambiente natural das artêmias. Após 48 horas, a aeração foi suspensa e a luz foi direcionada para a parte inferior do tubo. Devido ao seu comportamento fototrófico, os náuplios migraram na direção da luz e se acumularam no fundo do tubo, enquanto os cistos que não eclodiram mantiveram-se na superfície. Os náuplios saudáveis, que se aglomeraram no fundo do tubo, foram coletados e utilizados para o ensaio (Figura III.8).

As lectinas (HML, rHML, BTL e rBTL) foram dissolvidas em água do mar artificial a uma concentração de 200 µg/mL. Os testes foram conduzidos usando placas de Limbro® de 24 poços. Cada poço foi preenchido com 10 náuplios, solução lectínica nas concentrações de 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL ou 100 µg/mL e água do mar artificial, totalizando um volume de 2 mL. Os testes foram realizados em triplicata. Como controle negativo foram usados poços de 2 mL contendo somente náuplios de *Artemia sp.* Após 24 e

48 horas de incubação, o número de náuplios mortos em cada poço foi contado e a toxicidade da lectina foi avaliada.

Figura III.8: Representação esquemática do teste de toxicidade contra *Artemia sp.*



5.2 Cultura celular e ensaio colorimétrico MTT

Células de adenocarcinoma de pulmão (A549) foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A linhagem celular foi crescida em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab, Brazil), contendo 1% de L-glutamina e 1% de penicilina e estreptomicina. As células foram crescidas a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Todos os experimentos foram feitos com as células na fase logarítmica de crescimento.

A determinação da concentração das lectinas totais solúveis foi feita utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para os ensaios, as lectinas foram dissolvidas em DMEM contendo 10% de SBF a uma concentração de 1,0 mg/mL (para HML, rHML, BTL e rBTL), em seguida, foram diluídas no mesmo meio a 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL. Como controle negativo foi utilizado albumina sérica bovina (BSA) a 50 µg/mL e 100 µg/mL.

A citotoxicidade da HML, rHML, BTL e rBTL contra a linhagem celular A549 foi avaliada utilizando o ensaio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- brometo difeniltetrazolio) (Sigma-Aldrich). As células foram semeadas em placas de 96 poços (1 × 10⁴ células/poço).

Depois de 24 horas, as células foram expostas às diferentes concentrações das lectinas ou a BSA. Depois de 24 h, 48 h e 72 horas de tratamento, 20 µL de MTT foram adicionados a cada poço, e as células foram incubadas durante um período adicional de 3 horas a 37 °C. As diferenças no metabolismo celular total foram detectadas pela medição da redução do MTT solúvel à água de formazan insolúvel. A viabilidade da linhagem celular A549 depois de tratamento foi determinada utilizando uma leitora de microplaca (VICTOR™ X5 *Multilabe Plate Reader*; PerkinElmer) a 492 nm (A_{492nm}). Os ensaios foram feitos em triplicata e a porcentagem de inibição do crescimento celular foi calculada a partir da seguinte equação, segundo ZHENG *et al.*, 2011.

$$\text{Porcentagem de inibição} = [1 - (A_{492nm} \text{ para as células tratadas} / A_{492nm} \text{ para as células não tratadas})] \times 100$$

Todas as observações foram validadas por, pelo menos, três ensaios independentes em triplicata para cada experimento.

Os conjuntos de dados foram analisados pelo teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Foi considerado significativo $P < 0,05$ em todas as análises. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

6. ENSAIOS DE CRISTALOGRAFIA

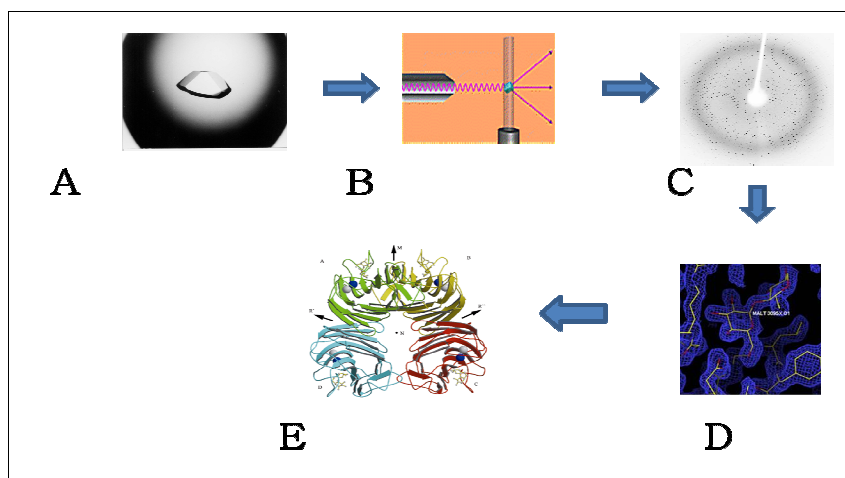
6.1 Processo de cristalização da rHML e da rBTL

Uma das partes mais críticas na resolução da estrutura de uma macromolécula biológica por difração de raios X é a cristalização da mesma. Os principais passos envolvidos na resolução da estrutura a nível atômico de uma macromolécula biológica envolve a cristalização da molécula, a coleta de dados por difração de raios X, a resolução da estrutura e, por fim, sua análise (Figura III.9). Entre todos estes passos, a cristalização é o menos entendido.

Biocristalização é um processo de múltiplos parâmetros, que envolve os três passos clássicos da cristalização: nucleação, crescimento e cessação de crescimento (BOISTELLE; ASTIER, 1988).

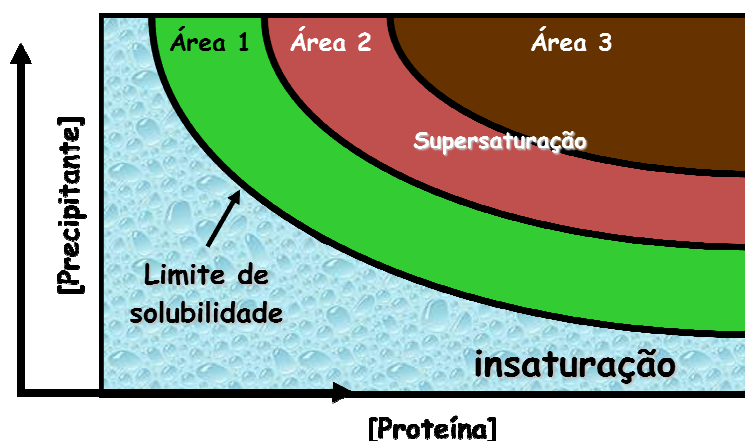
Para crescer cristais de qualquer composto, um estado de supersaturação tem que ser alcançado, um estado que é termodinamicamente instável, no qual pode se desenvolver em uma fase amorfa ou cristalina quando este retornar ao equilíbrio. A supersaturação pode ser alcançada pela evaporação lenta do solvente ou pela variação de alguns dos parâmetros como temperatura, pH e força iônica. O conhecimento das solubilidades macromoleculares é um pré-requisito para o controle das condições de cristalização (Figura III.10).

Figura III.9: Principais passos na resolução da estrutura de uma biomolécula por cristalografia.



A) Cristalização. B) e C) Difração e coleta de dados difração de raios X. D) Resolução da estrutura. E) Análise da estrutura.

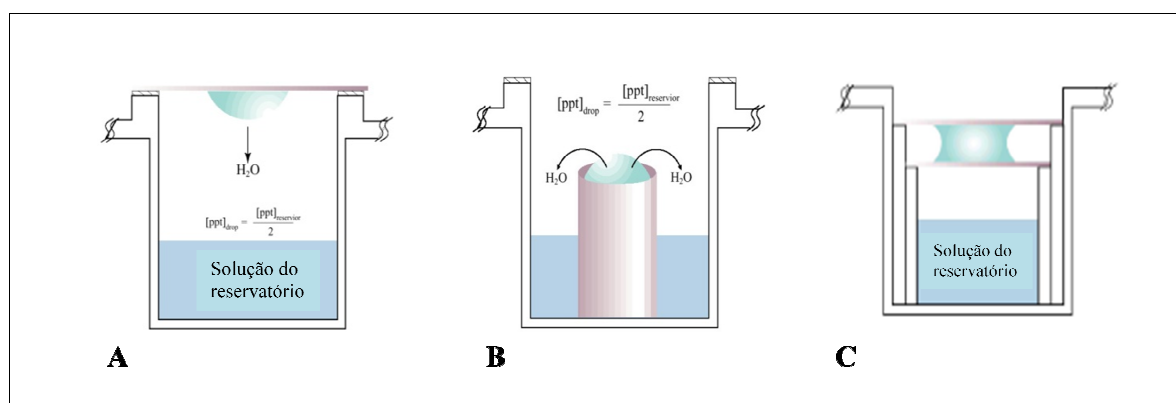
Figura III.10: Representação de um diagrama de fases correlacionando a concentração de precipitante com a concentração de proteína para se atingir o estado de supersaturação.



Área 1 – Metaestável: a nucleação pode não acontecer por muito tempo. Esta área sustenta o crescimento dos cristais. Área 2 – Nucleação: os cristais de proteína nucleiam e crescem (estado de supersaturação). Área 3 – Precipitação: as proteínas não nucleiam e precipitam saindo da solução.

Existem muitas técnicas para a cristalização de macromoléculas biológicas, todas tendo como objetivo trazer a solução a um estado de supersaturação. A fim de obter cristais de proteínas, um método frequentemente utilizado é a difusão de vapor. Essa técnica foi utilizada pela primeira vez na cristalização do tRNA (HAMPEL *et al.*, 1968). Nesta técnica, uma gota contendo poucos microlitros da macromolécula biológica a ser cristalizada é solubilizada em um agente de cristalização contendo tampão e aditivos, é equilibrada contra um reservatório contendo a solução de cristalização a uma concentração mais alta do que na gota e um volume largamente maior. O equilíbrio prossegue por meio da difusão das espécies voláteis (água e solventes orgânicos) até que a pressão de vapor na gota se iguale àquela do reservatório. Se o equilíbrio ocorre por meio de troca da água (da gota para o reservatório), isto leva a uma diminuição do volume da gota, e conseqüentemente, a um aumento na concentração de todos os constituintes da gota de cristalização, inclusive da proteína. Para espécies químicas com pressão de vapor maior que a pressão de vapor da água, a troca ocorre do reservatório para a gota. Os mesmos princípios se aplicam para os métodos de gota suspensa (*hanging drops*), gota sentada (*sitting drops*) e gota sanduíche (*sandwich drops*) (Figura III. 11).

Figura III.11: Representação esquemática dos métodos de difusão de vapor para cristalização de proteínas.



A) gota suspensa (*hanging drops*), B) gota sentada (*sitting drops*) e C) gota sanduíche (*sandwich drops*).

Com o aumento do número de macromoléculas biológicas cristalizadas com sucesso, tornou-se claro que muitas das condições de cristalização se assemelhavam, ou seja, havia uma concentração de resultados positivos de cristalização que usava um número limitado de precipitantes, tampões e aditivos. Isto levou à proposição de diversos métodos de cristalização (CARTER; CARTER, 1979), onde um número limitado de condições eram

testadas, usando-se pequenas quantidades da macromolécula biológica. A partir da observação dos resultados preliminares destes experimentos era possível determinar que tampão, aditivo e agente precipitante seriam os mais favoráveis e com esses dados proceder sucessivos melhoramentos até se conseguir cristais adequados. Dentro deste raciocínio a Dra. Jaru Jancarick da UC Berkeley propôs o método da matriz esparsa (JANCARICK; KIM, 1991) onde diversas condições diferentes são tentadas para se cristalizar a macromolécula biológica.

O número de variáveis que afetam a cristalização, tais como, concentração, temperatura, pH, força iônica, aditivos específicos e precipitantes, é grande e combinatória; o número total de possíveis condições de cristalização a serem testadas, portanto, é tão grande que uma procura completa com todas as condições em potencial seria inviável. Kits comerciais triam várias condições, e muitas vezes são o ponto de partida para os ensaios.

O kit da *Hampton Research* é composto por 98 condições que, de acordo com uma revisão feita pelos autores, são as mais indicadas para o crescimento de cristais. O Kit *Morpheus* é composto por 96 diferentes condições iniciais para cristalização de proteínas. O kit conta com diversas abordagens inovadoras, tais como misturas quimicamente compatíveis de potenciais ligantes, novos sistemas de tampão e misturas de precipitantes que também atuam como crioprotetores. Em vez de reunir um conjunto de condições de cristalização que já tenham sido bem sucedidos, uma seleção de moléculas frequentemente observadas no *Protein Data Bank* (PDB) para co-cristalizar com proteínas foi feita. Outro kit, denominado MIDAS (*Modern Intelligent Dynamic Alternative Screen*) conta com 96 condições de cristalização baseados em precipitantes poliméricos alternativos.

Para os ensaios de cristalização da rHML e da rBTL o método utilizado foi o de difusão de vapor, gota suspensa, utilizando placas de cristalização de 48 poços (Hampton Research). Foram colocados em cada poço da placa de cristalização 200 μ L da condição de cristalização e a gota foi composta por 1 μ L da solução de proteína (rHML a 4 mg/mL ou rBTL 6 mg/mL) e 1 μ L da condição do poço. Os poços foram vedados com silicone e deixados em repouso à temperatura de 20 °C. Após a obtenção de possíveis cristais numa determinada solução pertencente ao kit do screen inicial, otimizações dessas condições de cristalização foram feitas, variando a concentração de precipitante e o pH da solução, repetindo o método da difusão de vapor. Essas otimizações visaram melhorar a condição de formação dos possíveis cristais, para que fosse produzido assim, um cristal com características necessárias para difração de raios X. Os testes de cristalização também foram

conduzidos mediante a utilização de um robô de cristalização modelo Mosquito®. Gotas de 100 nL foram preparadas a partir da solução de poço e da solução das lectinas na proporção de 1:1. As gotas foram montadas sobre uma superfície plástica e esta foi selada sobre uma placa de microtitulação de 96 poços. Cada poço foi preenchido com 100 µL de uma solução de cristalização contida nos Screens I e II da Hampton research. Após montagem, as placas foram mantidas a temperatura de 20 °C.

Os possíveis cristais foram transportados ao ESRF (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, França). Os experimentos de difração de raios X foram realizados à fim de determinar a natureza dos cristais, se proteína ou sal.

CAPÍTULO IV:
RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. LECTINAS SELVAGENS DE *H. musciformis* e *B. triquetrum*

1.1 Extração e purificação

As lectinas selvagens HML e BTL foram obtidas à partir da cromatografia de troca aniônica em coluna de DEAE-celulose. As frações não retidas (PI DEAE) resultantes dessa cromatografia apresentaram atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho tratados e não tratados com enzimas proteolíticas. A Tabela IV.1 mostra os resultados da purificação. Ademais, o perfil eletroforético da HML e da BTL (Figura IV.1) mostra que ambas as proteínas foram obtidas de forma pura e livre de contaminantes, semelhante aos resultados obtidos por Nagano *et al.*, 2002 e Ainonz *et al.* 1995, respectivamente.

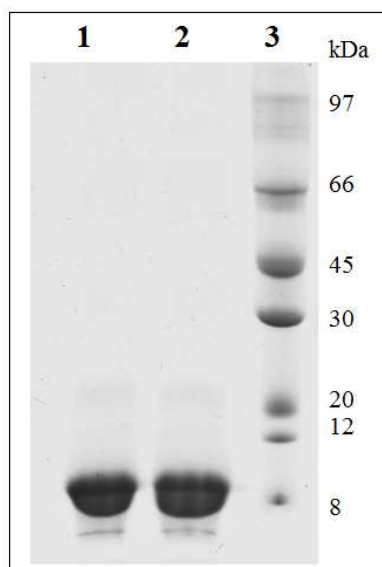
Tabela IV.1: Tabela de purificação das lectinas HML e BTL, respectivamente.

Frações	¹ Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	² Título (UH/mL)	Atividade total (UH)	³ A.H.E (UH/mg)	Rendimento (%)	⁴ F.P
Extrato	0,019	0,57	2	60	105,2	100	1
Fração 0-70	0,019	0,095	8	40	421,05	66,7	4
PI DEAE	0,0016	0,48	4	120	250	200	2,37

Frações	¹ Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	² Título (UH/mL)	Atividade total (UH)	³ A.H.E (UH/mgP)	Rendimento (%)	⁴ F.P
Extrato	0,095	2,28	256	6144	2694	100	1
Fração 0-60	0,034	0,17	512	2560	15059	41,68	5,58
PI DEAE	0,0065	0,27	128	5504	19692	86,55	7,3

1) Concentração de proteínas solúveis (BRADFORD, 1976); 2) Título: unidade hemaglutinante (UH/mL.); 3) A.H.E: Atividade hemaglutinante específica (UH/mgP), sendo a relação entre a atividade hemaglutinante e a concentração de proteínas; 4) F.P: Fator de purificação calculado a partir da relação entre a atividade hemaglutinante específica do extrato total e aquela de cada passo seguinte.

Figura IV.1: Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% sob condições desnaturantes e redutoras da HML e da BTL.



1) 1 mg/mL da HML, 2) 1 mg/mL da BTL e 3) Marcador de peso molecular LMW (GE Healthcare).

Cromatografia de troca aniônica em coluna de DEAE-celulose é bastante utilizada para isolar lectinas de algas marinhas, como por exemplo, a lectina de *Hypnea cervicornis* (NASCIMENTO *et al.*, 2006), *Bryothamnion seaforthii* (AINOUZ *et al.*, 1995), *Solieria robusta* (HORI *et al.*, 1988), *S. filiformis* (BENEVIDES *et al.*, 1996), *Amansia multifida* (COSTA *et al.*, 1999), *Gracilaria ornata* (LEITE *et al.*, 2005), entre outras. Na maioria das purificações a coluna de DEAE-celulose é efetiva em reter pigmentos, como as ficobilinas presentes em abundância em algas vermelhas, e outros contaminantes presentes na fração depois da precipitação com sulfato de amônio, livrando as frações que apresentam atividade lectínica, permitindo assim, a purificação da proteína. Dessa forma, HML e BTL foram purificadas em coluna de DEAE-celulose e subsequentemente utilizadas nos experimentos de *glycan array* e nos testes de toxicidade.

2. CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DAS LECTINAS HML E BTL EM SISTEMA PROCARIÓTICO

2.1 Purificação e digestão enzimática dos plasmídeos recombinantes

Após obtenção das construções pET32a-HML e pET32a-BTL, esses vetores foram utilizados para transformar células de clonagem competentes de *E.coli* (DH5a e XL 1

Blue). O método utilizado foi o do choque térmico e a finalidade foi propagar os plasmídeos recombinantes. Esse método se mostrou eficiente e resultou em colônias visíveis crescidas em meio LB ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina.

Posteriormente, os clones positivos foram selecionados e submetidos à extração plasmideal para validação da transformação. A tabela IV.2 representa a quantificação plasmideal dos clones selecionados obtidos por meio de minipreps com o kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA purification System* (Quick protocol, Promega).

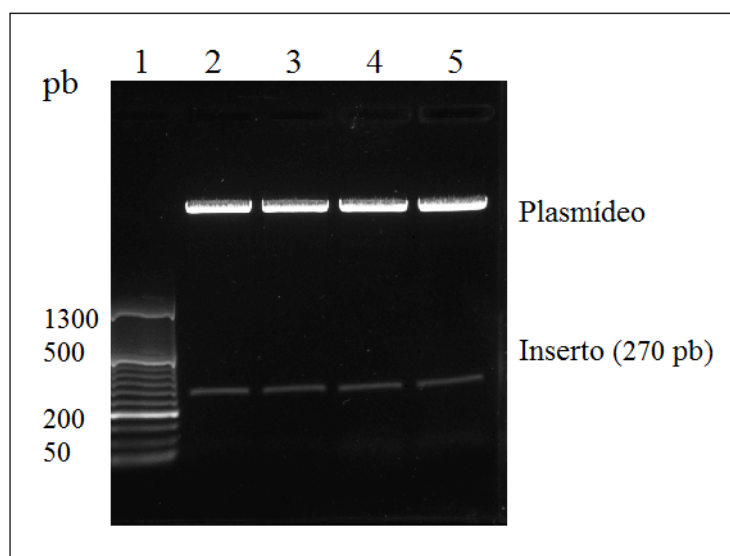
Tabela IV.2: Quantificação plasmideal dos clones de HML e de BTL selecionados para transformação bacteriana. A (absorbância).

Clones	A _{260nm} (ng/µL)	A _{260/280nm}	A _{260/230nm}
HML1	368	1,83	2,30
HML2	450	1,70	1,63
HML3	432	1,65	2,01
HML4	521	1,66	2,0
BTL1	303	1,80	2,06
BTL2	302	1,80	2,03
BTL3	460	1,87	2,00
BTL4	432	1,63	2,0

A relação A_{260/280nm} recomendada é na faixa de 2,0, valores abaixo dessa relação normalmente indicam contaminação por proteínas, já a relação A_{260/230nm} recomendada fica na faixa de 2,0-2,2, valores a baixo dessa faixa indicam contaminação por substâncias que absorvem a 230nm, como EDTA, carboidratos e fenol (Manual nanodrop). Nessa perspectiva, as relações de absorbância obtidas para o DNA plasmideal da HML e da BTL estão dentro dos valores recomendados para amostras de DNA puras.

Adicionalmente, para validação da transformação, os clones selecionados sofreram uma digestão enzimática com as enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI* o que resultou na liberação de um fragmento específico ao tamanho esperado para os genes que codificam para a HML e a BTL (em torno de 270 pares de bases) confirmando a transformação e a presença do inserto de interesse (Figura IV.2).

Figura IV.2: Validação da transformação de células de *E. coli* com o plasmídeo PET32a-HML e pET32a-BTL.



1) Marcador de peso molecular (50 pb DNA ladder/New England Biolabs). 2) e 3) pET32a-HML após digestão com *NcoI* e *XhoI*; 4 e 5- pET32a-BTL após digestão com *NcoI* e *XhoI*. pb (pares de bases).

Após confirmação dos clones recombinantes contendo o inserto de interesse, as bandas correspondentes aos genes da HML e da BTL foram purificadas com base nos seus respectivos pesos moleculares. O material purificado resultou em quantidade suficiente de DNA para se proceder com os experimentos de subclonagem dos insertos em outros vetores de expressão.

2.2 Clonagens dos genes da HML e da BTL e transformação bacteriana

As reações de ligação resultaram em plasmídeos recombinantes contendo os genes da HML e da BTL. As construções recombinantes (pET32aTEV-HML, pET32aTEV-BTL, pMalp2-TEVNK-HML e pMalp2-TEVNK-BTL) foram comprovadas por sequenciamento e

em seguida foram utilizadas, juntamente aos vetores pET32a-HML e pET32a-BTL, para transformação bacteriana nas diferentes cepas de expressão (BL 21 (DE3), Origami (DE3), Origami B (DE3), Rosetta-gami 2 (DE3)).

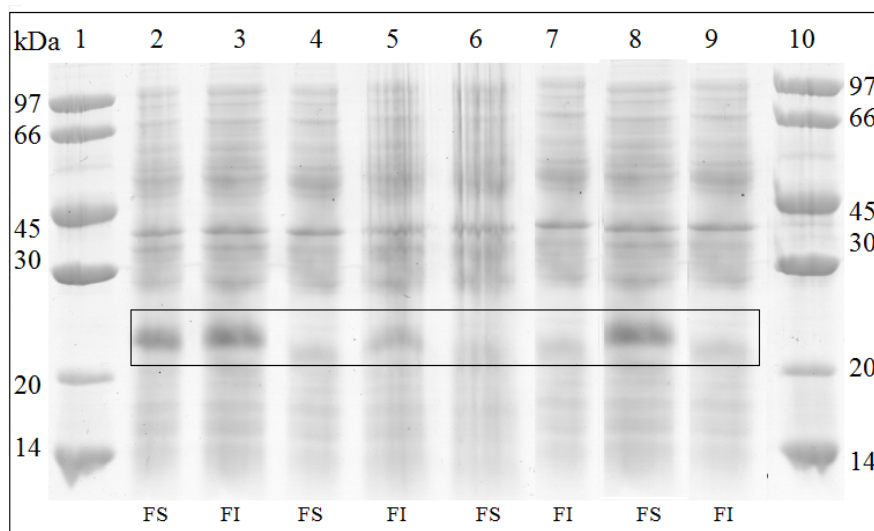
2.3 Ensaio para o estabelecimento da condição ótima de expressão da rHML e da rBTL

Inúmeros parâmetros podem influenciar o rendimento de proteínas recombinantes expressas em sistemas heterólogos. Dentre esses parâmetros, podemos citar o tipo de célula hospedeira, a temperatura de indução, a concentração do indutor (IPTG), a duração da indução, a densidade ótica no momento da indução ($D.O_{600nm}$), bem como o vetor utilizado para clonagem (GRASLUND *et al.*, 2008). Para determinar as condições ótimas de expressão de uma determinada proteína, devem-se levar em consideração todos esses parâmetros. Entretanto, essas estratégias não garantem nem resultam no mesmo grau de sucesso para diferentes proteínas e, conseqüentemente, o rendimento e a solubilidade permanecem ainda um processo empírico (VILLAVERDE; CORRIÓ 2003).

Após confirmação de clones positivos de *E. coli*, transformados com os plasmídeos contendo a sequência correta para a HML e a BTL, foi realizado um experimento piloto de expressão e análise mediante SDS-PAGE, com uma comparação dos lisados celulares, para a escolha da melhor condição de indução.

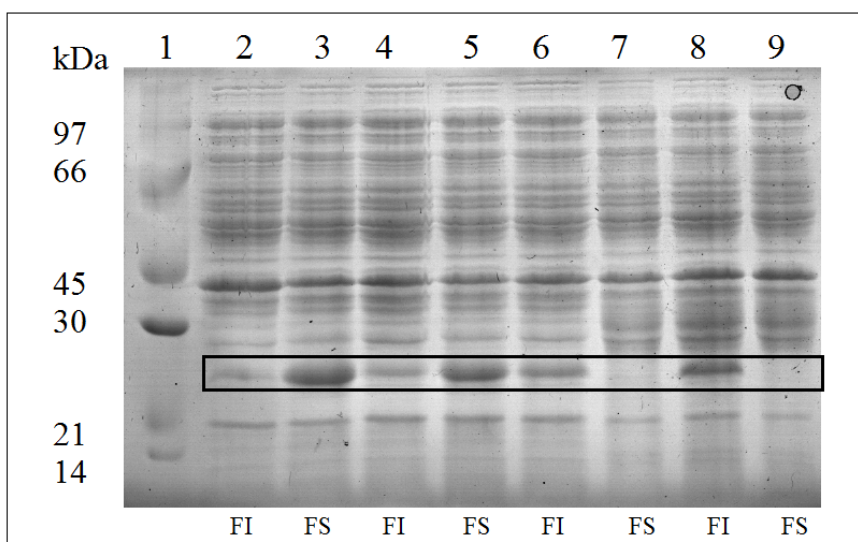
Algumas conclusões podem ser tiradas dos diferentes ensaios. A variação de temperatura, por exemplo, modifica de forma considerável a proporção entre proteína solúvel e proteína agregada na forma de corpos de inclusão, um problema comum durante a expressão recombinante de proteínas. Quanto mais elevada a temperatura, mais a proteína tende a ser expressa e concentrada na fração insolúvel, formando os corpos de inclusão. Isso foi verificado para as diferentes cepas utilizadas na expressão. As Figuras IV.3 e IV.4 exemplificam as frações solúveis e insolúveis obtidas para expressão da rHML e da rBTL utilizando diferentes temperaturas de indução. Numa revisão feita por Francis e Page (2010) é relatado que baixas temperaturas de indução promovem a solubilidade de proteínas expressas de forma recombinante por reduzir as taxas de transcrição, tradução e divisão celular, enquanto também permite a redução da agregação de proteínas. Ademais, muitas proteases são menos ativas a baixas temperaturas, dessa forma baixas temperaturas resultam na redução da degradação de proteínas sensíveis a proteases (FRANCIS; PAGE, 2010).

Figura IV.3: SDS-PAGE 12% do extrato celular de *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3) após indução da rHML com 0,2 mM de IPTG e ruptura celular.



1 e 10: Marcadores de pesos moleculares (kDa); 2: Extrato celular após indução a 30 °C por 6 horas, FS (fração solúvel); 3: Extrato celular após indução a 30 °C por 6 horas, FI (fração insolúvel); 4: Extrato celular após indução a 25 °C por 6 horas, FS; 5: Extrato celular após indução a 25 °C por 6 horas, FI; 6: Extrato celular após indução a 20 °C por 6 horas, FS; 7: Extrato celular após indução a 20 °C por 6 horas, FI; 8: Extrato celular após indução a 16 °C por 16 horas, FS; 9: Extrato celular após indução a 16 °C por 16 horas, FI.

Figura IV.4: SDS-PAGE 12% do extrato celular de *E. coli* BL21 (DE3) após indução da rBTL com 0,2 mM de IPTG e ruptura celular.



1: Marcadores de pesos moleculares (kDa); 2: Extrato celular após indução a 16 °C por 16 horas, FI (fração insolúvel); 3: Extrato celular após indução a 16 °C por 16 horas, FS (fração solúvel); 4: Extrato celular após indução a 20 °C por 6 horas, FI; 5: Extrato celular após indução a 20 °C por 6 horas, FS; 6: Extrato celular após indução a 25 °C por 6 horas, FI; 7: Extrato celular após indução a 25 °C por 6 horas, FS; 8: Extrato celular após indução a 30 °C por 6 horas, FI; 9: Extrato celular após indução a 30 °C por 6 horas, FS.

Corpos de inclusão consistem em moléculas protéicas desnaturadas (agregados insolúveis) que se formam no citoplasma bacteriano quando é detectada a presença de altos níveis de proteínas potencialmente tóxicas, exógenas ou inativas. Isso acaba por diminuir substancialmente a quantidade solúvel de proteína recombinante (SØRENSEN; MORTENSEN, 2005).

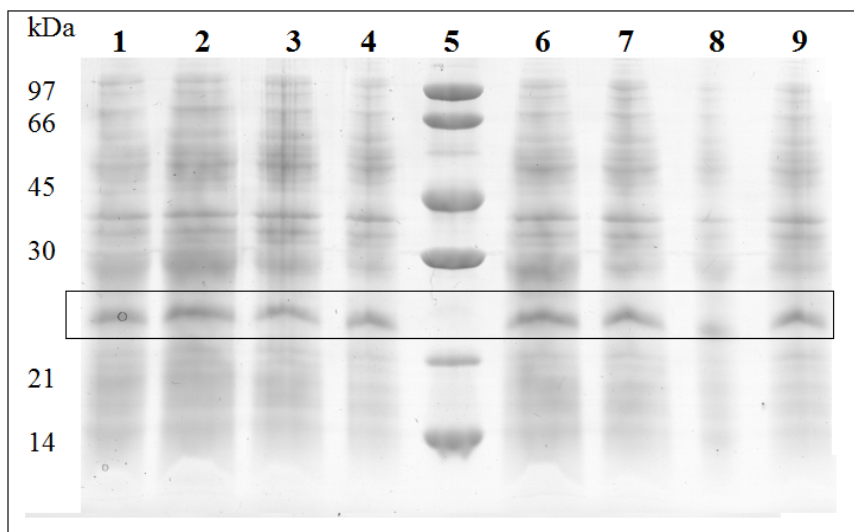
Esses agregados protéicos podem ser solubilizados (após extração) por meio de agentes desnaturantes (tampões contendo uréia 8 M, cloridrato de guanidina 7 M, entre outros). Porém, é necessário submeter posteriormente a lectina a um processo de “*refolding*” (renaturação). Tal processo é realizado mediante a remoção progressiva do agente desnaturante por ultracentrifugação ou sucessivas diálises, o que, lentamente, cria um ambiente apropriado onde a proteína pode atingir o seu correto enovelamento. Existem ainda, kits comerciais disponíveis que utilizam uma combinação de tampões que permitem uma rápida identificação dos fatores que têm um efeito importante sobre a renaturação da proteína. Há alguns exemplos de proteínas recuperadas com sucesso de corpos de inclusão (STANCOMBE *et al.*, 2003; LUO *et al.*, 2005; BENEVIDES *et al.*, 2012). Porém, o limitado conhecimento sobre as bases moleculares da agregação de proteínas não permite a utilização de abordagens de engenharia metabólica ou genética que possam conduzir e garantir um enovelamento bem sucedido de proteínas recombinantes, quando isso não ocorre espontaneamente (SØRENSEN; MORTENSEN, 2005b, VILLAVERDE; CARRIÓ, 2003). Não há, no entanto, nenhum método confiável para prever as condições necessárias para reenovelamento de uma proteína. Assim, a identificação das condições necessárias ao adequado *refolding* da molécula continua a ser uma ciência empírica.

A estratégia de renaturação dos corpos de inclusão não foi adotada pra a rHML e para a rBTL, em decorrência da quantidade de pontes dissulfeto presentes nas proteínas selvagens; a HML possui sete pontes dissulfeto e a BTL possui duas. Provavelmente essas lectinas, após uma desnaturação seguida por uma renaturação, não alcançariam o enovelamento correto, o que é crucial para manter a proteína ativa. Mesmo que fosse possível que as proteínas alcançassem uma correta renaturação, muitas proteínas recuperadas de corpos de inclusão resultam em um baixo rendimento, o processo é laborioso e acaba por encarecer a produção final da lectina recombinante.

Com relação a concentração de indutor, pode-se observar que nos ensaios realizados, 0,2 mM de IPTG foi suficiente para induzir a expressão da rHML e da rBTL. O tempo também foi relevante, onde se verificou um aumento na quantidade de proteína

expressa, em decorrência do tempo de indução. A figura IV.5 exemplifica as frações solúveis obtidas para expressão da rHML e da rBTL utilizando diferentes concentrações de IPTG para indução.

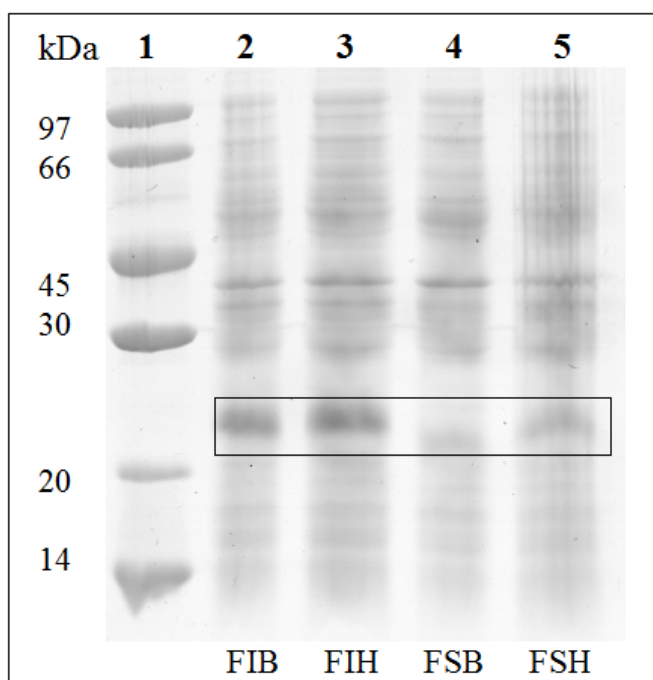
Figura IV.5: SDS-PAGE 12% do extrato celular de *E. coli* após indução a 16 °C e ruptura celular, seguido por recuperação das frações solúveis.



1: Extrato celular de Rosetta-gami 2 (HML) após indução com 0,2 mM de IPTG por 16 horas; 2: 0,5 mM de IPTG por 16 horas; 3: 1,0 mM de IPTG por 16 horas; 4: 1,5 mM de IPTG por 16 horas; 5: Marcador de peso molecular; 6: Extrato celular da BL 21 (BTL) após indução com 0,2 mM de IPTG por 16 horas; 7: 0,5 mM de IPTG por 16 horas; 8: 1,0 mM de IPTG por 16 horas; 9: 1,5 mM de IPTG por 16 horas.

Para os diferentes vetores utilizados, não se verificou diferenças consideráveis nos níveis de expressão da rHML e da rBTL. Tanto o pET32a quanto o pET32a-TEV tiveram os mesmos níveis de expressão para os polipeptídeos, porém durante os processos de purificação, para remoção da proteína de fusão e da etiqueta de histidina, seria necessário a utilização de 2 enzimas proteolíticas, a enteroquinase e a trombina para o pET32a (devido a inespecificidade da enteroquinase), o que comprometeu o rendimento final da rHML e da rBTL, enquanto que para o pET32a-TEV, só foi necessário uma única enzima, a TEV. Quanto ao pMalp2-TEVNX a motivação em utilizar esse plasmídeo foi pela possibilidade de expressar a proteína de interesse no periplasma da bactéria, ambiente altamente oxidativo, o que poderia ajudar na formação das pontes dissulfeto. Porém, não foi verificado alto nível de expressão das proteínas de interesse na fração solúvel dos extratos protéicos de *E. coli* utilizando este vetor (Figura IV.6).

Figura IV.6: SDS-PAGE 12% do extrato celular de *E. coli* contendo o plasmídeo pMalp2-TEVNX após indução com 0,5 mM de IPTG a 16 °C por 16 horas.



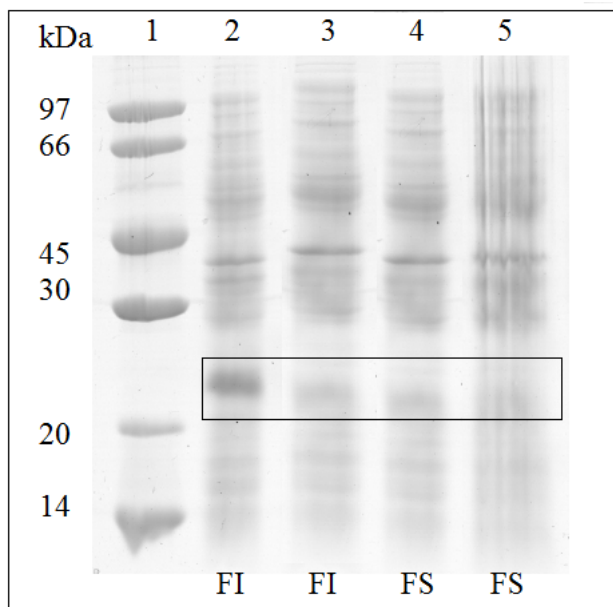
1: Marcador de peso molecular; 2: FIB- Extrato celular da fração insolúvel de BL21 (rBTL); 3: FIH: Extrato celular da fração insolúvel de Rosetta-gami 2 (rHML); 4: FSB- Extrato celular da fração solúvel de BL21 (rBTL); 5: FSH- Extrato celular da fração solúvel de Rosetta-gami 2 (rHML);

Após as análises, foram eleitas as melhores condições de indução para a rHML e para a rBTL. Para ambas as proteínas foi eleito o pET32a-TEV como melhor vetor de expressão e as condições de indução consistiram em 0,2 mM de IPTG por 16 horas à 16 °C. Para a rHML a cepa selecionada para expressão foi a Rosetta-gami 2 (DE3), e para a rBTL, como não houve diferença significativa nos níveis de expressão e nem na solubilidade da proteína, a BL21 (DE3) foi a selecionada.

Também foi comparado, sob as mesmas condições anteriores, se haveria um melhor rendimento para a rHML e para a rBTL se as mesmas fossem auto-induzidas em substituição à indução com IPTG. Porém, não foram verificadas diferenças nos níveis de expressão, e toda a proteína produzida por auto-indução ficou concentrada na fração insolúvel formando os corpos de inclusão (Figura IV.7). Muito provavelmente, este resultado está relacionado à temperatura de indução utilizada que foi de 37 °C. Novos experimentos devem ser realizados utilizando temperaturas mais baixas que promovam a expressão das proteínas

mais lentamente e, dessa forma, favoreçam seu correto enovelamento e não comprometa sua solubilidade.

Figura IV.7: SDS-PAGE 12% do extrato celular de *E. coli* auto-induzidas a 37 °C.



1: Marcador de peso molecular; 2: Rosetta-gami 2 (DE3) contendo o pET32a-TEV-HML, FI (Fração insolúvel); 3: BL21 (DE3) contendo o pET32a-TEV-BTL, FI; 4: Rosetta-gami 2 (DE3) contendo o pET32a-TEV-HML, FS (Fração solúvel); 5: BL21 (DE3) contendo o pET32a-TEV-BTL, FS.

Com base em todos os ensaios feitos, pET32a-TEV-HML expressa por Rosetta-gami 2 (DE3) com 0,2 mM de IPTG por 16 horas a 16 °C e pET32a-TEV-BTL expressa por BL21 (DE3) com 0,2 mM de IPTG por 16 horas a 16 °C foram então utilizadas nos ensaios de indução em larga escala, bem como para incorporação de metal pesado na estrutura da proteína, o que foi testado apenas para a HML, uma vez que a BTL não apresenta metioninas em sua sequência.

Desse modo, Rosetta-gami 2 contendo o pET32a-TEV-HML foi crescida em meio mínimo contendo selenometionina, ao invés de metionina, com o intuito que a bactéria incorporasse esse metal pesado na estrutura primária da lectina, que seria então utilizado para a resolução do problema de fases nos experimentos de dispersão anômala.

O mesmo procedimento foi realizado com sucesso para a lectina da macroalga vermelha grifithisina (GRFT), que teve sua estrutura tridimensional determinada por SAD com a proteína produzida de forma recombinante em *E. coli* e marcada com selenometionina.

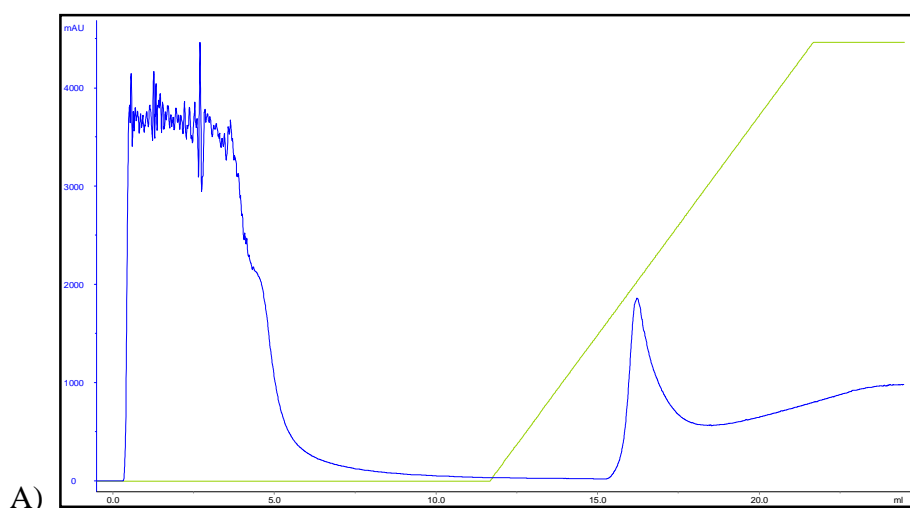
Até então, GRFT é a única lectina de macroalga com estrutura tridimensional disponível. Porém, não obtivemos resultados satisfatórios para a rHML. Rosetta-gami 2 não cresceu no meio mínimo, necessário para o protocolo utilizado, provavelmente devido a necessidade de um meio rico em nutrientes, uma vez que a bactéria gasta muita energia para sobreviver em um meio com três antibióticos diferentes, pela pressão seletiva imposta pelos antibióticos.

2.4 Purificação da rHML e da rBTL por cromatografia de afinidade e de exclusão molecular

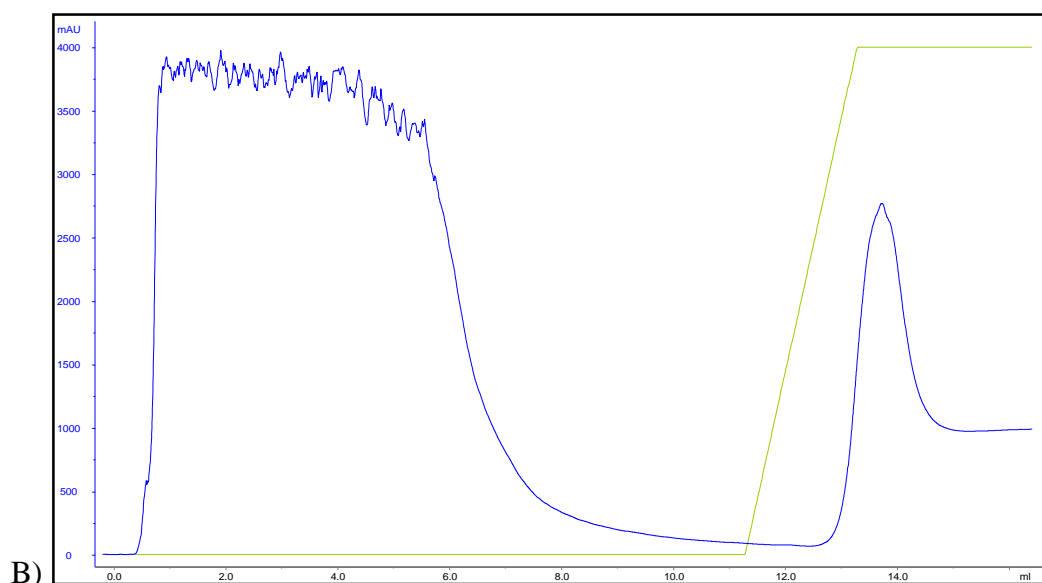
Após eleitas as melhores condições de indução das proteínas recombinantes, culturas celulares foram feitas para produção em larga escala das proteínas de interesse. Para o processo de purificação foi levado em consideração as características das proteínas de fusão presentes no plasmídeo pET32a-TEV.

O plasmídeo pET32a-TEV origina uma proteína de fusão formada pela proteína alvo, acrescida da proteína tioredoxina e de uma etiqueta de histidina (histag – 6 X histidina). Essa etiqueta foi explorada no processo de purificação tanto da rHML quanto da rBTL. Os anéis de imidazol da histidina interagem com as cargas positivas dos íons de níquel da resina, através de interação iônica, o que permite a purificação da proteína de interesse através de cromatografia de afinidade em coluna de níquel imobilizado (IMAC). Na tentativa de evitar interações inespecíficas com a coluna, ao tampão de equilíbrio foram adicionados 10 mM de imidazol. Os picos de eluição foram obtidos à partir de concentrações crescentes de imidazol (10 – 500 mM) e então analisados por SDS-PAGE (Figuras IV.8 e IV.9).

Figura IV.8: Cromatograma referente à aplicação da fração solúvel dos lisados de células de *E.coli* aplicados em coluna de níquel imobilizado (Histrap).

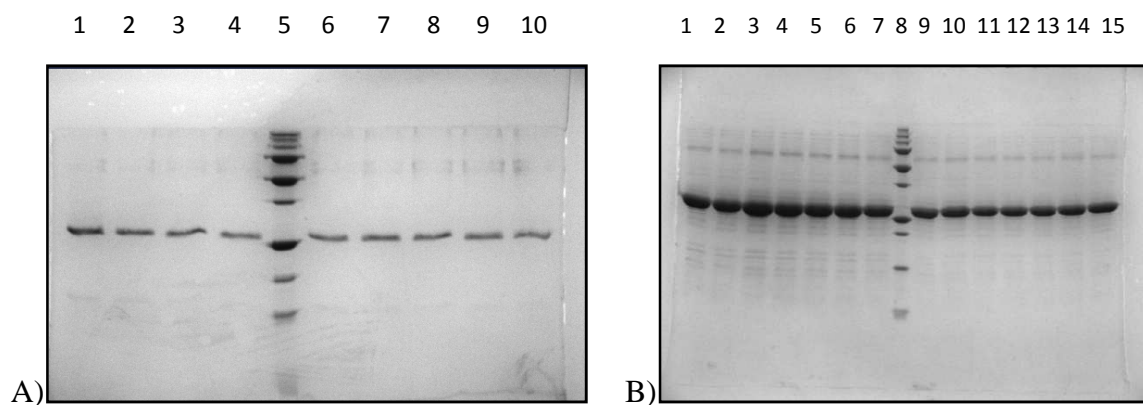


Continuação da Figura IV.8:



HML e BTL, respectivamente A e B. **Tampão de equilíbrio:** PBS pH 7,4 contendo 10 mM de imidazol, **tampão de eluição:** PBS pH 7,4 contendo 500 mM de imidazol, fluxo: 1 mL/min. Em verde: gradiente de imidazol (10-500 mM), em azul (absorbância a 280 nm).

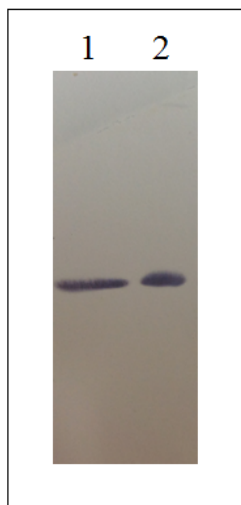
Figura IV.9: Perfil eletroforético das frações solúveis da rHML e da rBTL à partir de cromatografia de afinidade em níquel imobilizado.



HML e BTL, respectivamente A e B, obtidos à partir das frações retidas em coluna HisTrap e eluídas em gradiente de imidazol (10-500 mM). Os poços 5 e 8 representam o marcador de peso molecular para proteínas (10, 15, 20, 25, 37, 50 e 75 kDa).

Em seguida, as amostras eluídas da coluna de His-trap, correspondentes a rHML e a rBTL, foram reunidas e concentradas a 1 mg/mL, seguidas por análise por *Western Blot*, para confirmação que as proteínas que se fixaram à coluna se tratavam realmente das proteínas de interesse fusionadas à etiqueta de histidina (Figura IV.10).

Figura IV.10: *Western blot* de tioredoxina-His₆-rHML e tioredoxina-His₆-rBTL, respectivamente 1 e 2.

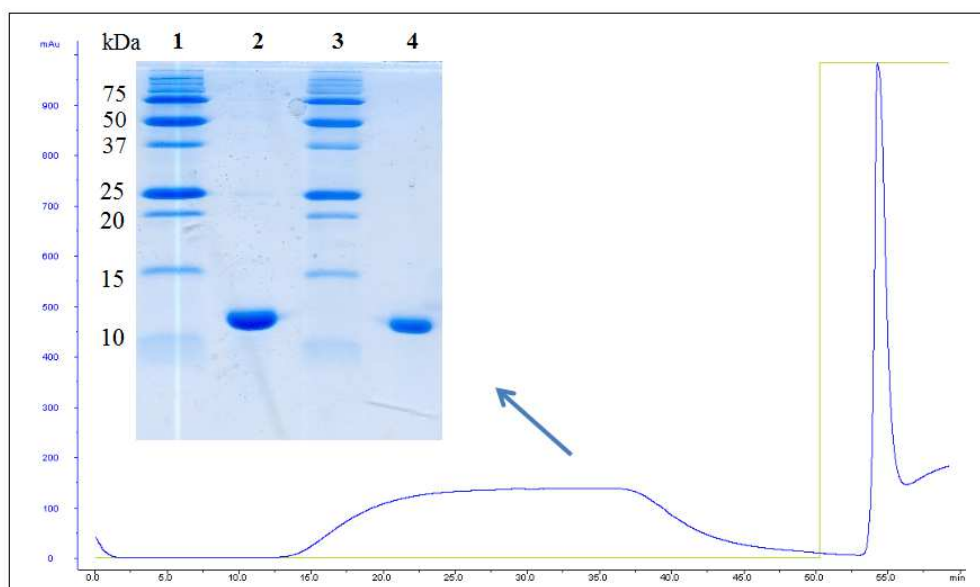


A análise do gel mostrou que as frações retidas na coluna de His-trap se tratavam das proteínas rHML e rBTL fusionadas à etiqueta de histidina. As bandas de interesse possuem um peso molecular aparente de 25 kDa o que corresponde à proteína de fusão tioredoxina com etiqueta de histidina, em torno de 14 kDa, fusionada às proteínas de interesse rHML e rBTL, ambas em torno de 9 kDa.

Portanto, com o objetivo de obter rHML e rBTL livres da cauda de histidina e da proteína de fusão tioredoxina, as frações obtidas da cromatografia de afinidade em níquel foram submetidas à clivagem proteolítica com a protease TEV. A TEV é específica para a sequência Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly-Ala e possui uma etiqueta de histidina. Após incubação com a protease, a mistura foi recromatografada em coluna de níquel a fim de separar as proteínas clivadas das não clivadas e da TEV.

Dessa vez, a fração não retida contendo a proteína de interesse (rHML ou rBTL) foi recuperada. As proteínas não digeridas, a proteína de fusão e a protease TEV ficaram retidas na coluna, graças à presença da etiqueta de histidina. As frações não retidas na coluna foram reunidas e concentradas em tubos amicon de 3 kDa e submetidas à eletroforese SDS-PAGE (Figura IV.11).

Figura IV.11: Perfil cromatográfico e eletroforético da rHML e da rBTL.



Cromatografia de afinidade em coluna His-trap das digestões proteolíticas com TEV. Tampão de equilíbrio: 20 mM de Hepes pH 7,5 contendo 150 mM NaCl, tampão de eluição: 20 mM de Hepes pH 7,5 contendo 150 mM NaCl com 500 mM de imidazol. Inserido gel SDS-PAGE 15% da rHML (2) e da rBTL (4); 1 e 3 representam os marcadores de pesos moleculares.

As frações contendo as proteínas rHML e rBTL, durante o processo de concentração, apresentaram um alto índice de agregação o que resultou na diminuição progressiva do rendimento. Tal característica pode ser atribuída, possivelmente, à exposição de regiões hidrofóbicas e a consequente interação intermolecular. Com o intuito de reduzir a taxa de agregação, o volume da fração correspondente a rHML e a rBTL, obtida do pico não retido da coluna Histrap, foi aumentado em cinco vezes com o mesmo tampão de solubilização adicionado de 20% de glicerol para a rHML e 40% de glicerol para a rBTL. Esse aumento permitiu uma maior proteção das cargas expostas e uma diminuição do contato entre as regiões hidrofóbicas. As amostras também foram periodicamente filtradas (entre os passos posteriores) em membrana com poros de 0,22 μm para a remoção de quaisquer agregados que viessem a ser formados e só foram concentradas imediatamente antes de serem utilizadas para as caracterizações físico-químicas.

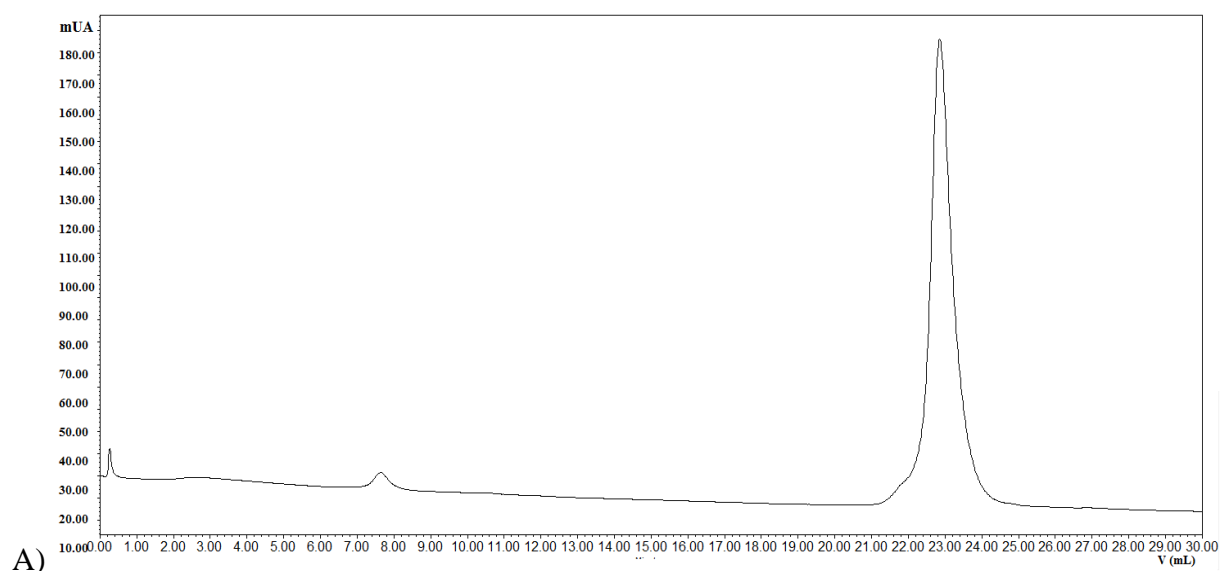
Ambas as amostras foram analisadas quanto ao grau de dispersidade por DLS. Os ensaios mostraram que tanto a rHML quanto a rBTL foram purificadas à partir de cromatografia de afinidade em coluna de níquel como formas monoméricas, e em baixas concentrações, não apresentaram formação de agregados. Porém, foi observado um alto grau

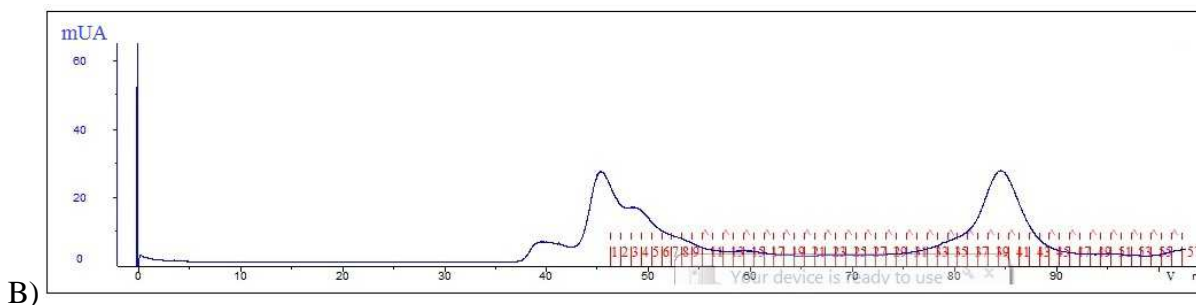
de dispersidade para concentrações acima de 3 mg/mL, forte indício de formação de agregados, onde eles foram bem mais recorrentes para a rHML que para a rBTL. Além disso, os resultados obtidos à partir de espectrometria de massas mostram a formação de multímeros para a HML e para a BTL, bem como uma forte tendência à formação de agregados, muito provavelmente pela capacidade de mudanças nas pontes dissulfeto entre os monômeros vizinhos. Dados de ultracentrifugação analítica da lectina selvagem HML também mostram a formação de agregados protéicos (NAGANO *et al.*, 2005; CALVETE *et al.*, 2000).

A partir da segunda cromatografia em coluna de níquel tanto a rHML quanto a rBTL foram consideradas puras e livres de contaminantes, sendo então utilizadas para as caracterizações físico-químicas.

Para assegurar a pureza da rHML e da rBTL, uma cromatografia de exclusão molecular usando uma coluna de Superdex 75 para a rHML e BioSuite 250 para rBTL foi realizada. Tanto a rHML quanto a rBTL se mostraram puras, livres de contaminantes e foram isoladas em um único pico simétrico. Apenas a rHML mostrou a presença de formas multiméricas e de agregados da proteína (Figura IV.12).

Figura IV.12: Perfil cromatográfico da rBTL e da rHML em coluna BioSuite 250 e Superdex 75, respectivamente.





As colunas foram equilibradas e eluídas isocraticamente em tampão 20 mM de HEPES contendo 150 mM de NaCl, pH 7,5. Foram aplicados 500 µl de amostra a 2 mg/mL e o fluxo foi conduzido a 0,5 mL/min.

A massa molecular da rHML e da rBTL, estimada por exclusão molecular, ficou em torno de 6 kDa e 7 kDa, respectivamente, enquanto que por SDS-PAGE ambos ficaram em torno de 9-11 kDa. Divergências entre massas moleculares estimadas por SDS-PAGE e gel filtração não são raras. É sabido que a conformação é um fator a ser considerado durante a migração de proteínas, tanto em SDS-PAGE quanto em gel filtração. Pois, proteínas globulares e muito compactas podem sofrer atraso em sua migração durante uma cromatografia de gel filtração. Tal característica é encontrada tanto para rHML quanto para rBTL, devido as inúmeras pontes dissulfeto, além disso, o caráter ácido dessas moléculas gera uma migração lenta em SDS-PAGE. Portanto, o peso molecular das proteínas apresentou-se diferente quando estimado por eletroforese e por exclusão molecular. Para a rHML também foi verificado a presença de agregados protéicos (Figura IV.12B, pico eluído de 40 a 50 mL) que foram eluídos antes do volume da coluna. Esses agregados podem ter sido formados durante o processo de concentração protéica.

Paralelamente, ensaios de desnaturação térmica foram realizados com o intuito de analisar as melhores condições tamponantes das proteínas e, dessa forma, se evitar ou ao menos amenizar o estado de agregação protéico. A tabela IV.3, mostra os resultados obtidos com os diferentes tampões utilizados.

De acordo com os teste de termodesnaturação, a maior estabilidade para rHML foi obtida com os tampões 20 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 20 mM de HEPES pH 7,5, ambos contendo 150 mM de NaCl. Para a rBTL a melhor condição tamponante ficou na faixa de pH entre 7,0 e 8,5 com os tampões 20 mM de Tris-HCl pH 7,5, 20 mM de HEPES pH 7,5 e 20 mM de bicina pH 8,5, todos contendo 150 mM de NaCl.

Tabela IV.3: Tampões utilizados nos ensaios de termodesnaturação da rHML e da rBTL, respectivamente.

Tampao (20 mM) + NaCl 150 mM	pH	Tm (°C)
Acetato	5,0	76
Bis-Tris	5,5	76
MES	5,5	79
Malonato	6,0	78
MES	6,0	78
Bis-Tris	6,5	78
Hepes	7,0	78
Tris-HCl	7,0	79
Hepes	7,5	83
Tris-HCl	7,5	83
Tris-HCl	8,0	80
Hepes	8,0	80
Tris-HCl	8,5	78
Bicina	9,0	77
Caps	9,5	78
Caps	10,0	78

Tampao (20 mM) + NaCl 150 mM	pH	Tm (°C)
Acetato	5,0	58
Citrato	5,0	57
Malonato	5,0	58
Cacodilato	5,5	59
Bis-Tris	5,5	57
MES	5,5	59
Malonato	5,5	58
Malonato	6,0	61
MES	6,0	61
Acetato	6,0	66
Bis-Tris	6,5	68
MES	6,5	70
Hepes	7,0	70
Tris-HCl	7,0	76
Hepes	7,5	76
Tris-HCl	7,5	75
Tris-HCl	8,0	79
Hepes	8,0	79
Tris-HCl	8,5	76
Bicina	8,5	76
Bicina	9,0	69
Caps	9,0	69
Caps	9,5	67
Caps	10,0	66

As faixas de pH que correspondem a uma maior estabilidade das proteínas estão destacadas em cinza.

Reconhecidamente, a água do mar é levemente alcalina o que leva a maioria das lectinas de organismos marinhos a apresentarem ótimo de atividade em pH neutro ou levemente básico (PAJIC *et al.*, 2002; MOURA *et al.*, 2005; DRESCH *et al.*, 2008). Notoriamente, especula-se que as lectinas podem desempenhar funções tanto de maneira intra

quanto extracelular (VASTA *et al.*, 2008). A presença de lectinas com atividade ótima em pH diferente daquele do meio circundante pode sugerir que tais lectinas se localizem em frações subcelulares onde o pH predominante é diferente daquele do meio. Os dados obtidos para a rHML e a rBTL mostram que a faixa de pH ótimo para ambas as proteínas está próximo ao pH do meio onde os organismos foram coletados, poças d'água durante as marés de sizígia. A partir desses resultados, todas as caracterizações físico-químicas foram feitas no tampão de preferência das proteínas.

Apesar de todos os esforços nos ensaios de otimização na expressão heteróloga da rHML e da rBTL, o rendimento final da purificação foi de cerca de 2 mg de proteína solúvel por quatro litros de cultura induzida para a rHML e de 4 mg de proteína solúvel por quatro litros de cultura induzida para a rBTL. Esses resultados podem ser considerados insatisfatórios se compararmos ao rendimento de trabalhos anteriores envolvendo a expressão de lectinas de microalgas e de macroalgas, onde na maioria das vezes as proteínas recombinantes apresentaram um bom rendimento (GIOMARELLI *et al.*, 2006; MASSI; AHMAD, 2012; XIONG *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2011; GAO *et al.*, 2010). Porém, tanto a rHML quanto a rBTL foram expressas de forma solúvel, livres de corpos de inclusão e se mostraram ativas frente a eritrócitos de coelho, como será descrito mais adiante. Com alguns ensaios, foi possível obter quantidade suficiente de ambas as proteínas para as diferentes caracterizações físico-químicas.

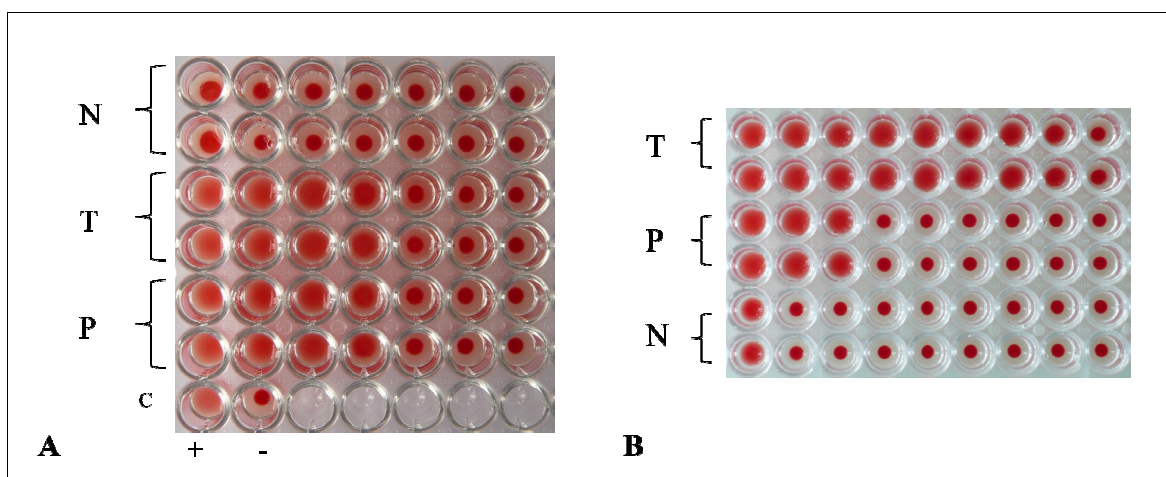
3. FERRAMENTAS PARA O ESTUDO DE INTERAÇÃO LECTINA-CARBOIDRATO

3.1 Atividade hemaglutinante da rHML e da rBTL

Para confirmar o correto enovelamento e a funcionalidade da rHML e da rBTL, foram realizados ensaios de hemaglutinação com uma suspensão de hemácias de coelho a 2% em solução salina. Esse teste é rápido, de fácil visualização e conclusivo.

A Figura IV.13 mostra as propriedades hemaglutinantes da rHML e da rBTL purificadas e concentradas a 1,0 mg/mL. A partir de diluições seriadas, foi possível calcular a quantidade de unidades de hemaglutinação em solução (UH/mL). Considerou-se o equivalente a 1 UH/mL a última diluição que ainda apresentava hemaglutinação nítida macroscopicamente em relação ao controle negativo (-).

Figura IV.13: Propriedades hemaglutinantes da rHML e da rBTL, respectivamente.



Sangue de coelho a 2% tratado com as enzimas proteolíticas tripsina (T) e papaína (P), N se referente ao sangue não tratado. C corresponde aos controles positivo “+” (HML selvagem a 0,5 mg/mL) e negativo “-” (50 mM de Tris contendo 150 mM de NaCl).

A rHML apresentou maior atividade hemaglutinante quando em contato com eritrócitos tratados com tripsina ou papaína, sendo detectada aglutinação até uma diluição de 2^4 , o que confere a proteína uma atividade específica de 16 UH/mg de proteína. Sua contraparte selvagem mostrou uma atividade específica bem mais elevada de 250 UH/mg de proteína. A rBTL apresentou maior atividade quando em contato com eritrócitos tratados com tripsina, sendo detectada aglutinação até uma diluição de 2^8 , o que confere a proteína uma atividade específica de 256 UH/mg de proteína. Comparando com dados da contraparte selvagem, a atividade específica foi de 19.692 UH/mg de proteína. Os títulos mais elevados para as lectinas selvagens podem estar relacionados a gama de isoformas presentes nas frações obtidas a partir da cromatografia de troca aniônica. A presença de isoformas de lectinas de algas também já foi observada para as espécies de *E. serra* (HORI *et al.*, 2007), *B. seaforthii* (NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012; MEDINA-RAMIREZ *et al.*, 2006), *H. japonica* (HORI *et al.*, 2000), *B. plumosa* (YON *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2010, 2011), *E. prolifera* (AMBROSIO *et al.*, 2012), entre outras.

As proteínas recombinante rHML e rBTL mostraram-se fortemente capazes de aglutinar eritrócitos de coelho tratados com as enzimas proteolíticas tripsina e papaína, com sangue não tratado o título de hemaglutinação não foi tão evidente. Provavelmente, os carboidratos reconhecidos pela rHML e rBTL se encontravam “mascarados” pelo glicocálice das hemácias e a exposição dos mesmos só aconteceu após tratamento enzimático. O mesmo é

verificado para as lectinas selvagens HML e BTL. Muitas outras lectinas de alga apresentaram um título de hemaglutinação mais evidente quando os eritrócitos foram tratados com enzimas proteolíticas como as lectinas de *Caulerpa cupressoides* (AINOUZ; SAMPAIO, 1991), *Gracilaria ornata* (LEITE *et al.*, 2005), *Oscillatoria agardhii* (SATO *et al.*, 2000; SATO; HORI, 2009), etc.

Mesmo antes da clivagem da proteína de fusão tioredoxina e da etiqueta de histidina pela enzima TEV, ambas as proteínas tioredoxina-His₆-rHML e tioredoxina-His₆-BTL se mostraram capazes de reconhecer e aglutinar eritrócitos, mas não com a mesma intensidade, sendo constatado um aumento substancial na atividade da rHML e da rBTL após a remoção completa da cauda de fusão. Tal fato pode ser atribuído ao bloqueio parcial do sítio de ligação a carboidrato pela cauda, ou mesmo a alterações conformacionais causadas pela presença da mesma.

Os resultados mostram que a rHML e a rBTL possuem propriedades hemaglutinantes, confirmando o enovelamento correto e o estado funcional das proteínas. É interessante o questionamento de como lectinas monoméricas conseguem reconhecer e aglutinar eritrócitos formando assim uma malha, visível macroscopicamente. Provavelmente essas moléculas, após concentradas, formem multímeros das unidades monoméricas, provocando assim, a formação da malha de eritrócitos o que caracteriza um teste positivo para hemaglutinação. Multímeros das proteínas nativas HML e BTL já foram detectadas por espectrometria de massas (NAGANO *et al.*, 2002; CALVETE *et al.*, 2000). No organismo vivo, por exemplo, nada impede que, sob determinadas circunstâncias, como por exemplo, após as lectinas se ligarem a algum receptor da superfície celular, a conformação e o estado de oligomerização das mesmas possam ser alterados.

3.2 Análise da especificidade por *glycan-array*

A técnica de *glycan array*, desenvolvida pelo *Consortium for Functional Glycomics* (CFG) é uma técnica rápida, colocada à disposição da comunidade científica para estudar as interações entre uma gama de importantes açúcares e lectinas, enzimas, anticorpos, RNAs, vírus, bactérias e etc.

Lectinas de diferentes origens apresentam a capacidade de reconhecer especificamente mono e oligossacarídeos inexistente no organismo de origem, mas abundantes em outros organismos. Em vegetais, por exemplo, a especificidade encontrada em

lectinas encontra-se direcionada para carboidratos presentes em potenciais patógenos, como bactérias, vírus e fungos, e parasitas, como insetos, animais, etc. Em algas, a grande estabilidade devido às várias pontes dissulfeto, e a capacidade de reconhecer principalmente estruturas de glicoconjugados complexos, como os presentes na superfície das células de bactérias, vírus e fungos, direciona essas proteínas também, como moléculas de defesa, e como moléculas de potencial biotecnológico a ser explorado. Nesse contexto, o conhecimento dos receptores oligossacarídicos torna-se de suma importância para a compreensão do mecanismo de interação com esses ligantes naturais, sua distribuição, estrutura e função biológica, bem como para a concepção de glicomiméticos que permitam entender e manipular essas interações.

Os métodos de análise de especificidade disponível no *Consortium for Functional Glycomics* (CFG) permitem testar um grande número de oligossacarídeos, incluindo diferentes *N*-glicanos do tipo complexo, *N*-glicanos ricos em manose, *O*-glicanos, entre outros. rHML, HML, rBTL e BTL foram marcadas com o fluoróforo Alexa Fluor-488 e enviadas para análise. Mais de 600 oligossacarídeos foram testados pelo método de *glycan array*. Quatro concentrações diferentes das lectinas foram utilizadas 0,2 µg/mL, 2,0 µg/mL, 20,0 µg/mL e 200,0 µg/mL.

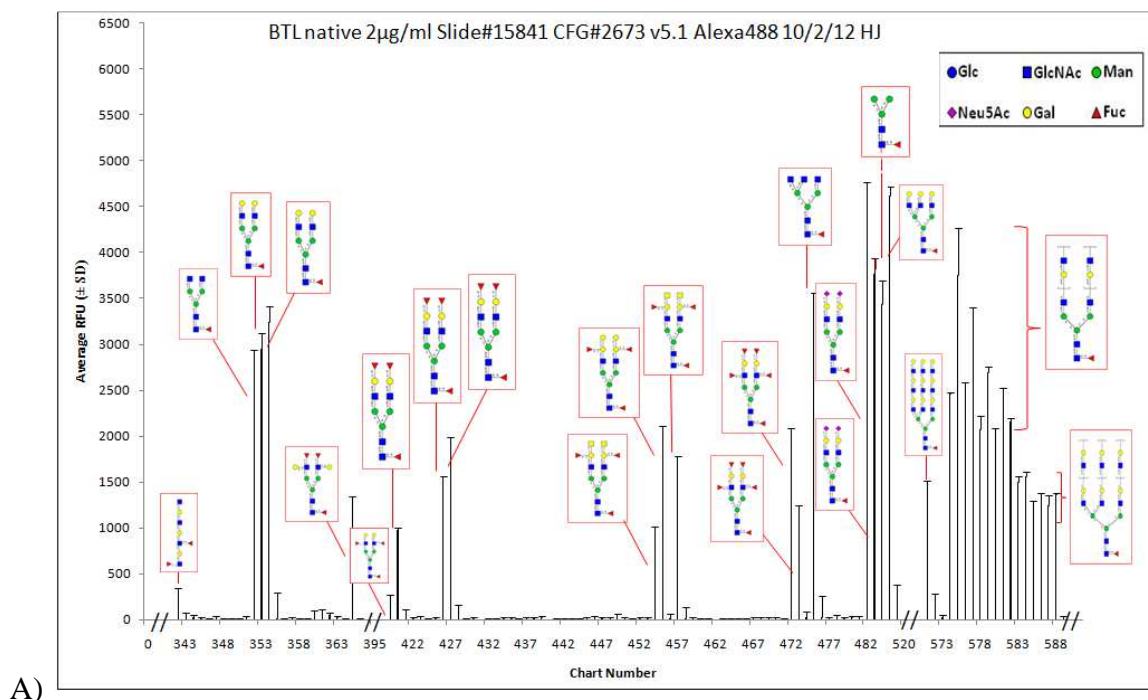
Os dados observados para a BTL selvagem (Figura IV.14A) mostram uma especificidade restrita para *N*-glicanos complexos contendo o núcleo de fucosilação (Man α 1-6(Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc β). A afinidade de ligação para esses *N*-glicanos foi afetada pela existência de bisectados resíduos de GlcNAc, onde a baixas concentrações (0,2 µg/mL ou 2,0 µg/mL), o sinal de fluorescência foi perdido, porém a altas concentrações (200 µg/mL), o sinal foi recuperado. Levando a afirmação que a BTL foi capaz de reconhecer quase todos os *N*-glicanos complexos contendo o núcleo de fucosilação (α 1-6) utilizados nesse estudo. Muito provavelmente, BTL tenha preferência pelos não bisectados *N*-glicanos, implicando que a ligação da lectina ao núcleo de fucosilação (α 1-6) pode ser afetada por uma interferência estérica da ramificação. A mesma conclusão pode ser tirada para os *N*-glicanos tetra-antenados, no qual a BTL não apresentou nenhuma especificidade de ligação. Dos *N*-glicanos analisados, também foi verificado que a lectina tem uma especificidade nata por *N*-glicanos bi- e triantenados de cadeia curta, que a alongação dos braços dos triantenados diminui a afinidade em relação a alongação dos braços nos biantenados. Outra conclusão diz respeito à adição de unidades de ácido siálico no terminal não-redutor dos glicanos, o que influencia de forma positiva a especificidade de ligação da lectina. BTL também não

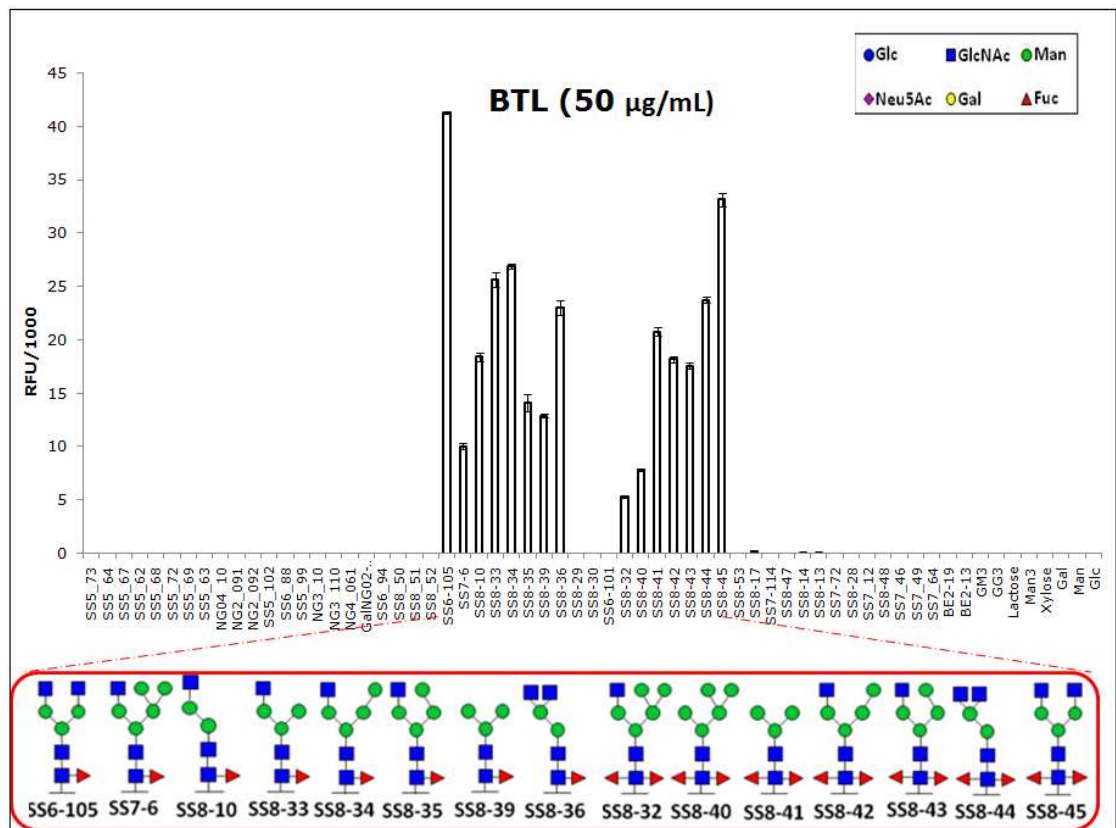
apresentou especificidade de ligação a nenhum outro *N*-glicano fucosilado que não possua o núcleo de fucosilação (α 1-6).

Para investigar mais precisamente essa especificidade da BTL, outra análise foi feita pela equipe do Dr. Niels Reichard da Universidade de San Sebastián, na Espanha. BTL mostrou uma ligação exclusiva a glicanos com o núcleo de fucosilação (α 1-6), a bifucosilação (α 1-3) e (α 1-6) também foi reconhecida, porém a ligação foi completamente abolida na presença apenas da fucosilação (α 1-3). Dessa forma, podemos concluir que BTL é estritamente específica para *N*-glicanos complexos com o núcleo de fucosilação (α 1-6) (Figura IV.14B).

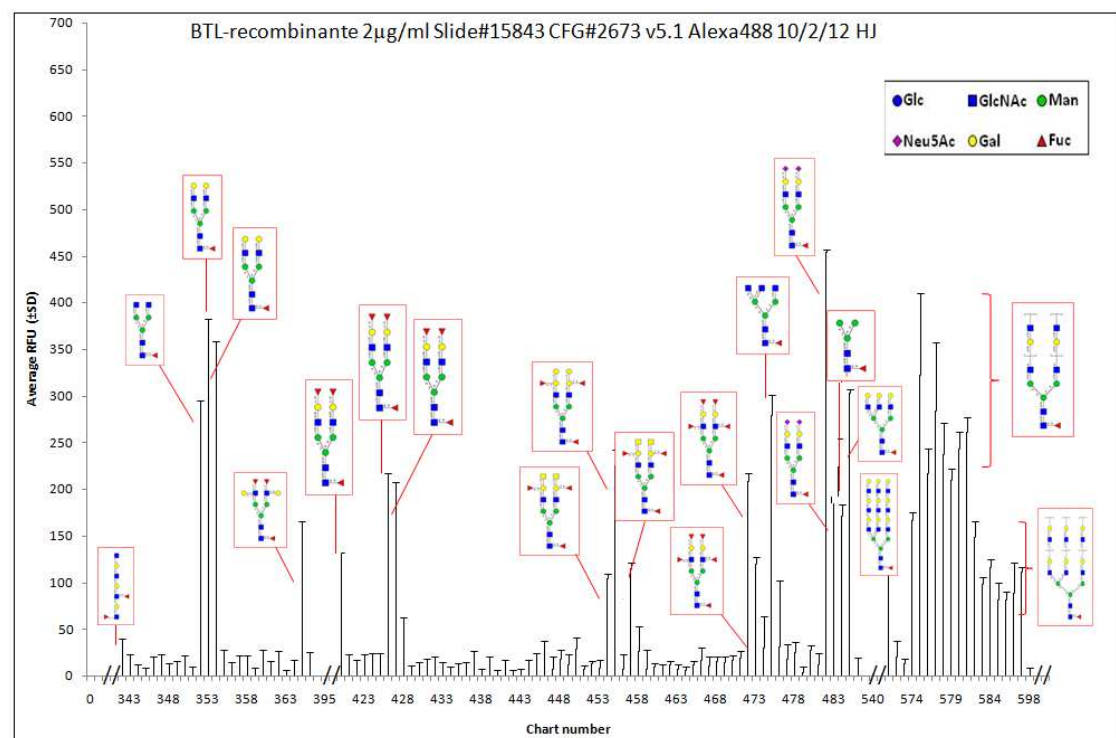
A especificidade da rBTL também foi analisada nas mesmas condições experimentais da BTL. Os resultados apresentados no gráfico seguinte (Figura IV.14C) mostram que a lectina recombinante possui a mesma especificidade de ligação a oligossacarídeos do tipo *N*-glicanos com o núcleo de fucosilação (α 1-6) que a lectina selvagem, apenas se mostrou menos ativa, o que pode ser verificado pela fluorescência relativamente baixa se comparada com a lectina selvagem na mesma concentração.

Figura IV.14: *Glycan array* da BTL e da rBTL.





B)

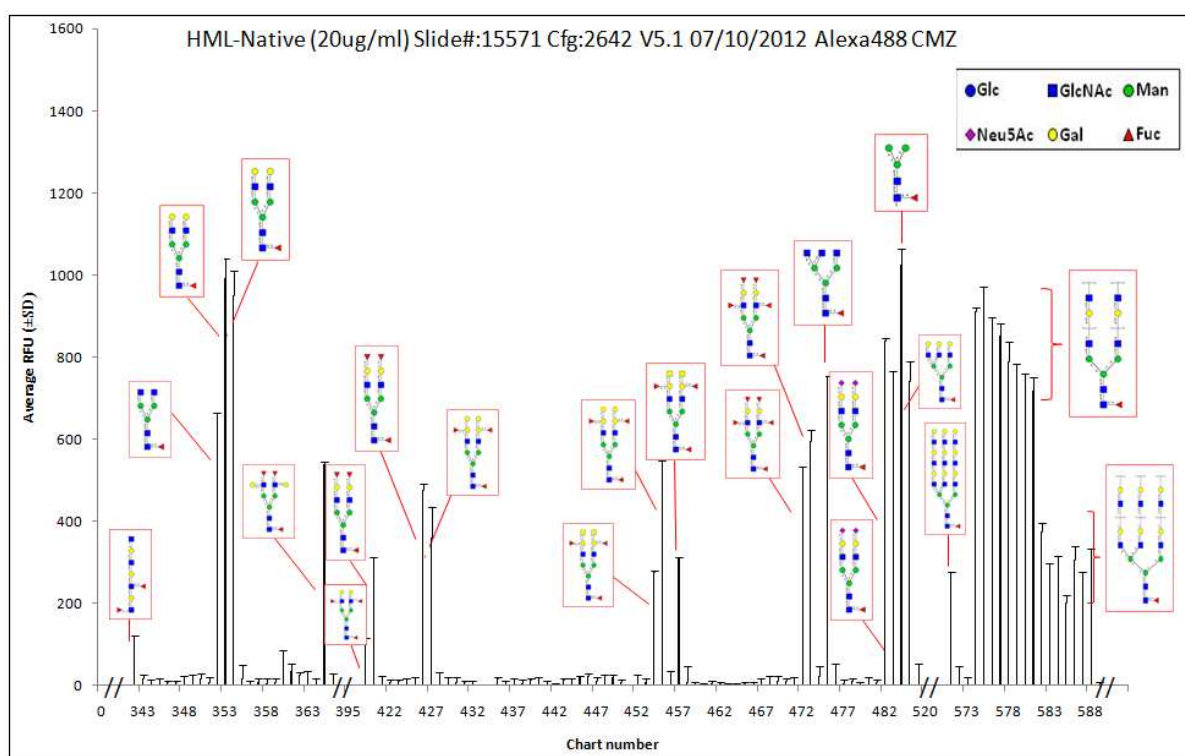


C)

Ligação da BTL (A) e da rBTL (C) (2 µg/mL) a todos os carboidratos disponíveis do *glycan array*, versão 5.1, do CFG (1 a 610) versus RFU (unidades relativas de fluorescência). O resultado completo incluindo a lista de oligossacarídeos está disponível em (<http://www.functionalglycomics.org/>). (B) Ligação de BTL (50 µg/mL) a todos os carboidratos disponíveis do *glycan array* do Departamento de nanomateriais biofuncionais. A monofucosilação se refere a ligação (α1-6) e a bifucosilação as ligações (α1-3) e (α1-6). As representações dos oligossacarídeos foram feitas à partir da plataforma *GlycoWork* (CERONI *et al*, 2007).

Para a HML as mesmas conclusões quanto à especificidade de ligação estrita para *N*-glicanos complexos com o núcleo de fucosilação (α 1-6) foram obtidas (Figura IV.15). Porém, para a lectina recombinante (rHML), não foi possível caracterizar sua especificidade de ligação a carboidratos por *glycan array*. Como dito anteriormente, rHML possui uma forte tendência à formação de agregados, além de ser muito instável, o que pode ter ocorrido, uma vez que não foi possível obter um perfil de ligação para esta lectina. Ensaio de ultracentrifugação analítica mostraram uma forte tendência da HML à formação de agregados a pHs básicos (NAGANO *et al.*, 2005). Provavelmente a rHML não tenha se mantido estável após marcação com Alexa Fluor-488, onde a lectina foi solubilizada em tampão 100 mM de bicarbonato de sódio pH 9,0. Mesmo que ela tenha mantido sua atividade hemaglutinante logo após a marcação, porém com o tempo e o transporte, pode ter ocorrido a formação de agregados. Talvez uma marcação da rHML com biotina, que é normalmente realizada a pH neutro, seja o mais apropriado para determinar o perfil de ligação a carboidratos dessa proteína por *glycan array*.

Figura IV.15: *Glycan array* da HML.



Ligação da HML a 20 μ g/mL a todos os carboidratos disponíveis do *glycan array* do CFG (1 a 610) versus RFU (unidades relativas de fluorescência). O resultado completo incluindo a lista de oligossacarídeos está disponível em (<http://www.functionalglycomics.org/>). As representações dos oligossacarídeos foram feitas à partir da plataforma *GlycoWork* (CERONI *et al.*, 2007).

Especificidade semelhante às encontradas para HML e BTL também foram relatadas para as hypninas, lectinas da alga marinha vermelha *H. japonica*. A especificidade de ligação a oligossacarídeos dessas lectinas foi investigada por cromatografia de afinidade frontal (FAC - *Frontal Affinity Chromatography*) com oligossacarídeos piridilaminados. Nos experimentos, HJA1, HJA2 e HJA3 se ligaram especificamente a *N*-glicanos complexos com o núcleo de fucosilação (α 1-6) e não se ligaram a outros oligossacarídeos examinados contendo (α 1-2), (α 1-3) ou (α 1-4) fucose. As três hypninas mostraram quase o mesmo perfil de afinidade e especificidade entre si por oligossacarídeos, o que implica que a diferença de três aminoácidos na sequência primária das hypninas não está relacionada à especificidade de ligação a carboidratos (OKUYAMA *et al.*, 2009; KOBAYASHI *et al.*, 2012).

As comparações de sequências das estruturas primárias da BTL e das HJAs (1, 2 e 3) revelaram similaridades entre si e também com as lectinas de *Bryothamnion seaforthii* da Costa do Brasil (BSL2, BSL3 e BSL4), e da Costa do Caribe (BSHV1, BSHV2, BSHV3 e BSHV4) (NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012; MEDINA-RAMIREZ *et al.*, 2006). Em contrapartida, há consideráveis diferenças estruturais entre lectinas das macroalgas marinhas vermelhas *H. musciformis* e *H. cervicornis* encontradas na costa do Brasil, e a lectina da alga *H. japonica* da costa do Japão (NAGANO *et al.*, 2005b), apesar das semelhanças quanto a especificidade de ligação a oligossacarídeos apresentadas nesse trabalho.

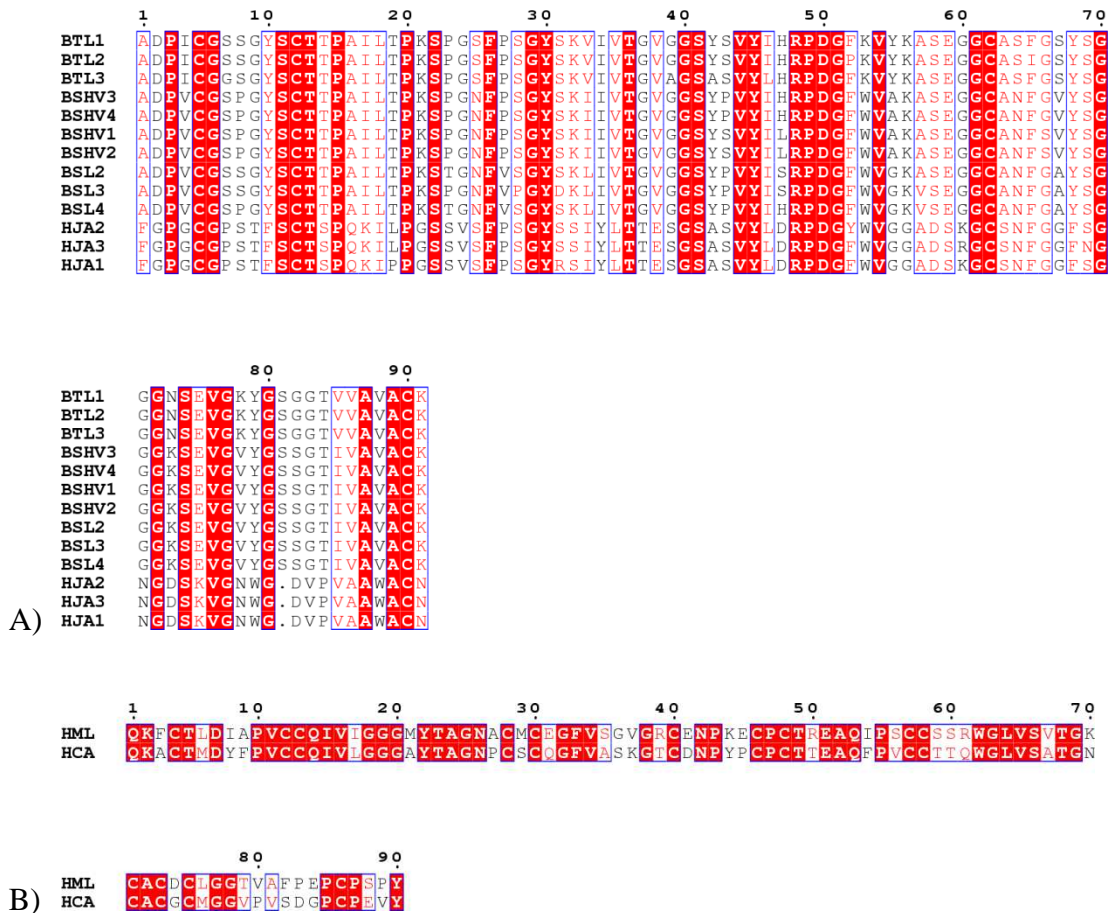
A Figura IV.16 mostra o alinhamento de sequências primárias de lectinas de algas semelhantes a HML e BTL. As lectinas são compostas por 90 a 91 resíduos de aminoácidos e compartilham uma posição comum de quatro resíduos de cisteínas.

O alinhamento da sequência da BTL com um banco de dados no BLAST revela 83% de identidade e 93% de similaridade com as BSLs, lectinas isoladas da alga vermelha *Bryothamnion seaforthii* da Costa do Brasil, 72% de identidade e 81% de similaridade com as BSHVs, lectinas isoladas da alga vermelha *Bryothamnion seaforthii* da costa da Venezuela e 33% de identidade e 57% de similaridade com as HJAs, lectinas isoladas da alga vermelha *Hypnea japonica*, além das heterogeneidades entre suas próprias isoformas.

HML e HCA (Lectina isolada da alga vermelha *H. cervicornis*) apresentam 55% de identidade entre suas sequências e 80% de similaridade, além da existência de duplicação interna de domínios. Seis cisteínas conservadas em cada domínio podem formar três pontes dissulfeto intracadeia e um único resíduo de cisteína no N-terminal cys⁴⁶ e outro no domínio C-terminal cys⁷¹ podem formar uma ponte dissulfeto intersubunidade, como sugerido por Nagano *et al.*, 2005b. HML não tem similaridade de sequência com as hypninas, exceto na

posição de quatro resíduos de cisteínas. HML e BTL também não compartilham similaridades de sequência entre si.

Figura IV.16: Alinhamento de sequências polipeptídicas de lectinas de macroalgas vermelhas.



O alinhamento foi feito utilizando o programa webESPrift (GOUET *et al.*, 1999). A) Dados de sequência para as BTLs, lectinas de *Bryothamnion triquetrum* (CALVETE *et al.*, 2000), BSLs, lectinas de *B. seaforthii* (NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012) isoladas da costa do Brasil, BSHVs, lectinas isoladas de *B. seaforthii* da costa da Venezuela (MEDINA-RAMIREZ *et al.*, 2006), hypninas, lectinas de *H. japonica* (HJA1- JC5773, HJA2- JC5774 e HJA3-P85888) (HORI *et al.*, 2000 e OKUYAMA *et al.*, 2009). B) Dados de sequência para a HML de *Hypnea musciformis* (P84871) e HCA de *H. cervicornis* (P84870) (NAGANO *et al.*, 2005).

A superfície das células dos organismos é coberta por abundantes e diversos carboidratos, por causa dessa diversidade estrutural, esses carboidratos têm um importante papel nos fenômenos de reconhecimento biológico. Portanto, algumas lectinas têm um valor particular como marcador específico, para investigação da distribuição, estrutura e função biológica das cadeias de carboidratos na superfície dessas células. Isso é devido à grande especificidade de lectinas aos mais diversos carboidratos.

Várias lectinas com propriedades de ligação a fucose ou ao núcleo de fucosilação (α 1-6) têm sido obtida de várias fontes: lectina de *Lotus tetragonolobus* (LTA), *Ulex europaeus* (UEA-1) (revisado por MATSUMURA *et al.*, 2007), *Lens culinaris* (LCA-1), *Pisum sativum* (PSA) (TATERRO, NAKAMURA; HIRABAYASHI, 2009) de plantas, *Aleuria aurantia* (AAL) (WIMMEROVA *et al.*, 2003), *Aspergillus aryzae* (AOL) (MATSUMURA *et al.*, 2007), *Ralstonia solanacearum* (RSL) (SUDAKEVITZ, IMBERTYU; GILBOA, 2002) e *Pholiota squarrosa* (PhoSL) (KOBAYASHI *et al.*, 2012) de fungos, *Burkholderia ambifaria* (BambI) (AUDFRAY *et al.*, 2012) e *B. cenocepacia* (BC2L-C) (SULAK *et al.*, 2011) de bactéria. Porém, nem sempre a especificidade de ligação ao núcleo de fucosilação (α 1-6) é guardada. AAL, por exemplo, reconhece fucose (α 1-3), (α 1-4) e (α 1-6); UEA e LTA reconhecem fucose (α 1-2); LCA reconhece a forma nativa de fucose (α 1-6) com um braço de manose; e AOL e PhoSL são as únicas que reconhecem fucose (α 1-6) mais especificamente. AAL, AOL e LCA têm sido utilizadas como marcadores de carboidratos para o núcleo de fucosilação em glicoproteínas e são moléculas comercializáveis para esse fim.

Estruturas fucosiladas são conhecidas por estarem envolvidas em inúmeros eventos biológicos. A fucosilação é largamente distribuída em tecidos de mamíferos e é alterada sob determinadas condições patológicas. Em *N*-glicanos presentes em vertebrados, a principal modificação no núcleo é a adição de uma fucose (α 1-6) a uma unidade de *N*-acetilglicosamina adjacente a asparagina do núcleo de fucosilação (VARKI *et al.*, 2009). Esse núcleo atrai a atenção como um marcador crítico de câncer humano. Ele funciona como um biomarcador para hepatocarcinoma celular devido a elevada quantidade da fucosilada α -fetoproteína (AFP-L3) nesse tipo de câncer (MIYOSHI *et al.*, 2008). Também é conhecido que o conteúdo do núcleo de fucose (α 1-6) aumenta com a tumorigênese do tecido, como de fígado, pulmão e estômago, além de afetar a eficiência da citotoxicidade celular dependente de anticorpos (SHEILDS *et al.*, 2002).

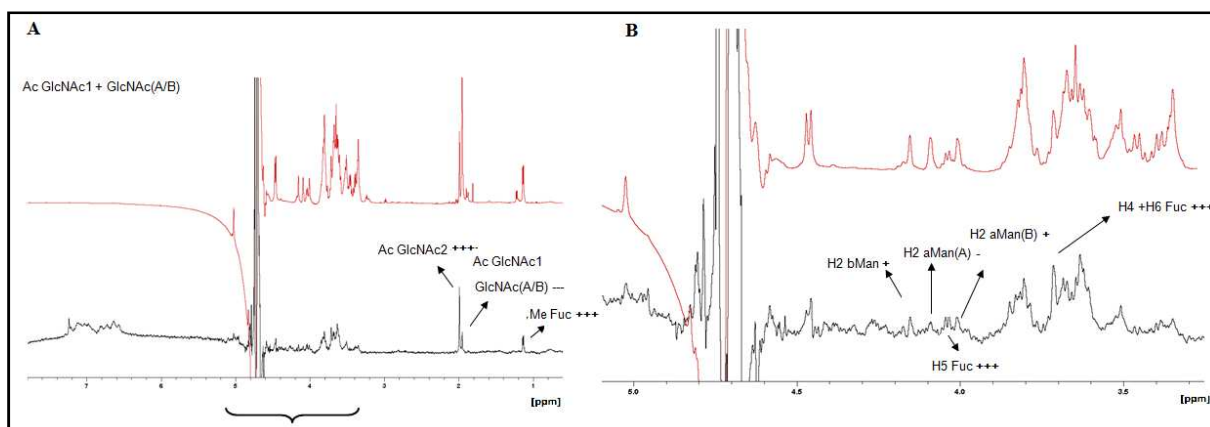
Os resultados obtidos por *glycan array* mostram que as lectinas de algas vermelhas HML e BTL possuem uma estrita especificidade por *N*-glicanos complexos que possuem o núcleo de fucosilação (α 1-6) e, dessa forma, indicam que essas lectinas são potenciais candidatos para detectar o núcleo de fucosilação em glicoproteínas na superfície de células animais bem como no diagnóstico de câncer e como reagente para a preparação e o controle de qualidade de anticorpos que perdem o núcleo fucosilado de *N*-glicanos. Um marcador que especificamente detecte o núcleo fucose (α 1-6) é importante para entender o papel dessa estrutura oligossacarídica.

A significância biológica da especificidade restrita de ligação a *N*-glicanos complexos com o núcleo de fucose (α 1-6) ainda é desconhecida.

3.3 Análise da interação da BTL com Fuc-Octa por STD-RMN

A análise da interação da BTL com o octassacarídico (Fuc-Octa) ($\text{GlcNAc}\beta$ 1-2 $\text{Man}\alpha$ 1-6($\text{GlcNAc}\beta$ 1-2 $\text{Man}\alpha$ 1-3) $\text{Man}\beta$ 1-4 $\text{GlcNAc}\beta$ 1-4($\text{Fuc}\alpha$ 1-6) $\text{GlcNAc}\beta$) mostra que alguns prótons do ligante estão mais próximos da BTL que outros. H4, H5 e H6 da fucose, o grupo acetil do $\text{GlcNAc}2$ e, em menor intensidade, o H2 da manose do braço B (1-6). O efeito STD mais forte foi observado para H4, H5 e H6 da fucose sugerindo que estes prótons estão mais próximos ao sítio de ligação da proteína (Figura IV.17). Dessa forma, um efeito STD foi observado para a BTL saturada com o octassacarídeo Fuc-Octa contendo o núcleo de fucosilação (α 1-6), confirmando os resultados obtidos por *glycan array*.

Figura IV.17: Espectro STD-RMN da BTL com Fuc-Octa.



Espectro de referência (vermelho) e espectro STD-RMN (preto) de Fuc-Octa na presença da BTL. B representa a região destacada em A ampliada.

4. ENSAIOS DE TOXICIDADE da HML, rHML, BTL e rBTL

4.1 Letalidade contra *Artemia sp.*

As lectinas HML, rHML, BTL e rBTL testadas a diferentes concentrações (12,5 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ ou 100 $\mu\text{g/mL}$) não apresentaram toxicidade contra *Artemia sp.* em nenhuma das concentrações utilizadas, nem mesmo depois de 48 horas de incubação com

o microcústáceo, sugerindo que tanto a HML e a rHML como a BTL e a rBTL foram inócuas nos testes de letalidade contra as artêmias.

Contudo, poucas lectinas de algas foram avaliadas quanto à toxicidade sobre náuplios. Esse teste foi realizado com a lectina da alga marinha vermelha *Amansia multifida* (AML) que também não mostrou toxicidade contra o microcústáceo (SILVA, 2010) e as lectinas da alga verde *Codium isthmocladum* CiL-1 e CiL-2. Nos ensaios CiL-1 e CiL-2 também não mostraram toxicidade nas primeiras 24 horas do teste, e após 48 horas, somente a CiL-2 foi tóxica com uma CL_{50} de 30 $\mu\text{g/mL}$, apresentando um nível de toxicidade significativo contra o microcústáceo (SILVA, 2013). Não parece haver relação entre alguma característica marcante da lectina e o grau de toxicidade que a mesma apresenta contra náuplios.

Artemia sp. tem sido largamente utilizada em testes de toxicidade e de letalidade, por se tratar de um animal de fácil manutenção em condições de laboratório e de ampla distribuição. Esses testes são amplamente utilizados como indicador de citotoxicidade de compostos bioativos. Tal toxicidade está diretamente relacionada a diversas propriedades biológicas, incluindo atividade anti-HIV, atividade inseticida, pesticida e antitumoral (CARBALHO *et al.*, 2002; NUNES *et al.*, 2006).

O Instituto Nacional do Câncer/USA mostrou que se pode correlacionar toxicidade contra artemia e a inibição de crescimento de células cancerígenas (ANDERSON *et al.*, 1991). Desde então, o ensaio de toxicidade contra *Artemia sp.* tem sido utilizado como teste preliminar para compostos com possíveis aplicações antitumorais (BAGYA, RAJASHREE; SAM, 2011). Porém, não se pode generalizar essa afirmação, ensaios de compostos contra *Artemia sp.* que mostram letalidade contra o microcústáceo não necessariamente será um alvo na inibição do crescimento de células cancerígenas. O inverso também é verdadeiro, ensaios de compostos contra *Artemia sp.* que não mostram letalidade contra o microcústáceo não exclui a possibilidade de uma ação tóxica dessas moléculas contra células cancerígenas, como foi o caso observado nos ensaios de MTT com a lectina HML e sua contraparte recombinante rHML, descrito à seguir.

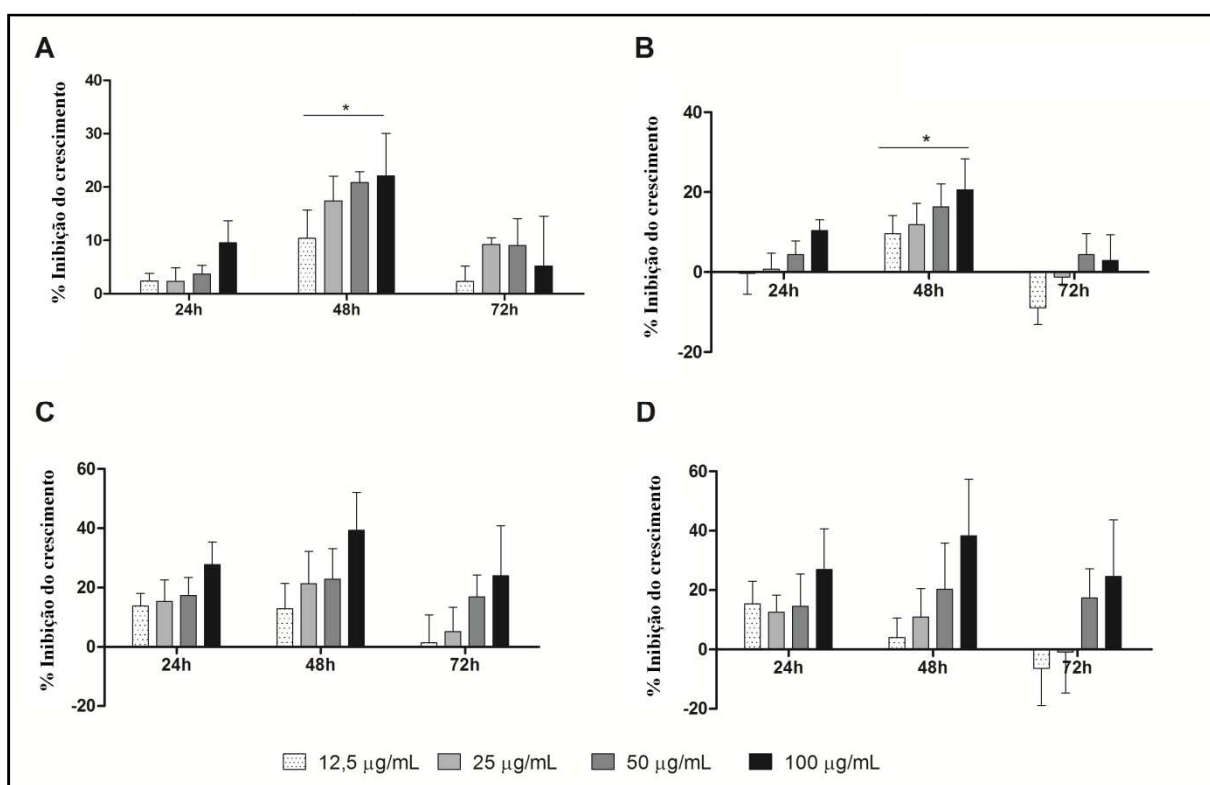
4.2 Cultura celular e ensaio colorimétrico MTT

Os resultados do ensaio de MTT mostraram que a incubação com as lectinas HML e rHML diminuiu a viabilidade das células A549 em 48 horas de tratamento (Figuras IV.18A

e IV.18B). A inibição do crescimento celular após o tratamento com HML e rHML foi cerca de 20% em 48 horas, porém não foram observadas diferenças entre as diferentes concentrações testadas.

O tratamento com as lectinas BTL e rBTL mostrou uma tendência para o aumento da citotoxicidade às 24 e 48 h, mas esta tendência não foi significativa nas diferentes concentrações testadas (Figuras IV.18C e IV.18D). O tratamento com BSA não apresentou citotoxicidade contra células A549 (dados não mostrados).

Figura IV.18: Efeito da citotoxicidade de HML, rHML, BTL e rBTL contra células A549 investigados por ensaio de MTT.



A) HML; B) rHML; C) BTL e D) rBTL. (*) Indicam diferença significativa entre os tempos de tratamento (24, 48 e 72 horas). A diferença foi considerada significativa em $P < 0,05$.

Certamente uma ação citotóxica de HML, rHML, BTL e rBTL contra a linhagem A549 não é a aplicação biotecnológica mais indicada para essas lectinas. Porém, nada impede uma ação de reconhecimento celular desencadeado por uma interação das lectinas estudadas com as células em questão, uma vez que, reconhecidamente, adenocarcinomas de pulmão apresentam níveis consideráveis de glicoproteínas com o núcleo de fucosilação ($\alpha 1-6$).

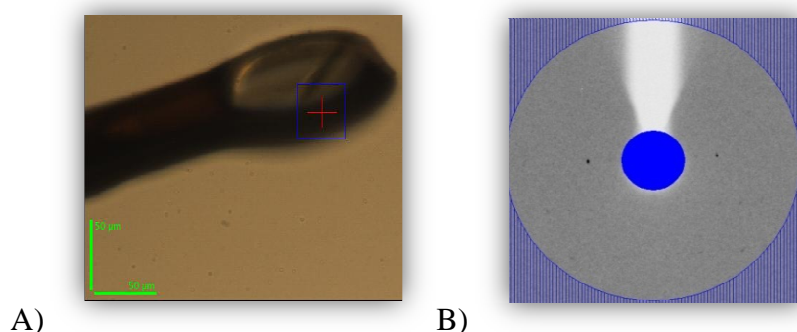
Considerando que HML, rHML, BTL e rBTL reconhecem de forma estritamente específica o núcleo de fucosilação (α 1-6), essas lectinas poderiam funcionar como glicobiomarcadores de adenocarcinomas de pulmão. Porém, experimentos devem ser conduzidos com o intuito de averiguar essa possível aplicação.

Em estudos realizados por Pinto *et al* (2009), BTL foi capaz de diferenciar variantes celulares de carcinoma de colon humano onde o núcleo de fucosilação (α 1-6) têm seu nível aumentado nos estágios iniciais do desenvolvimento do câncer de colon, e subsequentemente diminui na fase metastática.

5. ENSAIOS DE CRISTALOGRAFIA

Para os ensaios de cristalização, rHML (4 mg/mL) e rBTL (6 mg/mL) foram submetidas ao screen inicial com os kits de cristalização da Hampton research, Midas e Morpheus (Crystal Screen I e IITM). Após seis semana de montagem das microplacas foi observado um microcristal da rBTL somente na condição 1,0 M LiCl, 0,1 M Tris pH 8,0 contendo 10% PEG 6K (Figura IV.19A). Este cristal foi imerso na solução mãe, suplementado com 30% de PEG 6K antes de serem colocados em uma *litholoop* (Molecular dimensions Ltd.) e congelados em nitrogênio líquido. rBTL difratou a 15 Å na linha de luz ID14-4 do ESRF equipado com um detector de ADSC Quantum 4. Estes resultados confirmaram que era um cristal de proteína, mas a resolução não foi suficiente para coleta de dados. Depois de obter o primeiro cristal, tentou-se reproduzi-lo manualmente e otimizar as condições de cristalização a fim de obter um cristal em tamanho adequado para os ensaios de difração. Infelizmente, a formação do cristal não foi adequada e o padrão de difração foi fraco, com resolução de apenas 15 Å e, portanto, um conjunto de dados de qualidade que permitisse a resolução da estrutura da lectina não pôde ser coletado (Figura IV.19B). Por vezes, é difícil reproduzir os cristais obtidos em nanogotas. São necessários estudos de otimizações mais avançados.

Figura IV.19: Microristal de proteína da rBTL.



A) Um microcristal da rBTL foi obtido à partir da condição 1,0 M LiCl, 0,1 M Tris pH 8,0 contendo 10% PEG 6K. As gotas (100 nL) foram preparadas por um robô de cristalização, montadas sobre uma superfície plástica e seladas sobre uma placa de microtitulação. B) Difração do microcristal da rBTL a 15 Å.

A lectina selvagem de *H. musciformis* (HML) possui um conjunto de dados obtidos à partir do cristal difratado por raios X a 2,4 Å de resolução, porém não teve sua estrutura terciária resolvida, dado que o problema das fases não pôde ser resolvido por substituição molecular, uma vez que não existem lectinas com similaridade suficiente com a HML com estrutura tridimensional resolvida. Faz-se necessário a utilização de outros métodos para resolução do problema de fases. A presença de 16 átomos de enxofre, provenientes das cisteínas e metioninas da sequência de aminoácidos da HML, poderia permitir a eliminação do problema de fases utilizando o sinal anômalo do enxofre para a coleta de dados pelas técnicas de SAD (Difração anômala em um único comprimento de onda) e MAD (Difração anômala em múltiplos comprimentos de onda). A mesma condição que proporcionou o crescimento de cristais para a HML foi testada para a rHML, bem como algumas otimizações da condição inicial, mas todas as tentativas falharam na obtenção de cristais da proteína, o que pode ter ocorrido devido ao problema de agregação, descrito anteriormente. Apenas cristais de sal foram obtidos. Portanto, faz-se necessário estabilizar a rHML para evitar esses problemas antes de continuar com os ensaios de cristalização da forma recombinante.

CAPÍTULO V:
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

CAPÍTULO V: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A concepção e execução desse trabalho de tese permitiu a descrição completa da clonagem do gene sintético e produção heteróloga de lectinas das algas vermelhas marinhas *Hypnea musciformis* (rHML) e *Bryothamnion triquetrum* (rBTL).

As proteínas recombinantes rHML e rBTL foram produzidas em sistema heterólogo de *Escherichia coli*. Apesar do baixo rendimento final de purificação, os resultados foram considerados satisfatórios, uma vez que tanto a rHML quanto a rBTL foram expressas de forma solúvel, livres de corpos de inclusão e se mostraram ativas frente a eritrócitos de coelho. Com alguns ensaios, foi possível obter quantidade suficiente de ambas as proteínas para as diferentes caracterizações físico-químicas.

A produção da HML e da BTL recombinantes poderá contribuir com uma diminuição no extrativismo dessas algas no litoral Nordeste, bem como a possibilidade de produção dessas proteínas em épocas do ano de escassez dessas algas, devido a sazonalidade.

Nos ensaios de *glycan array* HML, BTL e rBTL mostraram ter uma especificidade restrita à oligossacarídeos complexos com o núcleo de fucosilação (α 1-6) com uma preferência sobretudo por *N*-glicanos não bisectados, bi- e triantenados de cadeia curta. Formas sialiladas ao terminal não redutor dos glicanos também influenciaram de forma positiva a especificidade de ligação das lectinas. Esta foi a primeira caracterização de lectinas de alga por *glycan array*. Uma interação da BTL com um octassacarídeo contendo o núcleo de fucosilação (α 1-6) também foi verificado por STD-RMN. Tomando como base esses resultados, HML e BTL podem ser vistas como possíveis novos glicobiomarcadores para detecção do núcleo de fucosilação (α 1-6) em glicoproteínas na superfície de células animais, podendo ainda ser utilizadas como uma ferramenta biotecnológica na detecção e diagnósticos do câncer.

A significância biológica da especificidade restrita de ligação a *N*-glicanos complexos com o núcleo de fucosilação (α 1-6) para essas lectinas ainda é desconhecida, mas podemos aventar uma relação de proximidade que essa classe de oligossacarídeo deva ter com o ligante natural da lectina em seu modo de ação (endógeno ou exógeno).

O estudo dessas lectinas de algas e sua caracterização bioquímica forneceram, portanto, informações importantes sobre as interações proteína-açúcar e a especificidade a oligossacarídeos complexos, ponto de partida para compreender os mecanismos de ação, de

reconhecimento e afinidade por esses açúcares. Uma vez em posse dessas informações, a sua capacidade de reconhecer glicanos envolvidos em eventos biológicos interessantes, desde a investigação de sua função no organismo de origem, como em aplicações biotecnológicas, poderá ser entendida, amplificada ou revertida.

O maior desafio agora será tentar responder à pergunta biológica sobre a importância dessa interação para o organismo de origem: que eventos estão relacionados, em que etapas da vida e como pode ser melhor explorado. Esse trabalho fornece informações significativas que somam aos estudos de lectinas de macroalgas marinhas. O conhecimento da forma recombinante das lectinas, aliados ao conhecimento de como se dá sua interação a oligossacarídeos complexos, são importantes ferramentas de partida para essa abordagem. A análise da especificidade dessas lectinas frente a oligossacarídeos diversos, além dos aspectos estruturais e termodinâmicos envolvidos nas interações, poderão contribuir para o entendimento de como se dá o reconhecimento de carboidratos envolvidos nos mais distintos processos biológicos por lectinas. Esses estudos ajudarão a compreender melhor as lectinas desses organismos, suas funções, modo de ação, bem como possíveis aplicações biotecnológicas.

Nos ensaios de citotoxicidade, HML, rHML, BTL e rBTL não apresentaram toxicidade contra náuplios de *Artemia sp.*, nem mesmo contra células de adenocarcinoma de pulmão A549. Experimentos devem ser conduzidos com o intuito de averiguar um possível aplicação dessas lectinas como glicobiomarcadores para células da linhagem A549 de adenocarcinoma de pulmão.

O primeiro cristal de rBTL foi obtido em micro escala através da utilização de um robô de cristalização. Infelizmente, a formação do cristal não foi adequada e o padrão de difração foi muito fraco e, dessa forma, um conjunto de dados de qualidade que permita a resolução da estrutura da lectina não pôde ser coletado. O caminho para a resolução da estrutura cristalográfica de rHML e de rBTL pode ser o emprego das técnicas de MIR (*Multiple isomorphous replacement*), SAD ou MAD, o que faz necessário a obtenção de co-cristais complexados com metais pesados. Visando resolver a estrutura tridimensional da rHML e da rBTL, novos experimentos de cristalização serão conduzidos para obtenção de cristais de qualidade passíveis de difração.

Os resultados presentes nesse trabalho tornaram possível a redação de um manuscrito em língua inglesa que será submetido para publicação.

OUTROS TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O DOUTORADO

O trabalho envolvendo a produção heteróloga das lectinas das algas marinhas vermelhas de *Hypnea musciformis* (rHML) e de *Bryothamnion triquetrum* (rBTL), a caracterização físico-química dessas lectinas, o estudo da especificidade à oligossacarídeos e a toxicidade dessas moléculas foi utilizado para redigir esse trabalho de tese, por reunir dados desenvolvidos pela colaboração das equipes brasileira e francesa por ocasião do estágio em co-tutela de tese, mas durante o período do doutorado, outros projetos também foram executados envolvendo lectinas vegetais e animais na Universidade Federal do Ceará, gerando no total seis publicações incluindo autoria e co-autoria. Em relação a esses assuntos, foram geradas as seguintes publicações, disponíveis em revistas científicas indexadas, segundo descrito abaixo, além de outras quatro publicações, resultado de trabalhos em co-autoria durante o período de estágio em iniciação científica e mestrado.

Alves-Filho, J. G.; **do Nascimento, A. S.**; Gondim, A. C.; Pereira, R. H.; da Cunha, R. M.; Nagano, C. S.; Teixeira, E. H.; Nascimento K. S.; Cavada, B. S. *Isoform characterisation, heterologous expression and functional analysis of two lectins from Vatairea macrocarpa*. Protein and Peptide Letters, v. 20(11), p.1204-10, 2013.

Júnior, V. R. P.; Santiago, M. Q.; Osterne, V. J. S.; Correia, J. L. A.; Cajazeiras, J. B.; Vasconcelos, M. A.; **Nascimento, A. S. F.**; Miguel, T. B. R.; Miguel, E. C.; Sampaio, A. H.; Nascimento, K. S.; Nagano, C. S.; Cavada, B. S. *Purification, Partial Characterization and Immobilization of a Mannose-Specific Lectin from Seeds of Dioclea lasiophylla Mart*. Molecules, v. 18, p. 10857-10869, 2013.

Rangel, T. B. A.; Rocha, B. A. M.; Bezerra, G. A.; Assreuy, A. M. S.; **Nascimento, A. S. F.**; Bezerra, M. J. B.; do Nascimento, K. S.; Nagano, C. S.; Sampaio, A. H.; Delatorre, P.; Fernandes, P. M. B.; Cavada, B. S. *Crystal structure of a pro-inflammatory lectin from the seeds of Dioclea wilsonii Standl*. Biochimie (Paris. Print), v. 94, p. 525-532, 2012.

Nascimento, A. S. F.; Cajazeiras, J. B.; Nascimento, K. S.; Nogueira, S.M.S.; Teixeira, E. H.; Melo, L. M.; Cunha, R. M. S.; Silva, A. L. C.; Cavada, B. S. *Expression, purification and structural analysis of recombinant rBdh-2His6, a spermadhesin from buck (Capra hircus) seminal plasma*. Reproduction, Fertility and Development, v. 24, p. 580-587, 2012.

Cajazeiras, J. B.; Melo, L. M.; **Nascimento, A. S. F.**; Albuquerque, E. S.; Radis, B. G.; Freitas, V. J. F.; Cavada, B. S. *Expression of recombinant buck (Capra hircus) spermadhesinin a prokaryotic system*. Revista Brasi de Biociências, v. 10, p. 60-65, 2012.

<p>Nascimento, A. S. F.; Gondim, A. C. S.; Cajazeiras, J. B.; Correia, J. L. A.; Pires, A. F.; Nascimento, K. S.; Nagano, C. S.; Assreuy, A. M. S.; Cavada, B. S. <i>Purification and partial characterization of a novel lectin from <i>Dioclea lasiocarpa</i> Mart seeds with vasodilator effects</i>. Journal of Molecular Recognition, v. 25, p. 657-664, 2012.</p>
<p>Cavalcante, T. T. A.; Rocha, A. M.; Alves, V. C.; Arruda, F. V. S.; Nascimento, A. S. F.; As, N. C.; Nascimento, K. S.; Cavada, B. S.; Teixeira, E. H.; <i>Effect of Lectins from <i>Diocleinae</i> Subtribe against Oral <i>Streptococci</i></i>. Molecules (Basel. Online), v. 16, p. 3530-3543, 2011.</p>
<p>Rangel, T. B. A.; Assreuy, A. M. S.; Pires, A. F.; Carvalho, A. U.; R. G.; Simões, R. C.; Silva, H. C.; Bezerra, M. J. B.; Nascimento, A. S. F.; Nascimento, K. S.; C. S.; Sampaio, A. H.; Delatorre, P.; Rocha, B. A. M.; Fernandes, P. M. B.; Cavada, B. S. <i>Crystallization and Characterization of an Inflammatory Lectin Purified from the Seeds of <i>Dioclea wilsonii</i></i>. Molecules (Basel. Online), v. 16, p. 5087-5103, 2011.</p>
<p>Correia, J. L. A.; Nascimento, A. S. F.; Cajazeiras, J. B.; Gondim, A. C. S.; Pereira, R. I.; Sousa, B. L.; Silva, A. L. C.; Garcia, W.; Teixeira, E. H.; Nascimento, K. S.; Rocha, Bruno A. M.; Nagano, C. S.; Sampaio, A. H.; Cavada, B. S.. <i>Molecular Characterization and Tandem Mass Spectrometry of the Lectin Extracted from the Seeds of <i>Dioclea sclerocarpa</i> Ducke</i>. Molecules (Basel. Online), v. 16, p. 9077-9089, 2011.</p>
<p>Melo, L. M.; Nascimento, A. S. F.; Silveira, F.; Cunha, R.; Tavares, N.; Teixeira, D.; Lima-Filho, J.; Freitas, V.; Cavada, B. S.; Radis, B. G. <i>Quantitative expression analysis of <i>Bodhesin</i> genes in the buck (<i>Capra hircus</i>) reproductive tract by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)</i>. Animal Reproduction Science (Print), v. 110, p. 245-255, 2009.</p>

Outros projetos também foram iniciados ou dados continuidade com a equipe francesa, porém, devido ao tempo, não foram concluídos.

Produção heteróloga dos domínios separados das discoidinas: As lectinas da ameba *Dictyostelium discoideum* (DiscI et DiscII) tiveram seus domínios N- e C-terminais expressos separadamente em sistema heterólogo de *E. coli*. Esses domínios foram utilizados para caracterização da especificidade por oligossacarídeos por *Glycan array* e utilizados em testes de toxicidade contra o nematódeo *Caenorhabditis elegans*.

Produção heteróloga das lectinas sll2 e sll2.2: As lectinas do coral *Sinularia lochmodes* foram expressas de forma recombinante em sistema heterólogo de *E. coli*. As proteínas foram purificadas e diferentes protocolos foram testados a fim de obter as proteínas ativas.

Produção heteróloga da lectina de *Photorhabdus luminescens*: Uma lectina hipotética de membrana foi identificada no genoma da bactéria *P. luminescens*. O gene sintético para a lectina foi clonado e expresso de forma recombinante em *E. coli*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINONZ, I. L. *et al.* Comparative study on hemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 7, n. 15, p. 15-19, 1995.

AINOUZ, I. L.; SAMPAIO, A. H. Screening of Brazilian marine algae for hemagglutinins. **Botanica Marina**, Berlin. v. 34, n. 3, p. 211-214, 1991.

ALGABASE. Listing the world's algae. Disponível em: <http://www.algabase.org/search/species/detail/>. Acesso em 16/11/2013.

ALVAREZ-HERNANDEZ, S. *et al.* Isolation and partial characterization of geraffine, a lectin from the Mexican endemic alga *Codium giraffa* Silva. **Botanica Marina**. v. 42, p. 573-580, 1999.

AMBROSIO, A. L. *et al.* Isolation of two novel mannan- and l-fucose-binding lectins from the green alga *Enteromorpha prolifera*: biochemical characterization of EPL-2. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 415, n. 2, p. 245–250, 2003.

APWEILER, R.; HERMJAKOB, H.; SHARON, N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. **Biochimistry Biophys Acta**. v. 1473, n. 1, p. 4-8, 1999.

ARNOLD, J. N. *et al.* The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. **Annual Review Immunology**. v. 25, p. 21–50, 2007.

AUDFRAY A. *et al.* Fucose-binding lectin from opportunistic pathogen *Burkholderia ambifaria* binds to both plant and human oligosaccharidic epitopes. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 287, p.4335–4347, 2002.

BAGYA, S. K.; RAJASHREE, P. V.; SAM, K. G. Preliminary anticancer screening and standardization of some indigenous medical plants using cell-biology and molecular biotechnology based models. **Research Journal of Medical Plants**. v. 5, n. 6, p. 728-737, 2011.

BALZARINI, J. Carbohydrate-binding agents: A potential future cornerstone for the chemotherapy of enveloped viruses?. **Antiviral Chemistry Chemotherapy**. v. 18, n. 1, p. 1-11, 2007.

BARRE, A. *et al.* Structure-function relationship of monocot mannose-binding lectins. **Pant Physiology**. v. 112, p. 1532-1540, 1996.

BARRIENTOS, L. G. *et al.* Cyanovirin-N binds to the viral surface glycoprotein, GP (1,2) and inhibits infectivity of Ebola virus. **Antiviral Research**. v. 58, n. 1, p. 47–56, 2003.

BENEVIDES, N. M. B. *et al.* Atividade hemaglutinante da alga vermelha *Solieria filiformis*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 8, n. 117-122, 1996.

- BENEVIDES, R. G. *et al.* A lectin from *Platypodium elegans* with unusual specificity and affinity for asymmetric complex N-glycans. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 287, n. 31, p. 26352-26364, 2012.
- BEVILACQUA, A. H. V.; SUFFREDINI, I. B.; BERNARDI, M. M. Neem *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) toxicity in *Artemia sp*: comparison of a commercial preparation and the pure oil. **Revista do Instituto de Ciência da Saúde**. v. 26, n. 2, p. 157-160, 2008.
- BEWLEY, C. A. *et al.* New carbohydrate specificity and HIV-1 fusion blocking activity of the cyanobacterial protein MVL: NMR, ITC and sedimentation equilibrium studies. **Journal of Molecular Biology**. v. 339, n. 4, p. 901–914, 2004.
- BITENCOURT, F. D. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. v. 377, n. 2, p. 139-148, 2008.
- BLIXT, O. *et al.* Printed covalent glycan array for ligand profiling of diverse glycan binding proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 101, p. 17033-17038, 2004.
- BLOMME, B. *et al.* Alteration of protein glycosylation in liver diseases. **Journal of Hepatology**. v. 50, p. 592–603, 2009.
- BOISTELLE, R.; ASTIER, J. P. Crystallization mechanisms in solution. **Journal of Crystal Growth**. v. 90, p. 14-30, 1988.
- BOKESCH, H. R. *et al.* A potent novel anti-HIV protein from the cultured cyanobacterium *Scytonema varium*. **Biochemistry**. v. 42, n. 9, p. 2578–2584, 2003.
- BOYD, M. R. *et al.* Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applications to microbicide development. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 41, n. 7, p. 1521–1530, 1997.
- BOYD, W. C.; ALMODÓVAR, L. R. Agglutinin in marine algae for human erythrocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 6, p. 82-83, 1966.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.
- BURATINI, S. V.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 73, p. 878, 2004.
- CALVETE, J. J. *et al.* The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 57, p. 343-350, 2000.
- CAMPO, V. L. *et al.* Carrageenans: biological properties, chemical modifications and structural analysis – a review. **Carbohydrate Polymers**. v. 77, n. 2, p. 167-180, 2009.
- CANTRELL, A. *et al.* Singlet oxygen quenching by dietary carotenoids in a model membrane environment. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 412, p. 47–54, 2003.

- CARBALLO, J. L. *et al.* A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology**. v. 2, p.17-21, 2002.
- CARDOZO, K. H. *et al.* Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**. v. 146, p. 60-78, 2007.
- CARNEIRO, R. F. *et al.* Halilectin 1 (H-1) and Halilectin 2 (H-2): Two new lectins isolated from the marine sponge *Haliclona caerulea*. **Journal of Molecular Recognition**. v. 26, n. 1, p. 51-58, 2013.
- CARTER, C. W. JR.; CARTER, C. W. Protein crystallization using incomplete factorial experiments. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 254, p. 12219-12223, 1979.
- CERONI, A.; DELL, A.; HASLAM, S. M. The GlycanBuilder: a fast, intuitive and flexible software tool for building and displaying glycan structures. **Source Code Biological Medical**. v. 2, n. 3, 2007.
- CHEN, Y.H. *et al.* Growth-inhibitory effects of the red alga *Gelidium amansii* on cultured cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 27, p. 180–184, 2004.
- CHU, C. Y.; HUANG, R.; LIN, L. P. Purification and characterization of a novel haemagglutinin from *Chlorella pyrenoidosa*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, Heidelberg**. v. 33, n. 11, p. 967-973, 2006.
- COSTA, *et al.* Purification and Partial Characterization of a lectin from the red marine alga *Amansia multifida*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**. v. 5, p. 53-63, 1999.
- DANGUY, A. *et al.* Galectins and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1572, n. 2/3, p. 285-293, 2002.
- DAY, J. G. *et al.* In vitro culture and conservation of microalgae: applications for aquaculture, biotechnology and environmental research. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. v. 35, p. 127-136, 1999.
- DENNIS, J. W.; GRANOVSKY, M.; WARREN, C. E. Protein glycosylation in development and disease. **BioEssay**. v. 21, p. 412–21, 1999.
- DOUBLIE, S. *Methods in enzymology*. v. 276, p.523-530, 1997.
- DRESCH, R. R. Purificação e caracterização das lectinas ACL-I e ACL-II da esponja marinha *Axinella corrugata*, imunolocalização da ACL-I e avaliação do seu potencial como marcador de transformação celular. Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas da faculdade de farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 222p, 2008.
- FOUQUAERT, *et al.* Related lectins from snowdrop and maize differ in their carbohydrate-binding specificity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 380, n. 2, p. 260-265, 2009.
- FRANCIS, D. M.; PAGE, R. Strategies to optimize protein expression in *E.coli*. **Current protocols in protein science**. Cap. 5, Unit. 5.24.1-29, 2010.

- FUKUDA Y., *et al.* The anti-tumor effect of *Euchema serra* agglutinin on colon cancer cells in vitro and in vivo. **Anticancer Drugs**. V. 17, p. 943-947, 2006.
- FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoids biology. **Science**. v. 294, p. 1871–1875, 2001.
- GAO, X. *et al.* Soluble cytoplasmic expression, rapid purification, and characterization of cyanovirin-N as a His-SUMO fusion. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 85, p. 1051-1060, 2010.
- GILL, I.; VALIVETY, R. Polyunsaturated fatty acids: Part 1. Occurrence, biological activities and application. **Trends in Biotechnology**. v. 15, p. 401–409, 2011.
- GIOMARELLI, B. *et al.* Recombinant production of anti-HIV protein, Griffithsin, by auto-induction in a fermentor culture. **Protein Expression Purification**. v. 47, n. 1, p. 194-202, 2006.
- GOLKS, A.; GUERINI, D. The *O*-linked *N*-acetylglucosamine modification in cellular signalling and the immune system. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. **EMBO Reproduction**. v. 9, n. 8, p. 748-53, 2008.
- GOUET, P. *et al.* ESPript: multiple sequence alignments in PostScript. **Bioinformatics**. v. 15, p. 305-308, 1999.
- GRASLUND, S. *et al.* Protein production and purification. **Nature Methods**. v. 5, n. 2, p. 135-46, 2008.
- GROSSMAN, A. Regeneration of a cell from protoplasm. **Journal of Phycology**. v. 42, p. 1–5, 2005.
- HAKOMORI, S. Glycosylation defining cancer malignancy: New wine in an old bottle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 16, p. 10232–10233, 2002.
- HALLEGRAEFF, G. M.; ANDERSON, D. M.; CEMBELLA, A. D. Harmful algal blooms. A global review. **Manual on harmful marine microalgae**. v. 33, p. 1–22, 2003.
- HAMPEL, A. *et al.* Single crystals of transfer RNA from formylmethionine and phenylalanine transfer RNA's. **Science**. v. 162, p.1384, 1968.
- HAN, J. W. *et al.* Purification and characterization of a D-mannose specific lectin from the green marine alga, *Bryopsis plumose*. **Phycological Research**. v. 58, p. 143-150, 2010.
- HAN, J. W. *et al.* Isolation and Characterization of a sex-specific lectin in a marine red alga, *Aglaothamnion oosumiense* Itono. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 78, n. 20, p. 7283-7289, 2012.
- HAN, J. W. *et al.* Purification and characterization of a lectin, BPL-3, from the marine green alga *Bryopsis plumose*. **Journal Applied of Phycology**. v. 23, p. 745-753, 2011.
- HELLE, F. *et al.* Cyanovirin-N inhibits hepatitis C virus entry by binding to envelope protein glycans. **Journal of Biological Chemistry**. v. 281, n. 35, p. 25177–25183, 2006.

HOEK, C. *et al.* ALGAE: An introduction to phycology. Cambridge University Press., United Kingdom. 627 p., 1998.

HOLANDA, M. L. *et al.* Differential activity of a lectin from *Solieria filiformis* against human pathogenic bacteria. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**. v. 38, n. 12, p. 1769-1773, 2005.

HORI, *et al.* Mitogenic and antineoplastic isoagglutinins from red alga *Solieria robusta*. **Phytochemistry**. v. 27, p. 2063-2067, 1988.

HORI, K.; MATSUBARA, K.; MIYASAWA, K. Primary structures of two hemagglutinins from marine red alga *Hypnea japonica*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1474, p. 226-236, 2000.

HORI, K.; MIYAZAWA, K.; ITO, K. Some common properties of lectins from marine algae. **Hydrobiologia**. v. 204–205, p. 561-566, 1990.

HORI, K. *et al.* Strict specificity for high-mannose type *N*-glycans and primary structure of a red alga *Euclima serra* lectin. v. 17, n. 5, p. 479-491, 2007.

ISHIHARA K.; ARAI S.; SHIMADA, S. cDNA cloning of a lectin-like gene preferentially expressed in freshwater from macroalga *Ulva limnetica* (Ulcales, Chlorophyta). **Phycological Research**. v. 57, p. 104-110, 2009.

JANCARIK, J.; KIM, S.-H. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. **Journal of Applied Crystallography**. v. 24, p. 409-411, 1991.

KAWAKUBO, A. *et al.* Occurrence of highly yielded lectins homologous within the genus *Euclima*. **Journal of Applied Phycology**. v. 11, p. 149–156, 1999.

KEHR, J. C. *et al.* A mannan binding lectin is involved in cell-cell attachment in a toxic strain of *Microcystis aeruginosa*. **Molecular Microbiology**. v. 59, n. 3, p. 893–906, 2006.

KILPATRICK, D. C. Handbook of animal lectins, properties and biomedical applications. Eddinburg: British library, 468 p., 2000.

KIM, G. H.; FRITZ, L. Gamete recognition during fertilization in the red alga, *Antithamnion nipponicum*. **Protoplasma**. v. 174, n. 1/2, p. 69-73, 1993.

KIM, G. H. *et al.* Purification and a characterization of a lectin, Bryohealin, involved in the protoplast formation of a marine green alga *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta). **Journal of Phycology**. v. 42, p. 86–95, 2005.

KIM, G. H.; LEE, I. K.; FRITZ, L. Cell-cell Recognition during fertilization in a red alga, *Antithamnion sparsum* (Ceramiaceae, Rhodophyta). **Plant and Cell Physiology**. v. 37, n. 5, p. 621-628, 1996.

KIM, S. H.; KIM, G. H. Cell-cell recognition during fertilization in the red alga, *Aglaothamnion oosumiense* (Ceramiaceae, Rhodophyta). **Hydrobiologia**. v. 399, p. 81-89, 1999.

- KOBAYASHI Y. A novel core fucose-specific lectin from the mushroom *Pholiota squarrosa*. **Glycobiology and Extracellular Matrices**. v. 287, p. 33973-33982, 2012.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680–685, 1970.
- LEITE, Y. F., *et al.* Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**. v. 1724, n. 1/2, p. 137-145, 2005.
- LI, Y. *et al.* Cloning, Expression and Purification of *Microcystis viridis* Lectin in *Escherichia coli*. **Molecular Biotechnology**. v. 47, p. 105–110, 2011.
- LIANG, C.H; WU, C. Y. Glycan array: a powerful tool for glycomics studies. **Expert Review Proteomics**. v. 6, n. 6, p. 631-45, 2009.
- LIMA, H. C. *et al.*, Induction and inhibition of human lymphocyte transformation by the lectin from red marine alga *Amansia multifida*. **Journal of Applied Phycology**. v. 10, p. 153-162, 1998.
- LIMA, M. E. P. *et al.* Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria cornea* and its effects on the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, n. 16, p. 6414-6419, 2005.
- LIMA, R. F. *et al.* Red marine alga *Bryothamnion triquetrum* lectin induces endothelium-dependent relaxation of the rat aorta via release of nitric oxide. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 56, n. 11, p. 1415-1421, 2004.
- LOWE, J. B.; MARTH, J. D. A genetic approach to Mammalian glycan function. **Annual Review Biochemistry**. v. 72, p. 643–691, 2003.
- LUO, S.; ZHANGSUN, D.; TANG, K. Functional GNA expressed in *Escherichia coli* with high efficiency and its effect on *Ceratovacuna lanigera* Zehntner. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 69, p. 184–191, 2005.
- LUTHER, K. B.; HALTIWANGER, R. S. Role of unusual *O*-glycans in intercellular signaling. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 41, n. 5, p. 1011-24, 2008.
- MASSI, M. N.; AHMAD, A. Cloning and in vitro anti-mycobacterial activity of lectin protein in combination with streptomycin to increase sensitivity against *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal of Biotechnology and Biochemistry**. v. 8, n. 2, p. 101-111, 2012.
- MATSUBARA, K.; SUMI, H.; HORI, K. Platelet aggregation is inhibited by phycolectins. **Experientia**. v. 52, n. 6, p. 540-543, 1996.
- MATSUMURA, K. *et al.* Carbohydrate Binding Specificity of a Fucose-specific Lectin from *Aspergillus oryzae*: A Novel Probe for Fucose. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 282, p. 15700-15708, 2007.

- MAYER, A. M. S.; HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2000: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous system and other miscellaneous mechanisms of action. **Marine Biotechnology**. v. 6, p. 37–52, 2004.
- MEDINA-RAMIREZ, G.; GIBBS, R.V.; CALVETE, J.J. Micro-heterogeneity and molecular assembly of the haemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *B. triquetrum* from the Caribbean Sea. **European Journal of Phycology**. v. 42, n. 1, p.105-112, 2007.
- MELO, V. M. M. *et al.* Antifungal properties of proteins (agglutinins) from the red alga *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux. **Botanica Marina**. v. 40, n. 4, p. 281-284, 1997.
- MITCHELL S. W. Researchs upon the venom of the Rattlesnake. Smithsonian Institute. Philadelphia, USA. Monography. p. 145, 1860.
- MIYOSHI, E.; MIROWAKI, K.; NAKAGAWA, T. Biological Function of Fucosilation in Cancer Biology. **The Journal of Biochemistry**. v. 143, p 725-729, 2008.
- MOLCHANOVA, V., *et al.* Purification and partial characterization of the lectin from the marine alga *Tichocarpus crinitus* (Gmelin) Rupr. (Rhodophyta). **Botanica Mar.** v. 53, p. 69–78, 2010.
- MOLINARI, M. N-glycan structure dictates extension of protein folding or onset of disposal. **Natural Chemical Biology**. v. 3, n. 6, p. 313-20, 2008.
- MOREIRA, R. A.; PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**. v. 59, p. 783-787, 1977.
- MORI, T. *et al.* Isolation and characterization of griffithsin, a novel HIV-inactivating protein, from the red alga *Griffithsia sp.* **Journal Biology et Chemical**. v. 280, n. 10, p. 935-9353, 2005.
- MOURA, R. M. *et al.* CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenics bacteria and Leshimanis promastigotes. **Comparative biochemistry and physiology**. Part A, v. 145, p. 517-523, 2006.
- MUKHOPADHYAY, B. *et al.* Bacterial detection using carbohydrate-functionalised CdS quantum dots: a model study exploiting *E. coli* recognition of mannosides. **Tetrahedron Letters**. v. 50, p. 886–9, 2009.
- NAGANO C. S. *et al.*, HCA and HML isolated from the red marine algae *Hypnea cervicornis* and *Hypnea musciformis* define a novel lectin family. **Protein Science**. v. 14, n. 8, p.2167-2176, 2005b.
- NAGANO C.S. *et al.* Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of HML, a lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization**. v. 61, p. 997-999, 2005a.
- NAGANO, C. S. *et al.* Purification and characterization of a new lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*. **Protein and Peptides Letters**. v. 9, n. 2, p. 159-166, 2002.

- NASCIMENTO, K. S. *et al.* Isolation and characterization of a new agglutinin from the red marine alga *Hypnea cervicornis* J. Agardh. **Biochemistry and cell biology**. v. 84, n. 1, p. 49-54, 2006.
- NASCIMENTO-NETO, L. G. *et al.*, Characterization of isoforms of the lectin isolated from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and its pro-healing effect. **Marine Drugs**. v. 10, p. 1936-1954, 2012.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Principles of Biochemistry, Fifth Edition (Freeman Publishers), New York, 2009.
- NEVES, S. A. *et al.* Antinociceptive properties in mice of a lectin isolated from the marine alga *Amansia multifida* Lamouroux. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 40, n. 1, p. 127-134, 2007.
- NEVES, S. A. *et al.* Neutrophil migration induced *in vivo* and *in vitro* by marine algal lectins. **Inflammation Research**. v. 50, n. 10, p. 486-490, 2001.
- NILSSON, I. M., VON HEIJNE, G. Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. **Journal Biological Chemistry**. v. 268, p. 5798–5801, 1993.
- NIU, J. *et al.* Characterization of a new lectin involved in the protoplast regeneration of *Bryopsis hypnoides*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**. v. 27, n. 3, p. 502-512, 2009.
- NUNES, B. S. *et al.* Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution**. v. 144, n. 2, p. 453-462, 2006.
- O'KEEFE, B. R. *et al.* Potent anti-influenza activity of cyanovirin-N and interactions with viral hemagglutinin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.47, n. 8, p. 2518–2525, 2003.
- OKUYAMA *et al.* Strict Binding of small-sized Lectins from the Red Alga *Hypnea japonica* for Core (α 1-6) Fucosylated N-Glycans. **Bioscience, Biotechnology, Biochemistry**. v. 73, n. 3, p. 912-920, 2009.
- OLIVEIRA, S. C. B. *et al.* Modulation of the pharmacological effects of enzymatically-active PLA2 by BTL-2, an isolectin isolated from the *Bryothamnion triquetrum* red alga. **BMC Biochemistry**. v. 9, p. 1-12, 2008.
- OLIVEIRA, S. R. M. *et al.* Purification and characterization of a lectin from the red marine alga *Pterocladia capillacea* (S. G. Gmel.) Santel. & Hommers. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 25, n. 4, p. 397 – 403, 2002.
- PAJIC, I. *et al.* A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. **Comparative biochemistry and physiology**. v. 132, p. 213-221, 2002.
- PEUMANS, W. J; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**. v. 109, p. 347–352, 1995.

PIMENTEL, M. F. *et al.* Ecotoxicological analysis of cashew nut industry effluents, specifically two of its major phenolic components, cardol and cardanol PANAMJAS. **Pan-American Journal of Aquatic sciences**. v. 4, n. 3, p. 363-368, 2009.

PINTO, V. P. T. *et al.* Lectins from the Red Marine Algal Species *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum* as Tools to Differentiate Human Colon Carcinoma. **Cells Advances in Pharmacological Sciences**. v. 2009, p.1-6, 2009.

POCHEC, E. *et al.* Glycosylation profile of integrin $\alpha 3\beta 1$ changes with melanoma progression. **Biochemistry Biophys Acta**. v. 1643, p. 113–123, 2003.

POTIN, P. *Et al.* Oligosaccharide recognition signals and defence reactions in marine plant–microbe interactions. **Current Opinion in Microbiology**. v. 2, p. 276–283, 1999.

PRASEPTIANGGA, D.; HIRAYAMA, M.; HORI, K. Purification and characterization and c-DNA cloning of a novel lectin from the green alga *Codium barbatum*. **Bioscience, Biotechnology, Biochemistry**. v. 76, n. 4, p. 805-811, 2012.

RAVEN P. H.; EVERT R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7th ed. Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 2007.

RUDIGER, H.; GABIUS, H. J. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and application. **Glycoconjugate**. v. 18, p. 589-613, 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.

SANTOS, A. F. *et al.*, The lethality of *Euphorbia conspicua* to adults of *Biomphalaria glabrata*, cercaria of *Schistosoma mansoni* and larvae of *Artemia salina*. **Bioresource Technology**. v. 98, p.135–139, 2007.

SATO, T.; HORI, K. Cloning, expression and characterization of a novel anti-HIV lectin from the cultured cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii*. **Fish Science**. v. 75, p. 743–753, 2009.

SATO, Y. *et al.* Purification and characterization of a novel lectin from a fresh water cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. v. 125, p. 169-177, 2000.

SATO, Y. *et al.*, High Mannose-binding Lectin with Preference for the Cluster of $\alpha 1$ -2-Mannose from the Green Alga *Boodlea coacta* Is a Potent Entry Inhibitor of HIV-1 and Influenza Viruses. **The journal of Biological Chemistry**. v. 286, n. 22, 19446-19458, 2011.

SCHMALTZ, R. M.; HANSON, S. R.; WONG, C. Enzyme in the Synthesis of Glycoconjugates. **Chemistry Review**. v. 111, p. 4259-4307, 2011.

SCHMID, C. E. Cell-cell recognition during fertilization in *Ectocarpus siliculosus* (phaeophyceae). **Hidrobiologia**. v. 261, p. 437-443, 1993.

SHIELDS, R. L. *et al.* Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc γ RIII and antibody-dependent cellular toxicity. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, p. 26733–26740, 2002.

SILVA, F. R. F. *et al.* Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: action of major types of commercial carrageenans. **Carbohydrate Polymers**. v. 79, n. 1, p. 29-33, 2010a.

SILVA, L. M. C. M. *et al.* Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of Lectin from Marine Red Alga *Pterocladia capillacea*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**. v. 33, n. 5, p. 830 – 835, 2010b.

SILVA, S. R. Caracterização da lectina da alga marinha vermelha *Amansia multifida* J. V. Lamouroux por espectrometria de massas. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca)- Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010c.

SILVA, S. R. Purificação e Caracterização de duas lectinas (CiL-1 e Cil-2) da alga marinha verde *Codium isthmocladum* Virckers. Dissertação (Engenharia de Pesca)- Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

SINGH, R. S.; THAKUR, S. R.; BANSAL, P. Algal lectins as promising biomolecules for biomedical research. **Critical Reviews in Microbiology**. p. 1-12 (online), 2013.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**. v. 115, p. 113–128, 2005.

SOWDER, R. C. *et al.* Isolation and characterization of griffithsin, a novel HIV-inactivating protein, from the red alga *Griffithsia sp.* **Journal of Biological Chemistry**. v. 280, p. 9345–9353, 2005.

STANCOMBE, P. R. *et al.* Isolation of the gene and large-scale expression and purification of recombinant *Erythrina cristagalli* lectin. **Protein Expression and Purification**. v. 30, p. 283–292, 2003.

STEEN, P. V. *et al.* Concepts and Principles of O-Linked Glycosylation. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**. v. 33, n. 3, p. 151-208, 1998.

STILLMARK, H. Über ricin, ein giftiges ferment aus samen von *Ricinus communis* L., und einigen anderen euphobiaceen. PhD Thesis, University of Dorpat, Dorpat (Tartu), 1888.

STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Express Purification**. v. 41, p. 207-234, 2005.

SUDAKEVITZ, D.; IMBERTYU A.; GILBOA-GARBER, N. J. **Biochemistry**. v. 132, p. 353-358, 2002.

SUGAHARA, T. *et al.* The cytotoxic effect of *Eucheuma serra* agglutinin (ESA) on cancer cells and its application to molecular probe for drug delivery system using lipid vesicles. **Cytotechnology**. v. 36, p. 93–99, 2001.

SULAK, O. *et al.* A TNF-like trimeric lectin domain from *Burkholderia cenocepacia* with specificity for fucosylated human histo-blood group antigens. **Structure**. v. 18, n. 1, p. 59-72, 2010.

TAKAMINE, A.; KATO, N.; HORI, K. Oral administration of a red alga *Eucheuma serra* lectin remarkably suppresses the formation of colon aberrant crypt foci in mice received 1,2

dimethylhydrazine. In: Abstract of Paper Presented. 20th International Lectin Meeting. Copenhagen, Denmark. 146, 2002.

TAKEBE, Y. *et al.* Antiviral Lectins From Red and Blue-Green Algae Show Potent In Vitro and In Vivo Activity against Hepatitis C Virus. v. 8, n. 8, p. 1-10, 2013.

TATENO, H.; NAKAMURA-TSURUTA, S.; HIRABAYASHI, J. Comparative Analysis of core-fucose-binding lectins from *Lens culinaris* and *Pisum sativum* using Frontal Affinity Chromatography. **Glycobiology**. v. 19, p. 527-536, 2009.

TAYLOR, M.; DRICKAMER, K. Introduction to Glycobiology. Oxford University Press, 2003.

TECHNICAL SUPPORT BULLETIN. NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers. 2007.

TEIXEIRA, E. H. *et al.* Biological Applications of Plants and Algae Lectins: An Overview, Carbohydrates-Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology, Prof. Chuan-Fa Chang (Ed.), ISBN: 978-953-51-0864-1, InTech, DOI: 10.5772/50632, 2012.

TEIXEIRA, E. H. *et al.* In vitro inhibition of oral streptococci binding to enamel acquired pellicle by algae Lectins. **Journal of Applied Microbiology**. v. 103, p.1001-1006, 2007.

User Manual EasySelect™ Pichia Expression Kit For Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZα in *Pichia pastoris*. Cat. no. K1740-01, Rev. Date 18 June 2010 Manual n. 25-0172.

VANDERLEI, E. S. O. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. **International Immunopharmacology**. v. 10, n. 9, p.1113-1118, 2010.

VARKI, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. **Glycobiology**. v. 3, p. 97-130, 1993.

VARKI, A. *et al.* Essentials of Glycobiology, 2nd edition. Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California, 2009.

VASTA, G.; AHMED, H.; Animal lectins: A functional View. New York: CRC Press. 596 p. 2009.

VIANA, G. S. B. *et al.* Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red algae *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kütz. and *B. triquetrum* (S.G. Gmel.) M. Howe. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**. v. 35, n. 6, p. 713-722, 2002.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. **Química Nova**. v. 27, n. 1 p. 139-145, 2004.

VIEIRA, L. A. P. *et al.* The alga *Bryothamnion seaforthii* contains carbohydrates with antinociceptive activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 37, n. 7, p. 1071- 1079, 2004.

- VILLAVERDE, A.; CORRIÓ, M. M. Protein Aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. **Biotechnology Letters**. v. 25, p. 1385-1395, 2003.
- WISEUX, N. *et al.* Qualitative and quantitative analysis of the glycosylation pattern of recombinant proteins. **Analytic Chemistry**. v. 73, p. 4755–4762, 2001.
- WANG, S. *et al.* Molecular characterization of a new lectin from the marine alga *Ulva pertusa*. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**. v. 36, n. 2, p. 111-117, 2004.
- WHITEHEAD, K.; HEDGES, J. I. Photodegradation and photosensitization of mycosporine-like amino acids. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 80, p. 115–121, 2005.
- WIEDERSCHAIN, G. Y. Glycobiology: Progress, Problems, and Perspectives. **Biochemistry**. v. 78, n.7, p. 877-900, 2013.
- WIJESEKARA, A. *et al.* Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers**. v. 84, p.14–21, 2011.
- WIMMEROVA, M. Six-bladed β -propeller fold and novel fucose recognition mode for *Aleuria aurantia* lectin. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 278, p. 27059-27067, 2003.
- WOOD-CHARLSON, E. M. *et al.* Lectin/glycan interactions play a role in recognition in a coral/dinoflagellate symbiosis. **Cellular Microbiology**. v. 8, n. 12, p 1985-1993, 2006.
- WOPEREIS, S. *et al.* Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: a review. **Clinical Chemistry**. v. 52, n. 4, p. 574-600, 2006.
- XIONG, C. *et al.* Overexpression and purification of scytovirin, a potent, novel anti-HIV protein from the cultured cyanobacterium *Scytonema varium*. **Protein Expression and Purification**. v. 46, p. 233–239, 2006.
- YAMAGUCHI, M. *et al.* Isolation and characterization of a mannan-binding lectin from the freshwater cyanobacterium (blue-green algae) *Microcystis viridis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 265, n. 3, p. 703-708, 1999.
- YAMAGUCHI, M. *et al.* Purification and characterization of *Microcystis aeruginosa* (freshwater cyanobacterium) lectin. **Comparative Biochemistry and Physiology b-Biochemistry & Molecular Biology**. v. 119, n. 3, p. 593-597, 1998.
- YOON, K. S. *et al.* Molecular Characterization of the Lectin, bryohealin, involved in protoplast regeneration of the Marine alga *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta). **Journal of Phycology**. v. 44, p. 103-112, 2008.
- ZACHARA, N. E.; HART, G. W. The emerging significance of O-GlcNAc in cellular regulation. **Chemistry Review**. v. 102, p. 431–438, 2002.
- ZENG, D. *et al.* *In vitro* antitumor activity of silybin nanosuspension in PC-3 cells. **Cancer Letters**. v. 307, p. 158-164, 2011.

ZIÓŁKOWSKA, N. E. *et al*, Domain-swapped structure of the potent antiviral protein griffithsin and its mode of carbohydrate binding. **Structure**. v.7, p.1127–1135, 2006.

ZIÓŁKOWSKA, N. E. *et al*. Crystallographic studies of the complexes of antiviral protein griffithsin with glucose and N-acetylglucosamine. **Protein structure report**. v. 16, p.1485-1489, 2007.

ZIÓŁKOWSKA, N. E.; WLODAWER, A. Structural studies of algal lectins with anti-HIV activity. **Acta Biochimica Polonica**. v. 53, n. 4, p. 617–626, 2006.

<<http://www.algaebase.org/search/species/detail/>> acesso em: 06/01/2014.

<<http://www.functionalglycomics.org/>> acesso em 06/01/14.

<<http://lectin3d.cermav.cnrs.fr/search.php>> acesso em 06/01/14.

<<http://www.algaebase.org/search/species/detail/>> acesso em 06/01/2014.

ANEXO:
RESUMO DO TRABALHO DE TESE
EM LÍNGUA FRANCESA

ANTÔNIA SÂMIA FERNANDES DO NASCIMENTO

**Lectines recombinantes d'algues rouges marines *Hypnea musciformis*
(Wulfen) J. V. Lamouroux et *Bryothamnion triquetrum* (S. G. Gmelin) M.
Howe: production hétérologue et caractérisation biochimique**

(Résumé du travail de thèse en langue française)

Thèse en cotutelle préparée
au Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales (CERMAV)
– Équipe de Glycobiologie Moléculaire
et à l'Université Fédérale du Ceará (UFC)
– Équipe de Molécules Biologiquement Actives (BioMol-Lab)

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une bourse en cotutelle entre l'université Fédérale du Ceará de Fortaleza et l'université Joseph Fourier de Grenoble.

Mes vifs remerciements au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique Brésilien pour la bourse qui a rendu possible la réalisation de cette thèse.

J'adresse ensuite toute ma reconnaissance aux Dr. Paula Videira et Dr. Cintia Renata Costa Rocha pour avoir accepté de juger ce travail de thèse et de participer à ce jury.

J'adresse tout particulièrement mes remerciements et ma reconnaissance à mon directeur de thèse au Brésil: le professeur Benildo Sousa Cavada, pour son aide, ses conseils, son soutien et sa disponibilité.

Un grand merci à mes directrices de thèse en France Dr. Annabelle Varrot et Dr. Anne Imberty, qui ont su me faire profiter chacune à leur façon de leurs nombreuses compétences et de leur disponibilité et ce malgré leurs emplois du temps surchargés.

Je remercie également tous les professeurs responsables des cours de Biochimie de l'UFC, pour leurs leçons précieuses au cours de mon doctorat, en particulier les professeurs biomolenses, Alexandre Holanda, Bruno Matias, Celso Nagano et EdsonTeixeira. Et d'une manière très spéciale, à ma maîtresse bien-aimée, conseillère et amie Mme Kyrie, merci de tout mon coeur pour l'encouragement et le soutien.

Ma reconnaissance va également à toute l'équipe du BioMol-Lab: Quelzinha, Julinha, Ito, Alysson, Rafael, Helton (Truta), Júnior, Suzete, Mayron, Cíntia, Claudener, Rômulo (Mah), Guilherme, Fernando, Mayara Torquato, Mayara Queiroz, Vanir, Vinícius, Cláudia, Davi, Clareane, Alfa, Batista, Jorge, Clareane, Nágila, Thaty, Cleane, Ivanice, Gleiciane, Hilde, Winnie, Mayami e Alexandra. En particulier, mes collègues de laboratoire Aninha, Bruninho, Luciana (gata da galáxia), Renatinha, Rondy, Carolzinha et Larissa, indispensable dans ce travail, merci pour le soutien, les encouragements et l'humour de tous les jours.

Je remercie également toute l'équipe de Glycobiologie Moléculaire: Christelle, Géraldine, Olivier, Émilie, Valou, Soorej, Doerte, Aymeric, Félix, Aline, Joana et Julie pour

leurs conseils constructifs et pour leur disponibilité à chaque fois que j'ai eu à solliciter leurs compétences.

Un grand merci aux belles amitiés que j'ai développées au cours de mon séjour en France: Ilham, Tamiris, Djamila, Guillaume, Yasmina et Anna vous avez «ensoleillé» mon séjour à Grenoble, merci infiniment pour votre amitié!

A mes chers amis de toujours Bébé, Melzinha, Manélica, Camilinha, Eugênio, Liana, Paiva, Míriam, Caio, Antônio Maria e Samara, pour les bons moments qu'on a partagé ensemble, merci pour tout du bien que vous ajoutez dans ma vie.

Je remercie ma famille aimée, ma maman, mes sœurs et mes frères, vous m'avez donné tout le soutien, la compréhension et la patience durant cette phase. Merci d'avoir toujours été là pour moi!

A mon chéri Philippe Bourassa pour rendre ma vie plus douce.

Pour toutes les personnes qui ont contribué d'une certaine manière ou d'une autre à cet travail, je fais de ma conquête une forme de gratitude et de reconnaissance pour tout ce que j'ai reçu de vous.....Merci!

PRÉSENTATION DU TRAVAIL DE THÈSE

Les sujets abordés dans cette thèse se situent dans le domaine de la glycobiologie et de la biologie moléculaire. Ce travail a été développé en cotutelle entre deux différents groupes de recherche, le Biomol-Lab (UFC, Brésil), dirigé par le Prof. Benildo Cavada et l'équipe Glycobiologie moléculaire (CERMAV, CNRS, France) dirigée par le Dr. Anne Imberty, sous la co-direction du Dr. Annabelle Varrot.

Cette thèse peut être divisée en cinq parties. Le premier chapitre est une introduction aux questions abordées dans ce travail et à l'objet de notre étude: les lectines de macroalgues. Dans le second chapitre sont présentés les objectifs de cette thèse. Dans le troisième chapitre, une attention particulière a été portée aux méthodes expérimentales utilisées, notamment celles de biologie moléculaire: le clonage et la production des lectines des algues rouges marines *Hypnea musciformis* et *Bryothamnion triquetrum* (HML et de BTL) sous forme recombinante, la caractérisation de leur spécificité sur puces à sucres et les méthodes utilisées pour la caractérisation physico-chimique des protéines. Le quatrième chapitre est dédié aux principaux résultats et à leur discussion. Des conclusions et perspectives sont présentées dans le cinquième chapitre et ferment la présentation de ces travaux de thèse. Finalement, les autres sujets abordés et développés au cours de ces quatre années de doctorat seront présentés très brièvement.

Cette thèse a été rédigée en portugais, mais comprend un annexe: le résumé du travail de thèse en français. Dans cette version, la partie rédigée en français est présentée en premier lieu et est suivie par la version portugaise.

SOMMAIRE

CHAPITRE I: FONDEMENTS THÉORIQUES -----	32
1. GLYCOBIOLOGIE-----	32
1.1 Généralités sur la glycobioologie et la glycosylation-----	32
1.2 Types de glycosylation-----	33
2. LES ALGUES -----	36
2.1 Les algues marines-----	36
3. LES LECTINES-----	37
3.1 Généralités sur les lectines-----	37
3.2 Lectines des macroalgues-----	38
3.3 Aspects structurels des lectines de macroalgues-----	39
3.4 Études de la spécificité des lectines d'algues-----	42
3.5 Applications biotechnologiques des lectines d'algues-----	44
3.6 Les lectines recombinantes d'algues-----	45
3.7 Les algues rouges marines <i>Hypnea musciformis</i> et <i>Bryothamnion triquetrum</i> -----	47
CHAPITRE II: OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE -----	50
1. OBJECTIFS-----	52
1.1 Objectif général-----	52
1.2 Objectifs spécifiques-----	52
CHAPITRE III: MATÉRIEL ET MÉTHODES -----	54
1. MATÉRIEL BIOLOGIQUE-----	56
1.1 Extraction et purification des lectines natives de <i>Hypnea musciformis</i> (HML) et de <i>Bryothamnion triquetrum</i> (BTL)-----	56
2. PRODUCTION DES LECTINES rHML et rBTL DANS <i>E. coli</i> -----	57
2.1 Clonage et expression de rHML et de rBTL-----	57
2.2 Purification de rHML et de rBTL-----	58
3. CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DES PROTÉINES rHML et rBTL-----	59
3.1 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS-----	59
3.2 Transfert des protéines et immunodétection (<i>Western Blot</i>)-----	59
3.3 DLS: Diffusion dynamique de la lumière-----	60
3.4 TSA: Test de décalage thermique-----	60
4. OUTILS POUR L'ÉTUDE DES INTERACTIONS PROTÉINE-SUCRE-----	61

4.1 Tests d'héماغglutination de rHML et de rBTL-----	61
4.2 Analyse de la spécificité des protéines sur puce à sucres (<i>Glycan Array</i>)-----	61
4.3 Analyse de l'interaction de BTL avec un octasaccharide fucosylé par STD-RMN---	62
5. ESSAIS DE TOXICITÉ -----	63
5.1 Létalité contra <i>Artemia sp.</i> -----	63
5.2 Culture cellulaire et essais colorimétriques MTT-----	63
6. ÉTUDE STRUCTURALE DE rHML ET DE rBTL-----	64
6.1 Cristallisation de rHML et de rBTL-----	64
CHAPITRE IV: RÉSULTATS ET DISCUSSION -----	66
1. EXTRACTION ET PURIFICATION DES LECTINES SAUVAGES HML ET BTL	68
2. CLONAGE, EXPRESSION ET PURIFICATION DE rHML ET DE rBTL -----	69
3. CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE-----	75
4. OUTILS POUR L'ÉTUDE DES INTERACTIONS PROTÉINE-SUCRE -----	75
4.1 Tests d'héماغglutination de rHML et rBTL-----	75
4.2 Analyse de la spécificité des protéines par puce à sucres (<i>Glycan Array</i>)-----	77
4.3 Analyse de l'interaction de BTL avec un octasaccharide fucosylé par STD-RMN---	82
5. ESSAIS DE TOXICITÉ -----	83
5.1 Létalité contre le microcrustacé <i>Artemia sp.</i> -----	83
5.2 Culture cellulaire et essais colorimétriques MTT-----	84
6. ÉTUDE STRUCTURALE DE rHML ET DE rBTL-----	85
6.1 Processus de cristallisation-----	85
CHAPITRE V: CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES -----	88
POINT SUR LES AUTRES TRAVAUX DÉVELOPPÉ PENDANT LE	92
DOCTORAT-	
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUE -----	94

LISTE DES PRINCIPALES ABRÉVIATIONS

A.H	Activité hémagglutinante
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AFP-L3	Alpha-fétoprotéine fucosylée
BCA	Lectine de <i>Buddlea coacta</i>
BSA	Sérum albumine bovine
BSL	Lectine de <i>Bryothamnion seaforthii</i>
BTL	Lectine de de <i>Bryothamnion triquetrum</i>
CFG	<i>Consortium for Functional Glycomics</i>
CV-N	Lectine cyanovirine
D.O_{600nm}	Densité optique à 600 nm
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	Diméthylformamide
DSL	Diffusion dynamique de la lumière
DTT	Dithiotréitol
ESA	Lectine d' <i>Eucheuma serra</i>
ESRF	<i>European Synchrotron Radiation Facility</i>
GalNAc	<i>N</i> -acétylgalactosamine
GlcNAc	<i>N</i> -acétylglucosamine
GRFT	Lectine de <i>Grifthisin sp.</i>
HCA	Lectine de <i>Hypnea cervicornis</i>
HJAs	Hypnines, lectines de <i>Hypnea japonica</i>
HML	Lectine de <i>Hypnea musciformis</i>
IPTG	Isopropyl- β -D thiogalactoside
MAD	<i>Multiwavelength anomalous diffraction</i>
Man	Mannose
MTT	(3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
OAA	Lectina d' <i>Oscillatoria agardi</i>
PBS	Tampon phosphate salin
PDB	<i>Protein data bank</i>
PTG	Tyroglobuline de porc
rBTL	Lectine recombinante de <i>Bryothamnion triquetrum</i>
rHML	Lectine recombinante de <i>Hypnea musciformis</i>
SAD	<i>Single-wavelength Anomalous Diffraction</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SVF	Sérum de veau foetal
TEV	Protéase du virus <i>Tobacco Ech</i>
TFP	Tetrafluoro-phenyl ester
Tm	Température de dénaturation
TSA	Test de décalage thermique
U.H	Unité d'hémagglutination
VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

RÉSUMÉ

Les gènes synthétiques des lectines des algues marines rouges *Hypnea musciformis* (HML) et *Bryothamnion triquetrum* (BTL) ont été clonés dans différents vecteurs et transformés dans plusieurs souches bactériennes d'expression. Les lectines recombinantes ont été obtenues dans la fraction soluble de cultures bactérienne dans les souches d'*Escherichia coli* RosettaGami 2 (DE3) pour rHML et BL21 (DE3) pour rBTL. Les tests d'hémagglutination ont montré que rHML et rBTL sont capables d'agglutiner les érythrocytes de lapin avec un bon pouvoir hémagglutinant mais seulement après traitement à la trypsine et la papaine indiquant que leur ligands ne sont pas directement accessibles à la surface des hématies. Les propriétés hémagglutinantes de rHML et de rBTL confirment le repliement correct et l'état fonctionnel des protéines. La caractérisation de leur spécificité sur puces à sucres a montré une spécificité stricte de HML, BTL et rBTL pour les oligosaccharides complexes comportant la fucosylation (α 1-6) du noyau, avec une préférence particulière pour les *N*-glycanes non bisectés, bi- et tri-antennés de chaîne courte. La présence d'acide sialique à l'extrémité non réductrice du glycane favorise la reconnaissance de ces glycanes. C'est la première caractérisation des lectines d'algues rouges par puce à sucres. Des expériences de STD-RMN menées sur BTL, ont montré son interaction avec un octasaccharide au niveau de noyau fucosylé (α 1-6). L'activité toxique des lectines sauvages et recombinantes a été évaluée contre *Artemia sp.* et contre des cellules d'adénocarcinome du poumon (A549). Dans les essais de cytotoxicité, HML, rHML, BTL et rBTL n'ont montré aucune toxicité contre *Artemia sp.* et seulement HML et rHML ont montré une cytotoxicité faibles contre les cellules d'adénocarcinome du poumon (A549). Le premier cristal de rBTL a été obtenu à l'aide d'un robot de cristallisation et diffractait à 15 Å.

Mots-clés: Lectines recombinants; Algues rouges; *N*-glycanes fucosylés.

ABSTRACT

Synthetic genes from the red marine algae *Hypnea musciformis* (HML) and *Bryothamnion triquetrum* (rBTL) were cloned into different vectors and transformed into several bacterial expression strains. The recombinant lectins were obtained from the soluble fraction of bacterial cultures using *Escherichia coli* RosettaGami 2 (DE3) strain for rHML and *E. coli* BL21 (DE3) strain for rBTL. Haemagglutination tests showed that rHML and rBTL are able to agglutinate rabbit erythrocytes with strong haemagglutination activity only after treatment with papain and trypsin indicating that their ligands are not directly accessible at the cell surface. The haemagglutinating properties of rHML and rBTL confirm the correct folding and functional state of the proteins. A study of the specificity of these lectins by glycan array was conducted. HML, BTL and rBTL showed a restricted specificity for complex *N*-glycans with core (α 1-6) fucose. A more detailed analysis of the specificity of these lectins showed a preference for non bisecting *N*-glycans, bi- and tri-antennary branching sugars with short chains. Addition of Sialic acid at the non-reducing end of *N*-glycans favors their recognition by the lectins. This is the first characterization of lectins from red algae by glycan array. An interaction between BTL and a core (α 1-6) fucosylated octasaccharides was also observed by STD-NMR. The toxic activity of wild and recombinant lectins were evaluated against *Artemia sp.* and the human lung adenocarcinoma cell line (A549). In cytotoxicity assays, HML, rHML, BTL and rBTL showed no toxicity against *Artemia sp.* Only HML and rHML showed a low cytotoxic activity against cell line (A549). The first crystal of rBTL was obtained in micro-scale level using a robot and diffracted at 15 Å.

Keywords: Recombinant lectin; Red algae; Fucosylated *N*-glycan.

**CHAPITRE I:
FONDEMENTS THÉORIQUES**

1. GLYCOBIOLOGIE

1.1 Généralités sur la glycobiologie et la glycosylation

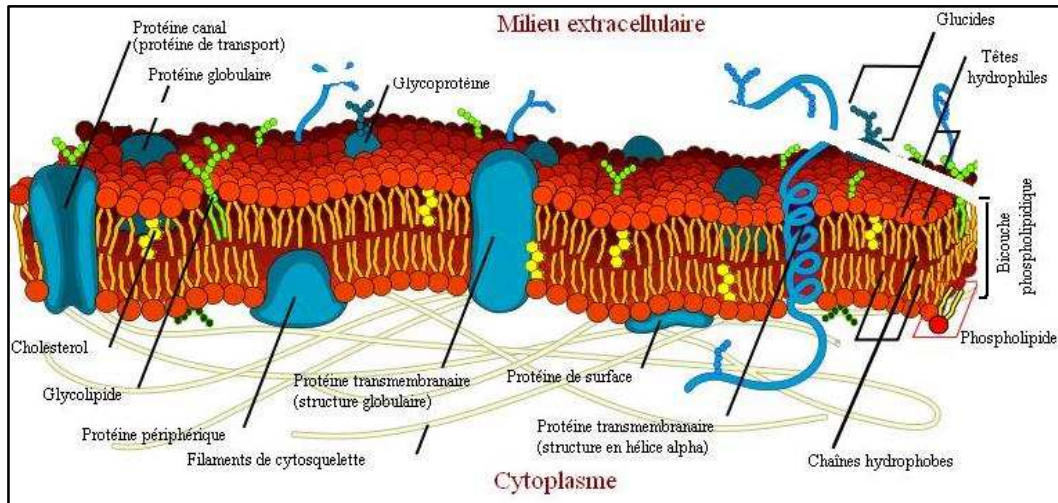
Le terme glycobiologie a été inventé en 1988 pour décrire une nouvelle branche de la biologie moléculaire impliquée dans l'étude de la structure, de la biosynthèse, du métabolisme et des fonctions biologiques des carbohydrates, ainsi que toutes les autres classes de biomolécules (protéines, lipides, et nucléotides) avec lesquelles ils interagissent. Suite à la découverte que les carbohydrates sont essentiels à de nombreux processus biologiques, il était d'importance fondamentale qu'ils commencent à ne plus être traités comme de simples molécules de structure et de stockage mais comme d'importantes molécules de reconnaissance et de signalisation (TAYLOR; DRICKAMER, 2003).

Les carbohydrates, aussi appelés glycanes ou sucres ou glucides sont des molécules très diverses. Il existe une centaine de monosaccharides identifiés à ce jour. Ils s'associent selon différents type de liaison pour former un large spectre d'oligosaccharides ou polysaccharides. Ils peuvent aussi s'associer à des lipides ou des protéines pour former les glycoconjugués. Ces derniers couvrent la surface des cellules et forment le glycocalix qui confèrent une identité moléculaire unique à chaque type cellulaire, tissu ou organe. Le glycocalix est impliqué dans la cohésion des cellules, dans leur protection contre les chocs et contre l'attaque par des microorganismes (VARKI, 1993; DENNIS *et al.*, 1999) (Figure I.1).

Les fonctions biologiques associées aux glycoconjugués sont nombreuses, il devient de plus en plus clair que les cellules utilisent des oligosaccharides spécifiques pour chiffrer des informations importantes. Ces dernières concernent le sort des protéines, les interactions cellulaires, la différenciation et développement des tissus, la coagulation du sang, la fertilisation et l'embryogenèse, entre autres. De plus, les glyconconjugués peuvent être utilisés en tant que signaux extracellulaires (revue par WIEDERSCHAIN, 2013).

La glycosylation des protéines est un ensemble de modifications post-traductionnelles très fréquentes chez les êtres vivants. Elle influe fortement sur de nombreux aspects fonctionnels, comme la localisation cellulaire, la dégradation et le contrôle de qualité des protéines (ARNOLD *et al.*, 2007). La clé de la compréhension de ces fonctions est la connaissance de la structure primaire des glycoconjugués.

Figure I.1: Schéma d'une membrane cellulaire montrant la diversité des glycoconjugués formant le glycocalix cellulaire.



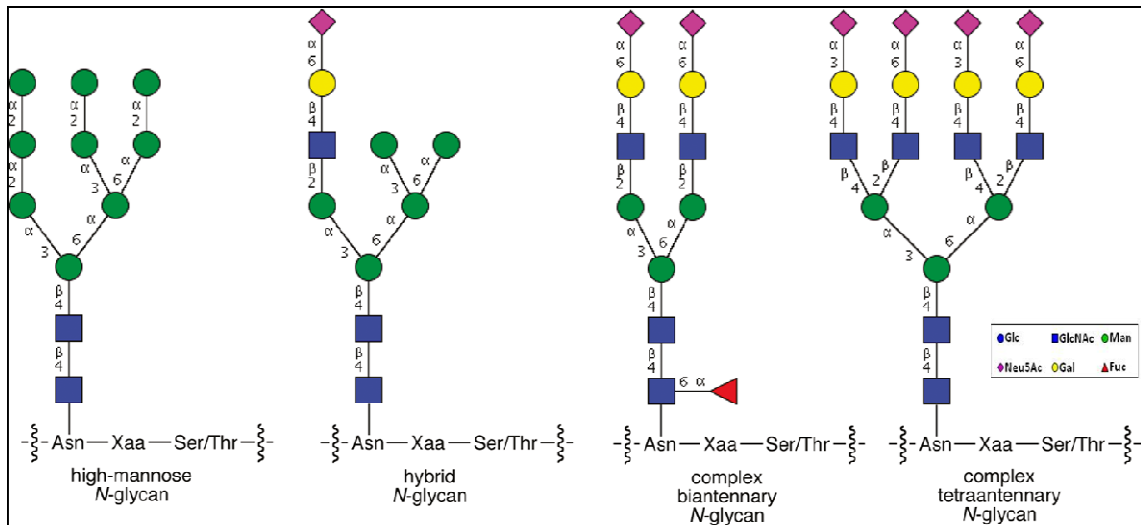
Deux grandes familles de glycoprotéines peuvent être définies en fonction de la nature de la liaison covalente établie entre le glycanes et la protéine: les *N*- et les *O*-glycoprotéines. Ces deux types de glycosylation peuvent être trouvés simultanément sur la même protéine.

1.2 Types de glycosylation

La *N*-glycosylation débute dans le réticulum endoplasmique par l'ajout d'un résidu *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) par une liaison amide à une asparagine appartenant à la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr, où X peut être n'importe quel acide aminé, sauf la proline. La présence de la séquence consensus est nécessaire pour la *N*-glycosylation, mais l'occupation du site potentiel n'est pas obligatoire. Par conséquent, une glycoprotéine peut contenir un certain nombre de sites de *N*-glycosylation potentiels et chacun peut être glycosylé ou non (SCHMALTZ *et al.*, 2011).

Les *N*-glycanes sont constitués d'une structure pentasaccharidique commune formée par deux résidus GlcNAc et trois résidus de mannose (Man): Man₃GlcNAc₂, appelé noyau ou base. Ce noyau est ensuite utilisé en tant que substrat pour la diversification des *N*-glycanes dans l'appareil de Golgi, où les glycanes sont transformés et modifiés pour générer les trois types de *N*-glycanes présents dans les protéines matures: riches en mannose, complexes ou hybrides (MOLINARI *et al.*, 2008) (Figure I.2).

Figure I.2: N-glycanes présents dans les protéines humaines matures: Types mannose, complexe et hybride.

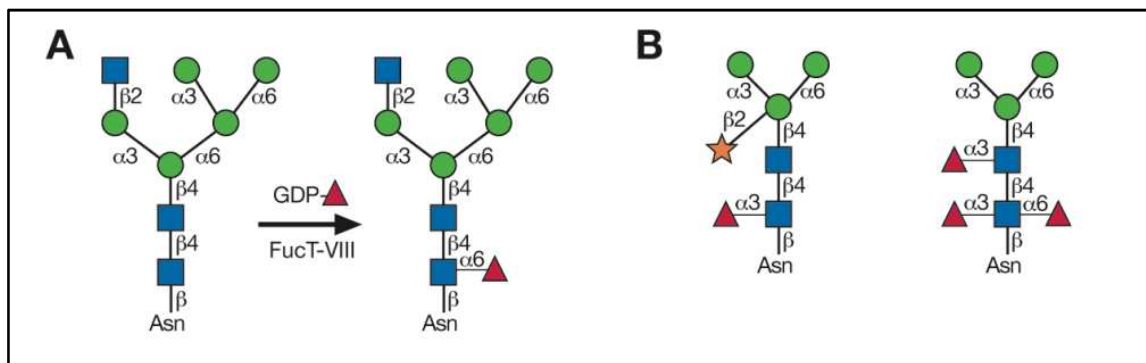


Les structures complexes peuvent être subdivisées en bi-, tri- et tétra-antennées en fonction du nombre de branches sur le noyau original du trimannoside (adapté de MIYOSHI; MORIWAKI; NAKAGAWA, 2008).

La *O*-glycosylation est une modification post-traductionnelle qui consiste en la formation d'une liaison glycosidique entre le carbone anomérique d'un glucide et l'hydroxyle d'un résidu sérine ou thréonine de la protéine après qu'elle ait atteint sa structure tridimensionnelle correcte. La *O*-glycosylation, qui a lieu dans l'appareil de Golgi, est extrêmement diverse dans sa composition chimique et aucune séquence consensus n'a été observée (SCHMALTZ *et al.*, 2011). Elle génère des structures de base différentes, en fonction du sucre attaché à la protéine, qui peuvent être étendues et modifiées par sialylation, sulfatation, acétylation et par extension avec des polylactosamines. La plus courante est la *O*-glycosylation de type mucine avec l'ajout d'un résidu GalNAc. Si l'allongement ne se produit pas (comme c'est le cas notamment des cellules transformées), l'antigène Tn (GalNAc α 1-Ser/Thr) est généré et il peut être modifié en sialyl-Tn par une sialylation (α 2-6). Par la suite, l'addition de galactose et/ou GlcNAc par des glycosyltransférases spécifiques conduit à la formation des différents noyaux identifiés pour les *O*-glycanes de type mucine (STEEN *et al.*, 1998). L'expression de mucines, glycoprotéines sécrétées ou liées aux membranes, est particulièrement abondante dans les cellules épithéliales spécialisées dans la production de mucus, qui agit comme une barrière protectrice. Elles participent également au contrôle de l'antigénicité du système immunitaire et peuvent être liées à des phénomènes d'adhésion cellulaire (SCHMALTZ *et al.*, 2011).

La fucosylation comprend la liaison d'un résidu fucose à un *N*-glycane, *O*-glycane ou un glycolipide et est une des modifications les plus courantes des glycoconjugués (VARKI *et al.*, 2009). Elle peut être divisée en plusieurs types, y compris (α 1-2), (α 1-3), (α 1-4) et (α 1-6). Dans les *N*-glycanes présents chez les vertébrés, la modification principale du noyau est l'addition d'un fucose par une liaison (α 1-6) à l'unité de *N*-acétylglucosamine liée à l'asparagine. Chez les invertébrés, le fucose peut y être ajouté selon une liaison (α 1-3) et/ou (α 1-6). Chez les plantes, le fucose est seulement retrouvée en (α 1-3) au noyau (Figure I.3). Les fucosyltransférases sont les enzymes responsables du transfert du fucose sur le premier GlcNAc du noyau des *N*-glycanes (VARKI *et al.*, 2009).

Figure I.3: Les variations sur le noyau des *N*-glycanes.



(A) Chez les mammifères, la principale modification est l'ajout de fucose (α 1-6) à la première unité GlcNAc. (B) Chez les plantes, le fucose est ajouté au GlcNAc de l'asparagine seulement en liaison (α 1-3) tandis que chez les invertébrés, le fucose peut être ajouté selon une liaison (α 1-3) et/ou (α 1-6) (MIYOSHI *et al.*, 2008) .

Certaines conditions pathologiques comprennent une augmentation des taux de fucosylation, y compris l'inflammation et le cancer. Certains types de glycoprotéines fucosylées et plusieurs types d'anticorps, qui reconnaissent les oligosaccharides fucosylés comme les sialyl Lewis a/x, ont été utilisés comme marqueurs tumoraux (MIYOSHI *et al.*, 2008). L'alpha-fétoprotéine (AFP), par exemple, est un marqueur tumoral bien connu pour l'hépatocarcinome cellulaire, mais parfois son niveau est augmenté dans d'autres maladies du foie, telles que l'hépatite chronique et la cirrhose. En revanche, l'AFP avec une fucosylation (α 1-6) du noyau, appelée AFP-L3, est un marqueur très spécifique de carcinome hépatocellulaire. Ainsi, la fucosylation de glycoprotéines régule la fonction biologique de ces molécules. Les variations de fucosylation et les molécules capables de les reconnaître

peuvent fournir une nouvelle stratégie dans le diagnostic et la thérapie du cancer (MIYOSHI *et al.*, 2008).

Récemment, de nombreuses initiatives en matière de recherche médicale visent à développer des outils d'analyse qui permettraient le suivi des modifications de la glycosylation lors de pathologies. Ils faciliteraient le diagnostic et le pronostic de ces maladies et aideraient à mieux les comprendre au niveau moléculaire, dans le but de développer des médicaments efficaces (LOWE; MARTH, 2003; POCHEC *et al.*, 2003; ZACHARA; HART, 2002; HAKOMORI, 2002). L'analyse des glycanes est devenue une étape essentielle pour une meilleure compréhension de la structure et du rôle biologique des glycoconjugués.

2. LES ALGUES

2.1 Les algues marines

Les algues sont des organismes autotrophes appartenant au règne des protistes et d'une grande valeur écologique. Elles se trouvent soit sous la forme d'organismes unicellulaires soit multicellulaires (eucaryotes et procaryotes). Dans l'environnement, les algues sont largement distribuées puisqu'elles sont retrouvées dans la mer, les eaux douces mais aussi sur terre. Les algues sont les organismes qui contribuent le plus à la productivité des écosystèmes, en jouant un rôle écologique comparable aux plantes dans les *habitats* terrestres. Ces organismes représentent la base de la chaîne alimentaire dans les océans et sont responsables de près de la moitié de la photosynthèse réalisée sur la planète. Ils ont un rôle dans le renouvellement de la plupart de l'oxygène dans l'air atmosphérique. Il est à noter l'importance des algues comme source pour divers composés bioactifs (RAVEN *et al.*, 2007).

Dans de nombreux pays, l'industrie alimentaire consomme une grande quantité d'algues, qui sont bien connues pour avoir une teneur élevée en fibres, minéraux, vitamines, enzymes, antioxydants et en différents peptides bioactifs (WIJESEKARA *et al.*, 2011). Certaines espèces sont utilisées dans le secteur des nutraceutiques et sont cultivées comme source de composés d'intérêt commercial. Elles agissent ainsi comme un moyen de subsistance pour certaines communautés et contribuent à la création d'emplois et de revenus (RAVEN *et al.*, 2007). Au cours des dernières décennies, une importance accrue a été accordée à la culture contrôlée des algues pour la production à grande échelle de produits d'intérêt commercial. Parmi ces produits remarquables, on trouve les acides gras polyinsaturés, les caroténoïdes, les phycocolloïdes et aussi les lectines.

Les macroalgues sont retrouvées dans trois grands phylums: *Rhodophyta*, pour les algues rouges, *Phaeophyta*, pour les algues brunes et *Chlorophyta* pour les algues vertes.

3. LES LECTINES

3.1 Généralités sur les lectines

Les lectines sont des protéines d'origine non-immune capables de reconnaître et fixer spécifiquement et de manière réversible les glycanes sans les modifier (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Les lectines sont aussi appelées agglutinines quand elles sont capables d'agglutiner les érythrocytes, les cellules et les glycoconjugués. Cette caractéristique est due au fait que ces protéines sont généralement multivalentes c'est-à-dire qu'elles possèdent plusieurs sites de fixation des sucres. Les lectines sont omniprésentes dans la nature et se trouvent chez tous les êtres vivants.

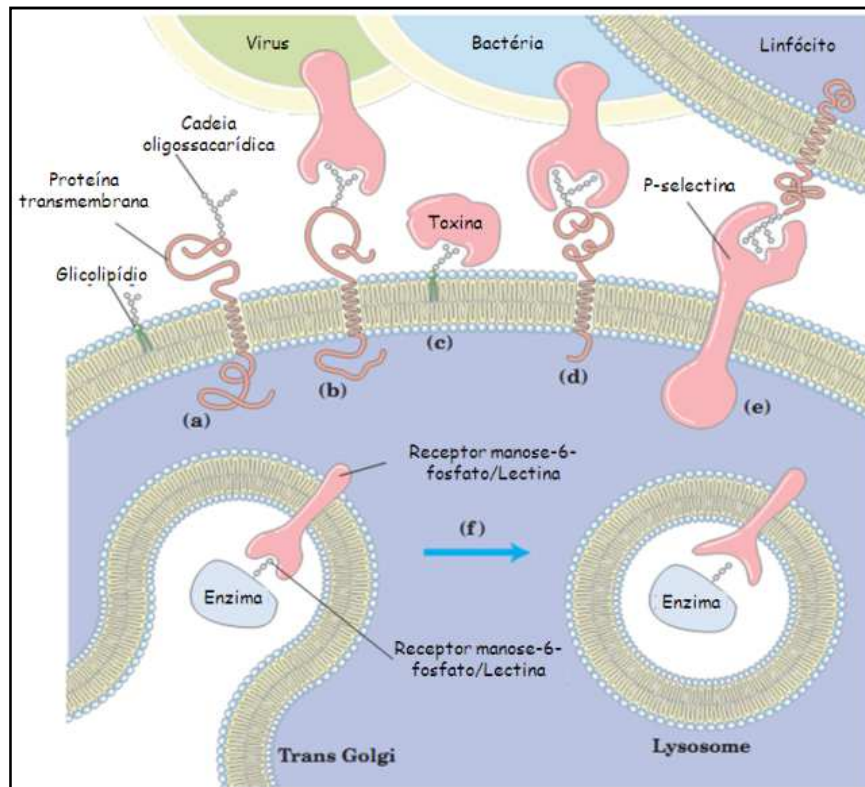
L'intérêt majeur qui pousse aujourd'hui la recherche sur les lectines est lié, sans doute, à leur capacité unique de «lire» l'information biologique qui est codifiée dans la structure tridimensionnelle des sucres. Les lectines sont en fait les récepteurs spécifiques des sucres et les interactions protéine-sucre jouent des rôles clés dans une multitude de processus de reconnaissance moléculaire et de signalisation cellulaire (AMBROSI *et al.*, 2003).

Les lectines sont apparues dans le scénario scientifique en 1860 avec Weir Mitchell, qui, au cours de ses études, a noté le phénomène de l'hémagglutination des érythrocytes lorsqu'ils étaient associés avec le venin de crotale (*Crotalus durissus*) (MITCHELL, 1860). Le premier rapport sur lectines végétales est paru en 1888 au cours d'études par Stillmark sur le principe toxique des extraits de graines de ricin (*Ricinus communis*), dans lequel il a noté que ces extraits avaient la capacité d'agglutiner les érythrocytes de différents animaux (STILLMARK, 1888). C'est seulement en 1966, que Boyd *et al.* ont constaté l'activité hémagglutinante d'extraits d'algues sur des érythrocytes humains (BOYD *et al.*, 1966).

Les lectines présentent des fonctions biologiques très diverses selon les organismes où elles se trouvent. Chez les plantes, elles agissent, par exemple, en tant que molécules de défense dans le contrôle de l'homéostasie et la symbiose des plantes avec des bactéries nitrifiantes. Chez les animaux, elles ont essentiellement un rôle dans les processus de reconnaissance cellulaire. Elles sont impliquées dans des activités biologiques diverses

telles que la cytotoxicité, l'adhésion cellulaire, les interactions cellule-matrice, l'induction de l'apoptose ou l'agglutination des cellules et des bactéries (DANGUY *et al.*, 2002) (Figure I.4).

Figure I.4: Rôle des oligosaccharides dans la reconnaissance et l'adhésion à la surface cellulaire.



(a) Les oligosaccharides constitués d'un assemblage précis de monosaccharides présentés par les glycoprotéines ou les glycolipides sur la surface externe de la membrane plasmique. (b) Certains virus infectant les cellules animales se lient à des glycoprotéines de la surface cellulaire lors de la première étape de l'infection. (c) Des toxines bactériennes se lient à des glycolipides avant de pénétrer dans les cellules. (d) Certaines bactéries adhèrent à la cellule, puis la colonisent ou infectent. (e) Les sélectines de la membrane plasmique de certaines cellules servent de médiateurs des interactions cellule-cellule. (f) Le récepteur du mannose 6-phosphate se lie aux oligosaccharides des enzymes lysosomales, une étape nécessaire pour leur transfert vers le lysosome (Adapté de NELSON; COX, 2009).

3.2 Lectines des macroalgues

Il existe peu d'études sur la détection et l'isolement des agglutinines dans les algues, par rapport aux études sur les plantes ou même les animaux, principalement en raison du fait de leur faible production et de la relative difficulté pour obtenir du matériel (NAGANO *et al.*, 2005a).

Plusieurs lectines d'algues, notamment celles d'algues rouges, ont des caractéristiques communes: la grande majorité est monomérique et le point isoélectrique est compris entre pH 4-6. Leur activité d'hémagglutination n'est pas inhibée par les monosaccharides, mais par des glycoprotéines et/ou des sucres complexes, et ne dépend pas de cations bivalents pour la plupart. Elles sont très résistantes aux hautes températures ou aux pH extrêmes (ZIÓLKOWSKA; WLODAWER, 2006). En comparaison avec les plantes, les lectines présentes chez les algues possèdent la caractéristique d'exercer une certaine action biologique à des concentrations beaucoup plus faibles. Elles sont donc plus actives et en raison de leur faible poids moléculaire, elles sont moins antigéniques que les lectines de haut poids moléculaire, retrouvées chez les plantes et les animaux, par exemple (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Depuis leur découverte, les lectines ont suscité la controverse quant à leurs possibles fonctions. Même pour les lectines ayant une forte homologie, il est difficile d'attribuer une fonction commune car elles peuvent différer, en fonction de leur spécificité, leur localisation intracellulaire et leur période de synthèse (RUDIGER; GABIUS, 2001). À ce jour, peu d'études se sont intéressées au rôle endogène des lectines d'algues. Par exemple elles reconnaissent et aident à l'adhérence des gamètes lors de la reproduction (KIM; KIM, 1999; HAN *et al.*, 2012). Une autre activité écologique et biologique est l'implication dans la symbiose et la défense. Pour l'algue verte *Bryopsis plumosa*, il a été constaté que lorsque l'organisme subit un dommage cellulaire, les composants cellulaires sont expulsés hors de la cellule et se produit un phénomène d'agrégation de ces organelles pour former un protoplaste qui est médiée par la lectine bryohealine (KIM *et al.*, 2005; GROSSMAN, 2005). Plus tard, il a été constaté que la lectine bryohealine pouvait accomplir deux fonctions: l'ajout d'organelles dans l'eau de mer et aussi la protection contre la contamination bactérienne lors de la régénération de protoplastes (YONN *et al.*, 2008).

3.3 Aspects structurels des lectines de macroalgues

À ce jour, il y a quelques lectines d'algues caractérisées avec des informations sur leur structure primaire, secondaire ou quaternaire. Des techniques telles que la dégradation d'Edman, la spectrométrie de masse et le clonage de l'ADNc ont fourni des informations sur leur séquence en acides aminés. Elles indiquent que les lectines des différentes espèces d'algues étudiées peuvent être regroupées dans diverses familles. Chez les algues rouges marines, la lectine de *Bryothamnion triquetrum* (BTL) a été la première dont la structure

primaire a été déterminée (CALVETE *et al.*, 2000). Dans la même année, Hori et ses collaborateurs ont rapporté la séquence primaire des hypnines (HJAs) de *Hypnea japonica* (HORI *et al.*, 2000). La comparaison de leur séquence primaire a révélé des similitudes entre elles et avec les isoformes des lectines de *B. seaforthii* permettant leur regroupement dans une même famille (NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012, MEDINA-RAMIREZ *et al.*, 2006). D'autre part, des différences ont été observées entre les lectines de *H. cervicornis* (HCA) et *H. musciformis* (HML) trouvé au Brésil, et les lectine de *H. japonica* (HJAs) trouvé au Japon, ce qui indique qu'il peut y avoir une variété de lectines pour les espèces du même genre qui occupent des écosystèmes distincts (NAGANO *et al.*, 2005b). Le tableau 1 présente les différentes lectines d'algues ayant leur séquence primaire déterminée.

Tableau I.1: Les lectines de macroalgues avec la séquence primaire déterminée.

Lectine	Algue d'origine	Spécificité	Références
BTL	<i>Bryothamnion triquetrum</i>	Fétuine et mucine	Calvete <i>et al.</i> , 2000.
BSL2 BSL3 BSL4	<i>Bryothamnion seaforthii</i>	Fétuine, avidine et mucine	Nascimento-Neto <i>et al.</i> , 2012.
BSHV1 BSHV2 BSHV3 BSHV4	<i>Bryothamnion seaforthii</i>	Fétuine et mucine	Medina-Ramirez <i>et al.</i> , 2006.
Hypnine A-1 Hypnine A-2 Hypnine A-3	<i>Hypnea japonica</i>	Noyau (α 1-6) fucosylé	Hori <i>et al.</i> , 2000. Okuyama <i>et al.</i> , 2009.
HML	<i>Hypnea musciformis</i>	Mucine	Nagano <i>et al.</i> , 2005b.
HCA	<i>Hypnea cervicornis</i>	Mucine et GalNac	Nagano <i>et al.</i> , 2005b.
ESA-1 ESA-2 ESA-3	<i>Eucheuma serra</i>	Mannose N-lié	Hori <i>et al.</i> , 2007.
GRFT	<i>Grifthisin sp.</i>	Mannose et GlcNAc	Mori <i>et al.</i> , 2005.

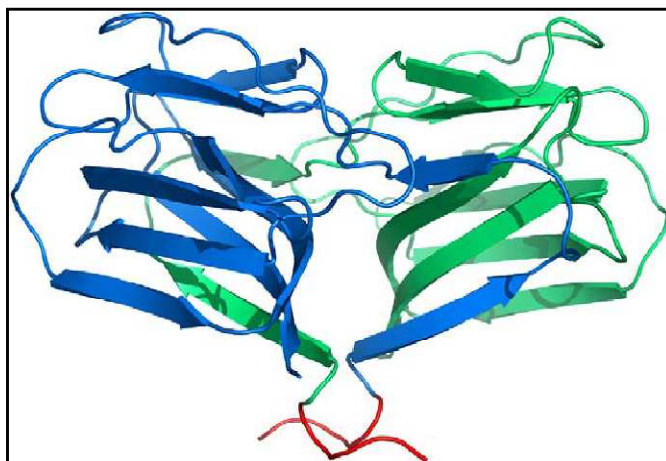
ULP1	<i>Ulva pertusa</i>	GlcNAc thyroglobuline	et Wang <i>et al.</i> , 2004.
ULL	<i>Ulva liminotica</i>	Mucine et fucose	Ishihara; Shimada, 2009.
Bryohealina BPL1 BPL2 BPL-4	<i>Bryopsis plumosa</i>	GalNAc Mannose GlcNAc	Yoon <i>et al.</i> , 2008. Han <i>et al.</i> , 2010, 2011, 2012.
BP	<i>Bryopsis hypnoides</i>	GlcNAc, GalNAc et Mucine	Niu <i>et al.</i> , 2011.
EPL-1 EPL-2	<i>Enteromorpha prolifera</i>	L-fucose	Ambrosio <i>et al.</i> , 2003.
CBA	<i>Codium barbatum</i>	N-glycanes complexes thyroglobuline de porc (PTG) et asialo-PTG	Praseptangga <i>et al.</i> , 2012.
BCA	<i>Boodlea coacta</i>	N-glycanes avec α 1-2 mannose	Sato <i>et al.</i> , 2011.

La détermination de la structure 3D des lectines natives ou en complexe avec des ligands par cristallographie aux rayons X ou résonnance magnétique nucléaire des protéines (RMN) donnent des informations précieuses sur leur repliement, pour élucider leur mécanismes de reconnaissance et de fixation des sucres et potentiellement sur leur rôle. Une base de données: lectin3d regroupe toutes les structures de lectines résolues selon leurs origines et est disponible sur <http://lectin3d.cermav.cnrs.fr/search.php>.

A ce jour, la lectine de *Grifthisin sp.* (GRFT), est la seule lectine de macroalgue dont la structure tridimensionnelle a été déterminée. Elle a été résolue et affinée à une résolution de 1,3 Å en utilisant la technique SAD (Single-wavelength Anomalous Diffraction) avec de la protéine recombinante produite dans *Escherichia coli* et marquée avec de la sélénométhionine. Le repliement de GRFT représente un motif structural appelé bêta-prisme composé de trois répétitions de quatre brins bêta anti-parallèles qui forment un prisme triangulaire. Contrairement à d'autres membres de la même famille, GRFT forme un dimère par échange de brin bêta, où les deux premiers brins bêta de la première chaîne sont associés à deux brins bêta de l'autre chaîne, et vice versa. La structure de chaque monomère a des

similitudes avec les lectines de la famille de la jacaline, mais sa structure dimérique est unique (ZIÓŁKOWSKA *et al.*, 2006) (Figure I.5).

Figure I.5: Représentation du dimère de la griffithsine



Les monomères sont en vert et en bleu. L'extension N-terminale de la protéine est colorée en rouge (code PDB: 2GTY).

Les structures cristallines de la GRFT complexée à différents ligands glycosidiques tels que le mannose (PDB: 2GUC et 2GUD), l'oligomannose (PDB: 3LL2), le glucose (PDB: 2NUO), la *N*-acétylglucosamine (PDB: 2GUE), le (α 1-6) mannobiose (PDB: 2HYQ) et le maltose (PDB: 2HYR) ont été également résolues (ZIÓŁKOWSKA *et al.*, 2006; 2007) et ont donné des informations essentielles sur le site de fixation des sucres.

3.4 Études de la spécificité des lectines d'algues

La spécificité des lectines peut être étudiée par diverses techniques, parmi lesquelles on peut citer: les tests d'inhibition de l'hémagglutination, la chromatographie d'affinité sur des colonnes avec des lectines ou des sucres immobilisés, l'ultrafiltration par centrifugation couplée à HPLC et/ou les puces à sucres. Les spécificités générales des lectines d'algue ont été étudiées, mais les détails sur leur spécificité fines ont encore rares. Les lectines d'algues reconnaissent les *N*-glycanes et peuvent être classées en fonction de leur trois types principaux: oligomannose, complexe, ou hybride/mixte qui possèdent généralement les caractéristiques des *N*-glycanes de type oligomannose et de type complexe (HORI *et al.*, 1990).

BCA, la lectine de l'algue verte *Boodlea Coacta* a eu sa spécificité étudiée par ultrafiltration par centrifugation couplée à HPLC avec des oligosaccharides pyridylaminés. Cette lectine possède une spécificité exclusive pour le mannose lié à l'extrémité non réductrice des *N*-glycanes en liaison (α 1-2), des groupes de ces résidus augmentent l'affinité de la lectine pour le glycane. D'autres lectines spécifiques des *N*-glycanes riches en mannose ont été décrites chez les algues, comme ESA-2 de l'algue rouge *Eucheuma serra*, et microalgues, comme CV-N de l'algue bleu-vert *Nostoc elliposporum* et OAA de l'algue bleu-vert *Oscillatoria agardi*. BCA ne partage pas d'homologie de séquence avec ces lectines (SATO *et al.*, 2011). ESA-2, elle est strictement spécifique pour les *N*-glycanes riches en mannose avec une structure minimale contenant le pentasaccharide Man(α 1-3)Man(α 1-6)Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)GlcNAc. ESA-2 ne se lie pas au noyau pentasaccharidique, mais exige un GlcNAc à l'extrémité réductrice pour la liaison. Elle est structurellement et évolutionnairement liée à la lectine OAA avec une spécificité restreinte pour les *N*-glycanes riches en mannose (α 1-3) (HORI *et al.*, 2007). Les lectines d'algues avec une spécificité pour les *N*-glycanes du type oligomannose présentent généralement une activité anti-VIH (virus de l'immunodéficience humaine). Elles sont décrites comme les lectines les plus efficace pour inhiber la réplication du virus VIH avec une EC₅₀ dans la gamme du nano- et picomolaire (ZIOLKOWSKA; WLODAWER, 2006).

La spécificité des lectines de *Hypnea Japonica* (HJAs) a été étudiée par chromatographie d'affinité frontale avec des oligosaccharides pyridylaminés. Ces lectines ont montré une spécificité pour les *N*-glycanes complexes avec leur noyau fucosylé en (α 1-6). Cette spécificité est affectée par la présence de résidus GlcNAc bissectés et tetraantennés (OKUYAMA *et al.*, 2009). Il est connu que la fucosylation (α 1-6) du noyau est modifiée dans certains types de cancer et qu'elle affecte l'efficacité de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps. Les lectines avec la capacité de reconnaître spécifiquement ces structures seraient donc des outils précieux dans le diagnostic de certains types de cancer et dans le contrôle de la qualité des anticorps (OKUYAMA *et al.*, 2009).

Pour élucider les interactions entre les sucres et différentes molécules, la technique de puces à sucres, développée par le *Consortium for Functional Glycomics* (CFG) (USA) est devenu un outil puissant, notamment dans l'analyse de la spécificité fine des lectines pour les sucres.

3.5 Applications biotechnologiques des lectines d'algues

Les lectines d'algues semblent être particulièrement intéressantes pour des applications biotechnologiques. Elles sont de petite taille, induisent une faible immunogénicité dans les cellules hôtes, ont une grande stabilité en raison de multiples ponts disulfures, et montrent une spécificité élevée pour les glycoconjugués présents à la surface des cellules (revue par PINTO *et al.*, 2009). Les lectines d'algues sont des molécules puissantes contre le VIH (BOYD *et al.*, 1997; BEWLEY *et al.*, 2004; SOWDER *et al.*, 2005). Il est à noter que la cyanovirine-N (CV-N) qui inhibe l'entrée du VIH dans les cellules hôtes, a aussi montré une inhibition potentielle d'autres virus tels que le virus Ebola, le virus de la grippe et celui de l'hépatite C (VHC) (BARRIENTOS *et al.*, 2003; O'KEEFE *et al.*, 2003; HELLE *et al.*, 2006). BCA a montré une activité puissante contre le virus influenza en se liant directement à l'enveloppe virale (SATO *et al.*, 2011). La GRFT a bloqué la liaison de la glycoprotéine gp120 de la capsid virale aux récepteurs CD4 sur les cellules, en se liant aux protéines gp120, gp41 et gp160 de la capsid virale (MORI *et al.*, 2005).

Les algues rouges marines prélevées sur la côte du Brésil *Bryothamnion seaforthii*, *B. triquetrum*, *Hypnea musciformis* et *H. cervicornis*, ont des lectines avec des propriétés biologiques importantes et très diversifiées, comme l'induction et l'inhibition des lymphocytes (LIMA *et al.*, 1998), une activité antifongique (MELO *et al.*, 1997), l'induction de la migration des neutrophiles (NEVES *et al.*, 2001), une activité anti-inflammatoire (SILVA *et al.*, 2010b), la relaxation musculaire de l'aorte (LIMA *et al.*, 2004) ou l'effet de cicatrisation (NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012).

Les lectines d'algues ont également un fort potentiel dans le domaine dentaire. L'inhibition de la formation de la plaque dentaire par *Streptococcus mutans*, le principal responsable de l'établissement et du développement des caries dentaires, a été observée avec des lectines isolées d'algues rouges telles que *B. triquetrum* (BTL) et *B. seaforthii* (BSL) (TEIXEIRA *et al.*, 2007).

Les lectines peuvent également fournir des applications thérapeutiques et être utilisées dans la lutte contre les agents pathogènes. La lectine isolée de l'algue rouge *Solieria filiformis* inhibe fortement la croissance des différentes bactéries gram-négatives (HOLANDA *et al.*, 2005). Des effets anti-nociceptifs et anti-inflammatoires significatifs ont été également mis en évidence chez les lectines isolées de certaines espèces d'algues, tels que *H. cervicornis* (BITENCOURT *et al.*, 2008), *Amansia multifida* (NEVES *et al.*, 2007), *B. triquetrum*, *B.*

seaforthii (VIANA *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2004), *Caulerpa cupressoides* (VANDERLEI *et al.*, 2010) et *Pterocladia capillacea* (SILVA *et al.*, 2010b).

Dans le domaine de l'oncologie, des extraits de plusieurs algues ont montré la capacité d'agglutiner fortement les cellules tumorales de souris de type FM3A à des concentrations inférieures à celles requises pour les lectines de plantes. Ceci suggère que les lectines d'algues pourraient être des outils puissants dans l'étude du cancer (TAKAMINE *et al.*, 2002). Il a été observé que la lectine isolée de l'algue rouge *Eucheuma serra* était capable de supprimer les cellules de cancer du côlon chez les souris. Cette lectine peut aussi être un outil pour la libération ciblée de médicaments, en utilisant des vésicules lipidiques (SUGAHARA *et al.*, 2001). Des études de cytométrie en flux et microscopie confocale ont montré que les lectines BTL et BSL reconnaissent des variants de cellules du cancer du côlon humain. Ces derniers ont probablement des différences au niveau de leurs glycorécepteurs présents dans la membrane cellulaire, ce qui suggère que ces lectines peuvent être un outil précieux pour le diagnostic précoce de ce cancer. De plus, il a été montré que la liaison des BTL et BSL à des cellules du carcinome entraîne leur internalisation. Cette propriété intéressante peut être exploitée dans de futures applications, par exemple, dans un système de libération de médicament contrôlée (*drug delivery*) (PINTO, 2009).

Ces études indiquent que les algues sont une source importante de lectines avec des applications potentielles dans de nombreux domaines de la biotechnologie. Il est à noter que de nombreuses entreprises de biotechnologie utilisent les lectines comme produits commerciaux. L'entreprise Qiagen en Allemagne par exemple, commercialise les lectines pour isoler des glycoprotéines pour les études glycoprotéomiques. Sigma-Aldrich, USA vend des dizaines de lectines végétales et une lectine d'algues. L'entreprise Aethlon Médical, USA commercialise un filtre à base de lectine afin de réduire la charge virale des patients infectés par le VIH et l'hépatite C sous hémodialyse, et une pommade vaginale qui empêche l'infection contre le VIH. Ces exemples démontrent le potentiel biotechnologique de ces molécules.

3.6 Les lectines recombinantes d'algues

Une caractéristique des lectines d'algues est leur faible rendement et la présence d'isoformes, ce qui rend nécessaire leur production sous forme recombinante afin de la contrôler. Grâce à la biologie moléculaire qui permet de cloner leur gènes et l'existence de différents systèmes d'expression hétérologues, il est possible d'obtenir ces protéines libres

d'isoformes et en quantité assez importante pour la réalisation d'études structurales et des applications biologiques. Le système d'expression hétérologue *E. coli* est largement utilisé pour produire les lectines présentes chez diverses algues sous forme recombinante (Tableau I.2). Les lectines, ainsi produites, montrent des propriétés identiques à celles des protéines sauvages.

Tableau I.2: Les lectines de macroalgues et de microalgues recombinantes produites chez *E. coli*.

Espèce	Lectine	Identification	Spécificité	Reference
<i>Griffithia sp.</i>	GRFT	Algue rouge	Mannose et GlcNAc	Giomarelli <i>et al.</i> , 2006.
<i>Gelidium amansii</i>	Ga_lectin	Algue rouge	ND	Massi; Ahmad 2012.
<i>Scytonema varium</i>	SVN	Cyanobactérie (algue bleu-vert)	N-glycanes du type oligomannose	Xiong <i>et al.</i> , 2006.
<i>Microcystis viridins</i>	MVL	Cyanobactérie (algue bleu-vert)	Mannose	Liet <i>al.</i> , 2011.
<i>Nostoc elliposporum</i>	CVN	Cyanobactérie (algue bleu-vert)	N-glycanes du type oligomannose	Gao <i>et al.</i> , 2010.

Les études faites sur l'activité antimycobactérienne de la lectine isolée d'algue rouge *Gelidium amansii* (Ga_lectin) ont révélé que la lectine recombinante n'a aucun effet inhibiteur sur la croissance de *Mycobacterium tuberculosis*, mais qu'elle pourrait augmenter la sensibilité de l'agent pathogène à la streptomycine. Ces résultats suggèrent que Ga_Lectin, en combinaison avec la streptomycine, peut jouer un rôle important dans la défense de l'hôte contre la souche de *M. tuberculosis* H37Rv (MASSI; AHMAD, 2012).

La lectine recombinante *Griffithia sp.* (His-GRFT) a inhibé la cytopathogénicité induite par le VIH avec une EC₅₀ similaire à celle mesurée pour la lectine sauvage. Ainsi, l'activité anti-VIH et les caractéristiques de liaison à la gp120 étaient essentiellement identiques entre la His-GRFT recombinante et la GRFT sauvage (GIOMARELLI *et al.*,

2006). Dans une autre étude, la GRFT recombinante était capable d'inhiber l'infectivité du VHC en se liant aux glycoprotéines E1 et E2 de l'enveloppe du virus et en bloquant ainsi sa liaison aux hépatocytes humains (TAKEBE *et al.*, 2013).

3.7 Les algues rouges marines *Hypnea musciformis* et *Bryothamnion triquetrum*

L'algue rouge *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamouroux appartient à l'ordre des *Gigartinales* et à la famille *Hypneaceae*. L'espèce a une taille globale de 3 à 30 cm avec des branches cylindriques et cartilagineuses, très ramifiées. Les ramifications sont variables et irrégulières, facilement identifiable par les bords roulés (crochets) de leurs branches. *H. musciformis* se trouve sur les côtes, les estuaires et les *habitats* marins. Elle est largement distribuée dans les océans et son capacité de dispersion sans doute due à son taux de croissance rapide, à sa capacité à réaliser une épibiose avec d'autres algues et à sa fragmentation facile.

A partir des extraits protéiques de *H. musciformis*, une lectine, appelé HML, a été isolée. La purification a été effectuée par chromatographie sur colonne DEAE-cellulose et sa structure primaire a été déterminée en combinant les techniques de spectrométrie de masse et de dégradation d'Edman. HML a une seule chaîne polypeptidique constituée de 90 résidus d'acides aminés, ayant sept ponts disulfure intrachaîne. L'alignement de la séquence en acides aminés d'HML a révélé l'existence de domaines internes, les résidus 1-47 et 48-90 correspondent aux domaines N- et C-terminaux, respectivement (NAGANO *et al.*, 2002; 2005b). HML reconnaît spécifiquement la structure Tn (Ser/Thr-GalNAc), un antigène exprimé sélectivement dans différents types de tumeurs. Les lectines spécifiques de l'antigène Tn peuvent être d'excellents outils biotechnologiques pour la détection précoce des cellules cancéreuses. La structure tertiaire d'HML n'a pas encore été résolue, malgré la disponibilité des données de diffraction aux rayons X (NAGANO *et al.*, 2005b).

L'algue rouge *Bryothamnion triquetrum* (S. G Gmelin) M. Howe appartient à l'ordre des *Ceramiales* et à la famille *Rhodomelacea*. Il s'agit d'une algue verte-rouge, avec des branches principales irrégulièrement ramifiées, courtes et disposées en trois rangées longitudinales, donnant aux algues une apparence triangulaire. Une lectine, appelé BTL, a été isolée à partir des extraits de *B. triquetrum*. Sa purification a été effectuée par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose. BTL a été la première lectine d'algue à avoir sa structure primaire déterminée par les techniques de dégradation d'Edman et de

spectrométrie de masse. L'analyse de BTL a montré qu'elle est composée d'une seule chaîne polypeptidique contenant 91 résidus d'acides aminés, ayant quatre résidus cystéines qui forment deux ponts disulfures intra-chaîne (Cys5-Cys62 et Cys12-Cys90). Un de ces résidus cystéine peut interagir avec d'autres cystéines présentes dans la chaîne polypeptide et éventuellement former un dimère. BTL a montré la présence d'isoformes et de multimères (CALVETE *et al.*, 2000). BTL est capable de provoquer un effet relaxant sur les anneaux aortiques isolés de rat par une interaction spécifique avec l'endothélium (LIMA *et al.*, 2004). BTL a également montré un potentiel dans le domaine dentaire avec sa capacité à inhiber la formation de plaques par *Streptococcus mutans* (TEIXEIRA *et al.*, 2007). Dans le domaine de l'oncologie, BTL a été utilisée pour discriminer des variants de carcinome du côlon humain probablement en raison des glycorécepteurs différents au niveau des membrane des cellules (PINTO *et al.*, 2009).

Les potentiels biotechnologiques sont encore à explorer pour HML et BTL. Le principal facteur limitant de ces études et des études structurales sont celles citées ci-dessus soit la faible quantité de protéine produite par des méthodes biochimiques classiques, la présence d'isoformes et la quantité relativement faible d'algues dans la nature. De plus, il n'existe aucun modèle structural pour la résolution de la structure tridimensionnelle de ces deux lectines à ce jour. La production de lectine recombinante permettrait de pallier en partie à ces problèmes.

CHAPITRE II:
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE

CHAPITRE II: OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE

1. OBJECTIFS

1.1 Objectif général

L'objectif général de cette étude est d'obtenir sous forme recombinante les lectines d'algues rouge marines *Hypnea musciformis* (rHML) et *Bryothamnion triquetrum* (rBTL). Tout ceci dans le but de déterminer leur spécificité pour les oligosaccharides complexes et d'évaluer leur potentiel toxique contre *Artemia sp.* et contre les adénocarcinomes du poumon (A549).

1.2 Objectifs spécifiques

Objectif 1: Obtenir de différents clones positifs *d'E. coli* transformés avec le gène synthétique codant pour rHML et pour rBTL.

Objectif 2: Exprimer et purifier les protéines recombinantes: rHML et rBTL.

Objectif 3: Déterminer l'activité d'héماغglutination de rHML et de rBTL.

Objectif 4: Déterminer les tampons convenables pour rHML et de rBTL, par des analyses de dénaturation thermique.

Objectif 5: Évaluer la spécificité des lectines sauvages (HML et BTL) et recombinantes (rHML et rBTL) pour différents oligosaccharides par des expériences sur puces à sucres.

Objectif 6: Analyser l'interaction de BTL avec un octasaccharide fucosylé par STD-RMN.

Objectif 7: Évaluer la cytotoxicité de HML, rHML, BTL et de rBTL contre *Artemia sp.*

Objectif 8: Évaluer la cytotoxicité de HML, rHML, BTL et de rBTL contre de lignée de cellule A549 en utilisant le test MTT.

Objectif 9: Obtenir des cristaux de rHML et de rBTL pour les études par cristallographie aux rayons X.

La difficulté de séparation des différentes isoformes de lectines d'algues rouges *Hypnea musciformis* et *Bryothamnion triquetrum* par des techniques chromatographiques, a conduit à la définition des activités biologiques et des propriétés fonctionnelles d'un mélange

de protéines, ce qui empêche une étude détaillée de leurs propriétés. L'expression des lectines d'algues dans le système hétérologue *E. coli* se révèle être un moyen de sélection approprié pour l'étude de chaque isoforme isolée. Cette approche offre un moyen de produire la protéine d'intérêt avec la séquence d'acides aminés définie et permet de tracer une relation spécifique entre la séquence et la fonction.

L'étude des lectines recombinantes de rHML et de rBTL et leur caractérisation biochimique fournissent des informations sur l'interaction protéine-sucre nécessaire à la compréhension des mécanismes d'action, la reconnaissance et la spécificité des oligosaccharides complexes en termes moléculaires. À long terme, ces lectines, produites sous forme recombinante, peuvent être testées pour leur capacité à reconnaître les glycanes impliqués dans des événements biologiques intéressantes.

CHAPITRE III:
MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. MATÉRIEL BIOLOGIQUE

1.1 Extraction et purification des lectines natives de *Hypnea musciformis* (HML) et de *Bryothamnion triquetrum* (BTL)

Les algues rouges marines *H.musciformis* et *B. Triquetrum* (Figure III.1) ont été collectées à partir de la côte de la plage de Pacheco dans l'État du Ceará, au Brésil. Les algues ont été transportées dans des sacs plastiques au laboratoire, puis lavées avec de l'eau distillée et ensuite séparées des épiphytes et maintenues à -20 °C jusqu'à leur utilisation.

Figure III.1: Représentation d'algues rouges *H. musciformis* et *B. triquetrum*, respectivement.



L'extraction et la purification des lectines HML et BTL ont été réalisées selon la procédure décrite par Nagano *et al.* 2002 et Ainonz *et al.* 1995, respectivement, avec quelques modifications. En bref, les algues ont été décongelées et écrasées dans l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Le matériel a ensuite été mis en suspension dans une solution de 20 mM de phosphate de sodium pH 7,0 contenant 150 mM de NaCl (PBS) (1:5 poids/volume) et a été soumis à une agitation constante pendant 18 heures à 4 °C. La suspension a été filtrée et centrifugée à 15000 x g pendant 30 minutes à 4 °C. Le surnageant a été appelé extrait total. Pour la purification de BTL, l'extrait total a été acidifié à pH 1,0 avec du HCl et conservé à 4 °C pendant 5 heures. La fraction qui a précipité a été séparée des protéines solubles par centrifugation et le pH du surnageant a été ajusté à 7,0 avec de la soude. Ensuite, les deux extraits ont été soumis à une précipitation des protéines au sulfate d'ammonium: 70% et 60%

de saturation pour HML et BTL, respectivement. Après un stockage de 18 heures à température ambiante suivi d'une centrifugation (7000 x g pendant 30 minutes à 4 °C), le culot a été remis en suspension dans PBS. Les sels ont été éliminés par une dialyse contre 20 mM de phosphate de sodium pH 7,0 avant de soumettre la fraction soluble à une chromatographie d'échange d'anions sur colonne de DEAE-cellulose. La colonne a été équilibrée avec du tampon de dialyse (tampon d'équilibration) et l'élution réalisée grâce à un gradient de 0 à 2 M NaCl dans le même tampon. Les fractions d'environ 1,5 mL ont été collectées et l'absorbance a été mesurée à 280 nm. L'activité hémagglutinante a été déterminée en utilisant des érythrocytes de lapin. Les fractions actives ont été dialysées contre de l'eau distillée, puis lyophilisées.

2. PRODUCTION DES LECTINES rHML et rBTL DANS *E. coli*

2.1 Clonage et expression de rHML et de rBTL

Les gènes synthétiques de HML et de BTL ont été obtenus commercialement par Epochbiolabs (www.epochbiolabs.com). La séquence du gène, basée sur l'information de la séquence primaire des lectines natives, a été optimisée avec les codons préférentiels de la bactérie *E. coli*. Les gènes synthétiques ont été insérés dans différents vecteurs (pET32a, pET32a-TEV et pMalp2-TEVNX) entre les sites de restriction *NcoI* et *XhoI*. Après transformation dans la souche d'amplification XL1 d' *E.coli*, l'insertion du gène a été vérifiée par digestion avec les deux enzymes de restriction des clones sélectionnés. Ces derniers ont ensuite été séquencés avant de transformer les plasmides dans des souches d'expression. Les différentes souches bactériennes utilisées pour l'expression de rHML et de rBTL sont BL21 (DE3), Origami (DE3), Origami B (DE3), Rosetta-gami 2 (DE3).

Lors des tests d'expression, les différentes souches d'*E. coli* ont été cultivées à 37 °C dans du milieu LB contenant l'antibiotique approprié. Lorsque la culture a atteint une DO_{600nm} entre 0,6-0,8, l'expression des protéines a été induite par l'ajout d'IPTG (isopropyl- β -D thiogalactoside) à différentes concentrations (0,2 - 0,5 - 1,0 et 1,5 mM). Plusieurs températures (16 °C, 20 °C, 25 °C et 30 °C) et différents temps d'induction (1 h, 2 h, 4 h, 6 h et 16 heures) ont été testés. Après cette procédure, une aliquote d'1 mL pour chacune des conditions mentionnées ci-dessus a été analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE 12%. Les conditions qui ont permis une expression maximale de rHML et rBTL ont été utilisées pour l'expression à grande échelle.

Des essais d'auto-induction ont été effectués pour remplacer l'induction par IPTG. Pour cela, les souches Rosetta-gami 2 (DE3) contenant pET32a-TEV-HML et BL21 (DE3) contenant pET32a-TEV-BTL ont été utilisées en suivant la procédure décrite par Studier, 2005.

Pour HML, qui contient deux résidus de méthionine (positions 20 e 28), les cellules Rosetta-gami 2 (DE3) transformées avec le plasmide pET32a-TEV-HML ont été cultivées dans un milieu minimal M9 par l'incorporation de sélénométhionines par la méthode de Doublie, 1997.

Les cellules des essais mentionné sont été centrifugées et les culots bactériens ont été resuspendus dans le tampon de lyse PBS (20 mM de phosphate de sodium, 150 mM NaCl pH 7,4 - 5 mL pour 1 g de culot cellulaire). Les cellules ont été lysées par pression en utilisant le *one shot cell disrupter* (Constant Systems Ltd) à 1700 bars. La séparation des fractions solubles et insolubles a été obtenue après centrifugation à 30000 x g pendant 30 min à 4 °C, le surnageant (fraction soluble) et le culot (fraction insoluble) ont été utilisés pour l'analyse par SDS-PAGE 12%. Ces évaluations ont permis de déterminer les conditions optimales pour l'expression de rHML et de rBTL.

2.2 Purification de rHML et de rBTL

La purification de rHML et de rBTL a été effectuée par chromatographie d'affinité sur une colonne de HisTrapTM (1 mL, GE Healthcare) en utilisant un AKTA-Prime (GE Healthcare) à un débit de 1 mL.min⁻¹. La colonne a été équilibrée avec un tampon PBS pH 7,4 contenant 10 mM imidazole (tampon d'équilibration). Après charge des fractions solubles préalablement filtrées, la colonne a été lavée avec cinq volumes de tampon d'équilibration. Les protéines ont ensuite été éluées par un gradient linéaire de 10 à 500 mM d'imidazole sur 15 volumes de colonne.

L'étiquette hexahistidine a été éliminée par clivage avec la protéase TEV. Les protéines d'intérêt ont été incubées pendant 16 heures à 20 °C avec la TEV diluée au 1/20 avec 2 mM de DTT. Ensuite, le mélange a été déposé sur colonne de nickel pour séparer les protéines clivées des protéines non clivées. Les protéines avec l'étiquette hexahistidine clivée, sont retrouvées dans la fraction non-retenue de la colonne. Les lectines ont ensuite été concentrée sur filtres vivaspin (5 kDa), avant leur caractérisation physico-chimique ou pour les soumettre à une chromatographie d'exclusion moléculaire avant des essais de

cristallogénèse. Pour la chromatographie d'exclusion moléculaire ont été utilisées les colonnes Superdex 75 ou Biosuite 250. Un volume de 500 μL d'échantillon à 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a été appliquée à la colonne à un débit de 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La colonne a été équilibrée et éluée de façon isocratique avec 20 mM Hepes contenant 150 mM NaCl, pH 7,5.

3. CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DES PROTÉINES rHML et rBTL

3.1 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

Des fractions d'intérêt ont été remises en suspension dans un tampon d'échantillon (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% de glycérol, 2% de SDS, 0,1 M de DTT et 0,01 de bleu de bromophénol). Pour les essais dans des conditions réductrices, les échantillons ont été placés dans un tampon contenant du β -mercaptoéthanol à une concentration finale de 5%, puis chauffés à 100 °C pendant 5 minutes. Les échantillons ont été ensuite déposés sur le gel de polyacrylamide formé à partir d'un gel d'une concentration de 4% d'acrylamide et d'un gel de séparation, dans lequel la concentration d'acrylamide varie en fonction de la masse moléculaire des protéines à séparer. Après migration, les gels ont été colorés avec une solution de coloration prête à l'emploi *Instant Blue* (Euromedex) directement, pendant 15 minutes sous agitation.

3.2 Transfert des protéines et immunodétection (*Western Blot*)

Pour la détection de rHML et de rBTL ayant l'étiquette polyhistidine, des échantillons ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. Pour cela, une tension constante de 25 V, intensité 300 mA à la température ambiante pendant 2 heures a été utilisée avec le système *Blot Module Appareil Mini EV* (GE Healthcare). Les sites non spécifiques ont été bloqués par incubation du gel avec le tampon de blocage TTBS (100 mM Tris-HCl pH 7,5, NaCl 150 mM et 1% Tween 20, lait écrémé 5%). Ensuite, la membrane a été incubée avec un anticorps monoclonal antipolyhistidine clone HIS-1 (Sigma-Aldrich). Après trois lavages de la membrane, l'anticorps conjugué a été ajouté (*anti-rabbit alkaline phosphatase conjugate*) et incubé pendant 1 heure à température ambiante. Après lavage de la membrane avec le tampon TTBS, la membrane a été lavée avec du TBS (TTBS sans Triton). Les lectines rHML et rBTL ont été visualisées en ajoutant du NBT et le substrat BCIP de la phosphatase alcaline. Finalement, la réaction a été arrêtée avec de l'eau distillée.

3.3 DLS: Diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière DLS (*Dynamic Light Scattering*) est une technique utilisée pour déterminer la taille des particules en solution. Elle mesure des fluctuations d'intensité en fonction du temps qui apparaissent lorsque des particules sont soumises au mouvement Brownien. Plus une molécule est volumineuse, moins son déplacement en solution est rapide. Les particules en mouvement vont interagir et disperser le faisceau dans toutes les directions. L'analyse de la lumière diffusée va être recueillie par un détecteur et permet de déduire un coefficient de diffusion des particules qui est converti en distribution de taille puis en rayon hydrodynamique. Elle fournit également des informations sur la présence d'agrégats, la polydispersité des échantillons et donc l'homogénéité de la solution. Il s'agit d'une technique rapide et facile à utiliser pour le contrôle de qualité des protéines et elle possède l'avantage principal de ne pas être destructrice. Les lectines rHML et rBTL ont été solubilisées dans le tampon 20 mM HEPES pH 7,5 contenant 150 mM NaCl. Les mesures ont été effectuées avec 50 µL de protéine dans des cuves en quartz (Hellma) grâce à un système « Zetasizer nano series » (Malvern Instrument).

3.4 TSA: Test de décalage thermique

Le TSA (*Thermal Shift Assay*) est un test qui surveille la stabilité thermique des protéines et examine les facteurs qui influent sa stabilité. Ces facteurs sont notamment le pH, la concentration du sel, la nature du tampon et/ou des ligands. Le test se réalise dans une plaque de 96 puits avec un appareil de QRT-PCR (Mini-Opticon, Biorad). Durant l'expérience de TSA, un gradient de température de 25 à 100 °C à raison de 1 degré par minute est induit sur un échantillon protéique mélangé à un fluorophore, le sypro-orange (Sigma-Aldrich). L'utilisation d'un fluorophore capable de fluorescer uniquement dans un environnement hydrophobe va permettre d'obtenir une cinétique de dénaturation de la protéine ainsi que de déterminer le T_m de la protéine. En effet tant que la protéine est correctement repliée, les acides aminés hydrophobes ne sont pas accessibles au fluorophore. La fluorescence mesurée reste faible. Puis lorsque la température augmente, la dénaturation progressive de la protéine rend les acides aminés hydrophobes accessibles au fluorophore. Une augmentation de la fluorescence est alors observée jusqu'à l'obtention d'un pic qui correspond au T_m de la protéine. Le calcul de la dérivée de la mesure de la fluorescence en fonction de la température facilite la lecture du T_m de la protéine d'intérêt. Différents tampons à différents pH ont été analysés pour les lectines rHML et rBTL.

4. OUTILS POUR L'ÉTUDE DES INTERACTIONS PROTÉINE-SUCRE

4.1 Tests d'hémagglutination de rHML et de rBTL

La détermination de l'activité hémagglutinante a été réalisée selon Moreira et Perrone (1977) avec quelques modifications décrites ci-dessous. Les tests ont été effectués dans des plaques de microtitration de 96 puits. Les protéines ont été préparées dans un tampon (50 mM Tris-HCl pH 7,5 + 150 mM NaCl) à une concentration de 1 mg.mL⁻¹. 50 µL de cette solution sont déposés dans le premier puits puis une gamme de concentration a été réalisée par dilution en cascade de deux en deux dans les puits suivants. Les hématies de lapin (BioMérieux) ont été diluées dans une solution saline de 150 mM NaCl pour obtenir une concentration finale à 2%. Les hématies ont également été soumises à des digestions soit avec la trypsine soit avec de la papaine selon des protocoles classiques. 50 µL de ces érythrocytes ont été ajoutés aux protéines dans chaque puits. L'activité hémagglutinante a été lue après 30 minutes d'incubation à 37 °C. La plus basse concentration en lectine pour laquelle une hémagglutination est encore visible est appelée point d'équivalence et la concentration en lectine de ce puits correspond à une unité d'hémagglutination (UH).

4.2 Analyse de la spécificité des protéines sur puce à sucres (*Glycan Array*)

Les protéines (HML, rHML, BTL et rBTL) ont été marquées par l'ester de tétrafluorophényle grâce au réactif Alexa-fluor 488-TFP (Fisher-Scientific). Les protéines ont été préparées à une concentration de 4 mg.mL⁻¹ dans un tampon 100 mM de bicarbonate de sodium pH 9,0. Le réactif TFP a été préparé extemporanément dans du DMF (diméthylformamide) à une concentration de 10 mg.mL⁻¹. Le mélange a été incubé une heure à température ambiante sous agitation. La protéine a été finalement séparée du réactif résiduel par dessalage sur colonne *D-salt polyacrylamide* (Pierce) dans un tampon 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl. Les échantillons marqués ont été ensuite envoyés au CFG (*Consortium for Functional Glycomics*) (<http://www.functionalglycomics.org/>) pour déterminer leur spécificité par *glycan arrays* à des concentrations de 0,2 - 2,0 - 20,0 et 200,0 µg.mL⁻¹ sur la puce mammifères version 5.1.

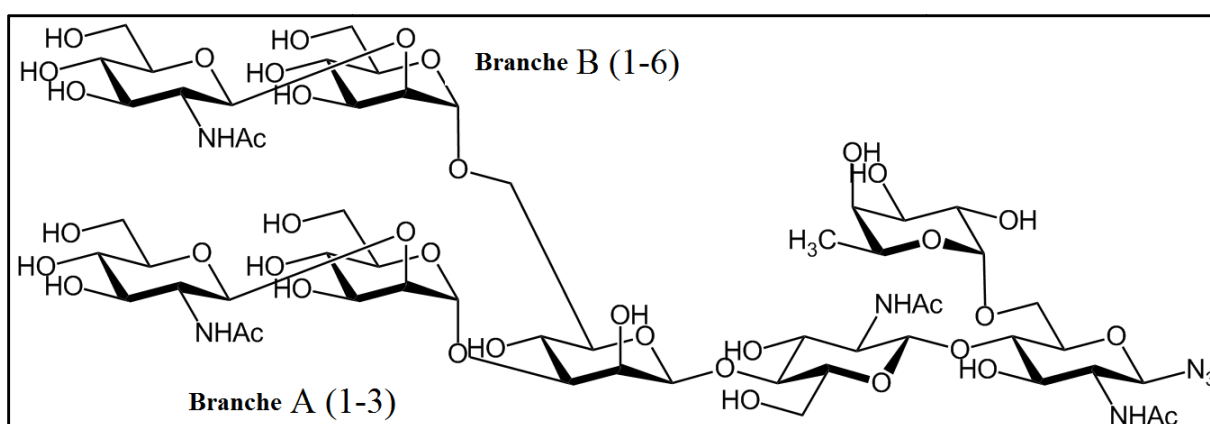
4.3 Analyse de l'interaction de BTL avec un octasaccharide fucosylé par STD-RMN

La STD-RMN (*Saturation Transfer Difference*) ou différence de transfert de saturation est une technique de spectroscopie de résonance magnétique nucléaire utilisée pour obtenir des informations sur l'interaction de petits ligands avec des protéines.

Les expériences de STD-RMN sont basées sur l'observation des signaux de résonance du ligand. Elle requiert la soustraction du spectre dans lequel la protéine a été saturée de manière sélective avec un ligand, du spectre dans lequel la protéine est libre du ligand. Seulement les signaux du ligand qui ont reçu le transfert de saturation de la protéine composeront le STD. Pour une molécule qui se lie à un récepteur, seulement les signaux des protons qui sont proches du contact avec la protéine et reçoivent le transfert de magnétisation apparaissent dans le spectre de différence. Ce transfert de saturation est une indication de liaison. Ainsi, il est possible de caractériser par STD-RMN les atomes d'hydrogène du ligand qui sont plus proches de la région de liaison à la protéine (VIEGAS *et al.*, 2011).

Pour les expériences de STD-RMN, un octasaccharide avec un noyau fucosylé (α 1-6), appelé Fuc-Octa, sélectionné à partir des résultats de puces à sucres, a été synthétisé par l'équipe de notre collaborateur Dr. Carlo Unverzagt (Université de Bayruth, Allemagne) (Figure III.2). BTL a été préparée à 0,1 mM et l'octasaccharide a été préparé 25 fois plus concentré que la protéine. Les deux échantillons ont été solubilisés dans 20 mM de tampon Tris-HCl pH 7,4 dans de l'eau lourde: D₂O. Les mesures ont été faites. Un contrôle STD-RMN a été effectué dans 99,96% D₂O en utilisant les mêmes conditions expérimentales, mais en l'absence de BTL.

Figure III.2: Structure du Fuc-Octa utilisé dans les tests de STD avec BTL



5. ESSAIS DE TOXICITÉ

5.1 Létalité contra *Artemia sp.*

L'effet de HML, rHML, BTL et de rBTL sur *Artemia sp.* a été évaluée par la méthode décrite par Carneiro *et al.*, 2013. Les cystes d'*Artemia sp.* ont éclos dans l'eau de la mer artificielle à 28 °C sous aération et un éclairage constant. Les cystes ont été incubés dans un tube cylindre de polyéthylène à une concentration de 1,0 g.L⁻¹ dans l'eau de la mer. Après 48 heures, l'aération a été suspendue et la lumière a été dirigée vers le fond du cylindre. En raison de son comportement phototrophe, les nauplii ont migré vers la lumière et se sont accumulés au fond du tube, tandis que les cystes qui n'ont pas éclos sont restés à la surface. Les nauplii en bonne santé, qui se sont regroupés au fond du tube, ont été recueillis et utilisés pour le test.

Les lectines (HML, rHML, BTL et rBTL) ont été dissoutes dans l'eau de la mer artificielle à une concentration de 200 µg.mL⁻¹. Les tests ont été effectués en utilisant des plaques de Limbro® de 24 puits. Chaque puits a été rempli avec 10 nauplii, une solution de lectine (12,5 - 25,0 - 50,0 ou 100 µg.mL⁻¹) et l'eau de la mer artificielle, avec un volume total de 2 mL. Les tests ont été effectués en trois exemplaires et le contrôle négatif ne contenait que 2 mL d'*Artemia sp.* Après 24 h et 48 heures d'incubation, le nombre de nauplii morts a été compté et la toxicité a ensuite été évaluée.

5.2 Culture cellulaire et essais colorimétriques MTT

Les cellules du cancer du poumon (A549) ont été cultivées dans le milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) à 37 °C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂. La détermination de la concentration des lectines a été mesurée en utilisant le kit BCA *Protein Assay* (Pierce). Pour les essais, les lectines ont été dissoutes dans DMEM contenant 10% de SVF à différentes concentrations (12,5 - 25,0 - 50,0 ou 100 µg.mL⁻¹). Le contrôle négatif était de la BSA à 50,0 et 100 µg.mL⁻¹. La cytotoxicité de HML, rHML, BTL et de rBTL contre des lignées de cellules CCL-185 et HTB-38 a été évaluée en utilisant le test MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium). Les cellules ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits (1 x 10⁴ cellules/puits). Après 24 heures, les cellules ont été exposées à différentes concentrations des lectines. Un dosage MTT a été fait 24 h, 48 h et 72 heures après le traitement. L'absorbance a été mesurée en utilisant un lecteur de microplaques (Victor™ X5

Multilabel Plate Reader, PerkinElmer) à 492 nm (A_{492nm}). Le pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire a été calculé à partir de l'équation suivante selon Zheng *et al.* 2011.

$$\text{Le pourcentage d'inhibition} = [1 - (A_{492nm} \text{ pour les cellules traitées} / \text{cellules non traitées à } A_{492nm})] \times 100$$

decontrôle négatifne contenait que des artemias

Toutes les observations ont été validées par, au moins, trois expériences indépendantes en triple exemplaire pour chaque expérience. Les données ont été analysées par le test ANOVA suivi d'un test de Tukey pour des comparaisons multiples. Il a été considéré comme significatif $P < 0,05$ pour toutes les analyses. Les données ont été exprimées en moyenne \pm SEM (erreur type de la moyenne).

6. ÉTUDE STRUCTURALE DE rHML ET DE rBTL

6.1 Cristallisation de rHML et de rBTL

Pour les essais de cristallisation, la méthode utilisée était la goutte pendante par diffusion de vapeur, en utilisant des plaques de 48 puits (Hampton Research). Une goutte de 1 μL de solution concentrée en protéine (4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour rHML ou 6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour rBTL) a été déposée sur une lamelle en verre siliconée et diluée au demi par une solution de précipitant (1 μL). La lamelle a été ensuite retournée et scellée avec de la graisse sur un puits contenant ce même agent précipitant (200 μL). Après l'obtention de cristaux, des essais d'optimisation ont été effectués en faisant varier la concentration de l'agent de précipitation et le pH de la solution, en répétant le procédé de diffusion de vapeur. Un criblage complet de plusieurs kits de cristallisation a été réalisé sur la plateforme de cristallisation de l'EMBL, Grenoble (HTX-Lab). La technique de la goutte assise par diffusion de vapeur a été utilisée dans ce cas avec des volumes de 100 nl de protéine et de 100 nl de précipitant. Les essais de cristallisation ont également été faites en utilisant un robot modèle Mosquito cristallisation®. Les plaques ont été maintenues à 20 °C. Les cristaux obtenus ont été placés dans une boucle de taille appropriée et une solution cryoprotectante si nécessaire avant d'être congelés dans l'azote liquide et transportés à l'ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*), Grenoble, France. Les expériences de diffractions aux rayons X ont permis de déterminer la nature des cristaux: protéine ou sel.

CHAPITRE IV:
RÉSULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE IV: RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. EXTRACTION ET PURIFICATION DES LECTINES SAUVAGES HML ET BTL

Les lectines sauvages HML et BTL ont été obtenues à partir de la chromatographie d'échange d'anions sur DEAE-cellulose. Les fractions non retenues (PI DEAE) ont montré une activité d'hémagglutinante contre les érythrocytes de lapin traités et non traités avec des enzymes protéolytiques. Le Tableau IV.1 et la Figure IV.1 montrent les résultats de la purification. En plus, les deux protéines ont été obtenus pures et libres de contaminants, similaires aux résultats obtenus par Nagano *et al.*, 2002 et Aionz *et al.* 1995, respectivement. À partir de 100 g des d'algues écrasées, il est généralement possible de purifier environ 70 mg d'HML et 80 mg de BTL.

Tableau IV.1: Tableau de purification des lectines HML et BTL, respectivement.

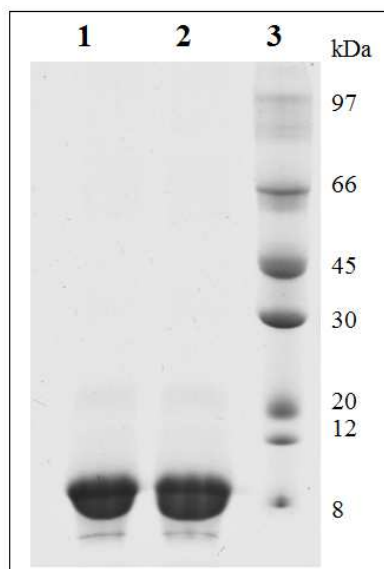
Fraction	¹ Protéine (mgmL ⁻¹)	Protéine totale (mg)	² Titre (UHmL ⁻¹)	Activité totale (UH)	³ A.H (UHmg ⁻¹)	Rendement (%)	⁴ F. P
Extrait	0,019	0,57	2	60	105,2	100	1
Fraction 0-70	0,019	0,095	8	40	421,05	66,7	4
PI DEAE	0,0016	0,48	4	120	250	200	2,37

Fraction	¹ Protéine (mgmL ⁻¹)	Protéine totale (mg)	² Titre (UHmL ⁻¹)	Activité totale (UH)	³ A.H (UHmg ⁻¹)	Rendement (%)	⁴ F. P
Extrait	0,095	2,28	256	6144	2694	100	1
Fraction 0-60	0,034	0,17	512	2560	15059	41,68	5,58
PI DEAE	0,0065	0,27	128	5504	19692	86,55	7,3

1) La concentration de protéines solubles (BRADFORD, 1976); 2) Titre: unité hémagglutinante (UH.mL⁻¹); 3)A.H: Activité Hémagglutinante (UH.mg⁻¹), la relation entre

l'activité d'hémagglutination et la concentration de protéines totales; 4) F.P: facteur de purification calculée à partir de la relation entre l'activité hémagglutinante de l'extrait total et chaque étape suivante.

Figure IV.1: Électrophorèse sur gel de polyacrylamide 15% de HML et de BTL en conditions de dénaturation et réductrices.



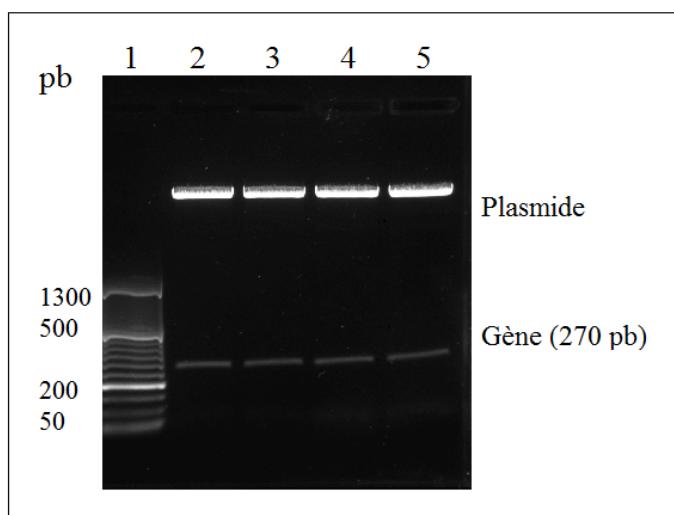
La chromatographie par échange d'anions sur colonne DEAE-cellulose est souvent utilisée pour isoler les lectines d'algues, comme les lectines de *Hypnea cervicornis* (NASCIMENTO *et al.*, 2006), *Bryothamnion seaforthii* (AINOUZ *et al.*, 1995), *Solieria robusta* (HORI *et al.*, 1988), *S. filiformis* (BENEVIDES *et al.*, 1996), *Amansia multifida* (COSTA *et al.*, 1999), *Gracilaria ornata* (LEITE *et al.*, 2005), entre autres. Dans la plupart des purifications, la colonne est efficace pour retenir tous les pigments, comme les phycobilines présents en abondance chez les algues rouges, ce qui facilite l'obtention des lectines pures dans les fractions non retenues sur la colonne. Ainsi, BTL et HML ont été purifiés sur DEAE-cellulose et en suite utilisées pour les tests de spécificité sur puce à sucre et les tests de toxicité.

2. CLONAGE, EXPRESSION ET PURIFICATION DE rHML ET DE rBTL

Les gènes synthétiques de HML et BTL ont été clonés dans différents vecteurs (pET32a, pET32a-TEV et pMalp2-TEVNX) en utilisant les sites de restriction *XhoI* et *NcoI*. Après digestion par ces deux enzymes des clones sélectionnés, la présence d'un fragment spécifique de la taille attendue pour les gènes codant pour HML et BTL d'environ 270 pb a

confirmé la transformation et la présence du gène d'intérêt (Figure IV.2). Le séquençage a démontré que la séquence nucléotidique était correcte et dans le bon cadre de lecture.

Figure IV.2: Validation de la transformation des cellules d'*E. coli* avec les plasmides d'intérêt, après digestion avec *Nco*I et *Xho*I.



1) Marqueur de poids moléculaire (50 bp DNA Ladder/New England Biolabs). 2) pET32a-HML; 3) pET32a-TEV-HML; 4) pET32a-BTL; 5) pET32a-TEV-BTL.

Ensuite, ces plasmides ont été transformés par choc thermique dans les différentes souches d'*E. coli* sélectionnées: pour exprimer rHML et rBTL: BL 21 (DE3), Origami (DE3), Origami B (DE3), Rosetta-gami 2 (DE3). Plusieurs conditions d'expression ont été testées afin de déterminer celles qui permettraient d'obtenir le plus de protéine sous forme soluble. Plusieurs paramètres peuvent en effet influencer le rendement de protéines recombinantes exprimées dans des systèmes hétérologues. Parmi ces paramètres, on peut citer le type de la cellule hôte, la température d'induction, la concentration de l'inducteur (IPTG), la durée d'induction, la densité optique au moment de l'induction (DO_{600nm}) ainsi que le vecteur utilisé pour le clonage (GRASLUND *et al.*, 2008). Pour déterminer les conditions optimales pour l'expression d'une protéine particulière, il faut tenir compte de tous ces paramètres. Toutefois, ces stratégies ne fournissent pas et ne provoquent pas le même degré de réussite pour chacune des différentes protéines. Par conséquent, la détermination du rendement et de la solubilité est toujours un processus empirique (VILLAVARDE; CORRIÓ 2003).

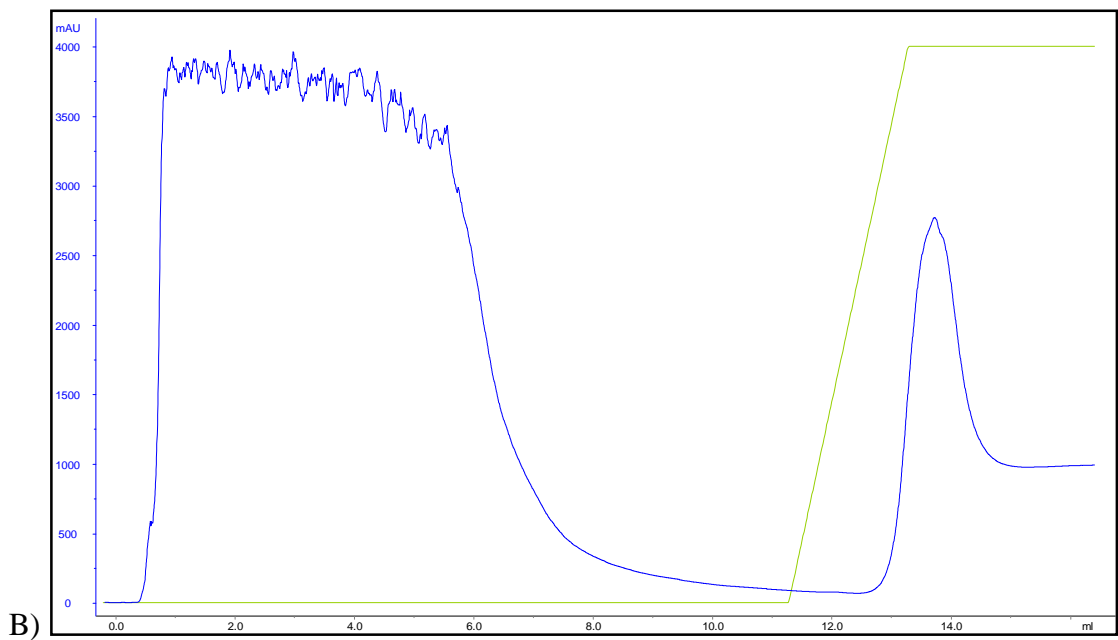
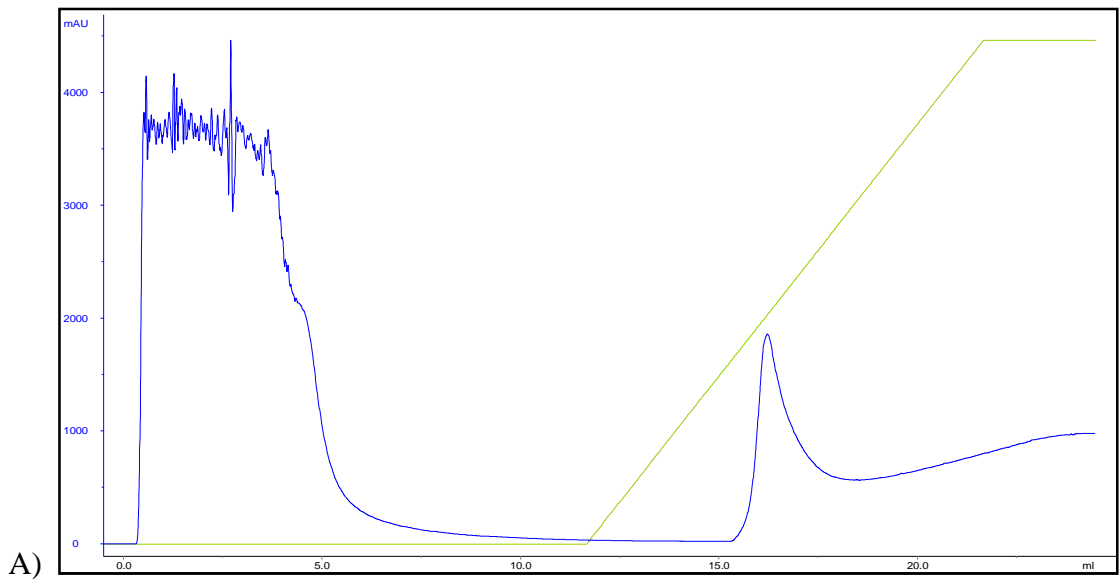
Dans les différents essais, quelques conclusions peuvent être tirées. La variation de température, par exemple, modifie considérablement la proportion entre les protéines

solubles et agrégées sous forme de corps d'inclusion. Plus la température est haute, plus la protéine exprimée tend à se concentrer dans la fraction insoluble. Les essais ont montrés qu'une concentration en IPTG de 0,2 mM était suffisante pour induire l'expression de rHML et rBTL. Le temps d'induction est dépendant de la température d'induction choisie et il ne doit pas être trop long sinon les protéines se dégradent ou s'agrègent. Ces résultats sont cohérents avec une revue de la littérature faite par Francis et Page 2010.

En ce qui concerne les différents plasmides testés, les meilleurs résultats ont été obtenus avec le plasmide pET32a-TEV. Dans ce plasmide la protéine recombinante est exprimée avec une protéine de fusion (thiorédoxine) suivie d'une étiquette hexahistidine clivable avec la protéase TEV à l'extrémité N-terminale. La thiorédoxine aide la solubilité des protéines et aussi la formation des ponts disulfures. Ces protéines de fusion ont été exprimées dans les souches d'*E.coli* BL21 (DE3) pour BTL et Rosetta-gami 2 (DE3) pour HML. Les meilleurs conditions d'expression ont été pour une induction avec 0,2 mM IPTG à 16 °C pendant 16 h lorsque les cellules avaient atteint une DO_{600nm} entre 0,6-0,8. Les essais d'auto-induction n'étaient pas satisfaisants car la protéine a seulement été obtenue sous forme de corps d'inclusion probablement à cause de la culture réalisée à 37 °C. Si de nouveaux essais devaient être tentés dans le milieu autoinductible, d'autres températures devraient être testées. Pour rHML, des essais d'incorporation de la sélénométhionine ont été réalisés mais ont échoués car la souche Rosetta-gami 2 avec le plasmide en question n'a pas réussie à croître dans le milieu minimum nécessaire dans ce protocole, pour une raison indéterminée.

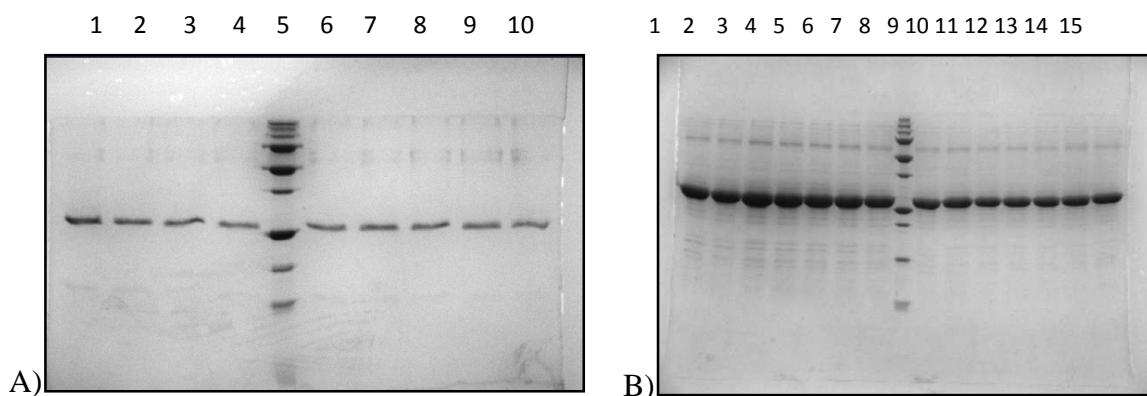
Une fois les meilleures conditions déterminées, les bactéries ont été lysées par pression et la purification a été effectuée par chromatographie d'affinité sur une colonne HisTrap, 1 mL (Figure IV.3 et IV.4).

Figure IV.3: Chromatogramme de l'application de la fraction soluble des lysats de cellules d'*E.coli* transformées avec le gène rHML (A) ou rBTL (B), sur une résine avec du nickel immobilisé (HisTrap).



Tampon d'équilibre: PBS pH 7,4 + 10 mM d'imidazole, tampon d'éluion: PBS pH 7,4 + 500 mM imidazole, flux: 1 mL.min⁻¹. Vert: gradient d'imidazole (10-500 mM), bleu (absorption à 280 nm).

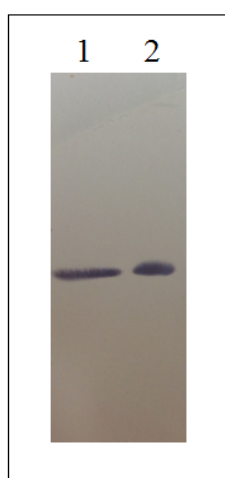
Figure IV.4: Profil électrophorétique des fractions protéiques éluées par chromatographie d'affinité sur colonne HisTrap.



A) rHML et B) rBTL. Elution avec un gradient d'imidazole (10-500 mM). Les puits 5 et 8 représentent les protéines marqueurs de poids moléculaire (10, 15, 20, 25,37, 50 et 75 kDa).

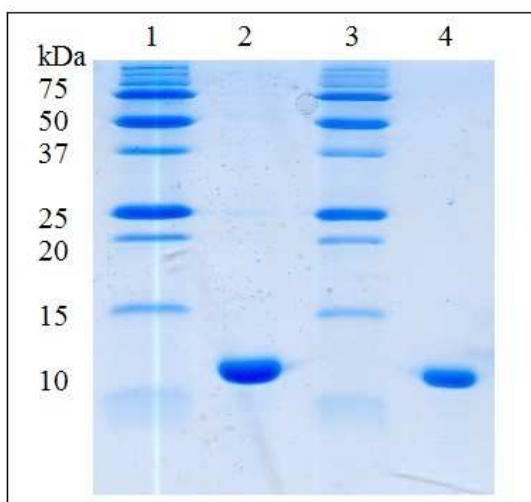
L'analyse sur gel SDS-PAGE 15% des fractions éluées de la HisTrap a montré la présence des protéines rHML et rBTL. Les bandes d'intérêt ont un poids moléculaire apparent de 25 kDa correspondant à la fusion thioredoxine et l'étiquette hexahistidine d'environ 15 kDa avec la protéine d'intérêt (rHML ou rBTL) d'environ 9 kDa. Les fractions les plus pures ont été rassemblées et concentrées à 1 mg.mL^{-1} avant d'être analysées par Western blot (Figure III.5). Un immunomarquage spécifique des deux lectines recombinantes est observé confirmant l'absence de dégradation et la présence de l'étiquette polyhistidine.

Figure IV.5: Western blot de thioredoxine-His₆-rHML (1) et thioredoxine-His₆-rBTL (2), respectivement.



Ensuite, l'étiquette polyhistidine et la thiorédoxine ont été éliminées par clivage avec la protéase TEV. Les échantillons ont été redéposés sur colonne de nickel afin de séparer la thiorédoxine et l'étiquette polyhistidine qui sont retenues de la lectine d'intérêt qui n'est pas retenue. L'analyse sur SDS-PAGE 15% confirme la coupure totale de la fusion et que les protéines rHML et rBTL étaient pures et libres de contaminants (Figure IV.6).

Figure IV.6: Profil électrophorétique de rHML et rBTL, respectivement 2 et 4. Les puits 1 et 3 représentent les marqueurs de poids moléculaire.



Les protéines ainsi obtenues ont été concentrées et soumises à une chromatographie d'exclusion moléculaire. Celle-ci a montré que les deux lectines recombinantes étaient monomériques et a permis d'éliminer les agrégats présents.

Malgré tous les efforts dans l'optimisation de l'expression hétérologue de rHML et de rBTL, le rendement final de la purification était d'environ 2 et 4 mg de protéine soluble pour quatre litres de culture pour rHML et rBTL, respectivement. Ces résultats peuvent être insatisfaisants, par rapport aux études précédentes impliquant l'expression des lectines de microalgues et de macroalgues, où dans la plupart des cas, les protéines recombinantes présentaient un bon rendement (GIOMARELLI *et al.*, 2006; MASSI, AHMAD, 2012; XIONG *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2011; GAO *et al.*, 2010). Cependant, rHML et rBTL présentent de nombreux ponts disulfures probablement impliqués dans leur repliement et leur stabilité. La bonne formation de ces ponts peut se révéler difficile lors de l'expression en système hétérologue bactérien. Malgré un rendement faible, les deux lectines ont pu être exprimées sous forme soluble, obtenues sous forme très pure et actives contre les érythrocytes de lapin

(indiqué ci-dessous). Il a été ainsi possible d'obtenir les quantités suffisantes de ces deux protéines pour leur caractérisation physico-chimique.

3. CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE

L'homogénéité de rHML et rBTL a été analysées par DLS. Les mesures réalisées ont montré qu'après la colonne de nickel, les protéines étaient monomériques et qu'il n'y avait aucune formation d'agrégats à faibles concentrations. Cependant des agrégats sont détectés à des concentrations supérieures à 3 mg.mL⁻¹ surtout pour rHML et il y a un haut degré de polydispersité. La formation de multimères ou d'agrégats de HML et de BTL a été aussi observée au cours de mesures en spectrométrie de masse et confirmée pour HML par des données d'ultracentrifugation analytique (NAGANO *et al.*, 2005b; CALVETE *et al.*, 2000). Ces multimères résultent probablement de la réorganisation des ponts disulfures et de leur échange avec des monomères voisins.

Des tests de dénaturation thermique ont été réalisés afin d'analyser les meilleures conditions de tampon des lectines et d'ainsi éviter, ou au moins atténuer, l'état d'agrégation des protéines. rHML est plus stable dans les tampons 20 mM Tris-HCl ou HEPES pH 7,5 contenant tous les deux 150mM NaCl. Pour rBTL les meilleurs tampons étaient entre pH 7,0 et 8,5 avec 20 mM Tris-HCl ou HEPES pH 7,5 ou bicine pH 8,5 supplémenté de 150 mM NaCl.

L'eau de la mer est légèrement alcaline ce qui conduit la plupart des lectines d'organismes marins à présenter une activité optimale à pH neutre ou légèrement basique (PAJIC *et al.*, 2002; MOURA *et al.*, 2006; DRESCH *et al.*, 2008). Il est supposé que les lectines peuvent jouer un rôle à la fois intra et extracellulaire (VAST *et al.*, 2008). La présence de lectines ayant une activité optimale à un pH différent de celui du milieu environnant laisse donc penser que ces lectines seraient situées dans des fractions subcellulaires où le pH est différent du milieu prédominant.

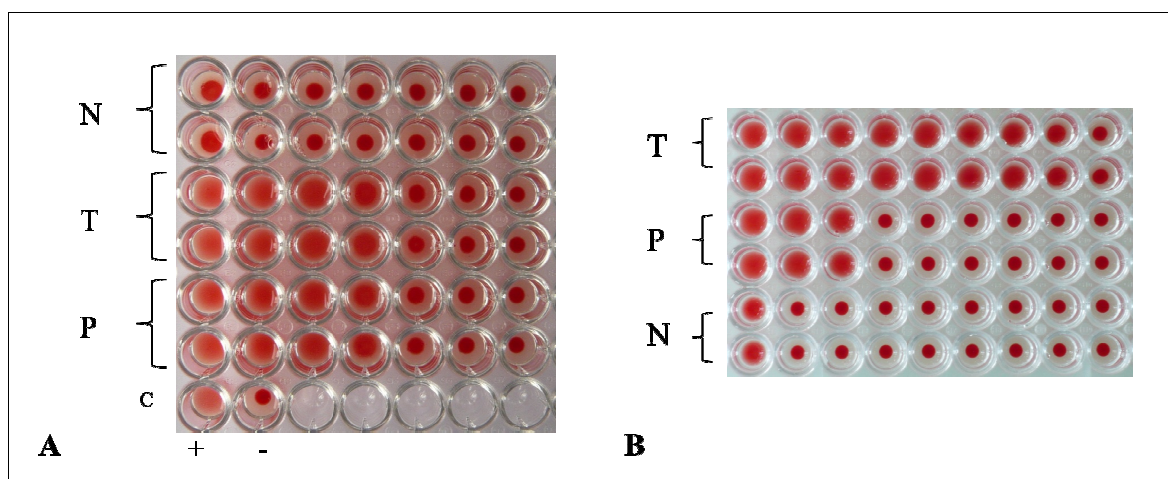
4. OUTILS POUR L'ÉTUDE DES INTERACTIONS PROTÉINE-SUCRE

4.1 Tests d'hémagglutination de rHML et rBTL

Pour confirmer le repliement correct et la fonctionnalité de rHML et rBTL, des tests d'hémagglutination ont été réalisés avec une suspension d'érythrocytes de lapin à 2%

traités et non traités avec des enzymes protéolytiques. Ce test est rapide, facile à réaliser et analyser et concluant (Figure IV.7).

Figure IV.7: Propriétés hémagglutinantes de rHML (A) et rBTL (B).



Sang de lapin traité avec les enzymes protéolytiques trypsine (T) et papaïne (P). Le N fait référence au sang non traité. Le C correspond aux contrôles positif "+" (HML sauvage à $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) et négatif "-" ($50 \text{ mM Tris} + 150 \text{ mM NaCl}$).

rHML a montré une activité hémagglutinante supérieure lorsqu'elle est en contact avec des hématies traitées par les enzymes trypsine ou papaïne. L'agglutination détectée à une dilution de 2^4 , donne à rHML une activité spécifique de 16 UH.mg^{-1} tandis que son homologue sauvage a montré une activité spécifique beaucoup plus élevée de 250 UH.mg^{-1} . rBTL a montré une meilleure activité après contact avec les érythrocytes traités à la trypsine. L'agglutination de rBTL, détectée à une dilution de 2^8 , correspond à une activité spécifique de 256 UH.mg^{-1} , tandis que BTL sauvage a montré une activité spécifique de $19.692 \text{ UH.mg}^{-1}$ de protéine, donc rBTL a une activité beaucoup plus faible que BTL sauvage. Le titre plus élevé pour les lectines sauvage par rapport aux lectines recombinantes peut être associée à la gamme des isoformes présentes dans les fractions protéiques. La présence d'isoformes n'est pas rare pour les lectines d'algues et a été observée entre autres pour les espèces de *E. serra* (HORI *et al.*, 2007), *B. seaforthii* (NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012; MEDINA-RAMIREZ *et al.*, 2006), *H. japonica* (HORI *et al.*, 2000), *B. plumosa* (YON *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2010, 2011) et *E. prolifera* (AMBROSIO *et al.*, 2012).

La détermination du titre était souvent difficile à la fois pour les protéines recombinantes et natives avec le sang non traité (NAGANO *et al.*, 2005b; AINOZ *et al.*,

1995). Elle a nécessité un traitement des érythrocytes de lapin avec des enzymes protéolytiques trypsine et papaine. Ceci implique que les glucides reconnus par ces lectines sont probablement «masqués» par le glycocalyx, et que leur exposition n'est possible qu'après traitement enzymatique. Le même phénomène a été observé pour d'autres lectines d'algues comme les lectines de *Caulerpa cupressoides* (AINOUZ; SAMPAIO, 1991), *Gracilaria ornata* (LEITE *et al.*, 2005), *Oscillatoria agardhii* (SATO *et al.*, 2000; SATO; HORI, 2009), ou *H. cervicornis* (NASCIMENTO *et al.*, 2006).

Avant le clivage de la fusion thiorédoxine et de l'étiquette d'histidine, les deux protéines thiorédoxine-His₆-HML et thiorédoxine-His₆-BTL étaient capables de reconnaître et d'agglutiner des érythrocytes, mais avec une activité moindre que les lectines rHML et rBTL finales clivées. Cet effet peut être attribué au blocage partiel du ou des sites de liaison aux glucides ou à de changements de conformation causés par la présence de la protéine de fusion.

4.2 Analyse de la spécificité des protéines par puce à sucres (*Glycan Array*)

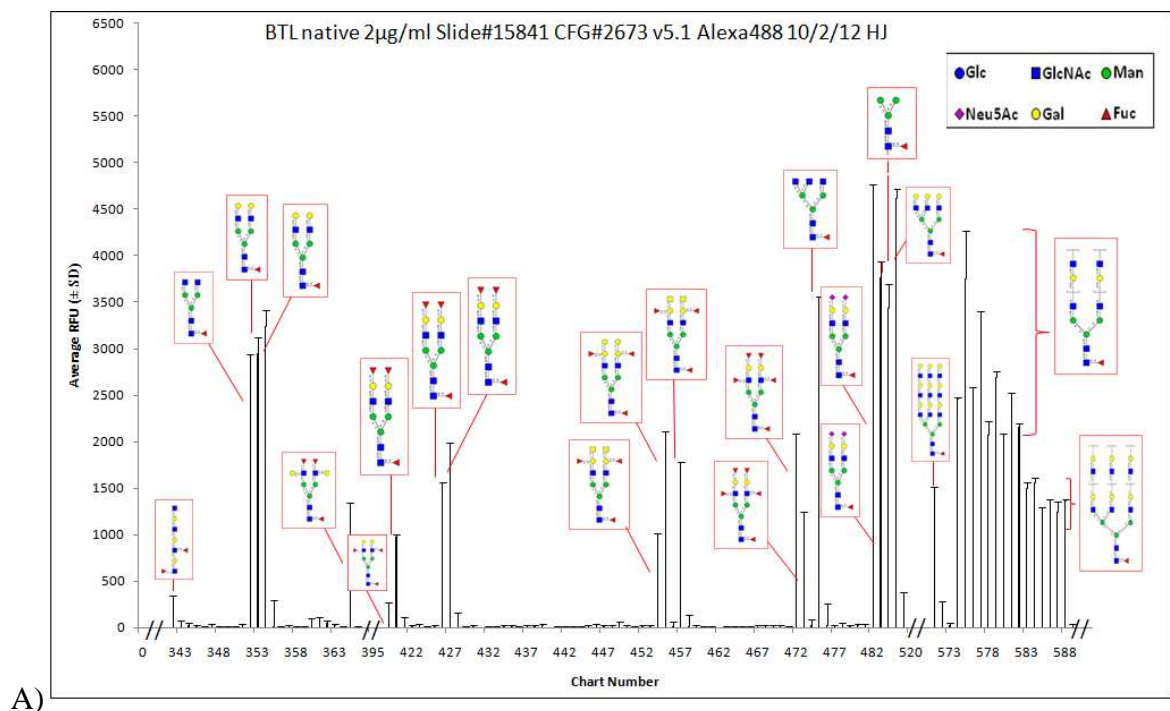
Les méthodes d'analyse de spécificité disponibles auprès du CFG permettent de tester un très grand nombre d'oligosaccharides avec peu de protéine. Les lectines HML, rHML, BTL et rBTL, marquées avec le fluorochrome Alexa Fluor-488, ont été envoyées pour analyse. Les 610 oligosaccharides de la puce mammifère version 5.1 ont été testés à quatre concentrations différentes en lectine: 0,2 - 2,0 - 20,0 - 200,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

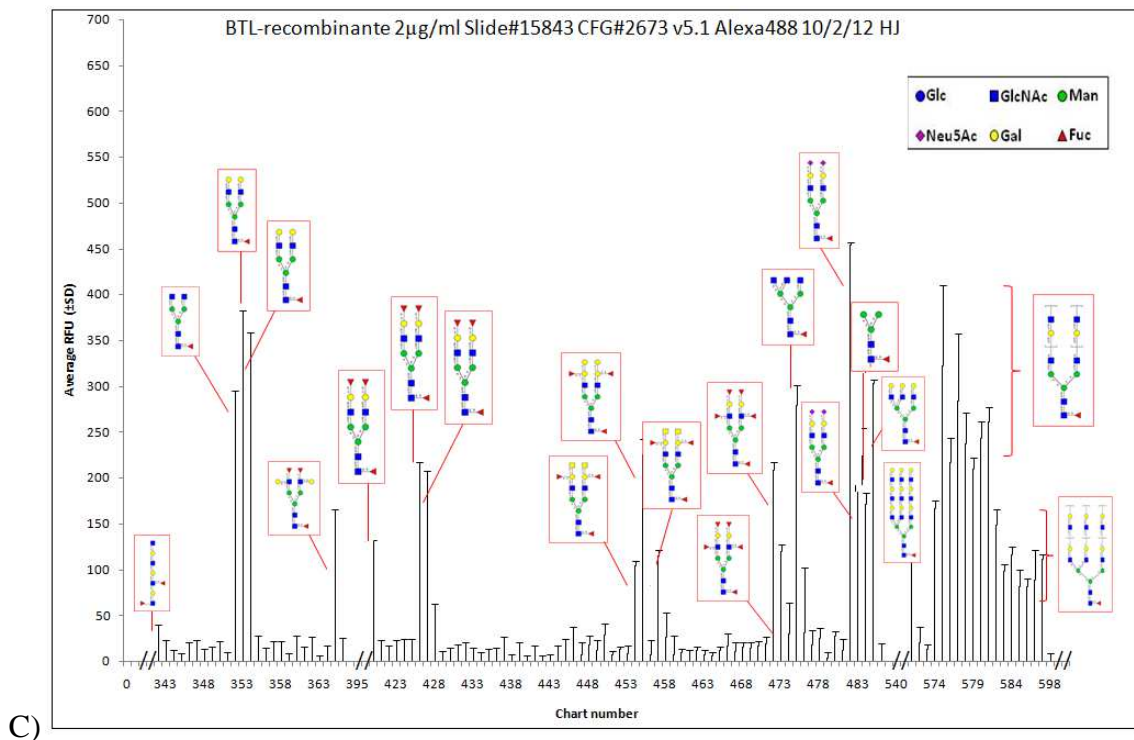
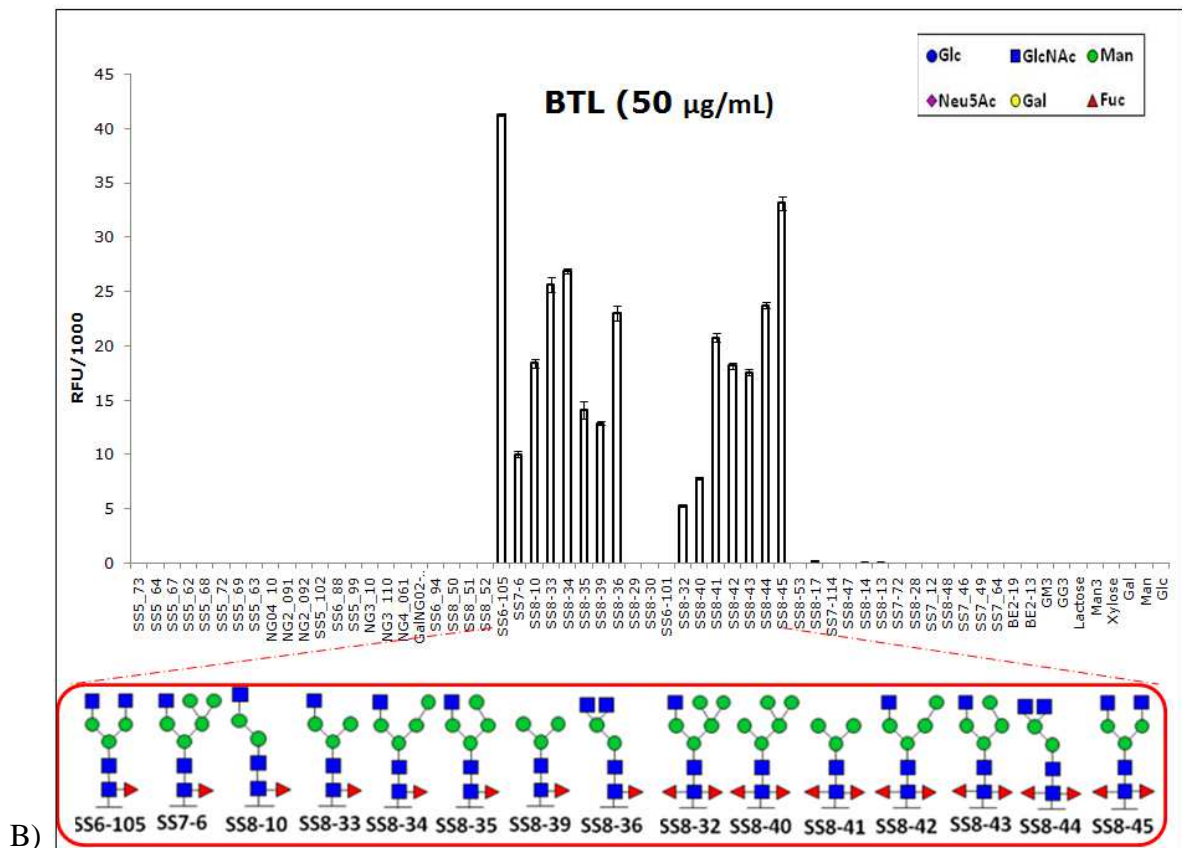
Les données observées pour la BTL sauvage (Figure IV.8A) montrent une spécificité remarquable pour les *N*-glycanes complexes présentant un noyau fucosylé (α 1-6) avec en particulier le motif (Man α 1-6(Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc β). L'affinité de liaison pour ces *N*-glycanes est affectée par la présence de résidus de GlcNAc bisectés puisqu'aux faibles concentrations (0,2 et 2,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), le signal de fluorescence est perdu mais pas aux concentrations élevées comme 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Ainsi, nous pouvons dire que BTL peut reconnaître presque tous les *N*-glycanes complexes contenant une fucosylation du noyau (α 1-6) utilisés dans cette étude. Il est très probable que BTL ait une préférence pour les *N*-glycanes non bisectés, ce qui implique que la liaison de la lectine au fucose de noyau (α 1-6) peut être affectée par des interférences stériques de la branche. Cette hypothèse est tout à fait plausible puisque BTL n'a montré aucune spécificité de liaison pour les *N*-glycanes tétra-antennés. On a également observé que la lectine reconnaît préférentiellement les *N*-glycanes bi- et tri-antennés de chaîne courte. L'allongement des branches dans les tri-antennés diminue

l'affinité, par rapport l'allongement des branches dans les bi-antennés. L'ajout d'acide sialique à l'extrémité non réductrice du glycanes influe positivement sur la spécificité de liaison de la lectine. BTL ne reconnaît pas d'autre type de glycanes fucosylés que ceux ayant le fucose de noyau (α 1-6). La bifucosylation (α 1-3) et (α 1-6) du noyau est certes reconnue mais ne dépend que de la présence du fucose (α 1-6) étant donné qu'en présence de fucose (α 1-3) il n'y a pas de liaison, comme démontré par les données de puce à sucres préparés par notre collaborateur Dr. Niels Reichard (Université de San Sebastián, Espagne). Ainsi, nous pouvons conclure que BTL est strictement spécifique pour les *N*-glycanes complexes comportant le fucose de noyau (α 1-6) (Figure IV.8B).

La spécificité de rBTL a également été analysée dans les mêmes conditions expérimentales de BTL. Les résultats présentés dans le graphique (Figure IV.8C) ont montré que la lectine recombinante a la même spécificité de liaison aux *N*-glycanes, avec la base de fucosylation (α 1-6), que la lectine sauvage, mais elle était moins active, ce qui peut être vérifié par la fluorescence relativement faible, par rapport à la lectine sauvage à la même concentration.

Figure IV.8: Etudes de la spécificité de BTL et rBTL sur puces à sucres.



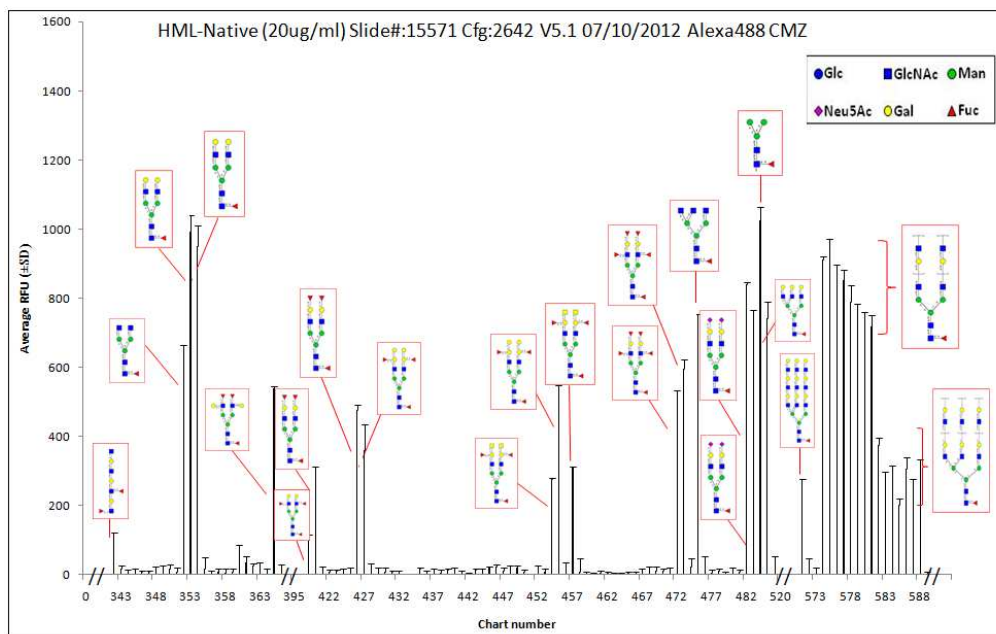


(A): résultats pour BTL marquée à l'Alexa fluor-488, $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ sur la puce mammifère version 5.1 du CFG (sucres 1 à 610 et RFU: unités relatives de fluorescence. Les résultats complets, y compris une liste des oligosaccharides est disponible à <http://www.functionalglycomics.org/>. (B): Liaison de BTL, $50,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ aux glucides disponibles du Département de nanomatériaux biofonctionnels. Le monofucosylation fait

référence à la liaison fucose (α 1-6) et les bifucosylations aux liaisons fucose (α 1-3) et fucose (α 1-6). (C): Résultats pour rBTL marquée à l'Alexa fluor 488, $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ sur la puce mammifère version 5.1 du CFG. Les représentations des oligosaccharides ont été faites à partir de la plate-forme GlycoWork (CERONI *et al*, 2007).

Pour HML, les mêmes conclusions peuvent être tirées quant à une spécificité stricte pour les *N*-glycanes complexes avec une fucosylation (α 1-6) du noyau (Figure IV.9). Il a été cependant impossible de caractériser la spécificité de la lectine recombinante rHML auprès du CFG. Comme décrit précédemment, rHML a une forte tendance à former des agrégats et est, de plus, très instable. L'ultracentrifugation analytique avait en effet montré une forte tendance à l'agrégation pour HML et en particulier à pH basiques (NAGANO *et al.*, 2005b). Lors du marquage avec l'Alexa Fluor-488, rHML a dû être solubilisée dans 100 mM de bicarbonate de sodium pH 9,0. Bien que la protéine marquée présentait une activité hémagglutinante, il est donc fortement probable qu'elle se soit agrégée au cours du temps et du transport. Peut-être qu'un marquage avec de la biotine, qui se réalise à pH neutre, serait plus approprié pour déterminer le profil de liaison aux oligosaccharides de rHML auprès du CFG.

Figure IV.9: Etudes de la spécificité de HML sur puce à sucres.



Liaison de HML ($20,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) marquée à l'Alexa Fluor-488 à tous les glucides disponibles de la puce mammifère version 5.1 du CFG (1 à 610) par rapport à RFU (unités relatives de fluorescence). Les résultats complets, y compris une liste des oligosaccharides est disponible sur <http://www.functionalglycomics.org/>. Les représentations des oligosaccharides ont été faites à partir de la plate-forme GlycoWork (CERONI *et al*, 2007).

Des spécificités semblables à celles de HML et BTL ont également été signalées pour les hypnines, des lectines de l'algue rouge *H. japonica*. HJA1, HJA2 et HJA3 reconnaissent spécifiquement les *N*-glycanes complexes avec une fucosylation (α 1-6) du noyau et pas les autres oligosaccharides fucosylés examinés (liaisons α 1-2, α 1-3 ou α 1-4). Les trois hypnines ont pratiquement montré la même affinité et la même spécificité pour oligosaccharides entre elles, ce qui implique que la différence de trois acides aminés dans la séquence primaire des hypnines n'est pas situés dans le site de liaison aux glucides (OKUYAMA *et al.*, 2009; KOBAYASHI *et al.*, 2012).

Les comparaisons de séquences primaires de BTL et des HJAs (1, 2 et 3) ont révélé des similitudes entre elles et avec les lectines de *Bryothamnion seaforthii* de la côte du Brésil (BSL2, BSL3 et BSL4) et de la côte des Caraïbes (BSHV1, BSHV2, BSHV3 et BSHV4) (NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012; MEDINA-RAMIREZ *et al.*, 2006). En revanche, il y a des différences considérables entre les lectines d'algues rouges *H. musciformis* et *H. cervicornis*, trouvés sur la côte du Brésil et les lectines de *H. japonica* de la côte du Japon (NAGANO *et al.*, 2005b), malgré des spécificités très similaires comme le montre ce travail.

Beaucoup de lectines avec des propriétés de liaison au fucose (α 1-6) ont été obtenues à partir de différentes sources: *Lotus tetragonolobus* agglutinin (LTA), *Ulex europeus* agglutinin 1 (UEA-1) (revu par MATSUMURA *et al.*, 2007), *Lens culinaris* agglutinin (LCA-1), *Pisum sativum* agglutinin (PSA) (TATENO; NAKAMURA; HIRABAYASHI, 2009) de plantes, *Aleuria aurantia* lectine (AAL) (WIMMEROVA *et al.*, 2003), *Aspergillus aryzae* lectine (AOL) (MATSUMURA *et al.*, 2007), *Ralstonia solanacearum* lectine (RSL) (SUDAKEVITZ; IMBERTYU; GILBOA, 2002), *Pholiota squarrosa* (PhoSL) (KOBAYASHI *et al.*, 2012) de champignons, *Burkholderia ambifaria* (BambL) (AUDFRAY *et al.*, 2012) et *B. cenocepacia* (BC2L -C) (SULAK *et al.*, 2011) de bactéries. Cependant, la spécificité de liaison pour la fucosylation (α 1-6) du noyau des *N*-glycanes n'est pas conservée. AAL, par exemple, reconnaît les fucoses liés en (α 1-3), (α 1-4) et (α 1-6), UEA et LTA reconnaissent le fucose (α 1-2) tandis que LCA reconnaît le fucose (α 1-6) mais aussi les résidus de mannose. Seules AOL et PhoSL reconnaissent le fucose (α 1-6) plus précisément. LCA et AAL sont utilisés comme marqueurs des glucides avec une fucosylation du noyau sur les glycoprotéines, et sont actuellement commercialisées à cet effet.

Les structures fucosylées sont connues pour être impliquées dans de nombreux événements biologiques. La fucosylation est largement distribuée dans les tissus des

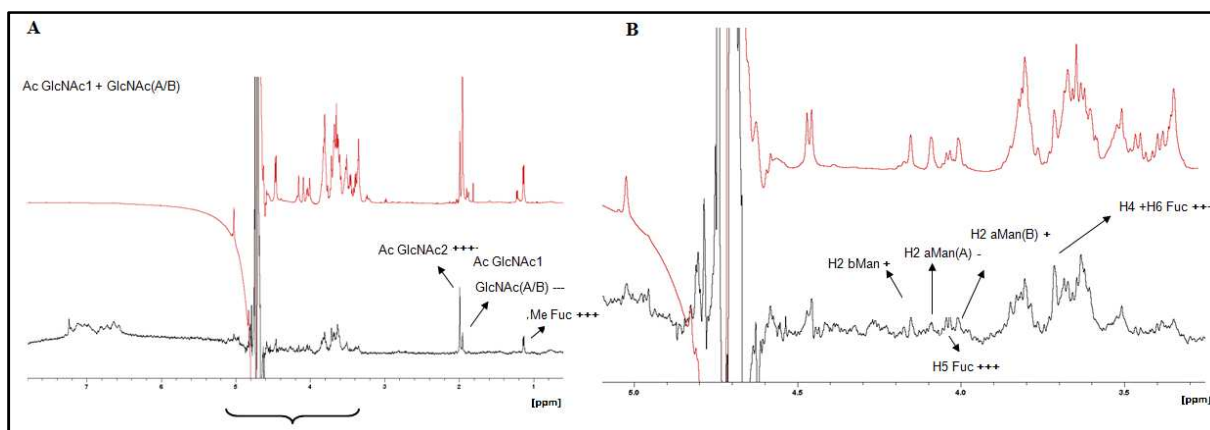
mammifères et est altérée dans certaines conditions pathologiques (VARKI *et al.*, 2009). La fucosylation (α 1-6) du noyau attire l'attention car elle est un marqueur essentiel de cancer chez l'homme. Elle fonctionne comme un biomarqueur des cellules de carcinome hépatocellulaire en raison de la grande quantité de α -fétoprotéine fucosylée (AFP-L3) dans ce genre de cancer (MIYOSHI *et al.*, 2008). Il est également connu que le contenu en fucose (α 1-6) sur le noyau des *N*-glycanes augmente avec la tumorigenèse d'un tissu, tel que le foie, les poumons et l'estomac. Il affecte aussi l'efficacité de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (SHEILDS *et al.*, 2002).

La spécificité stricte des lectines HML et BTL sous forme native ou recombinante pour ce type de fucosylation en fait de très bonnes candidates pour sa détection sur les glycoprotéines de la surface des cellules animales, elle pourraient aussi être utilisées dans le diagnostic du cancer et comme réactif pour la préparation et le contrôle de la qualité des anticorps dont les *N*-glycanes ont tendance à perdre cette fucosylation. Un marqueur spécifique de la fucosylation (α 1-6) du noyau serait important pour comprendre le rôle de cette structure oligosaccharidique, puisque la fonction biologique exclusive des *N*-glycanes complexes la portant est encore inconnue à ce jour.

4.3 Analyse de l'interaction de BTL avec un octasaccharide fucosylé par STD-RMN

L'analyse de l'interaction de BTL avec un octasaccharide fucosylé Fuc-Octa ($\text{GlcNAc}\beta$ 1-2 $\text{Man}\alpha$ 1-6($\text{GlcNAc}\beta$ 1-2 $\text{Man}\alpha$ 1-3) $\text{Man}\beta$ 1-4 $\text{GlcNAc}\beta$ 1-4($\text{Fuc}\alpha$ 1-6) $\text{GlcNAc}\beta$) par STD-RMN a montré que certains protons du ligand sont plus proches de BTL que d'autres. L'effet STD le plus fort a été observé pour les hydrogènes H4, H5 et H6 du fucose ce qui suggère que ces protons sont les plus proches du site de liaison de BTL. Un effet moindre a été observé pour le groupement acétyle du $\text{GlcNAc}2$ et l'hydrogène H2 du mannose de la branche B (1-6). Ainsi, l'effet STD observé pour BTL saturée avec du Fuc-Octa montre que la protéine reconnaît principalement le fucose de l'octasaccharide, confortant les résultats de spécificité obtenus par puce à sucres (Figure IV.10).

Figure IV.10: Spectre de STD-RMN de BTL avec Fuc-Octa



A) Spectre de référence (rouge) et spectre STD-RMN (noir) de Fuc-Octa en présence de BTL. B) représente la région mise en évidence en A amplifiée.

5. ESSAIS DE TOXICITÉ

5.1 Létalité contre le microcrustacé *Artemia sp.*

Artemia sp. a été largement utilisé dans les tests de toxicité et de létalité, parce que c'est un animal facile à maintenir dans des conditions de laboratoire et il est largement répandu. Ces tests sont souvent utilisés comme un indicateur de la cytotoxicité des composés bioactifs. Cette toxicité est directement liée à des propriétés biologiques telles que l'activité anti-VIH, l'activité insecticide, pesticide ou antitumorale (CARBALHO *et al.*, 2002; NUNES *et al.*, 2006).

Les lectines HML, rHML, BTL et rBTL n'ont montré aucune toxicité contre *Artemias sp.* aux concentrations utilisées (12,5 – 25,0 – 50,0 ou 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), même après 48 heures d'incubation avec le microcrustacé. Ceci suggère que les formes recombinantes et sauvages de HML et de BTL sont inoffensives pour *Artemia sp.*

Cependant, la toxicité des lectines d'algues pour les microcrustacés a rarement été évaluée. Dans le cas de la lectine de l'algue rouge *Amansia multifida* (AML), la aussi aucune toxicité n'a été démontré (SILVAc, 2010). Dans les tests avec les lectines de l'algue verte *Codium isthmocladum* (CiL-1 et CiL-2), aucune toxicité n'a été observée pendant les premières 24 heures. Cependant, après 48 h, CiL-2 s'est révélée toxique avec une CL_{50} de 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, correspondant à un niveau significatif de toxicité (SILVA, 2013). Il ne semble pas y avoir de relation entre une caractéristique marquante de la lectine et le degré de toxicité contre le microcrustacé.

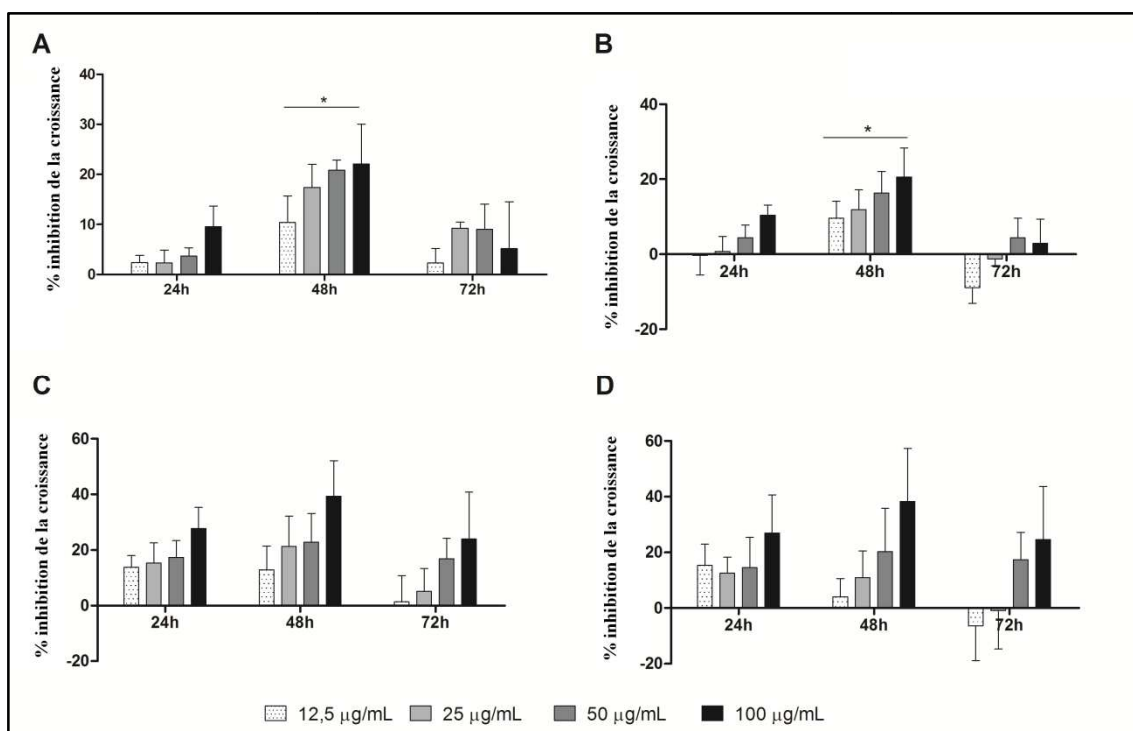
5.2 Culture cellulaire et essais colorimétriques MTT

Les résultats de l'essai MTT ont montré que l'incubation des cellules A549 avec les lectines HML et rHML diminue leur viabilité en 48 heures de traitement (Figures IV.11A et IV.11B). L'inhibition de la croissance cellulaire était d'environ 20% au bout de 48 heures, mais aucune différence significative n'a été observée entre les différentes concentrations testées.

Le traitement avec les lectines BTL et rBTL a montré une tendance à l'augmentation de la cytotoxicité à 24 h et à 48 h, mais cette tendance n'est pas concentration dépendante (Figures IV.11C et IV.11D). Le traitement avec BSA n'a montré aucune cytotoxicité contre les cellules A549 (données non représentées).

Certes, une action cytotoxique de HML, rHML, BTL et rBTL contre les cellules A549 n'est pas l'application biotechnologique la plus appropriée pour ces lectines. Cependant, rien n'empêche une action de reconnaissance cellulaire déclenchée par une interaction avec les lectines étudiées et les cellules en question, sachant que les adénocarcinomes pulmonaires présentent des niveaux considérables de glycoprotéines ayant la fucosylation (α 1-6) du noyau. Considérant que HML, rHML, BTL et rBTL reconnaissent spécifiquement cette fucosylation, ces lectines pourraient servir de glycobiomarqueurs. Cependant, des expériences complémentaires doivent être réalisées afin d'examiner cette application potentielle. Dans des expériences menées par Pinto *et al* (2009), BTL a été capable de différencier des variants de carcinome du côlon humain, où la fucosylation (α 1-6) a augmenté dans les premières phases de développement du cancer puis a ensuite diminué dans la phase métastatique.

Figure IV.11: Effet de la cytotoxicité de HML, rHML, BTL et rBTL contre les cellules A549 étudiée par le test MTT



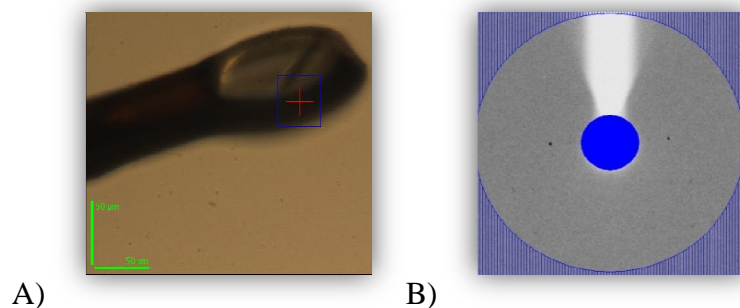
A) HML; B) rHML; C) BTL e D) rBTL. (*) Indiquent différences significatives entre les périodes de traitement (24, 48 et 72 heures). Les différences ont été considérées comme significatives à $P < 0,05$.

6. ÉTUDE STRUCTURALE DE rHML ET DE rBTL

6.1 Processus de cristallisation

Pour les essais de cristallisation, rHML (4 mg.mL^{-1}) et rBTL (6 mg.mL^{-1}) ont été soumises à un criblage initial de cristallisation avec les kits 1 et 2 de Hampton Research, les kits Midas, Morpheus, *Crystal Screen I* et II de Molecular Dimension Ltd disponible au laboratoire et un criblage auprès de la plateforme de cristallisation de l'EMBL. Après six semaines d'incubation, un cristal de rBTL est apparu dans le puit contenant 1,0 M LiCl, 0,1 M Tris pH 8,0, 10% PEG 6K (Figure IV.12).

Figure IV.12: Cristal de la protéine rBTL.



A) Microcristal de rBTL obtenu à partir de la condition 1,0 M LiCl, 0,1 M Tris pH 8,0, 10% PEG 6K. Les gouttes (200 nL) ont été préparées par un robot de cristallisation. B) Microcristal de rBTL diffracté à 15 Å.

Ce cristal a été plongé dans la solution mère supplémentée à 30% de PEG 6K avant d'être placé dans une litholoop (Molecular dimensions Ltd) et congelé dans l'azote liquide. Il a diffracté à 15 Å sur la ligne de lumière ID14-4 de l'ESRF équipée d'un détecteur ADSC quantum 4. Ces résultats ont confirmé que c'était un cristal de protéine mais la résolution n'était pas suffisante pour une collecte de données. Après l'obtention de ce premier cristal, nous avons essayé de le reproduire manuellement et d'optimiser les conditions de façon à voir aussi des cristaux plus gros mais nos essais n'ont pas abouti. Il est parfois difficile de reproduire les cristaux obtenus dans des nanogouttes. Des essais d'optimisation plus poussés sont nécessaires.

Un jeu de données natif à 2.4 Å a été collecté pour la lectine native HML (NAGANO *et al.*, 2005a). Sa structure tertiaire n'a pas encore été résolue faute de phases. En l'absence de structure de lectines homologues, la technique de remplacement moléculaire ne peut être utilisée et il est nécessaire de résoudre le problème des phases par d'autres méthodes. La présence de 16 atomes de soufre provenant des cystéines et des méthionines de HML dans la séquence pourrait permettre le phasage en utilisant le signal anomal du soufre lors de collecte de données SAD ou MAD. Il n'a pas été possible d'obtenir des cristaux satisfaisants à ce jour pour ce type d'étude. De plus, il a été impossible d'obtenir des cristaux avec la lectine recombinante HML dans les conditions de cristallisation de la protéine sauvage ou lors de criblage peut-être suite aux problèmes d'agrégation rencontrés décrits précédemment. Seuls des cristaux de sel ont été obtenus à Grenoble. Il semble donc nécessaire de stabiliser rHML pour éviter ces problèmes avant de poursuivre les essais de cristallisation de la forme recombinante.

CHAPITRE V:
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES



CHAPITRE V: CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La conception et l'exécution de ce travail de thèse ont permis le clonage du gène synthétique et la production hétérologue des lectines d'algues rouges marines *Hypnea musciformis* (rHML) et *Bryothamnion triquetrum* (rBTL).

Les protéines recombinantes rHML et rBTL ont été produites en système bactérien dans *Escherichia coli*. Malgré un rendement final de purification assez faible pour des lectines, les résultats sont satisfaisants, puisque les deux lectines rHML et rBTL ont été obtenues sous forme soluble et active. Il a été possible d'obtenir des quantités suffisantes de ces deux protéines pour leur caractérisation physico-chimique. La production de HML et de BTL sous forme recombinante contribuera à une diminution de l'extraction de ces algues dans l'environnement, et permettra également leur production lors des saisons de pénurie puisque ces algues sont saisonnières.

Les tests sur puces à sucres ont montré une spécificité stricte de HML, BTL et rBTL pour les oligosaccharides complexes comportant la fucosylation (α 1-6) du noyau, avec une préférence particulière pour les *N*-glycanes non bisectés, bi- et tri-antennés de chaîne courte. La présence d'acide sialique à l'extrémité non réductrice du glycanne favorise la reconnaissance de ces glycanes. C'est la première caractérisation des lectines d'algues rouges par puce à sucres. Des expériences de STD-RMN menées sur BTL, ont montré une interaction et donc sa reconnaissance d'un octasaccharide au niveau de noyau fucosylé (α 1-6). Ces résultats laissent entrevoir des applications potentielles comme glyco-biomarqueurs pour HML et BTL notamment pour la détection de la fucosylation (α 1,6) du noyau dans les glycoprotéines de la surface de cellules animales mais aussi comme outils pour la détection et le diagnostic du cancer.

La fonction biologique de la reconnaissance stricte de ce type de *N*-glycanes par ces lectines est inconnue, mais nous pouvons suggérer une relation étroite entre cette classe d'oligosaccharides et le ligand naturel de ces lectines dans leur mode d'action (endogène ou exogène).

L'étude de ces lectines d'algues et leur caractérisation biochimique ont donc fourni des informations importantes sur les interactions protéines-sucres et la spécificité pour les oligosaccharides complexes. C'est un point de départ pour comprendre les mécanismes d'action ou de reconnaissance et l'affinité pour ces sucres. Une fois en possession de ces

informations, l'analyse de la capacité de ces lectines à reconnaître les glycanes impliqués dans des événements biologiques intéressants, ou la recherche de leur fonction dans l'organisme d'origine pourra être entreprise.

Le plus grand défi maintenant sera de tenter de répondre à la question sur l'importance biologique de cette interaction pour les algues d'origine: quels sont les événements liés, quelles sont les étapes de la vie de l'organisme impliquées et comment ces processus peuvent-ils être explorés. Cette étude fournit des informations qui peuvent ajouter aux études des lectines de macroalgues marines. L'obtention de la forme recombinante de la lectine, combinée avec l'étude de son interaction avec des oligosaccharides complexes, sont des outils importants pour cette approche. Elles aideront à mieux comprendre les lectines de ces organismes, leur fonction, leur mode d'action et leurs applications biotechnologiques potentielles.

Dans les essais de toxicité, HML, rHML, BTL et rBTL n'ont montré aucune toxicité contre *Artemia sp.* une cytotoxicité faible contre les cellules d'adénocarcinome du poumon (A549). Cependant, des expériences complémentaires doivent être réalisées afin d'évaluer une potentielle application de ces lectines comme glyco-biomarqueurs pour les cellules en question.

Le premier cristal de rBTL, obtenu à l'aide d'un robot de cristallisation, a diffracté à basse résolution ne permettant pas une analyse plus poussée. Des problèmes de reproductibilité ont été rencontrés: homme-robot ou France-Brésil. Le chemin vers la résolution de la structure cristallographique de rHML et de rBTL nécessite de résoudre ces derniers et d'effectuer de nouvelles expériences de cristallisation. La présence de nombreux atomes de soufre pourrait être un atout pour résoudre la structure 3D de rHML sur des cristaux natifs. L'incorporation de sélénocystéines est aussi à envisager pour les deux lectines plutôt que celle de sélénométhionines au vue du nombre plus important de cystéines et du fait qu'elles seront plus stables car elles sont probablement impliquées dans des ponts disulfures. Les résultats présentés dans ce travail ont permis la rédaction d'un manuscrit pour publication dans la langue anglaise qui sera soumis prochainement.

POINT SUR LES AUTRES TRAVAUX DÉVELOPPÉ PENDANT LE DOCTORAT

Les travaux impliquant dans la production de lectines hétérologues des algues rouges marines *Hypnea musciformis* (rHML) et *Bryothamnion triquetrum* (rBTL), leur caractérisation physico-chimique, l'étude de leur spécificité pour les oligosaccharides et de leur toxicité a été utilisés pour écrire cette thèse, développer la collaboration des équipes brésiliennes et françaises pendant le stage en cotutelle. Au cours de la période du doctorat, d'autres projets ont également été effectués impliquant des lectines végétales et animales à l'Université Fédérale du Ceará, générant un total de six publications en tant que premier auteur ou co-auteur, listées ci-dessous. Quatre autres publications avaient été finalisées au cours de la période de stage pendant l'initiation scientifique et le master.

Alves-Filho, J. G.; **Nascimento, A. S. F.**; Gondim, A. C. S.; Pereira, R. H.; da Cunha, R. M.; Nagano, C. S.; Teixeira, E. H.; Nascimento K. S.; Cavada, B. S. **Isoform characterisation, heterologous expression and functional analysis of two lectins from *Vatairea macrocarpa***. Protein and Peptide Letters, v. 20 (11), p.1204-10, 2013.

Júnior, V. R. P.; Santiago, M. Q.; Osterne, V. J. S.; Correia, J. L. A.; Cajazeiras, J. B.; Vasconcelos, M. A.; **Nascimento, A. S. F.**; Miguel, T. B. R.; Miguel, E. C.; Sampaio, A. H.; Nascimento, K. S.; Nagano, C. S.; Cavada, B. S. ***Purification, Partial Characterization and Immobilization of a Mannose-Specific Lectin from Seeds of *Dioclea lasiophylla* Mart.*** Molecules, v. 18, p. 10857-69, 2013.

Rangel, T. B. A.; Rocha, B. A. M.; Bezerra, G. A.; Assreuy, A. M. S.; **Nascimento, A. S. F.**; Bezerra, M. J. B.; do Nascimento, K. S.; Nagano, C. S.; Sampaio, A. H.; Delatorre, P.; Fernandes, P. M. B.; Cavada, B. S. ***Crystal structure of a pro-inflammatory lectin from the seeds of *Dioclea wilsonii* Standl.*** Biochimie (Paris. Print), v. 94, p. 525-32, 2012.

Nascimento, A. S. F.; Cajazeiras, J. B.; Nascimento, K. S.; Nogueira, S.M.S.; Teixeira, E. H.; Melo, L. M.; Cunha, R. M. S.; Silva, A. L. C.; Cavada, B. S. ***Expression, purification and structural analysis of recombinant rBdh-2His₆, a spermadhesin from buck (*Capra hircus*) seminal plasma.*** Reproduction, Fertility and Development, v. 24, p. 580-87, 2012.

Cajazeiras, J. B.; Melo, L. M.; **Nascimento, A. S. F.**; Albuquerque, E. S.; Radis, B. G.; Freitas, V. J. F.; Cavada, B. S. ***Expression of recombinant buck (*Capra hircus*) spermadhesinin a prokaryotic system.*** Revista Brasileira de Biociências, v. 10, p. 60-65, 2012.

Nascimento, A. S. F.; Gondim, A. C. S.; Cajazeiras, J. B.; Correia, J. L. A.; Pires, A. F.; Nascimento, K. S.; Nagano, C. S.; Assreuy, A. M. S.; Cavada, B. S. ***Purification and partial characterization of a novel lectin from *Dioclea lasiocarpa* Mart seeds with vasodilator effects.*** Journal of Molecular Recognition, v. 25, p. 657-64, 2012.

Cavalcante, T. T. A.; Rocha, A. M.; Alves, V. C.; Arruda, F. V. S.; Nascimento, A. S. F.; As, N. C.; Nascimento, K. S.; Cavada, B. S.; Teixeira, E. H.; ***Effect of Lectins from Diocleinae Subtribe against Oral Streptococci***. *Molecules* (Basel. Online), v. 16, p. 3530-43, 2011.

Rangel, T. B. A.; Assreuy, A. M. S.; Pires, A. F.; Carvalho, A. U.; R. G.; Simões, R. C.; Silva, H. C.; Bezerra, M. J. B.; Nascimento, A. S. F.; Nascimento, K. S.; C. S.; Sampaio, A. H.; Delatorre, P.; Rocha, B. A. M.; Fernandes, P. M. B.; Cavada, B. S. ***Crystallization and Characterization of an Inflammatory Lectin Purified from the Seeds of Dioclea wilsonii***. *Molecules* (Basel. Online), v. 16, p. 5087-103, 2011.

Correia, J. L. A.; Nascimento, A. S. F.; Cajazeiras, J. B.; Gondim, A. C. S.; Pereira, R. I.; Sousa, B. L.; Silva, A. L. C.; Garcia, W.; Teixeira, E. H.; Nascimento, K. S.; Rocha, Bruno A. M.; Nagano, C.S.; Sampaio, A. H.; Cavada, B. S. ***Molecular Characterization and Tandem Mass Spectrometry of the Lectin Extracted from the Seeds of Dioclea sclerocarpa Ducke***. *Molecules* (Basel. Online), v. 16, p. 9077-89, 2011.

Melo, L. M.; Nascimento, A. S. F.; Silveira, F.; Cunha, R.; Tavares, N.; Teixeira, D.; Lima-Filho, J.; Freitas, V.; Cavada, B. S.; Radis, B. G. ***Quantitative expression analysis of Bodhesin genes in the buck (Capra hircus) reproductive tract by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)***. *Animal Reproduction Science* (Print), v. 110, p. 245-55, 2009.

D'autres projets ont également été commencés avec l'équipe française, mais, à cause du temps limité, n'ont pas encore été finalisés.

Production hétérologue des domaines isolés des discoidines: Les lectines de l'amibe *Dictyostelium discoideum* (DiscI et DiscII) sont constitués de deux domaines N- et C-terminaux. Ils ont été exprimés séparément dans le système hétérologue *E. coli* afin de caractériser leur spécificité pour les oligosaccharides sur puce à sucres d'évaluer leur toxicité contre le nématode *Caenorhabditis elegans*.

Production hétérologue des lectines sll2 e sll2.2: Les lectines du corail *Sinularia lochmodes* ont été exprimées dans le système hétérologue *E.coli*. Les protéines ont été purifiées et différents protocoles ont été testés pour obtenir des protéines actives mais sans résultats.

Production hétérologue de la lectine de Photorhabdus luminescens: Une lectine membranaire hypothétique a été identifié dans le génome de la bactérie *P. luminescens*. Le gène synthétique pour la lectine a été cloné et exprimé de manière recombinante dans *E. coli*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AINOUZ, I. L.; SAMPAIO, A. H. Screening of Brazilian marine algae for hemagglutinins. **Botanica Marina**. v. 34, n. 3, p. 211-214, 1991.

AINONZ, I. L. *et al.* Comparative study on hemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 7, n. 15, p. 15-19, 1995.

AMBROSIO, A. L. *et al.* Isolation of two novel mannan- and l-fucose-binding lectins from the green alga *Enteromorpha prolifera*: biochemical characterization of EPL-2. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 415, n. 2, p. 245–250, 2003.

ARNOLD, J. N. *et al.* The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. **Annual Review Immunology**. v. 25, p. 21–50, 2007.

AUDFRAY A. *et al.* Fucose-binding lectin from opportunistic pathogen *Burkholderia ambifaria* binds to both plant and human oligosaccharidic epitopes. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 287, p.4335–4347, 2002.

BARRIENTOS, L. G. *et al.* Cyanovirin-N binds to the viral surface glycoprotein, GP(1,2) and inhibits infectivity of Ebola virus. **Antiviral Research**. v. 58, n. 1, p. 47–56, 2003.

BENEVIDES, N. M. B. *et al.* Atividade hemaglutinante da alga vermelha *Solieria filiformis*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 8, n. 117-122, 1996.

BEWLEY, C. A. *et al.* New carbohydrate specificity and HIV-1 fusion blocking activity of the cyanobacterial protein MVL: NMR, ITC and sedimentation equilibrium studies. **Journal of Molecular Biology**. v. 339, n. 4, p. 901–914, 2004.

BITENCOURT, F. D. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. v. 377, n. 2, p. 139-148, 2008.

BOYD, M. R. *et al.* Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applications to microbicide development. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 41, n. 7, p. 1521–1530, 1997.

BOYD, W. C.; ALMODÓVAR, L. R. Agglutinin in marine algae for human erythrocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 6, p. 82-83, 1966.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

CALVETE, J. J. *et al.* The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 57, p. 343-350, 2000.

CARBALLO, J. L. *et al.* A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology**. v. 2, p. 17-21, 2002.

CERONI, A.; DELL, A.; HASLAM, S. M. The GlycanBuilder: a fast, intuitive and flexible software tool for building and displaying glycan structures. **Source Code Biological Medical**. v. 2, n. 3, 2007.

COSTA, *et al.* Purification and Partial Characterization of a lectin from the red marine alga *Amansia multifida*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**. v. 5, p. 53-63, 1999.

DANGUY, A. *et al.* Galectins and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1572, n. 2/3, p. 285-293, 2002.

DENNIS, J. W.; GRANOVSKY, M.; WARREN, C. E. Protein glycosylation in development and disease. **BioEssay**. v. 21, p. 412-21, 1999.

DRESCH, R. R. Purificação e caracterização das lectinas ACL-I e ACL-II da esponja marinha *Axinella corrugata*, imunolocalização da ACL-I e avaliação do seu potencial como marcador de transformação celular. Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas da faculdade de farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 222p, 2008.

DOUBLIE, S. **Methods in enzymology**. v. 276, p.523-530, 1997.

FRANCIS, D. M.; PAGE, R. Strategies to optimize protein expression in *E.coli*. **Current protocols in protein science**. Cap. 5, Unit. 5.24.1-29, 2010.

GAO, X. *et al.* Soluble cytoplasmic expression, rapid purification, and characterization of cyanovirin-N as a His-SUMO fusion. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 85, p. 1051-1060, 2010.

GIOMARELLI, B. *et al.* Recombinant production of anti-HIV protein, Griffithsin, by auto-induction in a fermentor culture. **Protein Expression Purification**. v. 47, n. 1, p. 194-202, 2006.

GRASLUND, S. *et al.* Protein production and purification. **Nature Methods**. v. 5, n. 2, p. 135-46, 2008.

GROSSMAN, A. Regeneration of a cell from protoplasm. **Journal of Phycology**. v. 42, p. 1-5, 2005.

HAN, J. W. *et al.* Purification and characterization of a D-mannose specific lectin from the green marine alga, *Bryopsis plumose*. **Phycological Research**. v. 58, p. 143-150, 2010.

HAN, J. W. *et al.* Isolation and Characterization of a sex-specific lectinn in a marine red alga, *Aglaothamnion oosumienses* Itono. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 78, n. 20, p. 7283-7289, 2012.

HAN, J. W. *et al.* Purification and characterization of a lectin, BPL-3, from the marine green alga *Bryopsis plumosa*. **Journal Applied of Phycology**. v. 23, p. 745-753, 2011.

- HELLE, F. *et al.* Cyanovirin-N inhibits hepatitis C virus entry by binding to envelope protein glycans. **Journal of Biological Chemistry**. v. 281, n. 35, p. 25177–25183, 2006.
- HOLANDA, M. L. *et al.* Differential activity of a lectin from *Solieria filiformis* against human pathogenic bacteria. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**. v. 38, n. 12, p. 1769-1773, 2005.
- HORI, *et al.* Mitogenic and antineoplastic isoagglutinins from red alga *Solieria robusta*. **Phytochemistry**. v. 27, p. 2063-2067, 1988.
- HORI, K. *et al.* Strict specificity for high-mannose type *N*-glycans and primary structure of a red alga *Eucheuma serra* lectin. **Glycobiology**. v. 17, n. 5, p. 479-491, 2007.
- HORI, K.; MATSUBARA, K.; MIYASAWA, K. Primary structures of two hemagglutinins from marine red alga *Hypnea japonica*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1474, p. 226-236, 2000.
- HORI, K.; MIYAZAWA, K.; ITO, K. Some common properties of lectins from marine algae. **Hydrobiologia**. v. 204–205, p. 561-566, 1990.
- ISHIHARA K.; ARAI S.; SHIMADA, S. cDNA cloning of a lectin-like gene preferentially expressed in freshwater from macroalga *Ulva limnetica* (Ulcales, Chlorophyta). **Phycological Research**. v. 57, p. 104-110, 2009.
- KAWAKUBO, A. *et al.* Occurrence of highly yielded lectins homologous within the genus *Eucheuma*. **Journal of Applied Phycology**. v. 11, p. 149–156, 1999.
- KIM, G. H. *et al.* Purification and a characterization of a lectin, Bryohealin, involved in the protoplast formation of a marine green alga *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta). **Journal of Phycology**. v. 42, p. 86–95, 2005.
- KIM, S. H.; KIM, G. H. Cell-cell recognition during fertilization in the red alga, *Aglaothamnion oosumiense* (Ceramiaceae, Rhodophyta). **Hydrobiologia**. v. 399, p. 81-89, 1999.
- KOBAYASHI Y. A novel core fucose-specific lectin from the mushroom *Pholiota squarrosa*. **Glycobiology and Extracellular Matrices**. v. 287, p. 33973-33982, 2012.
- LEITE, Y. F., *et al.* Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**. v. 1724, n. 1/2, p. 137-145, 2005.
- LI, Y. *et al.* Cloning, expression and purification of *Microcystis viridis* lectin in *Escherichia coli*. **Molecular Biotechnology**. v. 47, n. 2, p. 105-110. 2011.
- LIMA, H. C. *et al.*, Induction and inhibition of human lymphocyte transformation by the lectin from red marine alga *Amansia multifida*. **Journal of Applied Phycology**. v. 10, p. 153-162, 1998.

- LIMA, M. E. P. *et al.* Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria cornea* and its effects on the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, n. 16, p. 6414-6419, 2005.
- LIMA, R. F. *et al.* Red marine alga *Bryothamnion triquetrum* lectin induces endothelium-dependent relaxation of the rat aorta via release of nitric oxide. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 56, n. 11, p. 1415-1421, 2004.
- LOWE, J. B.; MARTH, J. D. A genetic approach to Mammalian glycan function. **Annual Review Biochemistry**. v. 72, p. 643-691, 2003.
- MASSI, M. N.; AHMAD, A. Cloning and *in vitro* anti-mycobacterial activity of lectin protein in combination with streptomycin to increase sensitivity against *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal of Biotechnology and Biochemistry**. v. 8, n. 2, p. 101-111, 2012.
- MATSUMURA, K. *et al.* Carbohydrate Binding Specificity of a Fucose-specific Lectin from *Aspergillus oryzae*: A Novel Probe for Fucose. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 282, p. 15700-15708, 2007.
- MEDINA-RAMIREZ, G.; GIBBS, R.V.; CALVETE, J.J. Micro-heterogeneity and molecular assembly of the haemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *B. triquetrum* from the Caribbean Sea. **European Journal of Phycology**. v. 42, n. 1, p.105-112, 2007.
- MELO, V. M. M. *et al.* Antifungal properties of proteins (agglutinins) from the red alga *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux. **Botanica Marina**. v. 40, n. 4, p. 281-284, 1997.
- MITCHELL S. W. Researchs upon the venom of the Rattlesnake. Smithsonian Institute. Philadelphia, USA. Monography. p. 145, 1860.
- MIYOSHI, E.; MIROWAKI, K.; NAKAGAWA, T. Biological Function of Fucosylation in Cancer Biology. **The Journal of Biochemistry**. v. 143, p. 725-729, 2008.
- MOLCHANOVA, V., *et al.* Purification and partial characterization of the lectin from the marine alga *Tichocarpus crinitus* (Gmelin) Rupr. (Rhodophyta). **Botanica Mar.** v. 53, p. 69-78, 2010.
- MOLINARI, M. *et al.* N-glycan structure dictates extension of protein folding or onset of disposal. **Natural Chemical Biology**. v. 3, n. 6, p. 313-20, 2008.
- MOREIRA, R. A.; PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**. v. 59, p. 783-787, 1977.
- MORI, T. *et al.* Isolation and characterization of griffithsin, a novel HIV-inactivating protein, from the red alga *Griffithsia sp.* **Journal Biology et Chemical**. v. 280, n. 10, p. 935-9353, 2005.
- MOURA, R. M. *et al.* CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and leishmanis promastigotes. **Comparative biochemistry and physiology**. Part A, v. 145, p. 517-523, 2006.

- NAGANO C. S. *et al.*, HCA and HML isolated from the red marine algae *Hypnea cervicornis* and *Hypnea musciformis* define a novel lectin family. **Protein Science**. v. 14, n. 8, p.2167-2176, 2005b.
- NAGANO C.S. *et al.* Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of HML, a lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*.**Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization**. v. 61, p. 997-999, 2005a.
- NAGANO, C. S. *et al.* Purification and characterization of a new lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*. **Protein and Peptides Letters**. v. 9, n. 2, p. 159-166, 2002.
- NASCIMENTO, K. S. *et al.* Isolation and characterization of a new agglutinin from the red marine alga *Hypnea cervicornis*J. Agardh. **Biochemistry and cell biology**. v. 84, n. 1, p. 49-54, 2006.
- NASCIMENTO-NETO, L. G. *et al.*, Characterization of isoforms of the lectin isolated from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and its pro-healing effect. **Marine Drugs**. v. 10, p. 1936-1954, 2012.
- NEVES, S. A. *et al.*Antinociceptive properties in mice of a lectin isolated from the marine alga *Amansia multifida* Lamouroux. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 40, n. 1, p. 127-134, 2007.
- NEVES, S. A. *et al.* Neutrophil migration induced *in vivo* and *in vitro* by marine algal lectins. **Inflammation Research**. v. 50, n. 10, p. 486-490, 2001.
- NILSSON, I. M.; VON HEIJNE, G. Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. **Journal Biological Chemistry**. v. 268, p. 5798–5801, 1993.
- NIU, J.*et al.* Characterization of a new lectin involved in the protoplast regeneration of *Bryopsis hypnoides*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**. v. 27, n 3, p. 502-512, 2009.
- NUNES, B. S. *et al.* Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution**. v. 144, n. 2, p. 453-462, 2006.
- O'KEEFE, B. R. *et al.* Potent anti-influenza activity of cyanovirin-N and interactions with viral hemagglutinin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.47, n. 8, p. 2518–2525, 2003.
- OKUYAMA, S.*et al.* Strict Binding of small-sized Lectins from the Red Alga *Hypnea japonica* for Core (α 1-6) Fucosylated *N*-Glycans. **Bioscience, Biotechnology, Biochemistry**. v. 73, n. 3, p. 912-920, 2009.
- OLIVEIRA, S. R. M. *et al.* Purification and characterization of a lectin from the red marine alga *Pterocladia capillacea*(S.G. Gmel.) Santel. & Hommers. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 25, n. 4, p, 397-403, 2002.
- PAJIC, I. *et al.*A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. **Comparative biochemistry and physiology**. v. 132, p. 213-221, 2002.

- PEUMANS, W. J; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**. v. 109, p. 347-352, 1995.
- PINTO, V. P. T. *et al.* Lectins from the Red Marine Algal Species *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum* as Tools to Differentiate Human Colon Carcinoma. **Cells Advances in Pharmacological Sciences**. v. 2009, p.1-6, 2009.
- POCHEC, E. *et al.* Glycosylation profile of integrin $\alpha 3\beta 1$ changes with melanoma progression. **Biochimistry Biophys Acta**. v. 1643, p. 113–123, 2003.
- PRASEPTIANGGA, D.; HIRAYAMA, M.; HORI, K. Purification and characterization and c-DNA cloning of a novel lectin from the green alga *Codium barbatum*. **Bioscience, Biotechnology, Biochemistry**. v. 76, n. 4, p. 805-811, 2012.
- RAVEN P. H.; EVERT R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7th ed. Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 2007.
- RUDIGER, H.; GABIUS, H.J. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and application. **Glycoconjugate**. v. 18, p. 589-613, 2001.
- SATO, Y. *et al.*, High Mannose-binding Lectin with Preference for the Cluster of $\alpha 1$ -2-Mannose from the Green Alga *Boodlea coacta* is a Potent Entry Inhibitor of HIV-1 and Influenza Viruses. **The journal of Biological Chemistry**. v. 286, n. 22, p. 19446-19458, 2011.
- SATO, T.; HORI, K. Cloning, expression and characterization of a novel anti-HIV lectin from the cultured cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii*. **Fish Science**. v. 75, p. 743–753, 2009.
- SATO, Y. *et al.* Purification and characterization of a novel lectin from a fresh water cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. v. 125, p. 169-177, 2000.
- SCHMALTZ, R. M. *et al.* Enzyme in the Synthesis of Glycoconjugates. **Chemistry Review**. v. 111, p. 4259-4307, 2011.
- SHIELDS, R. L. *et al.* Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc γ RIII and antibody-dependent cellular toxicity. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, p. 26733-26740, 2002.
- SILVA, L. M. *et al.* Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of Lectin from Marine Red Alga *Pterocladia capillacea*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**. v. 33, n. 5, p. 830-835, 2010b.
- SILVA, F. R. F. *et al.* Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: action of major types of commercial carrageenans. **Carbohydrate Polymers**. v. 79, n. 1, p. 29-33, 2010a.
- SILVA, S. R. Caracterização da lectina da alga marinha vermelha *Amansia multifida* J. V. Lamouroux por espectrometria de massas. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca)-Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010c.

SILVA, S. R. Purificação e Caracterização de duas lectinas (CiL-1 e CiL-2) da alga marinha verde *Codium isthmocladum* Virckers. Dissertação (Engenharia de Pesca)- Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

SOWDER, R. C. *et al.* Isolation and characterization of griffithsin, a novel HIV-inactivating protein, from the red alga *Griffithsia sp.* **Journal of Biological Chemistry.** v. 280, p. 9345–9353, 2005.

STEEN, P. V. *et al.* Concepts and Principles of *O*-Linked Glycosylation. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.** v. 33, n. 3, p. 151-208, 1998.

STILLMARK, H. Über ricin, ein giftiges ferment aus samen von *Ricinus communis* L., und einigen anderen euphobiaceen. PhD Thesis, University of Dorpat, Dorpat (Tartu), 1888.

STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Express Purification.** v. 41, p. 207-234, 2005.

SUDAKEVITZ, D.; IMBERTYU A.; GILBOA-GARBER, N. J. **Biochemistry.** v. 132, p. 353-358, 2002.

SUGAHARA, T. *et al.* The cytotoxic effect of *Eucheuma serra* agglutinin (ESA) on cancer cells and its application to molecular probe for drug delivery system using lipid vesicles. **Cytotechnology.** v. 36, p. 93–99, 2001.

SULAK, O. *et al.* A TNF-like trimeric lectin domain from *Burkholderia cenocepacia* with specificity for fucosylated human histo-blood group antigens. **Structure.** v. 18, n. 1, p. 59-72, 2010.

TAKAMINE, A.; KATO, N.; HORI, K. Oral administration of a red alga *Eucheuma serra* lectin remarkably suppresses the formation of colon aberrant crypt foci in mice received 1,2 dimethylhydrazine. In: Abstract of Paper Presented. 20th International Lectin Meeting. Copenhagen, Denmark. 146, 2002.

TAKEBE, Y. *et al.* Antiviral Lectins From Red and Blue-Green Algae Show Potent *In Vitro* and *In Vivo* Activity against Hepatitis C Virus. **PLoS ONE.** v. 8, n. 8, p. 1-10, 2013.

TAYLOR, M.; DRICKAMER, K. Introduction to Glycobiology. Oxford University Press, 2003.

TATENO, H.; NAKAMURA-TSURUTA, S.; HIRABAYASHI, J. Comparative Analysis of core-fucose-binding lectins from *Lens culinaris* and *Pisum sativum* using Frontal Affinity Chromatography. **Glycobiology.** v. 19, p. 527-536, 2009.

TEIXEIRA, E. H. *et al.* *In vitro* inhibition of oral streptococci binding to enamel acquired pellicle by algae Lectins. **Journal of Applied Microbiology.** v. 103, p.1001-1006, 2007.

VANDERLEI, E. S. O. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. **International Immunopharmacology.** v. 10, n. 9, p.1113-1118, 2010.

VARKI, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. **Glycobiology.** v. 3, p. 97-130, 1993.

- VARKI, A. *et al.* Essentials of Glycobiology, 2nd edition. Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California, 2009.
- VASTA, G.; AHMED, H. Animal lectins: A functional View. New York: CRC Press. 596 p. 2008.
- VIANA, G. S. B. *et al.* Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red algae *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kütz. and *B. triquetrum* (S.G. Gmel.) M. Howe. **Brazilian Journal Medical and Biological Research.** v. 35, n. 6, p. 713-722, 2002.
- VIEIRA, L. A. P. *et al.* The alga *Bryothamnion seaforthii* contains carbohydrates with antinociceptive activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** São Paulo, v. 37, n. 7, p. 1071- 1079, 2004.
- VILLAVERDE, A.; CORRIÓ, M. M. Protein Aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. **Biotechnology Letters.** v. 25, p. 1385-1395, 2003.
- WANG, S. *et al.* Molecular characterization of a new lectin from the marine alga *Ulva pertusa*. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica.** v. 36, n. 2, p. 111-117, 2004.
- WIEDERSCHAIN, G. Y. Glycobiology: Progress, Problems, and Perspectives. **Biochemistry.** v. 78, n.7, p. 877-900, 2013.
- WIJESEKARA, A. *et al.* Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers.** v. 84, p.14–21, 2011.
- WIMMEROVA, M. Six-bladed β -propeller fold and novel fucose recognition mode for *Aleuria aurantia* lectin. **The Journal of Biological Chemistry.** v.278, p. 27059-27067, 2003.
- XIONG, C. *et al.* Overexpression and purification of scytovirin, a potent, novel anti-HIV protein from the cultured cyanobacterium *Scytonema varium*. **Protein Expression and Purification.** v. 46, p. 233–239, 2006.
- YOON, K. S. *et al.* Molecular Characterization of the Lectin, bryohealin, involved in protoplast regeneration of the Marine alga *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta). **Journal of Phycology.** v. 44, p. 103-112, 2008.
- ZACHARA, N. E.; HART, G. W. The emerging significance of *O*-GlcNAc in cellular regulation. **Chemistry Review.** v. 102, p. 431–438, 2002.
- ZENG, D. *et al.* *In vitro* antitumor activity of silybin nanosuspension in PC-3 cells. **Cancer Letters.** v. 307, p. 158-164, 2011.
- ZIÓŁKOWSKA, N. E. *et al.* Domain-swapped structure of the potent antiviral protein griffithsin and its mode of carbohydrate binding. **Structure.** v.7, p.1127–1135, 2006.
- ZIÓŁKOWSKA, N. E. *et al.* Crystallographic studies of the complexes of antiviral protein griffithsin with glucose and N-acetylglucosamine. **Protein structure report.** v. 16, p.1485-1489, 2007.
- ZIÓŁKOWSKA, N. E.; WLODAWER, A. Structural studies of algal lectins with anti-HIV activity. **Acta Biochimica Polonica.** v. 53, n. 4, p. 617–626, 2006.