



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MAIARA QUEIROZ MONTEIRO DA SILVA

**APLICAÇÃO DE DIFERENTES CEPAS DE *Escherichia coli* NA OTIMIZAÇÃO DA
EXPRESSÃO DE UMA AGLUTININA DE LEGUMINOSA**

FORTALEZA
2021

MAIARA QUEIROZ MONTEIRO DA SILVA

APLICAÇÃO DE DIFERENTES CEPAS DE *Escherichia coli* NA OTIMIZAÇÃO DA
EXPRESSÃO DE UMA AGLUTININA DE LEGUMINOSA

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.

Co-orientadora: Dra. Ivanice Bezerra da Silva

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S581a Silva, Maiara Queiroz Monteiro da.
Aplicação de diferentes cepas de *Escherichia coli* na otimização da expressão de uma aglutinina de leguminosa / Maiara Queiroz Monteiro da Silva. – 2021.
87 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2021.
Orientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.
Coorientação: Profa. Dra. Ivanice Bezerra da Silva.
1. Produção heteróloga. 2. Cepas de *Escherichia coli*. 3. Aglutinina recombinante. I. Título.
CDD 570
-

MAIARA QUEIROZ MONTEIRO DA SILVA

APLICAÇÃO DE DIFERENTES CEPAS DE *Escherichia coli* NA OTIMIZAÇÃO DA
EXPRESSÃO DE UMA AGLUTININA DE LEGUMINOSA

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Vinicius José da Silva Osterne
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dra. Ivanice Bezerra da Silva
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Aos meus pais, amigos e famílias, de sangue ou
não,
dedico este e futuros trabalhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me confortar e me guiar espiritualmente nas horas que mais precisei.

Agradeço aos meus pais. A minha mãe, por me dar apoio incondicional e me encorajar a cursar e fazer o que amo. Sem você, não estaria aqui hoje escrevendo esses agradecimentos. Ao meu pai, por sempre querer o melhor para mim e me dar o primeiro equipamento como bióloga: uma bússola.

Agradeço a minha família, especialmente aos meus irmãos: Mariana, Maisa e Rafael. Quando estou com vocês, estou em conforto, alegria e segurança. Obrigada por sempre me apoiarem, me colocarem para cima e me perguntarem “que bicho é esse?”.

Agradeço aos meus amigos da vida. Desde os que enfrentavam as crianças que praticavam *bullying* comigo e ficavam ao meu lado, aos que comemoraram comigo a entrada nas Ciências Biológicas. Vocês trocaram muitas vezes uma lágrima minha por risadas. Nunca esquecerei tamanho apoio para me tornar o que sou hoje.

Agradeço aos meus amigos da universidade, especialmente “Os Colegas de Malaquias”: Feynman, Alice, Otávio, Larissa, Ryan, Mariana, Mateus, Ariane e Cláudio. Brigamos tantas vezes, mas nos apoiamos muitas mais. Sem vocês, a história seria completamente diferente. Agradeço por toda a leveza, apoio e compreensão. Vocês são amigos incríveis, e espero que a vida seja boa e nos mantenha juntos.

Agradeço a todas as professoras e professores que passaram pela minha vida, em especial as professoras Jaqueline, Vera e Rodrigo. Não sei como vocês estão hoje, mas espero que saibam o impacto que as palavras e atitudes de vocês foram enormes na minha vida, e tenho certeza que também na de outros alunos. Muito obrigada por me ensinarem muito além do que a matéria da escola.

Agradeço a todas as mulheres cientistas que começaram a vida nessa carreira, sendo muitas nem reconhecidas até hoje. Vocês lutaram muito para que eu pudesse escrever essas palavras.

Agradeço a Universidade Federal do Ceará, pela infraestrutura concedida aos seus alunos e ao Restaurante Universitário, por oferecer alimento digno todos os dias e a um preço acessível para todos os seus alunos.

Agradeço às minhas antigas orientadoras: Marlene, Arlete e Helena. Muito obrigada por todo o conhecimento repassado por vocês e suas equipes. Levo no coração e na mente todo aprendizado.

Agradeço à equipe do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab) por me receberem de braços abertos e me ensinarem todos os dias. Agradeço especialmente a equipe da Biologia Molecular: Mayara Torquato, Vinícius, Ivanice e Yara. Obrigada pela força, apoio e paciência de todos os dias.

Agradeço ao CNPq pelas bolsas concedidas e, assim, tornar possível o presente estudo.

Por fim, agradeço a mim, pela coragem, paciência e persistência de continuar nessa jornada.

“Pensamos em demasia e sentimos bem pouco. Mais do que máquinas, precisamos de humanidade. Mais do que inteligência, precisamos de afeição e doçura. Sem essas virtudes, a vida será de violência e tudo será perdido.”

Charles Chaplin - O Grande Ditador (1940)

RESUMO

A tecnologia do DNA recombinante visa a produção heteróloga de proteínas em sistemas diversos, com alto potencial biotecnológico e medicinal, com baixo custo e tempo laboratorial. Dentre os sistemas heterólogos, o mais comum é o sistema bacteriano *Escherichia coli*. Há diferentes cepas de *E. coli* disponíveis no mercado para as mais diversas aplicações, dependendo do objetivo almejado com a proteína em questão. Quando não se sabe ao certo qual o melhor hospedeiro e em quais condições a proteína será melhor expressa, o mais indicado é realizar ensaios de expressão. Lectinas são proteínas capazes de se ligarem de forma específica e reversível a carboidratos livres ou acoplados à glicoconjugados, sendo esses últimos normalmente encontrados em membranas celulares. Isso as tornam moléculas de elevado interesse biotecnológico. A lectina extraída das sementes de *Canavalia virosa* (ConV) é uma lectina do tipo ConA-like, com valiosas atividades antiglioma, antitumoral, inflamatória e vasorelaxante. Entretanto, as lectinas purificadas a partir de fontes naturais podem apresentar isolectinas ou subunidades resultantes de processamentos pós-traducionais, gerando alterações nas atividades biológicas dessas proteínas. Assim, o presente estudo objetivou otimizar a expressão heteróloga do gene correspondente à cadeia α da lectina ConV em sistema de *Escherichia coli* em diferentes cepas de expressão. A ConV recombinante (rConV) foi montada em um vetor pET-SUMO e expressa nas cepas de *E. coli* BL21 (DE3), BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, BL21 (DE3) pLysS, Tuner (DE3) pLysS e ArcticExpress (DE3) em diversas condições de temperatura, concentração e tempo de ação do indutor. Na fração solúvel, rConV foi expressa em duas cepas de expressão, com uma alta atividade hemaglutinante específica no extrato proteico bacteriano obtido a partir da cepa ArcticExpress (DE3). Os resultados aqui apresentados mostram a possibilidade da produção heteróloga de rConV na fração solúvel de pelo menos duas cepas de expressão de *E. coli*, caracterizando um protocolo eficiente. Isso torna possível a sua obtenção e utilização em futuros estudos estruturais e biológicos, bem como a sua aplicação biotecnológica.

Palavras-chave: Produção heteróloga. Cepas de *Escherichia coli*. Aglutinina recombinante.

ABSTRACT

The technology of recombinant DNA aims at the heterologous production of proteins in different systems, including *Escherichia coli*, of optimized proteins with high biotechnological and medicinal potential, with low cost and laboratory time. Among the heterologous systems, the most common is the bacterial system *Escherichia coli*. There are different strains of *E. coli* available on the market for the most diverse applications, depending on the objective pursued with the protein in question. When it is not known for sure which is the best host and under what conditions the protein will be better expressed, the most suitable is to perform expression tests. Lectins are proteins capable of binding in a specific and reversible way to free carbohydrates or coupled to glycoconjugates, the latter being normally found in cell membranes. This makes them molecules of high biotechnological interest. The lectin extracted from the seeds of *Canavalia virosa* (ConV) is a ConA-like lectin, with valuable antitumor, anti-inflammatory and vasorelaxant activities. However, lectins purified from natural sources can present isolectins or subunits resulting from post-translational processing, generating changes in the biological activities of these proteins. Thus, the present study aimed to optimize the heterologous expression of the gene corresponding to the α chain of lectin ConV in *Escherichia coli* system in different expression strains. The recombinant ConV (rConV) was assembled in a pET-SUMO vector and expressed in the strains *E. coli* BL21 (DE3), BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, BL21 (DE3) pLysS, Tuner (DE3) pLysS and ArcticExpress (DE3) under different conditions of temperature, concentration and time of action of the inducer. In the soluble fraction, rConV was expressed in two expression strains, with a high specific hemagglutinating activity in the bacterial protein extract obtained from the strain ArcticExpress (DE3). The results presented here show the possibility of heterologous production of rConV in the soluble fraction of at least two strains of *E. coli* expression, characterizing an efficient protocol. This makes it possible to obtain and use it in future structural and biological studies, as well as its biotechnological application.

Keywords: Heterologous production. *Escherichia coli* strains. Recombinant agglutinin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- As diferentes áreas que constituem a biotecnologia molecular e alguns dos setores comerciais as quais ela influencia	21
Figura 2	- Representação esquemática da clonagem de DNA recombinante	22
Figura 3	- Representação esquemática de um típico vetor de expressão e seus elementos constituintes	23
Figura 4	- Exemplo de um mapa de um vetor do sistema pET.....	24
Figura 5	- Representação esquemática do operon <i>lac</i> (A) geralmente encontrado no genoma de <i>E. coli</i> e do cassete DE3 (B), o qual possui o gene T7 1 que codifica para a T7 RNA polimerase. P: promotor; O: operador <i>lac</i> ; O1: operador <i>lac</i> (1) O2: operador <i>lac</i> (2)	25
Figura 6	- Representação esquemática da estratégia de expressão de genes marcados utilizando o sistema de vetor pET	26
Figura 7	- Exemplo de montagem de um vetor de expressão plasmidial com a sequência da proteína marcada e a sequência da cauda de fusão junto com a sequência do sítio de ação da protease	27
Figura 8	- Representação esquemática das subdivisões das lectinas vegetais de acordo com as estruturas maduras gerais segundo Van Damme <i>et al</i> (1998)	32
Figura 9	- Esquema da oligomerização canônica ocorrida nas lectinas do tipo ConA-like	36
Figura 10	- Estrutura quaternária em tetrâmero da lectina ConV complexada com α -metilmanosídeo	37
Figura 11	- Eletroforese em gel de agarose 1% das amostras de DNA plasmidial purificado das 10 réplicas obtidas	54
Figura 12	- Primeiro ensaio de expressão de rConV com a cepa de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) com indução de IPTG 1 mM em diferentes temperaturas e tempos de ação do indutor	56

Figura 13 - Primeiro ensaio de expressão de rConV com a cepa de <i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL com indução de IPTG 1 mM em diferentes temperaturas e tempos de ação do indutor	56
Figura 14 - Segundo ensaio de expressão de rConV com a cepa de <i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL com indução de IPTG em diferentes concentrações e temperaturas, com 1h de ação do indutor	57
Figura 15 - Segundo ensaio de expressão de rConV com a cepa de <i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL com indução de IPTG em diferentes concentrações e temperaturas, com 2h de ação do indutor	58
Figura 16 - Segundo ensaio de expressão de rConV com a cepa de <i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL com indução de IPTG em diferentes concentrações e temperaturas, com 4h de ação do indutor	59
Figura 17 - Segundo ensaio de expressão de rConV com a cepa de <i>E. coli</i> BL21 (DE3-pLysS com indução de IPTG em diferentes concentrações e temperaturas, com 1h de ação do indutor	60
Figura 18 - Segundo ensaio de expressão de rConV com a cepa de <i>E. coli</i> BL21 (DE3-pLysS com indução de IPTG em diferentes concentrações e temperaturas, com 2h de ação do indutor	61
Figura 19 - Segundo ensaio de expressão de rConV com a cepa de <i>E. coli</i> BL21 (DE3-pLysS com indução de IPTG em diferentes concentrações e temperaturas, com 4h de ação do indutor	62
Figura 20 - Segundo ensaio de expressão de rConV com a cepa de <i>E. coli</i> Tuner (DE3-pLysS com indução de IPTG em diferentes concentrações e temperaturas, com 1h de ação do indutor	63
Figura 21 - Segundo ensaio de expressão de rConV com a cepa de <i>E. coli</i> Tuner (DE3-pLysS com indução de IPTG em diferentes concentrações e temperaturas, com 2h de ação do indutor	64
Figura 22 - Segundo ensaio de expressão de rConV com a cepa de <i>E. coli</i> Tuner (DE3-pLysS com indução de IPTG em diferentes concentrações e temperaturas, com 3h de ação do indutor	65

Figura 23 - Segundo ensaio de expressão de rConV com as cepas de <i>E. coli</i> Tuner (DE3) pLysS (faixas 1 a 4) e BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (faixas 6 a 9) com indução de IPTG em diferentes concentrações na temperatura de 16°C por 16h de indução	66
Figura 24 - Segundo ensaio de expressão de rConV com as cepas de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS (faixas 1 a 4) e ArcticExpress (DE3) (faixas 7 a 10) com indução de IPTG em diferentes concentrações e tempos de indução, na temperatura de 16°C	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Descrição de algumas cepas de expressão de <i>Escherichia coli</i> disponíveis no mercado	29
Tabela 2	- Aplicações biotecnológicas e medicinais das lectinas	38
Tabela 3	- Algumas lectinas recombinantes produzidas em diferentes sistemas, provenientes de organismos diversos	41
Tabela 4	- Condições de expressão de proteínas para as diferentes cepas nos dois ensaios realizados	48
Tabela 5	- Quantificação da concentração do DNA plasmidial, contendo o gene para rConV, purificado e leitura de absorbância na faixa de 260-280 ($A_{260/280 \text{ nm}}$) das 10 réplicas obtidas	54
Tabela 6	- Condições escolhidas para cada cepa de expressão para prosseguir com os estudos de produção de rConV	71
Tabela 7	- Atividade hemaglutinante (unidades de hemaglutinação por mililitro) dos extratos proteicos na fase solúvel de rConV contra eritrócitos de coelho a 3% nos estados nativo (primeiro e segundo ensaios) e tratados com enzimas proteolíticas (papaína e tripsina, apenas para o primeiro ensaio)	72
Tabela 8	- Atividade hemaglutinante específica (unidades de hemaglutinação por miligrama de proteína) dos extratos proteicos na fase solúvel de rConV contra eritrócitos de coelho a 3% nos estados nativo (BL21-CodonPlus(DE3)-RIL do primeiro ensaio e ArcticExpress (DE3) do segundo ensaio) e tratados com enzimas proteolíticas (papaína e tripsina, apenas para BL21-CodonPlus(DE3)-RIL do primeiro ensaio)	76
Tabela 9	- Concentração mínima inibitória (CMI), em mM, de açúcares contra os extratos proteicos da lectina recombinante rConV	77
Tabela 10	- Concentração mínima inibitória (CMI), em mM, de açúcares contra o extrato bruto da lectina selvagem ConV	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Asp	Ácido aspártico
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CMI	Concentração mínima inibitória
ConA	Lectina de <i>Canavalia ensiformes</i>
ConBr	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>
ConV	Lectina de <i>Canavalia virosa</i>
C-terminal	Carboxil-terminal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAp	DNA plasmidial
D.O. _{600nm}	Densidade ótica a 600 nm
DRC	Domínio de reconhecimento a carboidratos
DWL	Lectina de <i>Dioclea wilsonii</i>
Fase log	Fase exponencial
Gly	Glicina
GRFT	Lectina de <i>Griffithsia</i> sp.
HCl	Ácido clorídrico
HCV	Vírus da hepatite C
His ₆	Poli-histidina de seis aminoácidos
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Vírus do papiloma humano
HSV	Vírus da herpes
JEV	Vírus da encefalite japonesa
kDa	Quilodalton
LB	Luria-Bertani
LB-Ágar	Luria-Bertani com ágar
LCA	Aglutinina de <i>Lens culinaris</i>
MERS-CoV	Coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio
Met	Metionina
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mL	Mililitro

mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetros
N-terminal	Amino-terminal
PEDV	Vírus da diarreia epidêmica suína
pH	Potencial hidrogeniônico
PPL-2	PPL-2: isoforma 2 da lectina de <i>Parkia platycephala</i>
Pré-pró-rConBr	Pré-pró lectina recombinante de <i>Canavalia brasiliensis</i>
Pro	Prolina
PSA	Aglutinina de <i>Pisum sativum</i>
r-αDGL	Lectina recombinante da cadeia alfa de <i>Dioclea grandiflora</i>
r-αDSL	Lectina recombinante da cadeia alfa de <i>Dioclea sclerocarpa</i>
rConV	Lectina recombinante de <i>Canavalia virosa</i>
rCRAMOLL-1	Lectina recombinante de <i>Cratylia mollis</i>
rDguiL	Lectina recombinante de <i>Dioclea guianensis</i>
rGNA	Lectina recombinante de <i>Galanthus nivalis</i>
rJacalin	Lectina recombinante de <i>Artocarpus integrifolia</i>
rNictaba	Lectina recombinante de <i>Nicotiana tabacum</i>
rPPL	Lectina recombinante de <i>Pleurocybella porrigens</i>
rPHA-L	Lectina recombinante de <i>Phaseolus vulgaris</i>
rPNA	Lectina recombinante do amendoim
rPSL	Lectina recombinante de <i>Pisum sativum</i>
rUDA:	Lectina recombinante de <i>Urtica doica</i>
rVML	Lectina recombinante de <i>Vatairea macrocarpa</i>
RNA	Ácido desoxiribonucleico
SARS-CoV	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave
TEV	Protease Tobacco Etch Virus
TxLC-I	Lectina da tulipa
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-d-galactopiranosídeo

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
g	Força g
M	Molar
W	Watts
°C	Graus celsius
%	Por cento
®	Marca comercial registrada
™	Marca comercial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Tecnologia do DNA recombinante	20
<i>1.1.1</i>	<i>O sistema de vetores pET</i>	24
<i>1.1.2</i>	<i>As caudas de fusão</i>	26
1.2	As células de expressão	28
1.3	Lectinas: definições, aplicações e classificações	31
1.4	Lectinas de leguminosas	33
<i>1.4.1</i>	<i>A subtribo Diocleinae e a lectina ConV</i>	34
<i>1.4.1.1</i>	<i>As lectinas do tipo ConA-like</i>	34
<i>1.4.1.2</i>	<i>A lectina ConV</i>	36
1.5	Potencial biotecnológico das lectinas	37
<i>1.5.1</i>	<i>Produção heteróloga de lectinas</i>	39
2	OBJETIVOS	41
2.1	Geral	41
2.2	Específicos	42
3	MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1	Vetor plasmidial de expressão	42
3.2	Transformação da cepa de clonagem	42
3.3	Plaqueamento e cultivo da cepa de clonagem transformada	43
3.4	Purificação e quantificação do DNA plasmidial das cepas de clonagem	44
<i>3.4.1</i>	<i>Monitoramento do DNAp por eletroforese de agarose 1%</i>	45
3.5	Transformação das cepas de expressão	45
3.6	Plaqueamento e cultivo das cepas de expressão transformadas	46
3.7	Ensaio de expressão de proteínas	46
<i>3.7.1</i>	<i>Avaliação da proteína expressa por eletroforese SDS-PAGE 12%</i>	48
3.8	Preparo dos extratos proteicos bacterianos	49
3.9	Determinação da atividade hemaglutinante dos extratos proteicos bacterianos	50
3.10	Quantificação de proteínas solúveis nos extratos proteicos bacterianos	51
3.11	Determinação da atividade hemaglutinante específica dos extratos proteicos bacterianos	51

3.12	Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante dos extratos proteicos bacterianos por açúcares	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1	Vetor plasmidial de expressão	52
4.2	Purificação e quantificação do DNA plasmidial da cepa de clonagem	53
4.3	Ensaio de expressão de proteínas	55
4.4	Atividade hemaglutinante dos extratos proteicos bacterianos	71
4.5	Quantificação de proteínas solúveis nos extratos proteicos bacterianos	75
4.6	Atividade específica dos extratos proteicos bacterianos em fase solúvel	75
4.7	Concentração mínima inibitória de açúcares para os extratos proteicos bacterianos	76
5	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS	81
	ANEXO A – MAPA DO VETOR PLASMIDIAL pET-SUMO	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tecnologia do DNA recombinante

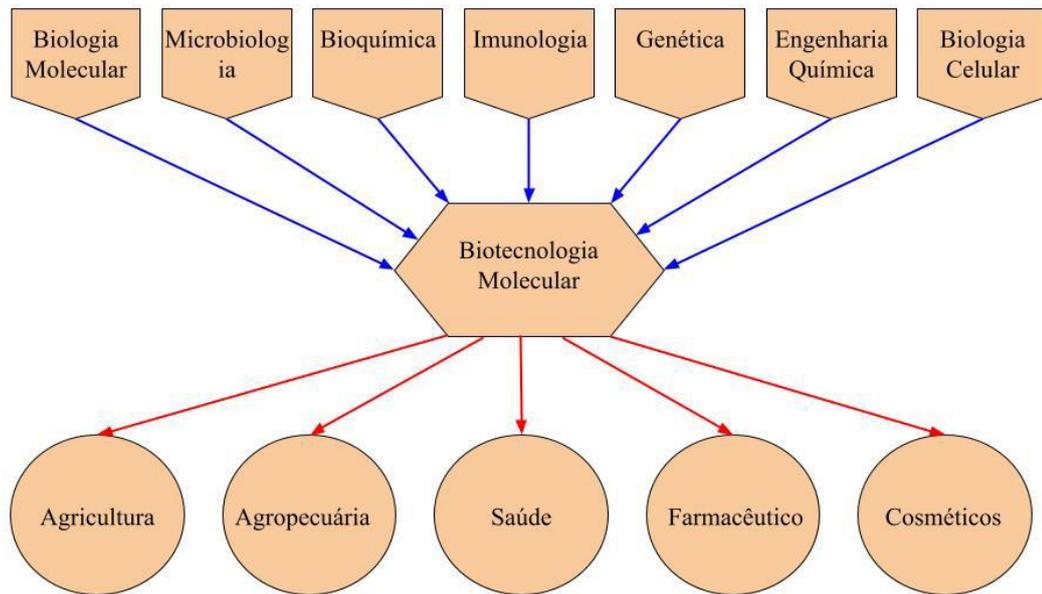
Biotecnologia molecular é a área envolvida com a manipulação de genes, objetivando a produção de bens úteis e serviços, utilizando organismos vivos. O desenvolvimento central que permitiu essa tecnologia foi o estabelecimento de técnicas para isolar genes e os transferir de um organismo para outro. Essa tecnologia é conhecida como tecnologia do DNA recombinante (GLICK *et al.*, 2010).

A tecnologia do DNA recombinante, clonagem de genes ou clonagem molecular, é um termo geral que engloba diversos protocolos experimentais com o intuito de transferir a informação genética (DNA) de um organismo para outro. Essa técnica foi primeiramente estabelecida por Cohen e Boyer em 1973, utilizando as técnicas de inserção de plasmídios em células de bactérias e os estudos das chamadas enzimas de restrição, as quais cortam em locais específicos as moléculas de ácidos nucleicos (DEMAIN & VAISHNAV, 2009; GLICK *et al.*, 2010).

O primeiro produto comercial desenvolvido utilizando essa tecnologia foi a insulina humana, onde a sequência de DNA dessa proteína foi sintetizada e inserida em plasmídios, os quais foram mantidos em células de *Escherichia coli*. Assim, as células dessas bactérias atuaram como fábricas para a produção da proteína em questão, sendo a insulina posteriormente purificada e utilizada no tratamento da diabetes (GLICK *et al.*, 2010). Este foi um passo muito importante, visto que vários diabéticos eram alérgicos ao tratamento anterior, que utilizava insulina de porco (DEMAIN & VAISHNAV, 2009).

Dessa forma, a tecnologia do DNA recombinante alterou drasticamente a natureza da biotecnologia, maximizando processos e expandindo novos horizontes para a área. Assim, a biotecnologia molecular, a qual faz uso do conhecimento de outras ciências, foi aplicada para diversos setores e criou produtos de interesse comercial, como hormônios, antígenos, proteínas terapêuticas, plantas resistentes à pragas, entre outros (Figura 1). A engenharia genética atualmente é considerada um processo comum (DEMAIN & VAISHNAV, 2009; ADRIO & DEMAIN, 2010; GLICK *et al.*, 2010).

Figura 1 - As diferentes áreas que constituem a biotecnologia molecular e alguns dos setores comerciais as quais ela influencia.

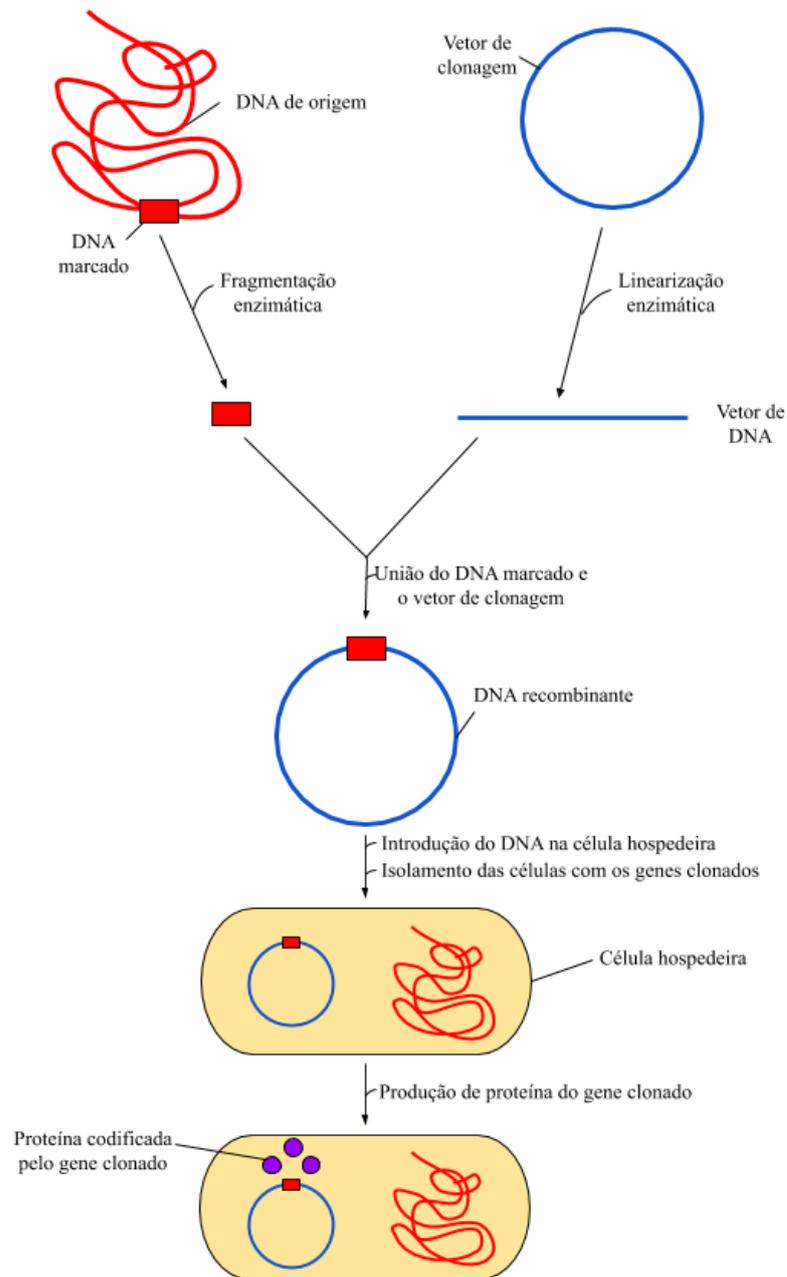


Fonte: Adaptado de Glick *et al.* (2010).

Não há um único método para se transferir a informação genética de um organismo para outro, mas todos os protocolos experimentais para esse objetivo seguem o mesmo formato apresentado a seguir (Figura 2) (YESILIRMAK & SAYERS, 2009; GLICK *et al.*, 2010):

1. O DNA de um organismo é extraído, cortado enzimaticamente e ligado a um vetor de clonagem ou de expressão (plasmídeo), formando uma molécula de DNA recombinante;
2. A molécula recombinante de DNA é, então, transferida e mantida em uma célula hospedeira (etapa de transformação);
3. As células transformadas são identificadas e isoladas daquelas que não foram transformadas;
4. Caso requerido, a célula hospedeira pode produzir a proteína codificada pelo inserto de DNA recombinante.

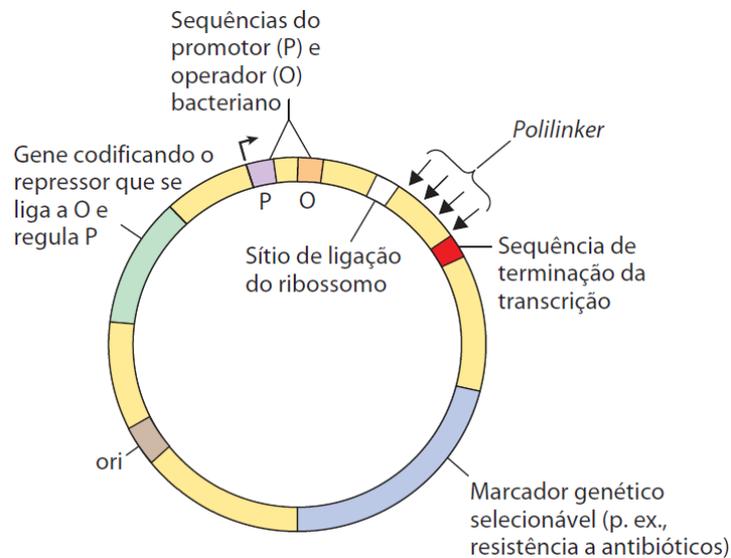
Figura 2 - Representação esquemática da clonagem de DNA recombinante.



Fonte: Adaptado de Glick *et al.* (2010).

Os vetores plasmidiais de expressão de *E. coli* possuem um esqueleto em comum, como mostrado na Figura 3. Os vetores plasmidiais correspondem a um DNA plasmidial otimizado para a clonagem e/ou expressão de genes correspondentes à proteína de interesse. Há diversos vetores plasmidiais de expressão disponíveis no mercado atualmente. Entre eles, estão os vetores pBR322, o sistema de vetores pUC, ambos mais historicamente conhecidos, e o sistema de vetores pET (JONASSON *et al.*, 2002; GLICK *et al.*, 2010).

Figura 3 - Representação esquemática de um típico vetor de expressão e seus elementos constituintes.



Fonte: Nelson & Cox (2014). *Polilinker*: também conhecido como sítio múltiplo de clonagem, é o local onde o gene a ser expresso é inserido. Ori: origem de replicação. P: sequência do promotor. O: sequência do operador.

O vetor plasmidial pBR322 foi muito estudado e utilizado na década de 1980 para uso em geral. Ele carrega dois genes de resistência a antibióticos, um para ampicilina e outro para tetraciclina, ambos utilizados no método de seleção de vetores e células adequadamente transformadas (BALBÁS *et al.*, 1986; GLICK *et al.*, 2010). É um vetor que gera poucas cópias de plasmídeo por célula (25-50 cópias/célula), motivo pelo qual se estudou a sua otimização (JONASSON *et al.*, 2002).

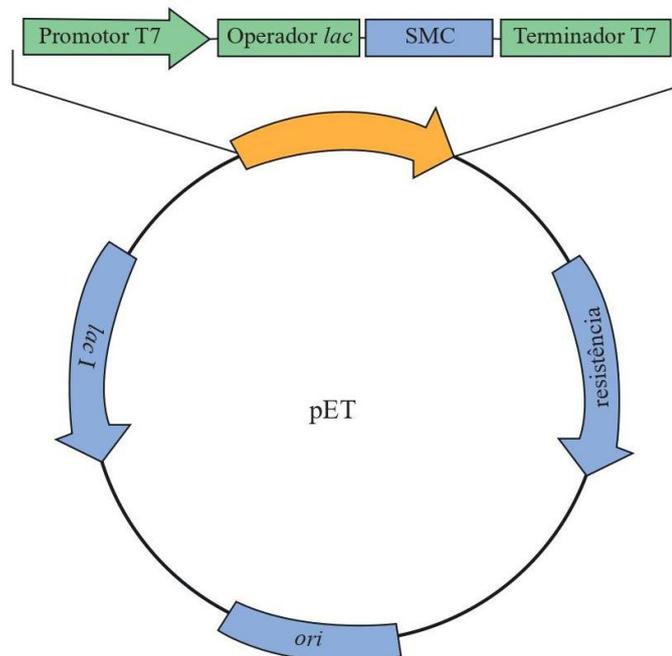
Já o vetor de expressão plasmidial pUC19, um dos vetores do sistema pUC, além de gerar muitas cópias de plasmídeo por célula (150-200 cópias/célula) faz uso do *screening* branco-azul (JONASSON *et al.*, 2002; GODISKA *et al.*, 2005). O plasmídeo carrega um gene de resistência a antibiótico (ampicilina), utilizado na seleção de células transformadas com o vetor. Para a seleção de vetores devidamente recombinados com o gene de interesse, o vetor possui um sistema que envolve o operon *lac* (conjunto de genes envolvidos no metabolismo da lactose). Quando o vetor não está transformado, consegue, em um meio contendo IPTG (indutor do operon *lac*), sintetizar uma β -galactosidase ativa. Assim, se o substrato X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -d-galactopiranosídeo) estiver presente no meio, a β -galactosidase ativa consegue hidrolisar este substrato, aparecendo uma coloração azul. Dessa forma, as colônias devidamente transformadas são aquelas formadas com coloração branca e em um meio

contendo ampicilina e X-Gal (YASNISCH-PERRON *et al.*, 1985; GODISKA *et al.*, 2005; GLICK *et al.*, 2010).

1.1.1 O sistema de vetores pET

O sistema de vetores pET é um conjunto de vetores plasmidiais produzidos pela Novagen. É o sistema de expressão mais comumente utilizado atualmente em cultivos de escala laboratorial (JONASSON *et al.*, 2002). O sistema inclui, em geral, promotores híbridos (promotor T7), sítios múltiplos de clonagem (SMC), gene de resistência a antibióticos e o gene *lacI* (expressa o repressor do operon *lac*) (Figura 4) (SØRENSEN & MORTENSEN, 2005). Esse sistema depende da seletividade naturalmente restrita da T7 RNA polimerase para com os seus respectivos promotores. O promotor T7 é altamente seletivo e, quando ligado à T7 RNA polimerase, permite a transcrição do gene marcado em altos níveis, acumulando a proteína desejada em concentrações altas (de 40-50% do total das proteínas da célula) (BANEYX, 1999; BESELIN, 2005).

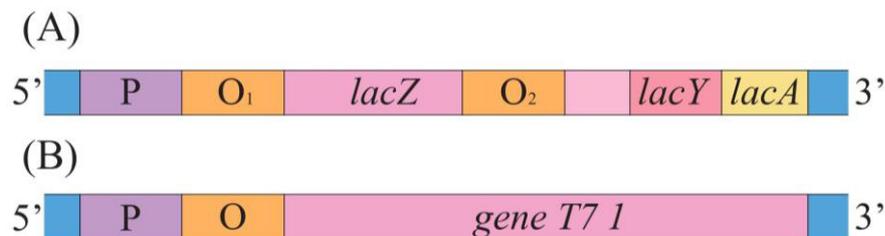
Figura 4 - Exemplo de um mapa de um vetor do sistema pET.



Fonte: Adaptado de Sørensen & Mortensen (2005). SMC: sítio múltiplo de clonagem; ori: origem de replicação; lac I: sequência de gene correspondente ao repressor do operon *lac* modificado.

Assim, para que haja a expressão do gene de interesse em um vetor pET, é necessário que o mesmo seja inserido em células hospedeiras que possuam, no seu genoma, o cassete DE3: uma versão do operon *lac* que possui o gene que expressa a T7 RNA polimerase (gene T7 1) no lugar dos genes *lacZ*, *lacY* e *lacA* (Figura 5) (MIROUX & WALKER, 1996; BESELIN, 2005; SØRENSEN & MORTENSEN, 2005; JOSEPH *et al.*, 2015). Há diversas cepas de *Escherichia coli* engenheiradas com esse cassete no genoma, com diferentes propriedades para objetivos distintos (YIN *et al.*, 2007; JOSEPH *et al.*, 2015).

Figura 5 - Representação esquemática do operon *lac* (A) geralmente encontrado no genoma de *E. coli* e do cassete DE3 (B), o qual possui o gene T7 1 que codifica para a T7 RNA polimerase. P: promotor; O: operador *lac*; O₁: operador *lac* (1); O₂: operador *lac* (2).

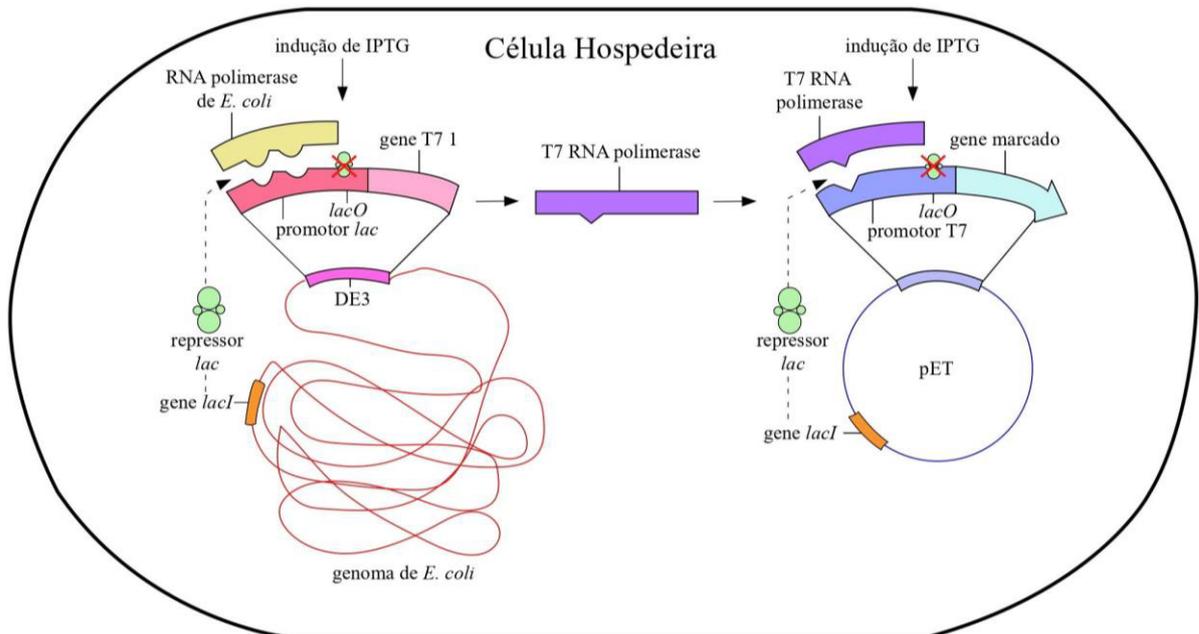


Fonte: Sørensen & Mortensen (2005) e Nelson & Cox (2014).

Dessa forma, é válido relembrar o funcionamento do operon *lac* convencional, o qual possui o seguinte formato: promotor, *lacI*, promotor, O (operador *lac*), *lacZ*, *lacY* e *lacA* (Figura 5). Em condições normais, o *lacI* produz uma proteína repressora, a qual se liga ao operador *lac* (O), impedindo a transcrição dos genes posteriores (*downstream*). Assim, o operon *lac* não é expresso. Entretanto, com a presença da lactose no substrato, a proteína repressora se liga ao isômero da lactose, a alolactose, quebrando a ligação com o promotor. Dessa forma, o promotor é ativado e o operon *lac* pode ser expresso (NELSON & COX, 2014).

Portanto, em células com o cassete DE3 transformadas com um dos vetores do sistema pET, na presença do isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo, ou IPTG (indutor do operon *lac*, o qual é análogo da lactose, mas não é capaz de ser metabolizado pela célula), o operon *lac* modificado é expresso, resultando na produção da T7 RNA polimerase. Em seguida, a T7 RNA polimerase produzida pela célula hospedeira se liga ao promotor T7 do vetor plasmidial, expressando altamente o gene marcado e, conseqüentemente, produzindo com eficácia a proteína de interesse (Figura 6) (BESELIN, 2005; NELSON & COX, 2014).

Figura 6 - Representação esquemática da estratégia de expressão de genes marcados utilizando o sistema de vetor pET.



Fonte: Adaptado de Beselin (2005). Na indução de IPTG, o repressor *lac* expresso pelo gene *lacI* é incapaz de se ligar ao operador *lac* (*lacO*). Assim, quando a RNA polimerase da *E. coli* se liga ao promotor *lac* no cassete DE3, o gene *T7 1* é expresso. A T7 RNA polimerase reconhece unicamente o promotor T7 do vetor plasmidial de expressão, permitindo a expressão do gene marcado na presença de IPTG.

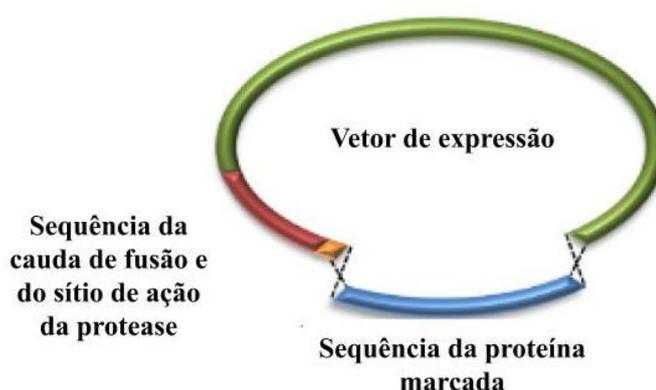
1.1.2 As caudas de fusão

Quando se planeja um projeto onde é desejada a produção de uma proteína recombinante solúvel e ativa, é necessário ter meios para detectá-la ao longo do sistema de expressão, atingir a sua solubilidade máxima e purificá-la facilmente do meio celular de *E. coli* (ROSANO & CECCARELLI *et al.*, 2014). O uso paralelo das caudas de fusão permite, então, a fácil modificação dessas proteínas recombinantes, concedendo identificação e produção eficientes, além do fácil isolamento a partir do sistema hospedeiro (YOUNG *et al.*, 2012).

As caudas de fusão são peptídeos ou polipeptídeos expressos *in tandem* com a proteína requerida, formando uma proteína quimérica (ROSANO & CECCARELLI *et al.*, 2014). Elas surgiram principalmente da necessidade de se obter proteínas recombinantes puras. Entretanto, muitas caudas de fusão também podem prover funções adicionais além do auxílio na purificação, como facilitar a detecção da proteína marcada ou aumentar a sua solubilidade (WOOD, 2014). No desenho do vetor plasmidial, a cauda de fusão pode ser inserida com o objetivo de se posicionar na extremidade N-terminal e/ou C-terminal da proteína de interesse.

Estão sempre ligadas à proteína hospedeira por uma pequena sequência contendo um sítio específico químico (como Met ou Asp-Pro) ou domínio de clivagem por protease (como a trombina) (WINGFIELD, 2015) (Figura 7).

Figura 7 - Exemplo de montagem de um vetor de expressão plasmidial com a sequência da proteína marcada e a sequência da cauda de fusão junto com a sequência do sítio de ação da protease.



Fonte: Adaptado de Wood (2014).

Há diversos tipos de caudas de fusão disponíveis no mercado, podendo ser utilizadas individualmente ou em conjunto, ou ainda formando complexos. A cauda peptídica mais comum é a de poli-histidina (His₆), utilizada principalmente por fornecer um impacto mínimo no enovelamento da proteína marcada expressa e, conseqüentemente, pouco interferir na sua atividade biológica (WOOD, 2014). Além disso, ela é purificada com bastante especificidade em uma cromatografia de afinidade do tipo IMAC (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*), com *beads* de íons níquel, sendo eluída com um gradiente de imidazol (ROSANO & CECCARELLI *et al.*, 2014). Outras caudas de fusão peptídicas comuns são as FLAG, c-Myc e S-tag (ROSANO & CECCARELLI *et al.*, 2014; WOOD, 2014).

Já as caudas de fusão polipeptídicas mais comumente utilizadas são as MBP, NusA, GST e SUMO (ROSANO & CECCARELLI *et al.*, 2014). A cauda de fusão SUMO (*Small ubiquitin-related modifier*), de aproximadamente 12 kDa, promove o correto enovelamento e estabilidade estrutural da proteína marcada, o que leva a uma maior produção funcional quando comparado com proteínas não-quiméricas (ROSANO & CECCARELLI *et al.*, 2014; YOUNG *et al.*, 2012). Além disso, a proteína SUMO se mostra uma ótima carreadora citosólica de proteínas recombinantes, aumentando a sua solubilidade. Diferentemente das caudas de fusão GST e MBP, SUMO não é utilizada para a purificação de proteínas recombinantes, sendo

necessário o uso concomitante com outra cauda de fusão, geralmente uma poli-histidina (His₆). Uma vantagem única da cauda SUMO sobre outras caudas de fusão polipeptídicas é a protease SUMO específica, diminuindo o risco de clivagem da proteína recombinante no processo de purificação (YOUNG *et al.*, 2012).

Para a realização de estudos bioquímicos e estruturais das proteínas recombinantes, é necessário retirar a cauda de fusão. Essas caudas podem ser clivadas enzimaticamente ou quimicamente (ROSANO & CECCARELLI *et al.*, 2014). No caso da digestão enzimática, o tipo mais comum de clivagem de cauda de fusão, a protease cliva em um sítio de ação da protease, sequência desenhada no vetor de expressão plasmidial na porção *downstream* à sequência da cauda de fusão (Figura 7). Assim, as proteases mais comumente utilizadas são a enteroquinase, trombina e TEV (ROSANO & CECCARELLI *et al.*, 2014). A SUMO protease anteriormente citada, específica para a cauda de fusão SUMO, cliva em um motivo Gly-Gly (YOUNG *et al.*, 2012). A clivagem química das caudas de fusão é menos comum, visto que as condições ambientais são muito agressivas, causando modificações indesejadas na proteína recombinante. É um método mais utilizado para proteínas recombinantes purificadas de corpos de inclusão, sendo o reagente químico mais comum o brometo de cianogênio (CNBr) (ROSANO & CECCARELLI *et al.*, 2014).

1.2 As células de expressão

Existem diversos sistemas heterólogos de expressão disponíveis para a produção de proteínas recombinantes, como *Escherichia coli*, fungos (*Pichia pastoris*, principalmente), linhas celulares de insetos e mamíferos, e os sistemas livres de células. Em todos os sistemas há pontos positivos e negativos, o que depende da proteína de interesse a ser sintetizada. Por exemplo, se a proteína a ser sintetizada requer modificações pós-traducionais, comum em proteínas de origem eucariótica, os sistemas de expressão procarióticos, em geral, não são os mais indicados por conta do seu aparato enzimático natural (JOSEPH *et al.*, 2015). Entretanto, há atualmente formas de superar os requisitos pós-traducionais para a produção recombinante de proteínas em sistemas procarióticos, como a síntese química otimizada do gene, o qual codifica a forma já madura da proteína (VAREJÃO *et al.*, 2010).

Os sistemas de expressão bacterianos, em geral, são escolhidos preferencialmente. A maior vantagem desses sistemas é o seu custo-benefício, graças às décadas de estudos da sua genética e às ferramentas de engenharia genética facilmente manipuláveis para modificar esses organismos. Além disso, as altas taxas de crescimento de *E. coli*, a capacidade de fermentação

contínua e os altos índices de expressão fazem desse organismo um dos melhores hospedeiros para se expressar proteínas recombinantes (JOSEPH *et al.*, 2015).

Há diferentes cepas de *E. coli* disponíveis no mercado para as mais diversas aplicações, dependendo do objetivo almejado com a proteína em questão (JOSEPH *et al.*, 2015). Quando não se sabe ao certo qual o melhor hospedeiro e em quais condições a proteína será melhor expressa, o mais indicado é realizar um ensaio de expressão, ou seja, testar diferentes cepas em diferentes condições de expressão, determinando qual o melhor protocolo para a proteína em estudo (VINCENELLI *et al.*, 2011). As cepas, geralmente, são deficientes em proteases citoplasmáticas (Lon, por exemplo) e membranares (OmpT, por exemplo) (JOSEPH *et al.*, 2015).

Entre as várias cepas de expressão de *E. coli* hospedeiras existentes, há a BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS, BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, Tuner (DE3), ArcticExpress (DE3), Rosetta™ e variações, entre outras (Tabela 2). Algumas dessas cepas possuem no seu nome as designações DE3 e pLysS. DE3 indica que as cepas são lisogênicas do bacteriófago λ DE3, possuindo um cassete cromossômico integrado onde a T7 RNA polimerase é expressa sob o controle do promotor *lacUV5*. Assim, tais cepas são adequadas para a expressão de proteínas a partir de genes clonados em vetores pET, por exemplo, por indução de IPTG. Já o pLysS indica que a cepa contém o plasmídeo pLysS, o qual expressa a lisozima T7, a qual suprime a expressão basal da T7 RNA polimerase antes da indução realizada pelo IPTG. Isso estabiliza os vetores pET, por exemplo, recombinantes que codificam proteínas tóxicas (BANEYX, 1999; SAMUELSON, 2011; JOSEPH *et al.*, 2015).

Tabela 1 (Continua) - Descrição de algumas cepas de expressão de *Escherichia coli* disponíveis no mercado.

Cepa de expressão	Descrição
BL21 (DE3) (Novagen®) Genótipo: F – ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3)	São cepas altamente utilizadas para checar a expressão básica de proteínas em <i>E. coli</i> , desde a sua introdução em 1990. São deficientes nas protease lon e ompT, o que irá estabilizar a expressão de algumas proteínas recombinantes.
BL21 (DE3) pLysS (Novagen®) Genótipo: F – ompT hsdSB (rB- mB-) dcm gal λ (DE3) pLysS Cm ^r	São cepas que possuem as mesmas características da BL21 (DE3), com o adicional de apresentar o plasmídeo pLysS.

Tabela 1 (Conclusão) - Descrição de algumas cepas de expressão de *Escherichia coli* disponíveis no mercado.

<p>Tuner™ (DE3) pLysS (Novagen®) Genótipo: F- <i>ompT hsdSB</i> (rB- mB-) <i>gal dcm lacY1</i>(DE3) pLysS (CamR)</p>	<p>São cepas derivadas da BL21, possuindo mutação de deleção no gene <i>lacY</i>, o que permite a entrada uniforme de IPTG em todas as células da cultura, criando uma relação positiva de concentração de IPTG/produção proteica. Apresentam o plasmídeo pLysS.</p>
<p>ArcticExpress™ (DE3) (Aligent Technologies) Genótipo: E. coli B F- <i>ompT hsdS</i>(rB - mB -) <i>dcm+</i> Tetr <i>gal λ</i>(DE3) <i>endA Hte</i> [cpn10 cpn60 Gent^f]</p>	<p>São cepas projetadas para melhorar o processamento de proteínas a baixas temperaturas, co-expressando chaperoninas da bactéria psicrófila <i>Oleispira antarctica</i>.</p>
<p>Origami™ 2 (Novagen®) Genótipo: $\Delta(ara-leu)7697 \Delta lacX74$ $\Delta phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL$ F'[<i>lac+</i> <i>lacIq pro</i>] <i>gor522::Tn10 trxB</i> (Str^R, Tet^R)</p>	<p>Possuem mutações nos genes <i>trxB</i> e <i>gor</i>, o que aumenta grandemente a formação de pontes dissulfeto no citoplasma da <i>E. coli</i>.</p>
<p>Origami™ B (Novagen®) Genótipo: F- <i>ompT hsdSB</i>(rB- mB-) <i>gal dcm lacY1 ahpC gor522:: Tn10 trxB</i> (Kan^R, Tet^R)</p>	<p>Possuem as mesmas mutações nos genes <i>trxB/gor</i>, como Origami 2, mas são derivados de uma mutação no gene <i>lacZY</i> proveniente da BL21. Além disso, é uma cepa que combina as características desejáveis das cepas BL21, Turner™ e Origami.</p>
<p>Rosetta-gami™ 2 (DE3) (Novagen®) Genótipo: $\Delta(ara-leu)7697 \Delta lacX74$ $\Delta phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL$ (DE3) F'[<i>lac+</i> <i>lacIq pro</i>] <i>gor522::Tn10 trxB pRARE2</i> (Cam^R, Str^R, Tet^R)</p>	<p>Diminuem o viés dos códons raros e melhoram a formação de ligações dissulfeto no citoplasma quando proteínas heterólogas são expressas em <i>E. coli</i>.</p>

Fonte: Joseph *et al.* (2015), Ferrer *et al.* (2003), Novagen (2003), Agilent Technologies Inc. (2015a e 2015b).

1.3 Lectinas: definições, aplicações e classificações

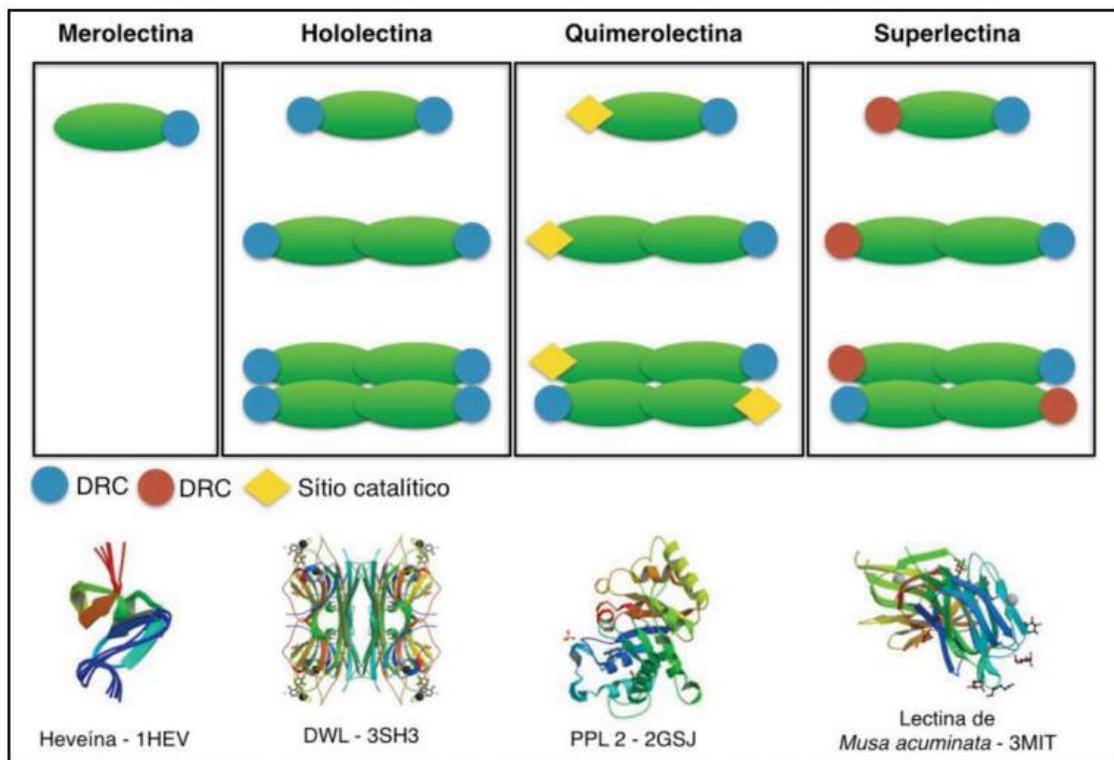
O reconhecimento celular é um evento central em diversos fenômenos biológicos, como a fertilização, migração celular, formação de órgãos, defesa imune, infecções, etc. (SHARON & LIS, 1989). O funcionamento impróprio do reconhecimento celular pode acarretar em doenças para o organismo em questão (SHARON & LIS, 1989). A alta seletividade necessária para tais processos é provida por um encaixe específico entre moléculas complementares: uma que está presente na célula que possui a informação biológica e outra que está na célula capaz de decodificar essa informação (SHARON & LIS, 1989, 1993). O reconhecimento celular, então, representa uma extensão da hipótese chave-fechadura formulada por Emil Fischer em 1897, utilizada para exemplificar a especificidade das interações entre enzimas e substratos (SHARON & LIS, 1989).

Carboidratos podem atuar como intermediadores da comunicação biológica em diversos sistemas biológicos de interação célula-célula, como os citados anteriormente (VARKI, 1993; SANZ-APARICIO *et al.*, 1997). Durante as últimas décadas, muitos estudos foram realizados com o objetivo de elucidar o reconhecimento celular mediado por carboidratos e lectinas (SHARON & LIS, 1989). A informação contida na enorme variedade de estruturas de oligossacarídeos normalmente conjugadas a proteínas ou lipídios em superfícies celulares é reconhecida e decifrada pelas lectinas (SHARON & LIS, 1993; SANZ-APARICIO *et al.*, 1997). As lectinas se tornam únicas pela capacidade de “ler” a informação biológica contida nas estruturas tridimensionais dos açúcares, o glicocódigo (NASCIMENTO *et al.*, 2019).

Lectinas constituem um diverso grupo de proteínas de origem não-imune, as quais possuem, pelo menos, um domínio não-catalítico o qual se liga reversivelmente e especificamente a um carboidrato (mono ou oligossacarídeo) (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). Antigamente pensava-se que as lectinas eram encontradas apenas em plantas, mas na verdade elas são onipresentes na natureza (SHARON & LIS, 1993). Estão presentes geralmente na superfície das células, onde se encontram estrategicamente posicionadas para se ligarem aos carboidratos das células vizinhas (SHARON & LIS, 1993). Dentro das células, as lectinas estão presentes nos corpos protéicos produzidos no retículo endoplasmático (NASCIMENTO *et al.*, 2012).

Uma das formas de classificar as lectinas é de acordo com as estruturas maduras encontradas. Assim, de acordo com Van Damme *et al.* (1998), as lectinas são subdivididas em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Figura 8).

Figura 8 - Representação esquemática das subdivisões das lectinas vegetais de acordo com as estruturas maduras gerais segundo Van Damme *et al.* (1998).



Fonte: Osterne (2016). DRC: Domínio de reconhecimento a carboidratos.

As merolectinas são lectinas que possuem um único domínio de ligação a carboidrato na sua estrutura. Possuem um caráter monovalente, sendo incapazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados. A heveína, uma lectina extraída do látex, é uma pequena merolectina ligante a quitina (VAN DAMME *et al.*, 1998).

As hololectinas são lectinas que, assim como as merolectinas, contêm apenas sítios de ligação a carboidratos na sua estrutura, mas possuem pelo menos dois desses domínios de reconhecimento, os quais são idênticos ou homólogos, se ligando aos mesmos carboidratos similares. Como são multivalentes, são capazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados pela capacidade de formar ligações cruzadas. A maioria das lectinas conhecidas é pertencente a esta classe (VAN DAMME *et al.*, 1998). A DWL, lectina extraída das sementes de *Dioclea wilsonii*, é uma representante dessa classe (RANGEL *et al.*, 2011).

As quimerolectinas são proteínas fusionadas que possuem um ou mais domínios de reconhecimento a carboidratos em conjunto a um domínio não relacionado, o qual age de modo independente ao domínio de reconhecimento a carboidratos (DRC). Dependendo do número de DRCs, as quimerolectinas podem se comportar tanto como merolectinas ou hololectinas. A

exemplo de representantes dessa classe, há as proteínas inativadoras de ribossomos do tipo 2 (*type 2 RIP*), as quais possuem dois sítios de ligação a carboidrato por promotor de inativação de ribossomo (VAN DAMME *et al.*, 1998). Outra representante é a PPL-2, extraída da semente de *Parkia platycephala*, a qual possui um sítio catalítico com atividade endoquitinásica além do sítio de reconhecimento a carboidrato (CAVADA *et al.*, 2006). Ambas agem como hololectinas. Já as quitinases classe I de plantas, com um único domínio de ligação a quitina por molécula, age como uma merolectina (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Por fim, as superlectinas, assim como as hololectinas, possuem pelo menos dois domínios de reconhecimento a carboidratos. Entretanto, diferente das hololectinas, os sítios de ligação a carboidratos das superlectinas reconhecem açúcares estruturalmente não relacionados. Dessa forma, essa classe de lectinas pode ser considerada, também, um grupo especial de quimerolectinas compostas de dois domínios de reconhecimento a açúcares estruturalmente e funcionalmente distintos. Como exemplo de superlectinas, há a TxLC-I extraída do bulbo da tulipa, a qual é capaz de se ligar a manose e *N*-acetil-galactosamina (VAN DAMME *et al.*, 1998). Há também a lectina extraída de *Musa acuminata*, a qual se liga a laminaribiose em diferentes domínios (MEAGHER *et al.*, 2005).

1.4 Lectinas de leguminosas

O termo “lectinas de leguminosas” provém de um tipo particular de lectinas de plantas que é encontrada exclusivamente na família Leguminosae (Fabaceae). A família Leguminosae contém os mais estudados grupos de lectinas de plantas, como também teve um papel determinante no desenvolvimento do estudo dessas proteínas. Muitas lectinas de leguminosas tornaram-se ferramentas importantes nas pesquisas biotecnológicas e são utilizadas como proteínas bioativas na pesquisa e na medicina (VAN DAMME *et al.*, 1998).

As lectinas pertencentes a esse grupo são bastante similares quanto às propriedades físico-químicas e estruturais. Apesar da alta proximidade filogenética e das estruturas conservadas, quando testadas em atividades biológicas, as lectinas de leguminosas apresentam resultados diversos (CAVADA *et al.*, 2001; NASCIMENTO *et al.*, 2019), demonstrando a importância de se continuar pesquisando e estudando essas lectinas de valor inestimável.

É válido ressaltar que a maior parte do trabalho pioneiro na bioquímica, fisiologia e biologia molecular de lectinas de plantas foi alcançada com os estudos de lectinas de leguminosas (VAN DAMME *et al.*, 1998). Como exemplo, a ConA, lectina extraída de sementes de *Canavalia ensiformes* foi a primeira lectina de planta a ser purificada e cristalizada,

e também foi a primeira lectina no mundo a ter a sequência primária detectada e a estrutura terciária resolvida (SUMNER & HOWELL, 1936; EDELMAN *et al.*, 1972; HARDMAN & AINSWORTH, 1972). Assim, ConA é a lectina de planta mais bem caracterizada e estudada até então (CAVADA *et al.*, 2001).

Depois de Poaceae, Leguminosae é a segunda maior família em importância econômica. Essa família é dividida nas subfamílias Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (JUDD *et al.*, 2009). A subfamília Papilionoideae destaca-se como a subfamília de Leguminosae que apresenta maior expressão taxonômica, sendo subdividida em 28 tribos, 500 gêneros e mais de 13 mil espécies, amplamente distribuídas entre as zonas tropicais, subtropicais e regiões temperadas. Phaseoleae é uma das tribos da subfamília Papilionoideae (LEWIS *et al.*, 2005).

1.4.1 A subtribo Diocleinae e a lectina ConV

1.4.1.1 As lectinas do tipo ConA-like

Dentro da família Leguminosae, a tribo Phaseoleae é a que contém o maior número de gêneros, tendo também a maior importância econômica por conter sementes de espécies muito utilizadas na alimentação humana, como a soja (*Glycine max*), o feijão vermelho (*Phaseolus vulgaris*) e o feijão-mungu (*Vigna radiata*) (AISYAH *et al.*, 2016; DA SILVA *et al.*, 2015).

Dentro das subtribos pertencentes à tribo Phaseoleae, encontra-se a subtribo Diocleinae, a qual compreende 13 gêneros (*Canavalia*, *Dioclea*, *Cymbosema*, *Cleobulia*, *Macropsychanthus*, *Neurodolphia*, *Lackeya*, *Luzonia*, *Camptosema*, *Cratylia*, *Collaea*, *Rhodopis* e *Galactia*) (CAVADA *et al.*, 2019b; CAVADA *et al.*, 2001). Lectinas da subtribo Diocleinae têm sido isoladas e purificadas de três desses gêneros: *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea* (CAVADA *et al.*, 2001). Todas as lectinas isoladas da subtribo Diocleinae possuem uma alta similaridade estrutural, mas com muitas diferenças na atividade biológica (CAVADA *et al.*, 2019b). ConA, a lectina extraída das sementes de *Canavalia ensiformes*, foi a primeira lectina dessa subtribo a ser extraída e purificada por Sumner em 1919, a mais bem estudada e conhecida lectina no mundo (VAN DAMME *et al.*, 1998; CAVADA *et al.*, 2019a). As lectinas da subtribo Diocleinae muito semelhantes a ConA são comumente chamadas de lectinas do tipo ConA-like (CAVADA *et al.*, 2019b).

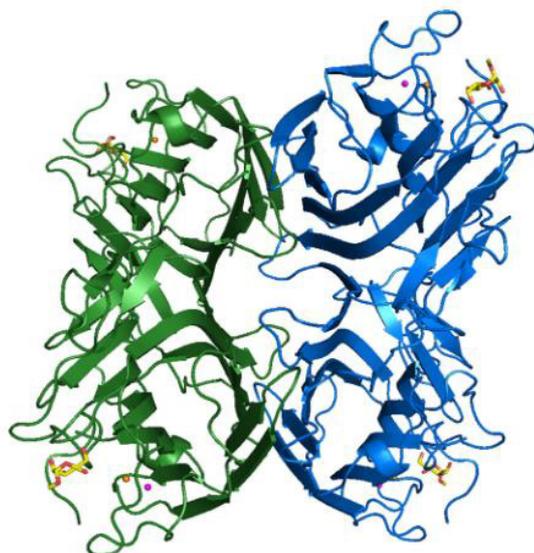
As lectinas do tipo ConA-like são caracterizadas por terem atividades biológicas diversas, como inflamatória, nociceptiva, vasoativa, antiproliferativa, antimicrobiana,

imunomodulatória, antidepressiva, entre outras. Muitas dessas atividades estão diretamente relacionadas à habilidade dessas proteínas de interagirem com carboidratos pelo DRC (CAVADA *et al.*, 2019b). Essas lectinas são compostas por 237 resíduos de aminoácidos e aproximadamente 25 kDa na forma madura, com raras exceções. Elas adquirem essa forma após um processamento pós-traducional dos seus precursores glicoproteicos, chamado de permutação circular (CAVADA *et al.*, 2019b).

Nesse processamento, a chamada pré-pró-lectina (peptídeo sinal + cadeia γ + peptídeo central + cadeia β + C-terminal), após sintetizada, é endereçada ao retículo endoplasmático, onde o peptídeo sinal é removido e o central é glicosilado, formando a pró-lectina. Ela é, então, encaminhada ao complexo de Golgi, onde é processada. Lá, o glicopeptídeo central é clivado juntamente com a região C-terminal, restando as cadeias γ e β . Essas cadeias são religadas em uma ordem inversa, formando a cadeia α ($\beta + \gamma$), a qual consiste na forma madura da lectina (CAVADA *et al.*, 2019b). É válido ressaltar que esse processamento não possui 100% de rendimento, com as cadeias β e γ sempre presentes na purificação dessas lectinas a partir de fontes naturais, constituindo em um perfil eletroforético composto por três bandas para as lectinas que sofrem esse processamento. Além disso, as lectinas selvagens podem ser constituídas como isolectinas ou com diferentes combinações dessas subunidades, trazendo proteínas com potencialidades diferentes (NASCIMENTO *et al.*, 2020).

Quanto à estrutura terciária, ou seja, o monômero, as lectinas do tipo *ConA-like* possuem enovelamento do tipo β -sanduíche, também conhecido como motivo *jellyroll*, o qual consiste em duas folhas β antiparalelas conectadas por loops. Já em relação à estrutura quaternária, dois monômeros podem se associar de forma adjacente, formando um dímero canônico (Figura 9). O tetrâmero é formado pela associação de dois dímeros canônicos, ou seja, é a formação de um dímero de dímeros. O estado de oligomerização das lectinas pode interferir nas suas especificidades a oligossacarídeos ou glicoconjugados e, assim, na sua atividade biológica. Essa oligomerização, no caso das lectinas do tipo *ConA-like* pertencentes à subtribo Diocleinae, pode ser afetada pelo pH do ambiente, uma propriedade chamada de oligomerização pH-dependente (CAVADA *et al.*, 2019b).

Figura 10 - Estrutura quaternária em tetrâmero da lectina ConV complexada com α -metil-manosídeo.



Fonte: Osterne *et al.* (2017).

Quanto às propriedades biológicas, ConV aglutina fortemente eritrócitos de coelho (32768 U.H./mL), com essa atividade inibida por açúcares (D-manose, D-glicose e α -metil-D-manosídeo) e glicoproteínas (ovalbumina e fetuína). Não possui atividade tóxica contra náuplios de *Artemia* sp. e possui efeito vasorelaxante em aorta com endotélio de rato, com a participação ativa do domínio de reconhecimento a carboidratos. ConV mostra, ainda, efeito inflamatório, induzindo edema em pata de rato quando injetada de forma subcutânea, também com participação do DRC. Por fim, ConV possui atividade citotóxica contra células de glioma C6 de ratos, induzindo a autofagia dessas células, bem como impedindo a migração e a viabilidade das mesmas. Assim, a lectina ConV se mostra uma potencial ferramenta nos estudos de atividade antitumoral, antiglioma, inflamatória e vasorelaxante (OSTERNE *et al.*, 2014; 2017).

1.5 Potencial biotecnológico das lectinas

Muitas lectinas têm sido conhecidas e purificadas, sendo a maioria delas oriundas de plantas (SHARON & LIS, 2004). Ainda não há um consenso acerca da função dessas proteínas nos organismos vegetais, mas há indícios que participem na proteção contra patógenos, transporte e armazenamento de carboidratos, armazenamento proteico, reconhecimento celular,

entre outros (PEUMANS & VAN DAMME, 1995; VAN DAMME *et al.*, 1998; NASCIMENTO *et al.*, 2019).

O interesse pelo estudo das lectinas cresceu após as mesmas se terem se mostrado ferramentas inestimáveis na 1) detecção, isolamento e caracterização de glicoconjugados, 2) histoquímica de células e tecidos e 3) no exame das alterações que ocorrem nas superfícies celulares em casos de anomalias e doenças (SHARON & LIS, 2004). Dessa forma, as aplicações biotecnológicas das lectinas são diversas, como listado na Tabela 2.

Tabela 2 - Aplicações biotecnológicas e medicinais das lectinas.

<p>Separação e identificação celular</p> <p>Detecção, isolamento e estudos estruturais de glicoproteínas</p> <p>Investigação de carboidratos em células e organelas; histoquímica e citoquímica</p> <p>Mapeamento de caminhos neuronais</p> <p>Estimulação mitogênica de linfócitos</p> <p>Limpeza da medula óssea para transplante</p> <p>Seleção de lectinas resistentes mutantes</p> <p>Estudos de biossíntese de glicoproteínas</p> <p>Atividade anti-inflamatória</p> <p>Atividade antiviral, antifúngica e antibacteriana</p> <p>Efeito anti-depressivo</p> <p><i>Drug delivery</i></p>

Fonte: SHARON & LIS, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2012

Tratando-se especificamente de lectinas manose-específicas, chama-se a atenção para a quantidade de lectinas purificadas com atividades antivirais, inclusive inativando as proteínas do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) (BARRE *et al.*, 2019). Um grande exemplo dessa atividade anti-HIV é a lectina GRFT, purificada da alga vermelha *Griffithsia* sp. Essa lectina não apenas apresenta atividade antiviral contra o HIV, como também para uma série de outros vírus, entre eles o SARS-CoV, MERS-CoV, HCV, HSV, JEV, PEDV e HPV (LEE, 2019). Algumas lectinas de leguminosas manose-específicas também possuem atividade anti-HIV publicadas, como a ConA, LCA e PSA (LAGARDA-DIAZ *et al.*, 2017).

Além disso, as lectinas manose-específicas também se destacam pelos seus efeitos antitumorais, agindo como biomarcadores e drogas anticâncer. Entretanto, essa atividade não se restringe às lectinas manose-específicas, visto que outras lectinas com diferentes especificidades a carboidratos, como as específicas aos antígenos T/Tn (ex.: jacalin, lectina de *Artocarpus integrifolia*), também podem interagir com os glicanos alterados que cobrem as células tumorais e, assim, exercer o seu efeito citotóxico (BARRE *et al.*, 2019; POIROUX *et al.*, 2017).

1.5.1 Produção heteróloga de lectinas

Como já citado anteriormente, lectinas são proteínas capazes de se ligarem específica e reversivelmente a carboidratos presentes nas membranas celulares (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). Assim, essas proteínas altamente seletivas têm sido amplamente utilizadas para o estudo de interações celulares ocorridas durante eventos patológicos e fisiológicos, o que promove as suas aplicações em escala industrial e farmacológica (MARTÍNEZ-ALARCÓN *et al.*, 2018).

Dessa forma, há um grande interesse nos estudos de purificação e caracterização de lectinas diversas, tendo sido publicados muitos artigos sobre o assunto (HIRABAYASHI *et al.*, 1984; KVENNEFORS *et al.*, 2008; ASHRAF *et al.*, 2010; MOURA *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2019; CAVADA *et al.*, 2020a; CAVADA *et al.*, 2020b). Variados métodos de isolamento e purificação têm sido estudados para a obtenção de lectinas puras a partir da sua origem natural (NASCIMENTO *et al.*, 2012).

Entretanto, tais técnicas geralmente trazem baixos valores produtivos e não são capazes de diferenciar isoformas da mesma lectina, dificultando a praticidade requerida para uma aplicação industrial (MARTÍNEZ-ALARCÓN *et al.*, 2018; NASCIMENTO *et al.*, 2020). Lectinas purificadas de fontes naturais também podem ser formadas a partir de arranjos da cadeia α com os fragmentos β e γ , interferindo na reprodutibilidade dos resultados esperados (NASCIMENTO *et al.*, 2020). Há também a problemática da variação climática, a qual pode influenciar a disponibilidade da lectina madura na sua fonte natural, visto que a sazonalidade interfere na quantidade de fragmentos β e γ . Por fim, problemas como demanda de trabalho, tempo laboratorial e grande consumo de biomassa são comuns em extração de lectinas puras de origem natural (OLIVEIRA *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2020).

Dessa forma, a produção de lectinas recombinantes por técnicas de engenharia genética, além de prover lectinas de uma única isoforma, traz a vantagem de evitar todas as potenciais

problemáticas citadas, ademais do baixo custo, fazendo da produção em escala industrial uma realidade mais factível (YESILIRMAK & SAYERS, 2009; BURGESS-BROWN & BURGESS-BROWN, 2017; MARTÍNEZ-ALARCÓN *et al.*, 2018).

Assim como a maioria das outras proteínas, os sistemas mais utilizados para expressar as lectinas são aqueles constituídos por bactérias e fungos (*E. coli* e *Pichia pastoris*, respectivamente). No caso do uso de sistemas procarióticos, contam-se com técnicas para superar as dificuldades providas pelas modificações pós-traducionais naturalmente existentes em muitas proteínas eucarióticas (MARTÍNEZ-ALARCÓN *et al.*, 2018). Entre as técnicas existentes, há o *refolding*, a otimização do gene da proteína, a inclusão de enzimas no maquinário proteico dos organismos trabalhados, a inclusão de peptídeos solubilizantes e as modificações protéicas *in vitro* (YESILIRMAK & SAYERS, 2009; MARTÍNEZ-ALARCÓN *et al.*, 2018). Entretanto, deve ser reconhecido que, para cada lectina em particular, um sistema menos usual, como o de células vegetais ou de mamíferos, pode ser mais apropriado que os sistemas mais comuns. Porém, o sistema de *E. coli* é o mais utilizado por ser mais barato e exigir menos tempo laboral. Tratando-se de um grupo tão heterogêneo, não se pode generalizar um sistema como mais apropriado que outro (YESILIRMAK & SAYERS, 2009; MARTÍNEZ-ALARCÓN *et al.*, 2018).

Já foram produzidas diversas lectinas recombinantes, a maioria de origem animal e vegetal, as quais têm se mostrado com um maior espectro de aplicações biotecnológicas (MARTÍNEZ-ALARCÓN *et al.*, 2018). De acordo com Gemeiner e colaboradores (2009), mais de 200 lectinas de diferentes fontes já foram clonadas e expressas em sistemas heterólogos. Há desde a produção heteróloga de lectinas humanas até de vegetais comercialmente utilizados na agricultura, como o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Algumas dessas proteínas recombinantes são reportadas na Tabela 3. Portanto, a produção heteróloga de lectinas almeja tanto a produção em larga escala de possíveis novos fármacos, como também uma maior possibilidade de entendimento de diversos processos fisiológicos influenciados pela ação dos carboidratos, como doenças neurológicas, câncer, inflamações, fitopatias e infestações, melhoramento vegetal, entre outros. As lectinas recombinantes são, assim, uma importante ferramenta biotecnológica e biomédica (STREICHER & SHARON, 2003; MARTÍNEZ-ALARCÓN *et al.*, 2018; NASCIMENTO *et al.*, 2020).

Tabela 3 - Algumas lectinas recombinantes produzidas em diferentes sistemas, provenientes de organismos diversos.

Lectina	Fonte original	Sistema produtor	Fonte
pré-pró-rConBr	Sementes de <i>Canavalia brasiliensis</i>	<i>E. coli</i> e <i>P. pastoris</i>	Nogueira <i>et al.</i> (2002); Bezerra <i>et al.</i> (2006)
rCRAMOLL-1	Sementes de <i>Cratylia mollis</i>	<i>E. coli</i>	Varejão <i>et al.</i> (2010)
rDguiL	Sementes de <i>Dioclea guianensis</i>	<i>E. coli</i>	Nagano <i>et al.</i> (2008)
rUDA	<i>Urtica doica</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Martínez-Alarcón <i>et al.</i> (2018)
rPPL	<i>Pleurocybella porrigens</i>	<i>Phanerochaete sordida</i>	Suzuki <i>et al.</i> (2014)
rVML	Sementes de <i>Vatairea macrocarpa</i>	<i>E. coli</i>	Alves-Filho <i>et al.</i> (2013)
rPHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>P. pastoris</i>	Raemaekers <i>et al.</i> (1999)
rNictaba	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>P. pastoris</i>	Martínez-Alarcón <i>et al.</i> (2018)
r- α DSL	<i>Dioclea sclerocarpa</i>	<i>E. coli</i>	Nascimento <i>et al.</i> (2020)

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O presente estudo objetivou otimizar a expressão heteróloga do gene correspondente à cadeia α da lectina ConV em sistema de *Escherichia coli* em diferentes cepas de expressão.

2.2 Específicos

1. Clonar o vetor plasmidial contendo o gene sintético codificante para a cadeia α (forma madura) da lectina ConV em cepas de *Escherichia coli*;
2. Expressar em diferentes cepas de expressão de *Escherichia coli* a lectina recombinante rConV;
3. Determinar as melhores condições de expressão da lectina recombinante rConV para cada cepa de expressão;
4. Avaliar a atividade hemaglutinante e específica de rConV nos extratos proteicos solúveis das diferentes cepas de expressão.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Vetor plasmidial de expressão

Para que a lectina recombinante possa ser expressa de forma heteróloga, o gene sintético foi obtido a partir da sequência otimizada de aminoácidos da cadeia α da forma selvagem (lectina purificada do extrato da semente de *Canavalia virosa*), a qual se encontra disponível no UniProt (ID: C0HJY1), com aproximadamente 237 resíduos de aminoácidos e 25 kDa.

O vetor utilizado para receber o gene otimizado para expressão em *Escherichia coli* e codificante para a lectina ConV foi o vetor plasmidial pET-SUMO (Invitrogen™) (ANEXO A). O plasmídeo pET-SUMO-His₆-ConV foi construído de modo que a lectina recombinante possua duas caudas de fusão, uma de poli-histina (His₆) para auxiliar na purificação da proteína expressa, e uma cauda SUMO, a qual auxilia no aumento da expressão de proteínas recombinantes funcionais e solúveis, evitando a formação de corpos de inclusão (WOOD, 2014; YOUNG *et al.*, 2012). Ambas as caudas foram inseridas na extremidade N-terminal.

3.2 Transformação da cepa de clonagem

Para que a concentração de DNA plasmidial (DNAP) contendo o gene de interesse seja maior, é necessária a clonagem do vetor contendo o gene marcado. A cepa de *Escherichia coli* de clonagem utilizada foi a DH5 α (Invitrogen™).

Para que as células de clonagem recebessem o DNAP com o gene da ConV, foi necessária a sua preparação prévia para receber o plasmídeo, ou seja, deixar a cepa competente.

Dessa forma, foi seguido o protocolo de Sambrook & Russell (2001) para tratamento com cloreto de cálcio (CaCl_2) e posterior transformação via choque térmico. Frascos contendo 100 mL de meio LB (Luria-Bertani) foram inoculados com 150 μL de cultivo de DH5 α *E. coli*, o qual foi previamente deixado sob agitação *overnight*/~16h a 37°C. Em seguida, o inóculo foi incubado a 30°C sob agitação (150 rpm) até que a fase log de crescimento bacteriano fosse alcançada, atingindo a leitura de densidade ótica a 600 nm ($\text{D.O.}_{600\text{nm}}$) de 0,6. Em seguida, a cultura foi distribuída em tubos estéreis, os quais foram centrifugados a 3000 rpm a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante, então, foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 2,85 mL de CaCl_2 100 mM gelado e estéril. Por fim, foram acrescidos 150 μL de glicerol 80% estéril, resultando em 3 mL de cultura, e o volume total foi distribuído em microtubos estéreis em alíquotas de 100 μL .

Após esse tratamento prévio da cepa de clonagem, a mesma foi transformada, ou seja, recebeu o DNAp contendo o gene de interesse, dando continuidade ao protocolo de Sambrook & Russell (2001). Para isso, 2 μL do plasmídeo (pET-SUMO-His₆-ConV) foi inoculado em cultura de 50 μL de DH5 α *E. coli* competente. A cultura, então, foi incubada por 30 minutos no gelo, seguidos por 50 segundos em banho maria a 42°C e, novamente, no gelo por mais dois minutos (tratamento de choque térmico). Por fim, foram adicionados 950 μL de meio LB à cultura e a mesma foi deixada sob agitação a 150 rpm a 37°C por uma hora e 30 minutos. É importante ressaltar que todo o processo foi realizado em fluxo laminar para que não houvesse contaminação das amostras obtidas.

3.3 Plaqueamento e cultivo da cepa de clonagem transformada

Após a transformação da cepa de clonagem, a mesma foi cultivada para a formação de colônias isoladas positivas e posterior purificação do DNAp, seguindo protocolo descrito por Sambrook & Russell (2001). Assim, 100 μL da cultura transformada foram plaqueados em placa de cultivo estéril contendo 25 mL meio LB Ágar (Ágar Luria-Bertani) e 25 μL de antibiótico (canamicina, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), com posterior incubação *overnight*/~16h a 37°C. O branco foi realizado contendo apenas o meio de cultura (LB Ágar) na mesma quantidade, a fim de se testar a esterilidade do meio.

Com o crescimento positivo das colônias isoladas da cepa de clonagem, cinco colônias características e isoladas da cepa foram inoculadas em 4 mL de meio LB contendo 4 μL de antibiótico (canamicina, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em 10 repetições. Os inóculos foram incubados *overnight*/~16h a 37°C sob agitação (150 rpm). O branco foi realizado contendo o meio LB o

mesmo antibiótico utilizado na incubação das culturas, todos nas mesmas proporções, e uma ponteira contaminada, a fim de se testar a eficácia do antibiótico. A incubação das culturas em meio LB se fez necessária para prosseguir com o método de purificação escolhido.

3.4 Purificação e quantificação do DNA plasmidial das cepas de clonagem

Após o crescimento positivo das cepas de clonagem no inóculo em meio LB, o processo seguiu para a purificação do DNA plasmidial contendo o gene de interesse por meio de uma cromatografia em coluna com membrana de sílica (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). Para isso, foi seguido o kit e o seu protocolo *Zippy™ Plasmid Miniprep System* (Zymo Research Corp.).

Assim, foram concentrados 600 µL de cada uma das culturas bacterianas em microtubos estéreis de 1,5 mL. Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução de lise celular (*7X Lysis Buffer (Blue)*) em cada microtubo de cultura celular, agitando-se por inversão seis vezes para solubilizar as amostras, até que fosse obtida uma coloração azul opaca, indicando a lise completa das cepas de clonagem. Ao final, aguardou-se por dois minutos para a continuidade do protocolo.

Posteriormente, foram acrescidos 350 µL da solução de neutralizante (*Neutralization Buffer (Yellow)*) nas amostras, e as mesmas foram agitadas por inversão até que houvesse o aparecimento de uma coloração amarela com a formação de um precipitado, indicando a completa neutralização das amostras. As amostras, então, foram centrifugadas em velocidade máxima (132000 rpm) a 4°C por três minutos. O sobrenadante (~900 µL) das amostras foram transferidos para minicolunas (*Zymo-Spin™ IIN column*) com o auxílio de uma pipeta. As minicolunas foram acopladas aos microtubos coletores (*Collection Tube*) limpos e centrifugadas em velocidade máxima (13200 rpm) a 4°C por 15 segundos.

O eluído foi descartado e, nas mesmas minicolunas, foram acrescidos 200 µL da solução removedora de endoxitonas (*Endo-Wash Buffer*). Novamente, as amostras foram centrifugadas em velocidade máxima (13200 rpm) a 4°C por 30 segundos. Posteriormente, foram acrescidos 400 µL nas minicolunas da solução de lavagem da coluna (*Zippy™ Wash Buffer*), seguida de uma centrifugação em velocidade máxima (13200 rpm) a 4°C por um minuto.

Por fim, as minicolunas foram transferidas para microtubos estéreis de 1,5 mL, onde foram acrescidos 30 µL da solução de eluição (*Zippy™ Elution Buffer*) diretamente na matriz das minicolunas. As amostras foram deixadas descansando por um minuto em temperatura ambiente e, em seguida, centrifugadas em velocidade máxima (13200 rpm) a 4°C por 30

segundos. O DNA plasmidial eluído foi armazenado a -20°C para posterior utilização.

Para a quantificação do DNA plasmidial em solução nas amostras, foi utilizado o espectrofotômetro *NanoVue Plus* (GE Healthcare®) com luz UV no programa específico para quantificação de ácidos nucleicos. Os dados acerca da concentração e absorbância na faixa de 260/280 ($A_{260/280}$) foram registrados e tabelados. O branco foi realizado com a mesma solução de eluição (*Zippy™ Elution Buffer*) utilizada na eluição do DNA plasmidial.

3.4.1 Monitoramento do DNAp por eletroforese de agarose 1%

Para a certificação de que as amostras não foram degradadas, foi necessária a realização da eletroforese das amostras de DNA plasmidial. Assim, a eletroforese em gel de agarose 1% seguiu o protocolo descrito por Sambrook & Russell (2001). Utilizou-se 3 μL das amostras de DNA plasmidial, 1 μL do tampão de amostra *Safer Dye* (KASVI), 2 μL do marcador molecular *100bp Ladder Plus* (Sinapse Inc.) e aproximadamente 350 mL de tampão de corrida TBE (*Tris-borate-EDTA*) 0,5x concentrado. A corrida eletroforética foi submetida a uma voltagem constante de 100 V. A visualização das bandas no gel se deu com o auxílio do fotodocumentador *Gel Doc™ EZ Imager* (Bio-Rad).

3.5 Transformação das cepas de expressão

As cepas de expressão utilizadas para receber o vetor de expressão com o gene marcado em estudo foram: BL21 (DE3) (NOVAGEN) e BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (Agilent Technologies) BL21 (DE3) pLysS (NOVAGEN), Tuner (DE3) pLysS (NOVAGEN) e ArcticExpress (DE3) (Agilent Technologies).

Cada uma das cepas foram transformadas, recebendo o DNAp contendo o gene de interesse seguindo o mesmo protocolo utilizado para a transformação das cepas de clonagem. Iniciou-se, então, pelo tratamento prévio para deixar as células de expressão competentes para a recepção do DNA plasmidial com o gene para ConV. Portanto, houve primeiramente a etapa de tratamento com cloreto de cálcio (CaCl_2), como descrito anteriormente, para cada uma das cepas de expressão.

Em seguida, as cepas de expressão receberam o DNAp contendo o gene de interesse. Assim, 2 μL do plasmídeo purificado da terceira réplica foram inoculados em culturas de 100 μL de cada uma das cepas de expressão escolhidas. Todas as culturas receberam o mesmo tratamento de choque térmico descrito anteriormente para as cepas de clonagem. Por fim, foram

adicionados 900 μL de meio LB em cada cultura e as mesmas foram deixadas sob agitação a 220 rpm a 37°C por uma hora e 30 minutos.

3.6 Plaqueamento e cultivo das cepas de expressão transformadas

Seguindo com o protocolo descrito por Sambrook & Russell (2001), as cepas de expressão transformadas foram cultivadas em meio LB Ágar para a seleção de colônias isoladas positivas. Dessa forma, 100 μL de cada uma das culturas transformadas foram plaqueadas em meio LB Ágar (25 mL) com 25 μL de antibiótico (canamicina, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O branco foi realizado contendo o meio de cultura na mesma quantidade. Todas as culturas foram incubadas *overnight*/~16h a 37°C.

Dando continuidade ao protocolo, cinco colônias características e isoladas formadas de cada cepa de expressão foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo 5 μL de antibiótico (canamicina, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em triplicata. O branco foi realizado com o meio LB e o mesmo antibiótico utilizado, nas mesmas proporções, e uma ponteira contaminada. Todos os inóculos também foram incubados *overnight*/~16h a 37°C sob agitação (150 rpm).

3.7 Ensaios de expressão de proteínas

Para a identificação da melhor condição de expressão proteica da lectina rConV nas cepas de expressão, foram realizados ensaios de expressão de proteínas. Os ensaios foram feitos duas vezes: o primeiro apenas com as cepas de expressão BL21 (DE3) e BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, enquanto o segundo foi realizado com as cepas BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, BL21 (DE3) pLysS, Tuner (DE3) pLysS e ArcticExpress (DE3). Em ambos ensaios, foi realizada a indução de expressão proteica das cepas de expressão variando a temperatura ambiente, o tempo de indução e a concentração de indutor proteico. Seguiu-se o mesmo protocolo descrito por Sambrook & Russell (2001).

Em ambos os ensaios, inicialmente, foram inoculados 5 μL das culturas celulares previamente cultivadas em 5 mL de meio LB, juntamente com 5 μL de antibiótico (canamicina, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para cada uma das cepas em diferentes repetições. Em seguida, os inóculos foram incubados a 37°C sob agitação (220 rpm) até que a fase log de crescimento bacteriano fosse alcançada, atingindo a leitura de densidade ótima a 600 nm ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) de 0,6.

Para o primeiro ensaio, culturas de cada uma das cepas de expressão (BL21 (DE3) e BL21-CodonPlus(DE3)-RIL) foram testadas para o ensaio de expressão proteica nas

temperaturas de 20°C e 37°C. De um inóculo extra de cada cepa de expressão, foi retirada imediatamente uma alíquota de 1 mL e a amostra foi identificada como extrato bacteriano. Posteriormente, em uma cultura celular de cada cepa de expressão para cada temperatura foi acrescido IPTG na concentração final de 1 mM. As culturas ausentes de IPTG são consideradas como controle (amostra não induzida) para posterior comparação com as amostras proteicas induzidas com IPTG. Em ambas temperaturas testadas, o tempo de ação do indutor testado foi de 2h e 16h.

Para o segundo ensaio, foram separadas quatro culturas das cepas de expressão BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, BL21 (DE3) pLysS e Tuner (DE3) pLysS para o teste a 37°C e outras quatro culturas dessas mesmas cepas de expressão para o teste a 30°C. Nesses dois testes, o indutor proteico (IPTG) foi adicionado nas concentrações finais de 0.25mM, 0.5mM e 1mM, com tempos de ação do indutor de 1h, 2h e 4h. Com essas mesmas cepas, também foi realizado o teste de expressão na temperatura de 16°C, com IPTG nas concentrações de 0.25mM, 0.5mM e 1mM, com tempo de ação do indutor de 16h. Já a cepa de expressão ArcticExpress (DE3) foi testada para expressar a proteína de interesse apenas na temperatura de 16°C, variando a concentração do indutor proteico (0.25mM, 0.5mM e 1mM), com 24h de tempo de indução. Essa cepa foi trabalhada apenas nesses parâmetros, pois é o indicado pelo fabricante (AGILENT TECHNOLOGIES, 2015b). Para cada parâmetro de cada cepa em ambos os ensaios, foi retirada uma alíquota de 1mL. Na tabela a seguir, seguem os parâmetros dos dois ensaios citados para cada uma das cepas.

Tabela 4 - Condições de expressão de proteínas para as diferentes cepas nos dois ensaios realizados.

Ensaio	Cepa de expressão	Temperatura	Concentração do indutor	Tempo de indução
Primeiro ensaio de expressão proteica	BL21 (DE3)	20°C e 37°C	1mM	2h e 16h
	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	20°C e 37°C	1mM	2h e 16h
Segundo ensaio de expressão proteica	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	37°C e 30°C	0.25mM, 0.5mM e 1mM	1h, 2h e 4h
		16°C		16h
	BL21 (DE3) pLysS	37°C e 30°C	0.25mM, 0.5mM e 1mM	1h, 2h e 4h
		16°C		16h
Tuner (DE3) pLysS	37°C e 30°C	0.25mM, 0.5mM e 1mM	1h, 2h e 4h	
			16°C	16h
ArcticExpress (DE3)	16°C	0.25mM, 0.5mM e 1mM	24h	

Fonte: a própria autora (2021).

3.7.1 Avaliação da proteína expressa por eletroforese SDS-PAGE 12%

Para a avaliação da melhor condição de expressão de rConV nos ensaios de expressão proteica, foi necessária a realização da eletroforese das amostras em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes 12% (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) (LAEMMLI, 1970).

Cada alíquota de 1 mL obtida foi centrifugada a 13200 x g por cinco minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado duas vezes com NaCl 0,15M da seguinte maneira: o *pellet* foi ressuspensionado em 1mL de NaCl 0,15M, a solução centrifugada a 13200 x g por cinco minutos a 4°C e o sobrenadante descartado, repetindo o processo mais uma vez. Essa etapa foi adicionada a fim de que o meio LB restante na amostra seja removido e não

interfira na visualização da proteína no gel de eletroforese.

Após a etapa de lavagem, os *pellets* das amostras foram ressuspendidos em 50 μ L de tampão de amostra SDS 1x concentrado (Tris-HCl 50mM pH 6.8, SDS 1%, glicerol 10%, bromofenol 0,001% e β -mercaptoetanol 5%). Todas as amostras foram aquecidas a 100°C por cinco minutos e, posteriormente, centrifugadas a 13200 x g por mais cinco minutos a 4°C.

Posteriormente, foram utilizados 12 μ L de cada amostra proteica, 5 μ L do marcador molecular *LMW-SDS Protein Marker (17044601)* (GE Healthcare®) e aproximadamente 500 mL de tampão de corrida 1x concentrado. A corrida eletroforética foi submetida a uma voltagem constante de 10 V. A visualização das bandas no gel de poliacrilamida se deu corando-o, após a corrida eletroforética, com Coomassie Brilliant Blue G-250 e o auxílio do fotodocumentador *Gel Doc™ EZ Imager* (Bio-Rad) para a revelação do gel.

3.8 Preparo dos extratos proteicos bacterianos

Após a seleção das melhores condições de expressão proteica, foi necessário avaliar se a proteína se encontrava solubilizada e/ou em corpos de inclusão. Posteriormente, foi necessária a devida avaliação da quantificação, atividade hemaglutinante específica e do ensaio de inibição por açúcares da proteína expressa na porção solúvel. Sendo assim, primeiramente se fez necessário o preparo do extrato proteico. O protocolo segue o mesmo descrito para a obtenção de proteínas recombinantes puras segundo Sambrook & Russell (2001).

Assim, foi preparado um inóculo bacteriano a partir das cepas de expressão com as melhores condições escolhidas, inoculando 5 μ L da cultura estoque celular em 5 mL de meio LB com antibiótico (canamicina, 50 μ g/mL) em duplicata. O branco foi realizado com o meio LB e o mesmo antibiótico utilizado, nas mesmas proporções, e uma ponteira contaminada. Todos os inóculos também foram incubados *overnight*/~16h a 37°C sob agitação (150 rpm).

Posteriormente, foram inoculados 5 μ L da cultura celular recém-cultivada, em 5 mL de meio LB, juntamente com 5 μ L de antibiótico (canamicina, 50 μ g/mL) em três repetições. Em seguida, os inóculos foram incubados a 37°C sob agitação (220 rpm) até que a fase log de crescimento bacteriano fosse alcançada, atingindo a leitura de densidade ótima a 600 nm (D.O._{600nm}) de 0,6. Atingindo a fase log, o indutor de expressão proteica (IPTG) foi adicionado na concentração final escolhida para cada um dos cultivos celulares, havendo o ajuste das temperaturas e tempos para as melhores condições escolhidas a partir dos ensaios de expressão proteica.

Após os tempos de indução determinados, todos os cultivos celulares foram reunidos

em tubos estéreis de 50 mL, um para cada cepa, resultando em 15 mL de cultivo celular induzido para cada cepa de expressão. A amostra foi centrifugada (6000 g) por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuscitado no tampão Tris-HCl 50 mM pH 7.6 com NaCl 0.5 M, CaCl₂ 5mM, MnCl₂ 5 mM e Glicerol 10%, na proporção de 10mL de tampão para cada um grama de *pellet*.

Em seguida, para o início da lise celular, as amostras foram submetidas a um rompimento celular enzimático. Assim, foi acrescentada nas amostras lisozima de clara de ovo de galinha (Sigma-Aldrich L7651), diluída em tampão Tris-HCl 10mM pH 8.0 com NaCl 0.1 M, EDTA 1 mM e TRITON® X-100 5%, na proporção de 200 µL de solução de lisozima a cada 100 mg de *pellet*. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 37°C. Para finalizar a lise celular, as amostras foram submetidas a um rompimento celular mecânico por meio de um sonicador *Sonoplus HD 2070* (Bandelin®) com os seguintes parâmetros: 15 ciclos de com duração de 15 segundos cada um, com intervalos de 15 segundos entre cada ciclo, a uma potência de 50W.

Ao final da lise celular, as amostras foram centrifugadas a (10000 g) por 30 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram separados dos *pellets*. Assim, o sobrenadante é considerado a fração solúvel contendo a proteína de interesse expressa solubilizada, e o *pellet* a fração contendo a proteína expressa precipitada e/ou em corpos de inclusão.

3.9 Determinação da atividade hemaglutinante dos extratos proteicos bacterianos

Para verificar a atividade das proteínas na fase solúvel presentes nos extratos proteicos, as mesmas foram submetidas a uma atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho a 3% nas formas nativa (para os extratos de ambos os ensaios) e nas tratadas enzimaticamente com papaína e tripsina (somente para os extratos do primeiro ensaio), seguindo o protocolo adaptado de Moreira & Perrone (1977).

Dessa forma, em uma placa de microtitulação, foram adicionados 50 µL do tampão Tris-HCl 0,1M pH 7.6 com NaCl 0,15M, onde foi diluída de forma seriada (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, etc.) as amostras dos extratos proteicos em triplicata. Em seguida, 50 µL de cada suspensão de eritrócitos a 3% nativo e tratados enzimaticamente foram adicionados às soluções. Por fim, os ensaios foram incubados em uma estufa a 37°C por 30 minutos e, posteriormente, acondicionado por mais 30 minutos em temperatura ambiente (25°C).

A aglutinação foi observada macroscopicamente, sendo considerada a concentração correspondente a uma unidade de hemaglutinação (U.H.) a menor concentração proteica capaz

de hemaglutinar visivelmente os eritrócitos. Esse título foi expresso em unidades de hemaglutinação por mililitro (U.H./mL).

3.10 Quantificação de proteínas solúveis nos extratos proteicos bacterianos

Após a obtenção dos extratos proteicos, os mesmos, na fase solúvel, foram submetidos a uma quantificação de proteínas solúveis através do método de Bradford (1976). Assim, 100 μ L do extrato proteico na fase solúvel de cada amostra foram solubilizados com 100 μ L do tampão Tris-HCl 0,1M pH 7.6 com NaCl 0,15M. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL de reagente de Bradford em um tubo de ensaio de vidro.

A solução foi acondicionada em ambiente protegido da luz por 15 minutos, havendo a leitura da absorbância em um espectrofotômetro (*Amersham Biosciences 2100*) no comprimento de onda de 595 nm. O branco foi realizado apenas com o tampão juntamente com o reagente de Bradford, nas mesmas quantidades. A concentração de proteínas solúveis é expressa em miligramas de proteína por mililitro (mg/mL). A proteína utilizada no preparo da curva padrão foi a Albumina Sérica Bovina.

3.11 Determinação da atividade hemaglutinante específica dos extratos proteicos bacterianos

Com os dados da concentração de proteínas solúveis e do título de hemaglutinação do extrato proteico, foi possível calcular a atividade hemaglutinante específica das proteínas presentes na fase solúvel dos extratos proteicos. Esse cálculo tem como objetivo monitorar a concentração da lectina recombinante ativa no extrato proteico.

Assim, o cálculo é feito dividindo-se o título de hemaglutinação obtido, em U.H./mL, pela concentração de proteínas solúveis nos extratos proteicos, em mg/mL. Portanto, a atividade hemaglutinante específica é expressa em unidades de hemaglutinação por miligrama de proteína (U.H./mg). Dessa forma, foi possível deduzir a concentração de proteínas hemaglutinantes presentes no extrato proteico em cada miligrama de proteína.

3.12 Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante dos extratos proteicos bacterianos por açúcares

Com a finalidade de avaliar a especificidade aos carboidratos da lectina rConV presente

nos extratos proteicos, foram realizados ensaios de inibição da atividade hemaglutinante dos extratos por açúcares diversos (D-Glucose, D-Manose, D-Galactose, L-manose, L-fucose, α -Lactose, Sacarose, Melibiose, Ovalbumina, Mucina, α -metil-D-manosídeo, α -metil-D-glucopiranosídeo e N-acetil-D-glucosamina) na concentração inicial de 100mM, seguindo o protocolo adaptado de Moreira & Perrone (1977).

Assim, em uma placa de microtitulação, foram adicionados, em duplicata, 25 μ L do tampão Tris-HCl 0,1M pH 7.6 com NaCl 0,15M. Em seguida, foram adicionados 25 μ L de cada açúcar apenas nos primeiros poços, havendo uma diluição seriada nos poços seguintes, resultando em concentrações finais dos carboidratos em 50 mM, 25 mM, 12,5 mM, etc. Posteriormente, 25 μ L dos extratos da lectina no título de 4 U.H./mL foram adicionados em todos os poços. Essa solução foi, então, incubada a 37°C por 30 minutos e por mais 30 minutos em temperatura ambiente (25°C). Por fim, 50 μ L dos eritrócitos de coelho a 3% tratados com tripsina foram adicionados em todos os poços. O ensaio foi novamente incubado a 37°C por 30 minutos e por mais 30 minutos em temperatura ambiente (25°C). Assim, a concentração mínima inibitória (CMI) foi interpretada como a menor concentração de açúcar necessária para inibir a aglutinação dos eritrócitos pela rConV.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Vetor plasmidial de expressão

O gene codificante para a cadeia α da proteína recombinante rConV foi construído em um vetor plasmidial da família pET, com a adição das caudas de fusão SUMO e poli-histidina (His₆) e sob a ação do promotor T7.

A forma selvagem da lectina ConV purificada, assim como outras lectinas do tipo ConA-like, é composta pela cadeia α e os fragmentos β e γ . Esse perfil é resultado da permutação circular, uma modificação pós-traducional que ocorre durante a produção da forma madura da lectina. Sendo esse um processo que requer um maquinário enzimático robusto, ausente em sistemas procarióticos (GRÄSLUND *et al.*, 2008), como em *Escherichia coli*, é necessário que uma otimização genética seja feita para a produção recombinante dessa lectina recombinante na forma madura e ativa.

Além disso, estudos anteriores realizados sem uma otimização genética para a produção recombinante das lectinas ConA e ConBr em sistema de *E. coli* geraram proteínas recombinantes inativas ou com baixa solubilidade (NOGUEIRA *et al.*, 2002; DINCTURK *et*

al., 2001). Assim, a produção recombinante da cadeia α da lectina ConV é uma tentativa viável de a produzir, de forma heteróloga em sistema de *E. coli*, no estado maduro e ativo, sem a necessidade de modificações pós-traducionais inviáveis em sistemas procarióticos.

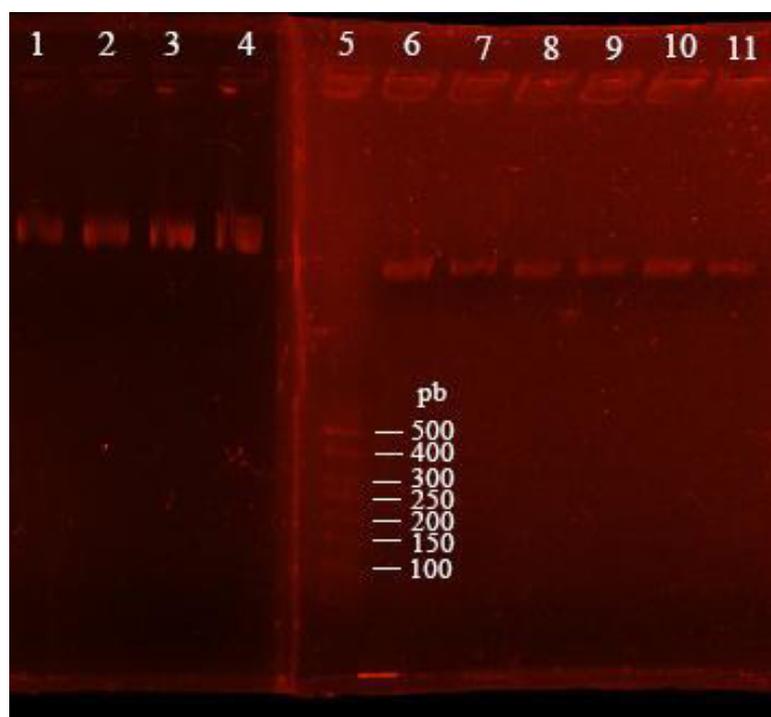
Uma das formas de auxiliar a solubilização das proteínas recombinantes no sistema de *E. coli* e, conseqüentemente, evitando a formação de agregados proteicos no interior bacteriano é adicionando caudas de fusão na construção do vetor plasmidial. Algumas caudas de fusão, como a NusA, SUMO, Trx, MBP, etc., são conhecidas por facilitarem esse processo (ROSENO & CECCARELLI, 2014).

Com base nessas informações, a cauda de fusão SUMO foi adicionada com o propósito de facilitar a solubilidade da proteína recombinante a ser expressa em *E. coli*, visto que rConV é uma proteína eucariótica e tem, assim, uma maior propensão a formar agregados proteicos (GRÄSLUND *et al.*, 2008). Além da SUMO, a cauda de poli-histidina (His₆) também foi adicionada para facilitar a purificação da proteína recombinante em uma cromatografia de afinidade do tipo IMAC (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*).

4.2 Purificação e quantificação do DNA plasmidial da cepa de clonagem

Após a obtenção do vetor construído contendo o gene que expressa para a rConV (pET-SUMO-His₆-ConV), o mesmo foi utilizado para transformar a cepa de clonagem competente de *E. coli* (DH5 α). Em seguida, os clones positivos transformados foram submetidos à extração e purificação plasmidial, com a finalidade de validar a transformação. Assim, as amostras de DNAs purificadas foram submetidas à uma eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 11), juntamente à uma quantificação de concentração (ng/ μ L) e leitura de absorbância na faixa de 260-280 nm ($A_{260/280\text{ nm}}$) (Tabela 5).

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1% das amostras de DNA plasmidial purificado das 10 réplicas obtidas.



Fonte: a própria autora (2021). 1-4) Réplicas de 1 a 4; 5) Marcador molecular; 6-11) Réplicas de 5 a 10). pb: pares de base.

Tabela 5 - Quantificação da concentração do DNA plasmidial, contendo o gene para rConV, purificado e leitura de absorbância na faixa de 260-280 ($A_{260/280 \text{ nm}}$) das 10 réplicas obtidas.

Réplica	Concentração (ng/ μ L)	$A_{260/280 \text{ nm}}$
1	130,5	1,992
2	87,5	1,966
3	122,5	2,008
4	105,0	1,963
5	50,0	2,000
6	80,0	1,975
7	64,5	2,016
8	93,0	2,000
9	121,0	2,000
10	55,0	1,964

Fonte: a própria autora (2021).

De acordo com a Figura 11, percebe-se que todos os vetores plasmidiais estão intactos e sem contaminação aparente, indicando o sucesso na etapa de purificação do DNAp realizada. É sabido que, de acordo com o manual do espectrofotômetro *NanoVue Plus* (GE Healthcare®), o valor recomendado para a faixa de absorvância 260/280 é na faixa de 2,0, pois valores abaixo disso indicam contaminação por proteínas. Assim, todas as réplicas estão de acordo com os padrões estabelecidos, reforçando a correta purificação do DNA plasmidial.

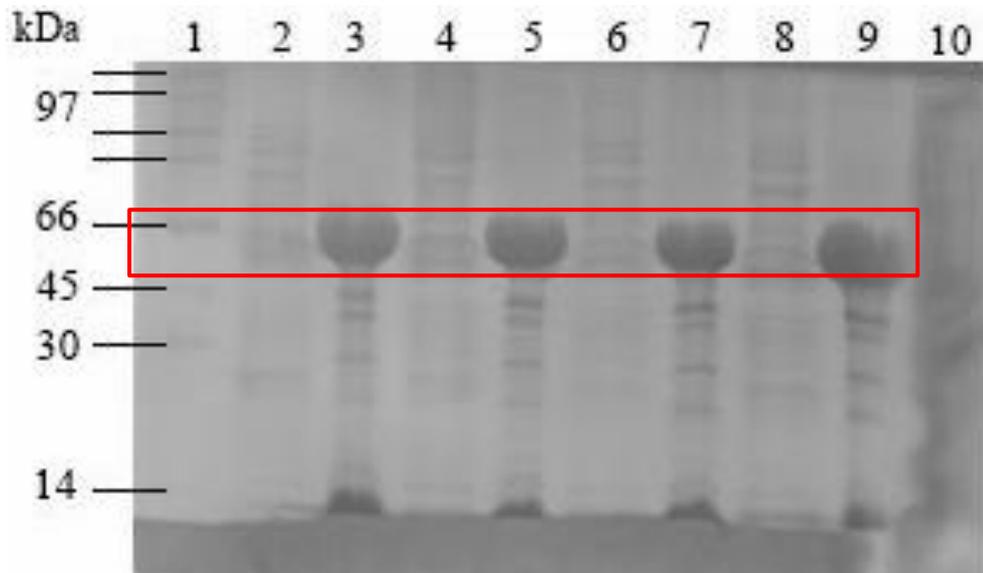
Dessa forma, a réplica de DNA plasmidial purificado escolhida para transformar as cepas de expressão foi a Réplica 3, por conter uma das maiores concentrações de DNAp entre as amostras e estar mais próximo da faixa de 2,0.

4.3 Ensaios de expressão de proteínas

A partir da obtenção do DNA plasmidial purificado, seguiu-se para a transformação das cepas de expressão (BL21 (DE3), BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, BL21 (DE3) pLysS, Tuner (DE3) pLysS e ArcticExpress (DE3)) com a terceira réplica amostra de DNAp. Com o crescimento positivo das colônias transformadas isoladas e características, seguiu-se para os ensaios de expressão proteica destas cepas.

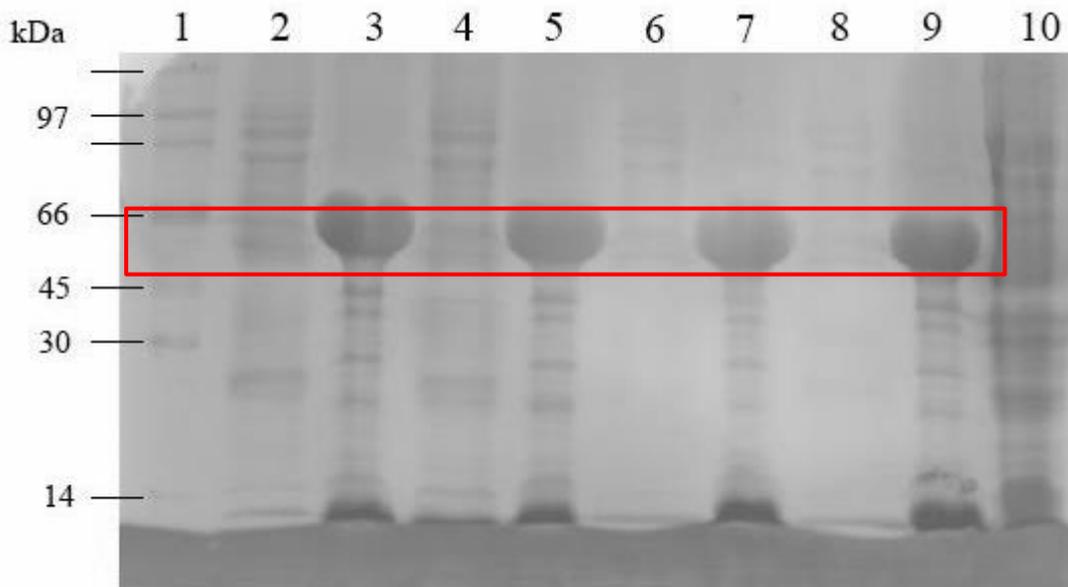
No primeiro ensaio de expressão proteica das cepas transformadas, as mesmas foram submetidas à expressão de proteínas nas temperaturas de 20°C e 37°C, com 1 mM de IPTG e 2h e 16h de ação do indutor. Para avaliar a melhor condição de expressão da rConV, foi realizada uma eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) de todas as amostras obtidas (Figuras 12 e 13). Já no segundo ensaio de expressão proteica, as cepas transformadas foram submetidas à expressão de proteínas nas temperaturas de 37°C e 30°C, com indutor nas concentrações de 0.25 mM, 0.5 mM e 1.0 mM, com 1h, 2h e 4h de ação do IPTG; na temperatura de 16°C, com IPTG nas concentrações de 0.25 mM, 0.5 mM e 1.0 mM, com tempo de ação do indutor de 16h; e, exclusivamente para a ArcticExpress (DE3), na temperatura de 16°C, com concentração de IPTG de 0.25 mM, 0.5 mM e 1.0 mM e 24h de ação do indutor. Por fim, para também avaliar as melhores condições de expressão da rConV, foram realizadas eletroforeses do tipo SDS-PAGE de todas as amostras obtidas (Figuras 14 a 24). É importante ressaltar que a proteína recombinante produzida se encontra na faixa de 45-66 kDa, visto que possui um peso molecular aproximado de 50 kDa.

Figura 12 - Primeiro ensaio de expressão de rConV com a cepa de *E. coli* BL21 (DE3) com indução de IPTG 1 mM em diferentes temperaturas e tempos de ação do indutor.



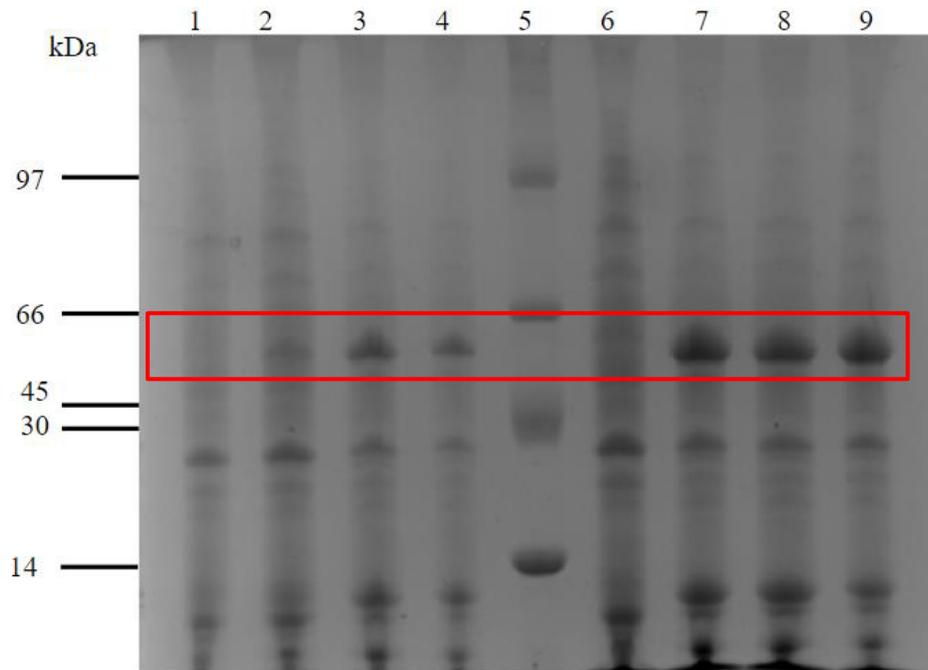
Fonte: a própria autora (2021). NI: Não induzido; CI: Com indução de IPTG 1mM. 1) Marcador molecular; 2) NI, 20°C, 2h; 3) CI, 20°C, 2h; 4) NI, 20°C, 16h; 5) CI, 20°C, 16h; 6) NI, 37°C, 2h; 7) CI, 37°C, 2h; 8) NI, 37°C, 16h; 9) CI, 37°C, 16h; 10) Extrato bacteriano sem transformação. Em destaque a proteína de interesse sintetizada.

Figura 13 - Primeiro ensaio de expressão de rConV com a cepa de *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL com indução de IPTG 1 mM em diferentes temperaturas e tempos de ação do indutor.



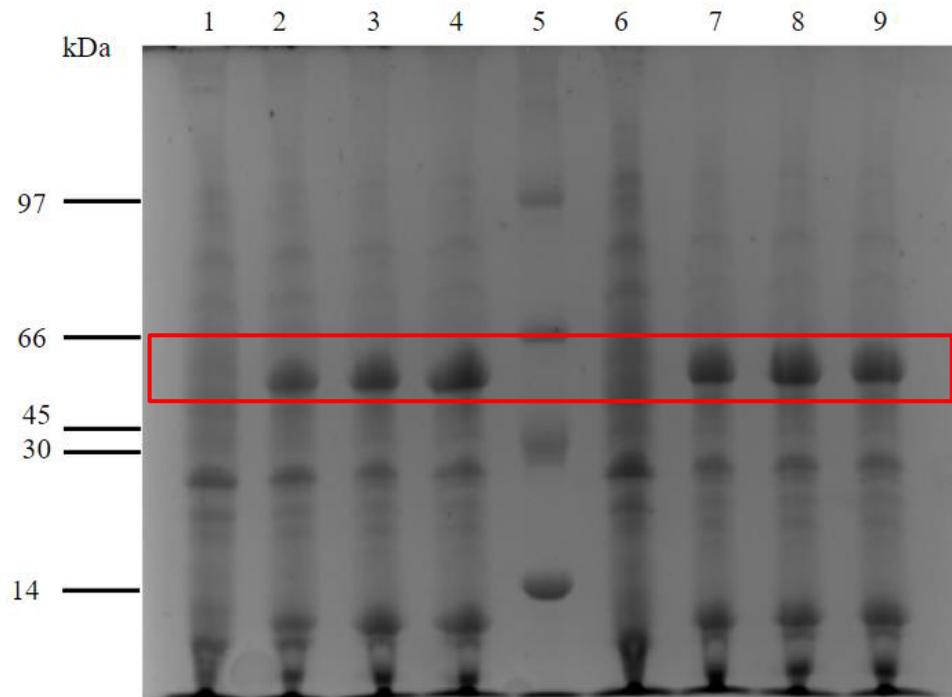
Fonte: a própria autora (2021). NI: Não induzido; CI: Com indução de IPTG 1mM. 1) Marcador molecular; 2) NI, 20°C, 2h; 3) CI, 20°C, 2h; 4) NI, 20°C, 16h; 5) CI, 20°C, 16h; 6) NI, 37°C, 2h; 7) CI, 37°C, 2h; 8) NI, 37°C, 16h; 9) CI, 37°C, 16h; 10) Extrato bacteriano sem transformação. Em destaque a proteína de interesse sintetizada.

Figura 14 - Segundo ensaio de expressão de rConV com a cepa de *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL com indução de IPTG em diferentes concentrações e temperaturas, com 1h de ação do indutor.



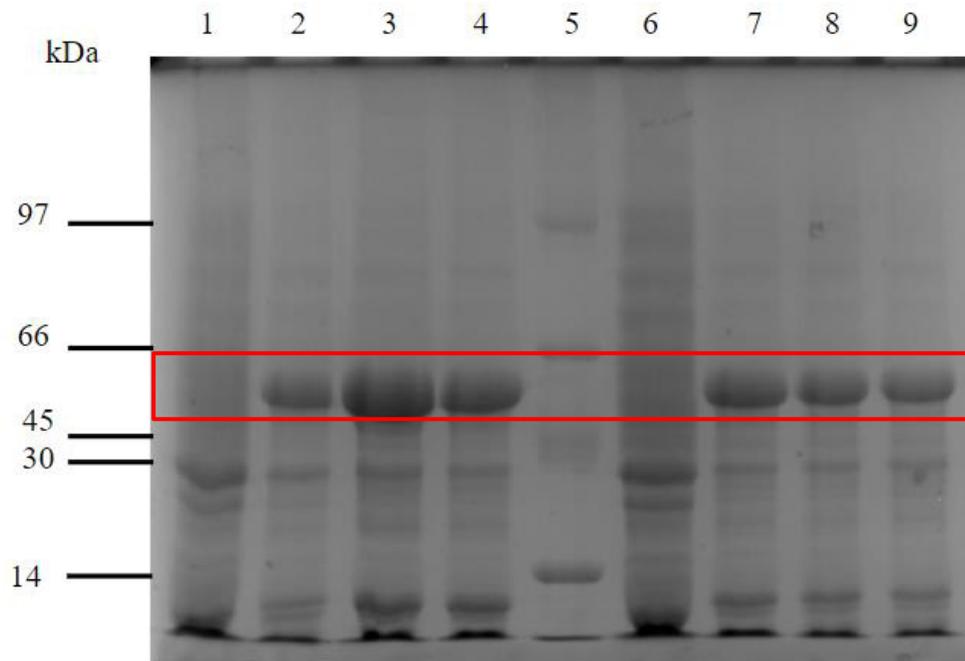
Fonte: a própria autora (2021). NI: Não induzido. 1) NI, 30°C, 1h; 2) IPTG 0.25 mM, 30°C, 1h; 3) IPTG 0.5 mM, 30°C, 1h; 4) IPTG 1 mM, 30°C, 1h; 5) Marcador molecular; 6) IPTG NI, 37°C, 1h; 7) IPTG 0.25 mM, 37°C, 1h; 8) IPTG 0.5 mM, 37°C, 1h; 9) IPTG 1 mM, 37°C, 1h. Em destaque a proteína de interesse sintetizada.

Figura 15 - Segundo ensaio de expressão de rConV com a cepa de *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL com indução de IPTG em diferentes concentrações e temperaturas, com 2h de ação do indutor.



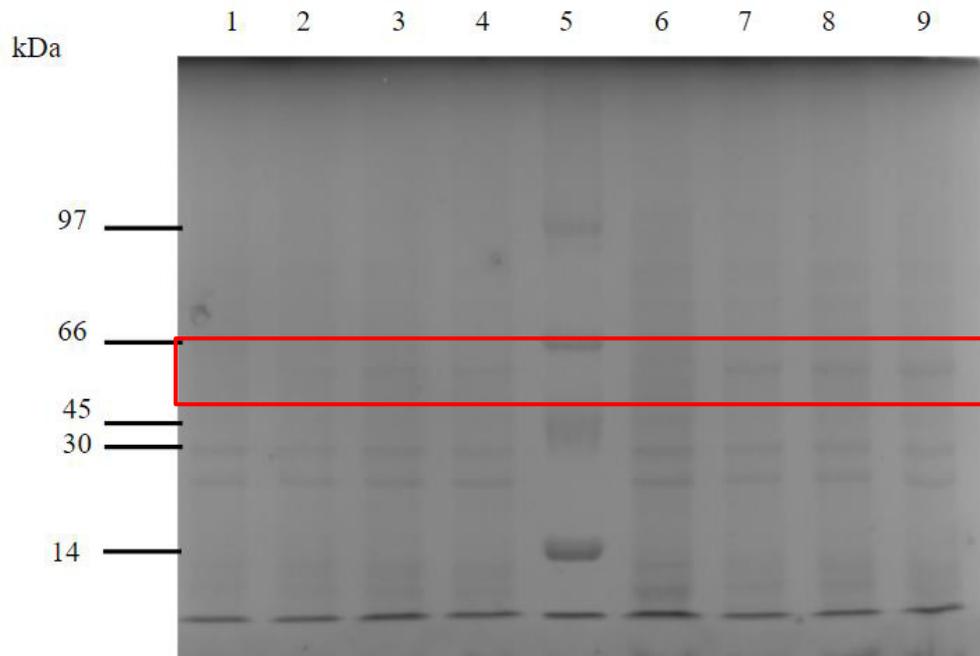
Fonte: a própria autora (2021). NI: Não induzido. 1) NI, 30°C, 2h; 2) IPTG 0.25 mM, 30°C, 2h; 3) IPTG 0.5 mM, 30°C, 2h; 4) IPTG 1 mM, 30°C, 2h; 5) Marcador molecular; 6) IPTG NI, 37°C, 2h; 7) IPTG 0.25 mM, 37°C, 2h; 8) IPTG 0.5 mM, 37°C, 2h; 9) IPTG 1 mM, 37°C, 2h. Em destaque a proteína de interesse sintetizada.

Figura 16 - Segundo ensaio de expressão de rConV com a cepa de *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL com indução de IPTG em diferentes concentrações e temperaturas, com 4h de ação do indutor.



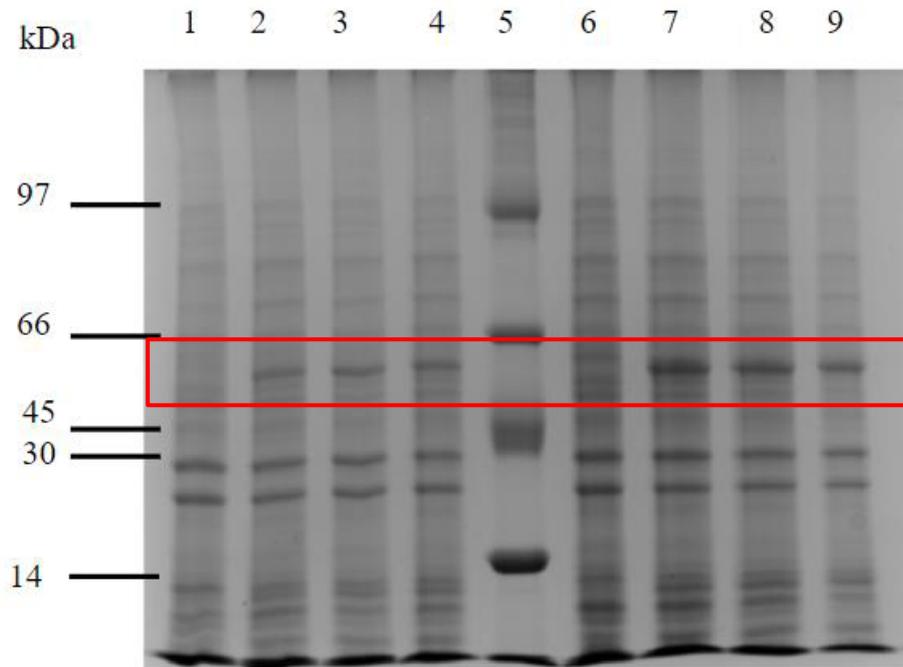
Fonte: a própria autora (2021). NI: Não induzido. 1) NI, 30°C, 4h; 2) IPTG 0.25 mM, 30°C, 4h; 3) IPTG 0.5 mM, 30°C, 4h; 4) IPTG 1 mM, 30°C, 4h; 5) Marcador molecular; 6) IPTG NI, 37°C, 4h; 7) IPTG 0.25 mM, 37°C, 4h; 8) IPTG 0.5 mM, 37°C, 4h; 9) IPTG 1 mM, 37°C, 4h. Em destaque a proteína de interesse sintetizada.

Figura 17 - Segundo ensaio de expressão de rConV com a cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS com indução de IPTG em diferentes concentrações e temperaturas, com 1h de ação do indutor.



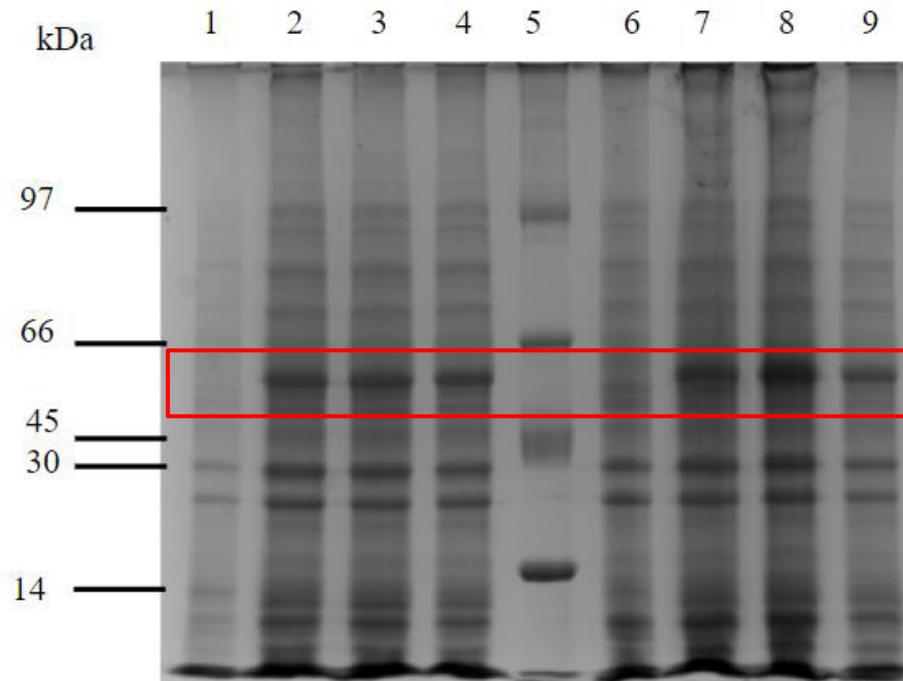
Fonte: a própria autora (2021). NI: Não induzido. 1) NI, 30°C, 1h; 2) IPTG 0.25 mM, 30°C, 1h; 3) IPTG 0.5 mM, 30°C, 1h; 4) IPTG 1 mM, 30°C, 1h; 5) Marcador molecular; 6) IPTG NI, 37°C, 1h; 7) IPTG 0.25 mM, 37°C, 1h; 8) IPTG 0.5 mM, 37°C, 1h; 9) IPTG 1 mM, 37°C, 1h. Em destaque a proteína de interesse sintetizada.

Figura 18 - Segundo ensaio de expressão de rConV com a cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS com indução de IPTG em diferentes concentrações e temperaturas, com 2h de ação do indutor.



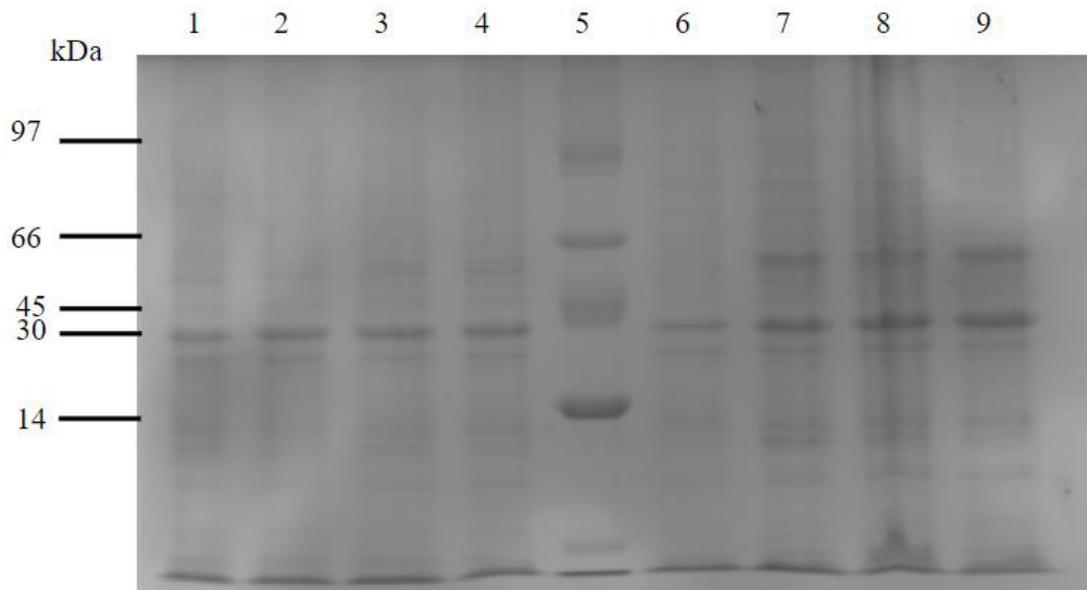
Fonte: a própria autora (2021). NI: Não induzido. 1) NI, 30°C, 2h; 2) IPTG 0.25 mM, 30°C, 2h; 3) IPTG 0.5 mM, 30°C, 2h; 4) IPTG 1 mM, 30°C, 2h; 5) Marcador molecular; 6) IPTG NI, 37°C, 2h; 7) IPTG 0.25 mM, 37°C, 2h; 8) IPTG 0.5 mM, 37°C, 2h; 9) IPTG 1 mM, 37°C, 2h. Em destaque a proteína de interesse sintetizada.

Figura 19 - Segundo ensaio de expressão de rConV com a cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS com indução de IPTG em diferentes concentrações e temperaturas, com 4h de ação do indutor.



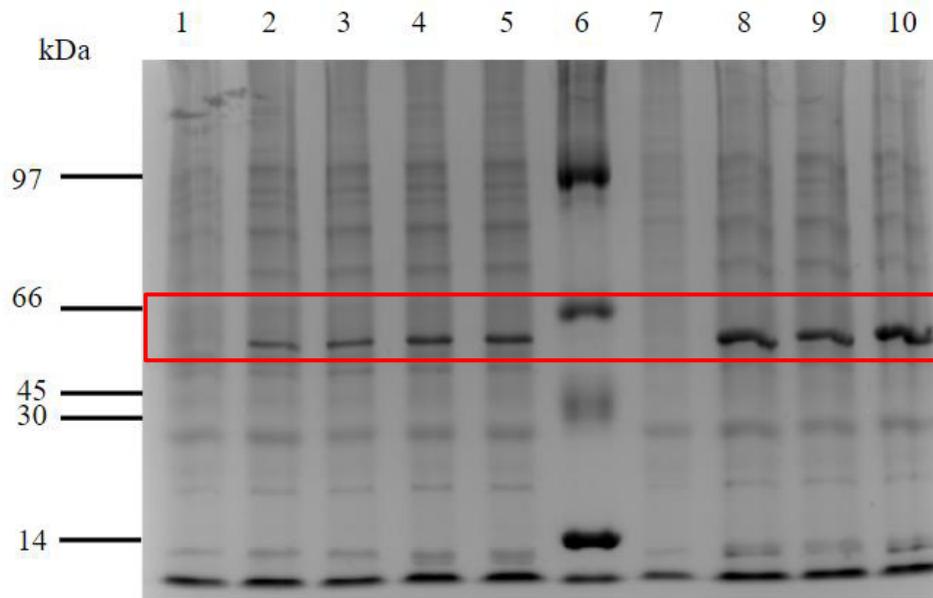
Fonte: a própria autora (2021). NI: Não induzido. 1) NI, 30°C, 4h; 2) IPTG 0.25 mM, 30°C, 4h; 3) IPTG 0.5 mM, 30°C, 4h; 4) IPTG 1 mM, 30°C, 4h; 5) Marcador molecular; 6) IPTG NI, 37°C, 4h; 7) IPTG 0.25 mM, 37°C, 4h; 8) IPTG 0.5 mM, 37°C, 4h; 9) IPTG 1 mM, 37°C, 4h. Em destaque a proteína de interesse sintetizada.

Figura 20 - Segundo ensaio de expressão de rConV com a cepa de *E. coli* Tuner (DE3) pLysS com indução de IPTG em diferentes concentrações e temperaturas, com 1h de ação do indutor.



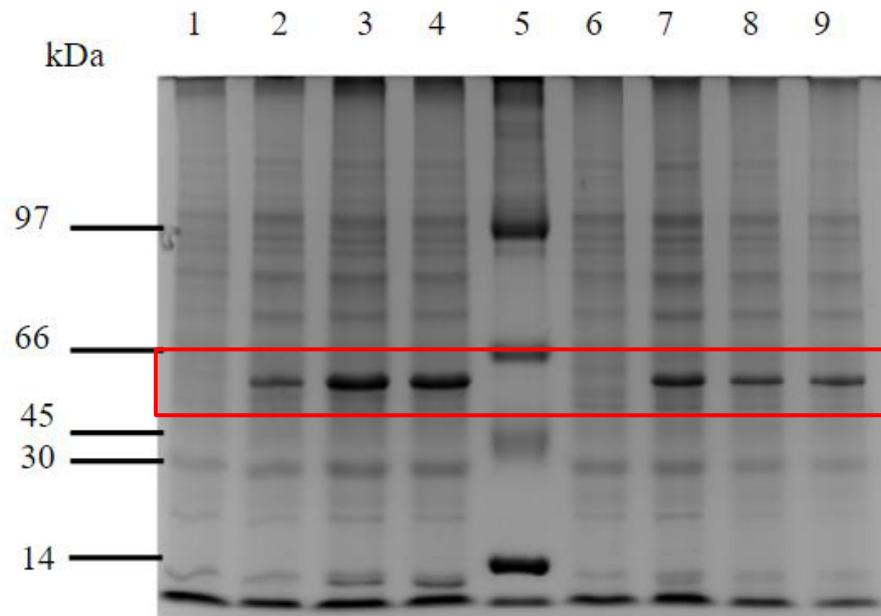
Fonte: a própria autora (2021). NI: Não induzido. 1) NI, 30°C, 1h; 2) IPTG 0.25 mM, 30°C, 1h; 3) IPTG 0.5 mM, 30°C, 1h; 4) IPTG 1mM, 30°C, 1h; 5) Marcador molecular; 6) IPTG NI, 37°C, 1h; 7) IPTG 0.25 mM, 37°C, 1h; 8) IPTG 0.5 mM, 37°C, 1h; 9) IPTG 1 mM, 37°C, 1h. Em destaque a proteína de interesse sintetizada.

Figura 21 - Segundo ensaio de expressão de rConV com a cepa de *E. coli* Tuner (DE3) pLysS com indução de IPTG em diferentes concentrações e temperaturas, com 2h de ação do indutor.



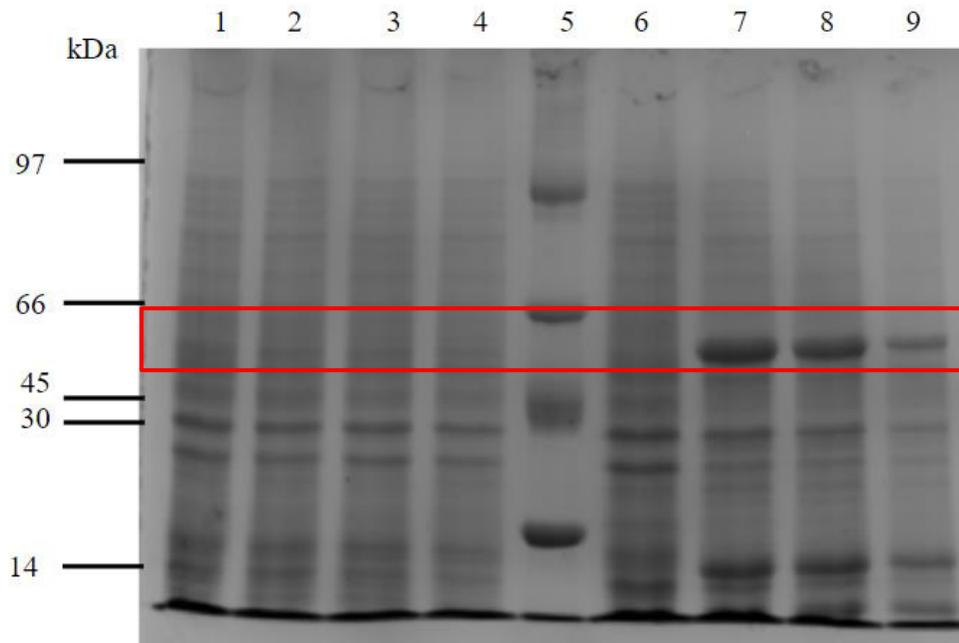
Fonte: a própria autora (2021). NI: Não induzido. 1) NI, 30°C, 2h; 2) IPTG 0.25 mM, 30°C, 2h; 3) IPTG 0.5 mM, 30°C, 2h; 4) e 5) IPTG 1mM, 30°C, 2h; 6) Marcador molecular; 7) IPTG NI, 37°C, 2h; 8) IPTG 0.25 mM, 37°C, 2h; 9) IPTG 0.5 mM, 37°C, 2h; 10) IPTG 1 mM, 37°C, 2h. Em destaque a proteína de interesse sintetizada.

Figura 22 - Segundo ensaio de expressão de rConV com a cepa de *E. coli* Tuner (DE3) pLysS com indução de IPTG em diferentes concentrações e temperaturas, com 3h de ação do indutor.



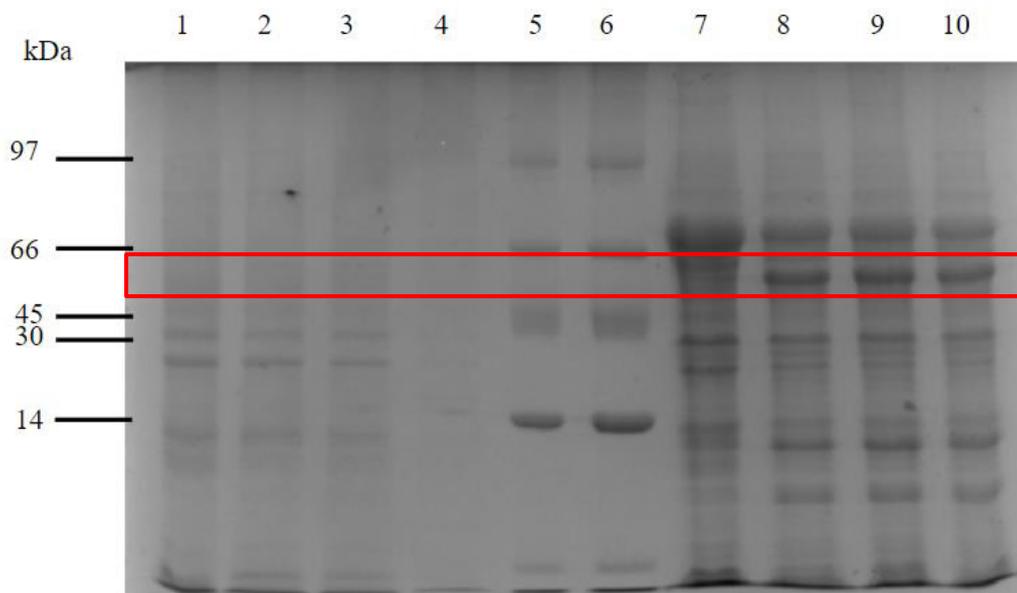
Fonte: a própria autora (2021). NI: Não induzido. 1) NI, 30°C, 4h; 2) IPTG 0.25 mM, 30°C, 4h; 3) IPTG 0.5 mM, 30°C, 4h; 4) IPTG 1 mM, 30°C, 4h; 5) Marcador molecular; 6) IPTG NI, 37°C, 4h; 7) IPTG 0.25 mM, 37°C, 4h; 8) IPTG 0.5 mM, 37°C, 4h; 9) IPTG 1 mM, 37°C, 4h. Em destaque a proteína de interesse sintetizada.

Figura 23 - Segundo ensaio de expressão de rConV com as cepas de *E. coli* Tuner (DE3) pLysS (faixas 1 a 4) e BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (faixas 6 a 9) com indução de IPTG em diferentes concentrações na temperatura de 16°C por 16h de indução.



Fonte: a própria autora (2021). NI: Não induzido. Faixas de 1 a 4 correspondem à expressão da proteína de interesse com a cepa Tuner (DE3) pLysS. Faixas de 6 a 9 correspondem à expressão da proteína de interesse com a cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. 1) NI, 16°C, 16h; 2) IPTG 0.25 mM, 16°C, 16h; 3) IPTG 0.5 mM, 16°C, 16h; 4) IPTG 1 mM, 16°C, 16h; 5) Marcador molecular; 6) IPTG NI, 16°C, 16h; 7) IPTG 0.25 mM, 16°C, 16h; 8) IPTG 0.5 mM, 16°C, 16h; 9) IPTG 1 mM, 16°C, 16h. Em destaque a proteína de interesse sintetizada.

Figura 24 - Segundo ensaio de expressão de rConV com as cepas de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (faixas 1 a 4) e ArcticExpress (DE3) (faixas 7 a 10) com indução de IPTG em diferentes concentrações e tempos de indução, na temperatura de 16°C.



Fonte: a própria autora (2021). NI: Não induzido. Faixas de 1 a 4 correspondem à expressão da proteína de interesse com a cepa BL21 (DE3) pLysS. Faixas de 7 a 10 correspondem à expressão da proteína de interesse com a cepa ArcticExpress (DE3). 1) NI, 16°C, 16h; 2) IPTG 0.25 mM, 16°C, 16h; 3) IPTG 0.5 mM, 16°C, 16h; 4) IPTG 1 mM, 16°C, 16h; 5) e 6) Marcador molecular; 7) IPTG NI, 16°C, 24h; 8) IPTG 0.25 mM, 16°C, 24h; 9) IPTG 0.5 mM, 16°C, 24h; 10) IPTG 1 mM, 16°C, 24h. Em destaque a proteína de interesse sintetizada.

É válido ressaltar que foram realizados dois ensaios de expressão proteica em momentos distintos, pois, em um primeiro momento, houve apenas a transformação positiva das cepas BL21 (DE3) e BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. Assim, seguiu-se com o trabalho apenas com essas cepas. Posteriormente, houve uma segunda tentativa de transformar as demais cepas, com repetição apenas da BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. Com o sucesso das transformações das demais cepas, seguiu-se com o ensaio de expressão proteica das mesmas. É notável que, em ambos os ensaios, houve a expressão da proteína de interesse em todas as cepas de expressão utilizadas em pelo menos uma das condições testadas, quando comparado com as cepas sem adição de indutor proteico (IPTG).

Como já falado anteriormente, o sistema de *Escherichia coli* é um sistema padrão para a produção de proteínas recombinantes, sendo preferencialmente utilizado na primeira tentativa para a produção dessas proteínas (GRÄSLUND *et al.*, 2008). É um sistema simples, economicamente barato e de fácil manipulação, pelos diversos estudos e protocolos já conhecidos e estabelecidos para o seu uso (JOSEPH *et al.*, 2015). Dessa forma, a expressão de

rConV foi preferencialmente realizada no sistema de *E. coli*, apesar de ser uma lectina proveniente de um organismo eucarioto, havendo a chance da proteína não ser corretamente enovelada.

É sabido que parâmetros como número de cópias do DNA plasmidial, tipo de promotor, meio de cultura utilizado, temperatura, cepas bacterianas, tempo, tipo e concentração de indutor são conhecidos por influenciar os níveis de solubilidade da proteína recombinante expressa (VINCENTELLI *et al.*, 2011). Assim, diferentes cepas de expressão geralmente são testadas para expressar eficientemente proteínas recombinantes. Cada cepa de expressão é modificada para atender às diferentes necessidades particulares das proteínas a serem expressas, como citado anteriormente (JOSEPH *et al.*, 2015).

A cepa de BL21 é dita como a padrão ouro para a expressão de proteínas recombinantes. Ela foi primeiramente caracterizada por Studier em 1986, sendo então a linhagem de *E. coli* mais comum como hospedeira de DNAp para a produção heteróloga de proteínas (ROSANO & CECCARELLI, 2014). Essa cepa é caracterizada por, em seu genótipo, ser deficiente em ompT e lon, duas proteases que podem interferir no isolamento da proteína recombinante intacta (SØRENSEN & MORTENSEN, 2005). Além disso, a perda do plasmídeo recombinante é prevenida graças à mutação do gene *hdsSB* (ROSANO & CECCARELLI, 2014).

Como já citado neste estudo, o termo DE3 significa que a cepa possui um cassete cromossômico onde a T7 RNA polimerase é expressa sob o controle do promotor *lacUV5* (BANEYX, 1999). Assim, a variante BL21 (DE3) é lisogênica do bacteriófago λ DE3, possuindo esse cassete cromossômico expresso sob o controle derivado do operon *lac*. Dessa forma, como um vetor da família pET foi escolhido para o estudo em questão, todas as cepas aqui trabalhadas apresentam o cassete cromossômico DE3.

Outra variante da cepa de *E. coli* BL21 escolhida para o estudo foi a BL21 (DE3) pLysS. Como já citado neste trabalho, o termo pLysS significa que a cepa possui o plasmídeo pLysS, o qual é capaz de expressar a liozima T7 e, conseqüentemente, suprime a expressão basal da T7 RNA polimerase anteriormente à ação do indutor proteico IPTG. Essa supressão é importante para a baixa expressão de proteínas que, porventura, possam ser tóxicas para as colônias de *E. coli* (BANEYX, 1999). Como não se sabe se a lectina ConV selvagem é citotóxica para *E. coli*, é importante possuir essa alternativa.

As cepas de expressão da série Tuner são caracterizadas por conterem em seu genótipo uma mutação no gene *lacY*, o qual permite a expressão da proteína de interesse em níveis ajustáveis, havendo uma correlação entre a concentração de IPTG adicionada e os níveis de expressão da proteína de interesse (SØRENSEN & MORTENSEN, 2005). Assim, o uso da

variante Tuner (DE3) pLysS traria um maior controle da expressão da lectina rConV. Entretanto, não foi possível observar uma expressão dose-dependente de IPTG da proteína de interesse (Figuras 20 a 22). Essa ausência de gradiente é, possivelmente, devido à alta concentração de indutor IPTG adicionada nos ensaios. De acordo com o manual do fabricante, o espectro recomendado de concentração de indutor para visualizar esse gradiente de expressão deve ser entre 0.25 μ M a 1 mM (NOVAGEN, 2003), enquanto que o espectro aqui utilizado foi de 0.25 mM a 1 mM. De toda forma, foi possível visualizar a expressão da proteína de interesse em pelo menos uma das condições testadas.

É sabido que, para a produção de proteínas de origem eucariótica, é importante utilizar cepas de *E. coli* que carregam genes adicionais que traduzam para RNAs transportadores (tRNAs) para superar os viés dos códons, visto que alguns códons utilizados na tradução proteínas eucarióticas são ausentes ou pouco frequentes nos sistemas procarióticos (GRÄSLUND *et al.*, 2008). Códons raros em *E. coli* são sempre abundantes em genes heterólogos de eucariotos. Assim, a expressão de genes contendo códons raros pode ocasionar em erros de tradução, como resultado da estagnação ribossomal em posições que requerem a incorporação de aminoácidos acoplados a tRNAs menos frequentes (SØRENSEN & MORTENSEN, 2005). Dessa forma, uma variante da linhagem BL21 de *E. coli* também foi selecionada para o presente estudo: BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. Essa cepa contém o plasmídeo pRI(P)L, o qual provê cópias extras de genes raros de tRNAs, superando o viés de códon citado (ROSANO *et al.*, 2019).

Também foi utilizada a cepa de *E. coli* derivada da linhagem BL21, a ArcticExpress (DE3). Essa cepa contém o diferencial de, em seu genótipo, expressar constitutivamente as chaperonas Cpn10 e Cpn60 proveniente da bactéria psicrófila *Oleispira antarctica* (AGILENT TECHNOLOGIES, 2015b). Essas chaperonas possuem alta atividade de re-enovelamento proteico a baixas temperaturas (ROSANO *et al.*, 2019). É sabido que as células de *E. coli* são capazes de crescer ainda a aproximadamente 7°C, mas essa capacidade cai drasticamente. Assim, o engenheiramento de cepas de *E. coli* com chaperonas adaptadas a baixas temperaturas permite o uso dessas células a 10°C ou temperaturas menores (SONG *et al.*, 2012). Como será explanado adiante, o enovelamento correto de proteínas eucarióticas expressas em sistema de *E. coli* é favorecido a baixas temperaturas (GRÄSLUND *et al.*, 2008). Assim, a seleção dessa cepa para o presente estudo se fez necessário, para testar a viabilidade da produção da lectina rConV em baixas temperaturas utilizando uma cepa adaptada a esta condição.

É válido ressaltar, ainda, que muitas proteínas recombinantes expressas através do sistema T7 sempre precipitam quando são expressadas a 37°C, mas são solúveis quando a

temperatura durante a ação do indutor proteico é de 15-25°C. Isso é explicado através do seguinte pressuposto: os baixos níveis de expressão proteica permitem um maior tempo de enovelamento correto para as recém transcritas proteínas recombinantes (GRÄSLUND *et al.*, 2008), impedindo a formação dos chamados corpos de inclusão. Os corpos de inclusão são proteínas não-enoveladas em altas concentrações. Elas tendem a se agregar graças à exposição da superfície hidrofóbica da proteína, que normalmente não estão expostas quando estão corretamente enoveladas (WINGFIELD, 2015). Uma agregação macromolecular de proteínas no citoplasma de *E. coli* resulta em um ambiente altamente desfavorável para o enovelamento proteico, especialmente durante a alta expressão de proteínas recombinantes (SØRENSEN & MORTENSEN, 2005).

A grande desvantagem da formação de corpos de inclusão é que, para a proteína ser purificada, ela deve ser extraída com agentes desnaturantes e posteriormente enovelada em uma conformação semelhante à sua forma nativa. Para proteínas grandes com múltiplos domínios esse processo é insatisfatório, além de consumir muito tempo laboratorial. Entretanto, a formação de corpos de inclusão pode ser prevenida alterando a cepa de expressão e controlando as condições de crescimento, como temperatura, pH, tempo de indução, concentração de indutor, entre outros (WINGFIELD, 2015).

Trazendo essas considerações, foram escolhidas as condições listadas na Tabela 6 a seguir para cada uma das cepas de expressão, com o intuito de dar continuidade aos testes de atividade hemaglutinante e específica do extrato proteico, além da inibição da atividade hemaglutinante por açúcares. Essas foram as condições onde havia uma maior probabilidade de a proteína recombinante ser sintetizada e enovelada corretamente, ou onde houve uma maior expressão aparente através da visualização das bandas dos géis de eletroforese. É válido ressaltar que houve a introdução de mais uma condição para testar a atividade hemaglutinante com a cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, com a finalidade de comparar a transformação do primeiro ensaio com a do segundo ensaio.

Tabela 6 - Condições escolhidas para cada cepa de expressão para prosseguir com os estudos de produção de rConV.

Ensaio	Cepa	Concentração o IPTG	Temperatura	Tempo de ação do indutor	Figura e faixa
Primeiro ensaio	BL21- CodonPlus(DE3) -RIL	1 mM	20°C	2h	Figura 13, faixa 3
	BL21 (DE3)	1 mM	20°C	2h	Figura 12, faixa 3
Segundo ensaio	BL21- CodonPlus(DE3) -RIL*	1 mM	20°C	2h	Sem figura*
	Tuner (DE3) pLysS	0.25 mM	37°C	2h	Figura 27, faixa 7
	BL21- CodonPlus(DE3) -RIL	0.25 mM	37°C	4h	Figura 16, faixa 7
	BL21 (DE3) pLysS	0.25 mM	37°C	4h	Figura 19, faixa 7
	ArcticExpress (DE3)	0.25 mM	16°C	24h	Figura 24, faixa 8

Fonte: a própria autora (2021). *Condição adicionada com a finalidade de comparar as transformações do primeiro ensaio com a do segundo ensaio da cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RIL.

4.4 Atividade hemaglutinante dos extratos proteicos bacterianos

Com a finalidade de detectar a lectina recombinante ativa no extrato proteico de rConV na fase solúvel, foram realizados ensaios de atividade hemaglutinante. O extrato proteico obtido do primeiro ensaio da cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RIL foi capaz de hemaglutinar, na fase solúvel, eritrócitos de coelho nos estados nativos e tratados enzimaticamente com papaína e tripsina, com título de hemaglutinação máximo de 128 U.H./mL (Tabela 7). Não houve atividade hemaglutinante para o extrato proteico na fase solúvel da cepa BL21 (DE3) do

primeiro ensaio. Já para o segundo ensaio de expressão proteica, apenas o extrato proteico na fase solúvel proveniente da cepa de expressão ArcticExpress (DE3) foi capaz de hemaglutinar eritrócitos de coelho no estado nativo. O título de hemaglutinação para esse extrato na fase solúvel foi de 256 U.H./mL.

Tabela 7 - Atividade hemaglutinante (unidades de hemaglutinação por mililitro) dos extratos proteicos na fase solúvel de rConV contra eritrócitos de coelho a 3% nos estados nativo (primeiro e segundo ensaios) e tratados com enzimas proteolíticas (papaína e tripsina, apenas para o primeiro ensaio).

Ensaio	Cepa de expressão	Tipo de eritrócito de coelho a 3%	Atividade hemaglutinante (U.H./mL)
Primeiro ensaio	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	Nativo	64
		Tratado com papaína	128
		Tratado com tripsina	128
	BL21 (DE3)	Nativo	-
		Tratado com papaína	-
		Tratado com tripsina	-
Segundo ensaio	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL*	Nativo	-
	Tuner (DE3) pLysS	Nativo	-
	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	Nativo	-
	BL21 (DE3) pLysS	Nativo	-
	ArcticExpress (DE3)	Nativo	256

Fonte: a própria autora (2021). *Condição adicionada com a finalidade de comparar as transformações do primeiro ensaio com a do segundo ensaio da cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RIL.

A aglutinação de eritrócitos por lectinas requer uma interação multivalente com os carboidratos da superfície celular. Como cada monômero de lectina possui apenas um domínio de reconhecimento a carboidrato, a aglutinação requer que a lectina esteja em uma forma multimérica, tendo pelo menos dois sítios de reconhecimento a carboidratos. Ou seja, para que uma lectina seja capaz de aglutinar eritrócitos, ela deve assumir pelo menos uma forma dimérica (STUBBS *et al.*, 1986; VAN DAMME *et al.*, 1998). O tratamento dos eritrócitos feito com enzimas proteolíticas, como papaína e tripsina, é realizado com a finalidade de expor os carboidratos que compõem o glicocálice presente na membrana dos eritrócitos, através da clivagem proteica. Isso permite que as lectinas tenham um maior acesso aos carboidratos, concedendo uma hemaglutinação com maior eficácia (MOREIRA, 2013).

Em comparação com a lectina ConV selvagem, observa-se uma semelhança com a lectina recombinante presente no extrato proteico de BL21-CodonPlus(DE3)-RIL do primeiro ensaio, visto que ambas foram capazes de hemaglutinar eritrócitos de coelho a 3% em todos os estados testados. Osterne e colaboradores (2014) relatam que houve uma forte atividade hemaglutinante no extrato proteico da lectina selvagem ConV, com título de hemaglutinação de 32768 U.H./mL com a proteína purificada. Entretanto, observa-se que aqui houve uma atividade hemaglutinante não tão forte na condição citada, com no máximo 128 U.H./mL.

Isso pode ser explicado pelo fato de que a lectina recombinante presente no extrato proteico de BL21-CodonPlus(DE3)-RIL do primeiro ensaio, está ainda ligada a duas caudas de fusão: uma poli-histidina (His₆) e uma SUMO. Apesar do pequeno tamanho da cauda de poli-histidina (0,84 kDa), há relatos que ela pode interferir negativamente na atividade biológica de proteínas recombinantes (ROSANO & CECCARELLI, 2014). Se mesmo um peptídeo de apenas seis resíduos de aminoácidos, como a poli-histidina, pode interferir na atividade biológica de uma proteína recombinante, a SUMO, um polipeptídeo de aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos de 12 kDa (ROSANO & CECCARELLI, 2014), muito provavelmente deve aqui interferir na conformação quaternária da lectina, impedindo a formação do tetrâmero semelhante à conformação da forma selvagem da ConV. Dessa forma, a lectina recombinante presente no extrato proteico de BL21-CodonPlus(DE3)-RIL do primeiro ensaio possivelmente não está exibindo toda a sua eficaz atividade, podendo isso ser recuperado após a digestão enzimática das caudas de fusão, com posterior purificação da lectina recombinante. Ainda assim, é possível concluir que a lectina recombinante produzida nessas condições está ativa, possuindo pelo menos uma forma divalente.

Outra possível causa para a diferença entre as atividades hemaglutinantes reportadas seria o fato de que o extrato bacteriano proteico de rConV possui uma série de proteínas

provenientes do sistema da própria *E. coli*. É conhecido que a presença de diferentes proteínas no meio dificulta a atividade hemaglutinante da proteína de interesse estudada. Por isso, é necessário o anterior isolamento proteico via cromatografia ou outras técnicas para posterior conclusão da atividade hemaglutinante da proteína estudada (NASCIMENTO *et al.*, 2012).

Além disso, a cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RIL provavelmente foi capaz de produzir a proteína recombinante com o correto enovelamento por conter, em seu genótipo, genes extras que codificam para tRNAs raros, sendo capaz de superar o viés de códons raros (ROSANO *et al.*, 2019). A cepa BL21 (DE3), apesar de ser a cepa padrão ouro para a produção de proteínas recombinantes, não é a mais indicada para a produção de proteínas eucarióticas na fase solúvel, justamente por não ser capaz de superar esse viés e não possuir adaptação a baixas temperaturas (SØRENSEN & MORTENSEN, 2005; GRÄSLUND *et al.*, 2008). Wakankar e colaboradores (2013) também relataram uma maior expressão de rCAL utilizando a cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RIL quando comparada à expressão em BL21 (DE3).

Já para o segundo ensaio, o único extrato proteico capaz de hemaglutinar eritrócitos de coelho no estado nativo foi a produzida pela cepa ArcticExpress (DE3). A atividade hemaglutinante da lectina recombinante presente nesse extrato foi de 256 U.H./mL, bem maior do que a apresentada pelo extrato proteico produzido pela cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RIL do primeiro ensaio. Essa diferença pode ser explicada pelo fato de que a cepa ArcticExpress (DE3) consegue produzir proteínas recombinantes com maior eficácia a baixas temperaturas do que outras cepas nas mesmas condições, por conseguir expressar chaperonas adaptadas a baixas temperaturas. Isso facilita o correto enovelamento da proteína de interesse, além da temperatura ambiente trabalhada facilitar a não formação de precipitados/aglomerados proteicos não-enovelados. Além disso, os ensaios de expressão proteica com a cepa ArcticExpress (DE3) foi o mais longo de todos, possibilitando também uma maior quantidade de proteínas expressas (GRÄSLUND *et al.*, 2008; ROSANO *et al.*, 2019). Assim, possivelmente, a proteína recombinante não deve estar mais concentrada no extrato proteico, mas sim com o correto enovelamento, oligomerizado mais eficazmente. Provavelmente não deve estar com a estrutura quaternária completa (em tetrâmero, semelhante a forma nativa), visto que ainda está associada às caudas de fusão, mas pelo menos na forma dimérica.

Por fim, as cepas de expressão BL21 (DE3) pLysS, Tuner (DE3) pLysS e BL21-CodonPlus(DE3)-RIL do segundo ensaio, nas condições de 0.25 mM de IPTG e 37°C, não devem ter conseguido produzir a proteína recombinante de interesse na fase solúvel devido à alta temperatura ambiente. Como já dito anteriormente, há uma maior probabilidade da proteína recombinante precipitar e/ou formar corpos de inclusão quando produzida em altas

temperaturas (37°C) do que a baixas temperaturas (15-25°C) (GRÄSLUND *et al.*, 2008). Entretanto, não houve atividade para o extrato proteico na fase solúvel produzido no segundo ensaio pela cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, nas condições de 1 mM de IPTG a 20°C. Como não houve monitoramento por eletroforese para essa cepa nessas condições no segundo ensaio, muito provavelmente a cepa não foi corretamente transformada, não expressando a proteína de interesse.

4.5 Quantificação de proteínas solúveis nos extratos proteicos bacterianos

Com a visualização positiva da expressão de proteínas no extrato proteico na fase solúvel de BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, para o primeiro ensaio, e ArcticExpress (DE3), para o segundo ensaio, como observado no ensaio de atividade hemaglutinante, se fez necessária a quantificação de proteínas solúveis nestes extratos lisados através do método de Bradford (1976). Através desse método, foi possível quantificar um total de 3,2 mg/mL de proteínas solúveis presentes no extrato proteico de BL21-CodonPlus(DE3)-RIL do primeiro ensaio e 0,18 mg/mL de proteínas solúveis no extrato proteico de ArcticExpress (DE3) do segundo ensaio. Entretanto, apenas a quantificação não é suficiente para afirmar que essa é a quantidade aproximada de lectinas recombinantes ativas presentes nos extratos proteicos, visto que nem todas as proteínas na fase solúvel estão corretamente enoveladas (VINCENNELLI *et al.*, 2011), além do método de Bradford detectar proteínas solúveis como um todo.

Assim, para melhor caracterizar as proteínas presentes na fase solúvel dos ensaios de expressão proteica, se fez necessário unir esses dados aos do teste de atividade biológica, para discriminar entre as proteínas solúveis ativas e inativas (VINCENNELLI *et al.*, 2011). Dessa forma, seguiu-se para a análise da de atividade hemaglutinante específica dos extratos proteicos.

4.6 Atividade específica dos extratos proteicos bacterianos em fase solúvel

Com a atividade hemaglutinante positiva para dois extratos proteicos na fase solúvel e com as suas devidas quantificações proteicas através do método de Bradford, foi possível calcular a atividade específica da proteína de interesse presente nos extratos para cada tipo de eritrócito (Tabela 8).

Tabela 8 - Atividade hemaglutinante específica (unidades de hemaglutinação por miligrama de proteína) dos extratos proteicos na fase solúvel de rConV contra eritrócitos de coelho a 3% nos estados nativo (BL21-CodonPlus(DE3)-RIL do primeiro ensaio e ArcticExpress (DE3) do segundo ensaio) e tratados com enzimas proteolíticas (papaína e tripsina, apenas para BL21-CodonPlus(DE3)-RIL do primeiro ensaio).

Ensaio	Cepa de expressão	Tipo de eritrócito de coelho a 3%	Atividade hemaglutinante específica (U.H./mg)
Primeiro ensaio	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	Nativo	20
		Tratado com papaína	40
		Tratado com tripsina	40
Segundo ensaio	ArcticExpress (DE3)	Nativo	1422,22

Fonte: a própria autora (2021).

Como pode ser observado, apesar do extrato proteico na fase solúvel produzido pela cepa ArcticExpress (DE3) conter uma quantidade menor de proteínas solúveis, sua atividade específica é expressamente maior quando comparado ao extrato proteico na fase solúvel produzido pela cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. Esses dados confirmam o pressuposto da produção de proteínas recombinantes pela cepa de expressão ArcticExpress (DE3): a produção da proteína de interesse ativa, com o seu correto enovelamento (AGILENT TECHNOLOGIES, 2015b). Assim, há geração de poucas proteínas, quando comparado apenas com a quantificação de proteínas solúveis, mas são as proteínas de interesse corretamente produzidas.

4.7 Concentração mínima inibitória de açúcares para os extratos proteicos bacterianos

O ensaio de inibição da atividade hemaglutinante com carboidratos mostrou que a lectina rConV produzida, presente nos extratos proteicos das fases solúveis produzidos pelas cepas BL21-CodonPlus(DE3)-RIL e ArcticExpress (DE3), é inibida pelos açúcares D-Manose e α -metil-D-manosídeo, nas concentrações de 50 mM e 25 mM, respectivamente, se mostrando específica a esses açúcares em ambos os extratos proteicos (Tabela 9). A concentração mínima inibitória foi a mesma para ambos os extratos.

Tabela 9 - Concentração mínima inibitória (CMI), em mM, de açúcares contra os extratos proteicos da lectina recombinante rConV.

Carboidrato (100 mM)	CMI
D-Glicose	NI
D-Manose	50 mM
D-Galactose	NI
L-manose	NI
L-fucose	NI
α -Lactose	NI
Sacarose	NI
Melibiose	NI
Ovalbumina	NI
Mucina	NI
α -metil-D-glucopiranosídeo	NI
α -metil-D-manosídeo	25 mM
N-acetil-D-glicosamina	NI

Fonte: a própria autora (2021). Concentração inicial dos carboidratos: 100 mM. NI: açúcar não-inibidor na concentração máxima testada (100 mM).

A especificidade a carboidratos pode ser estabelecida comparando os açúcares a partir da concentração mínima capaz de inibir a atividade hemaglutinante (CMI). Assim, os açúcares adicionados competem com os carboidratos da superfície celular dos eritrócitos pelo DRC da lectina testada. Dessa forma, quanto menor a concentração mínima inibitória de atividade hemaglutinante do carboidrato testado, mais específica a ele é a lectina estudada (STUBBS *et al.*, 1986).

Diferentemente da lectina na forma selvagem, a rConV nos extratos proteicos não se mostrou específica para o açúcar D-glucose. Isso pode ser explicado pelo fato de que a lectina recombinante é construída apenas pela cadeia α intacta. As subunidades β e γ , fragmentos presentes como resíduos do processamento pós-traducional na forma selvagem da lectina madura intacta (OSTERNE *et al.*, 2014), podem interferir na sua especificidade através da formação de monômeros não usuais. Esse cenário gera uma variação na especificidade aos carboidratos das lectinas entre as formas selvagem e recombinante, como foi também reportado por Nascimento e colaboradores (2020) na produção da cadeia α da lectina recombinante rDSL.

É observado também que a concentração mínima inibitória dos carboidratos D-manose e α -metil-D-manosídeo são maiores para a lectina recombinante presente nos extratos proteicos do que para a lectina selvagem (Tabela 10). Essa variação pode estar relacionada ao fato de que a rConV aqui testada, provavelmente, não está na sua conformação quaternária semelhante à ConV, visto que ainda está ligada às caudas de fusão, como anteriormente mencionado. Dessa forma, sem a formação do tetrâmero usual (Figura 2) impedida pela ligação das caudas de polihistidina (His₆) e SUMO, a lectina recombinante possivelmente não está completamente ativa. Esse também pode ser o motivo da variação da especificidade aos carboidratos aqui relatada.

Tabela 10 - Concentração mínima inibitória (CMI), em mM, de açúcares contra o extrato bruto da lectina selvagem ConV.

Carboidrato (100 mM)	CMI
D-Glucose	50 mM
D-Manose	12,5 mM
D-Galactose	NI
N-acetil-D-glucosamina	NI
α -Lactose	NI
N-acetil-D-manosamina	NI
Manitol	NI
α -metil-D-galactosídeo	NI
α -metil-D-manosídeo	6,25 mM

Fonte: OSTERNE *et al.* (2014). Concentração inicial dos carboidratos: 100 mM. NI: açúcar não-inibidor na concentração máxima testada (100 mM).

Apesar dessas variações observadas, a rConV ainda se mostra dentro dos padrões de especificidade a carboidratos para as lectinas do tipo ConA-*like*, as quais apresentam boa afinidade a manose, glucose e derivados, mas sem se ligar a galactose, fucose ou ácido siálico (CAVADA *et al.*, 2019b). Outras lectinas do tipo ConA-*like* que já foram produzidas na forma recombinante, como a r- α DguiL, r- α DGL (NAGANO *et al.*, 2008) e rCRAMOLL 1 (VAREJÃO *et al.*, 2010), assim como outras lectinas recombinantes diversas de plantas, como rPNA (RODRIGUEZ-ARANGO *et al.*, 1992), rJacalin (SAHASRABUDDHE *et al.*, 2004), rVMLS (ALVES-FILHO *et al.*, 2013), rGNA (LONGSTAFF *et al.*, 1998) e rPSL (STUBBS *et al.*, 1986)

possuem afinidade a carboidratos de forma semelhante às formas nativas. Entretanto, todas foram previamente purificadas e com as devidas caudas de fusão retiradas quando presentes na proteína recombinante.

É notável, portanto, que a comparação da atividade biológica entre as formas recombinante e selvagem que melhor representaria a realidade seria a feita com a rConV purificada, após a digestão e remoção enzimática das caudas de fusão. Entretanto, os resultados aqui elucidados mostram a viabilidade da produção heteróloga, em sistema de *Escherichia coli*, da cadeia α da lectina recombinante rConV, em fase solúvel e biologicamente ativa, a partir do extrato proteico de duas cepas de expressão diferentes. Com a obtenção da cadeia α de rConV, o seu uso para estudos antitumorais, antiglioma, vasorelaxantes e de doenças inflamatórias se torna ainda mais factível, visto que será obtida uma proteína purificada sem a presença de fragmentos de subunidades e suas interferências na atividade biológica, além do menor tempo laboratorial e custo de produção.

5 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos no presente estudo, foi possível clonar com sucesso o gene sintético codificante para a cadeia α da lectina ConV nas cepas de *E. coli* BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS, BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, Tuner (DE3) pLysS e ArcticExpress (DE3). rConV foi expressa e detectada em atividade hemaglutinante nos extratos bacterianos proteicos de BL21-CodonPlus(DE3)-RIL e ArcticExpress (DE3), com uma maior atividade específica no extrato bacteriano desta última. Futuramente, é necessária a remoção das caudas de fusão de rConV produzida para avaliar, com maior precisão, a sua atividade específica e comparar com as propriedades da forma selvagem. O presente estudo demonstrou a importância de serem utilizadas diferentes cepas de expressão no início de estudos de expressão de uma proteína recombinante, onde não se sabe como a mesma se comportará. A produção da cadeia α de rConV traz a lectina sem fragmentos de subunidades, tornando mais viável a sua aplicação em estudos biotecnológicos e biológicos.

REFERÊNCIAS

- ADRIO, J. L., & DEMAÏN, A. L. Recombinant organisms for production of industrial products. **Bioengineered bugs**, v. 1, n. 2, p. 116-131, 2010.
- AISYAH, S., GRUPPEN, H., ANDINI, S., BETTONVIL, M., SEVERING, E., & VINCKEN, J. P. Variation in accumulation of isoflavonoids in Phaseoleae seedlings elicited by Rhizopus. **Food chemistry**, v. 196, p. 694-701, 2016.
- AGILENT TECHNOLOGIES INC. **BL21-CodonPlus Competent Cells Manual Agilent Technologies**. p. 1-16. 2015a.
- AGILENT TECHNOLOGIES INC. **ArcticExpress Competent Cells and ArcticExpress (DE3) Competent Cells Manual Agilent Technologies**. p. 1-16. 2015b.
- ALVES-FILHO, G., NASCIMENTO, A. S. F., GONDIM, A. C. S., PEREIRA, R. H., DA CUNHA, R. M. S., 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, n. 11, p. 1204-1210, 2013.
- ANITA, D. D. & SRIDHAR, K. R. Assemblage and diversity of fungi associated with mangrove wild legume Canavalia cathartica. **Tropical and subtropical agroecosystems**, v. 10, n. 2, p. 225-235, 2009.
- ASHRAF, G. M., RIZVI, S., NAQVI, S., SUHAIL, N., BILAL, N., HASAN, S., TABISH, M. & BANU, N. Purification, characterization, structural analysis and protein chemistry of a buffalo heart galectin-1. **Amino Acids**, v. 39, n. 5, p. 1321-1332, 2010.
- BALBÁS, P., SOBERÓN, X., MERINO, E., ZURITA, M., LOMELI, H., VALLE, F., FLORES, N. & BOLIVAR, F. Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives—a review. **Gene**, v. 50, p. 3-40, 1986.
- BANEYX, F. (1999). Recombinant protein expression in Escherichia coli. **Current opinion in biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 411-421.
- BARRE, A., BOURNE, Y., VAN DAMME, E. J., & ROUGÉ, P. Overview of the structure–function relationships of mannose-specific lectins from plants, algae and fungi. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 2, p. 254, 2019.
- BESELIN, A. (2005). **Optimization of lipase production in Burkholderia glumae**. 2005. 140 p. Thesis (Doktors der Naturwissenschaften) - Heinrich-Heine-University Duesseldorf, Fakultät für Biologie, Bochum, 2005.
- BEZERRA, W. M., CARVALHO, C. P., MOREIRA, R. D. A., & GRANGEIRO, T. B. Establishment of a heterologous system for the expression of Canavalia brasiliensis lectin: a model for the study of protein splicing. **Genetics and molecular research**, v. 5, n. 1, 216-223, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. **72**, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BURGESS-BROWN, N. A. & BURGESS-BROWN. **Heterologous Gene Expression in E. coli**. New York: Springer, 2017.

CARVALHO, C. P. S., ROCHA, C. S., NEPOMUCENO, D. R., OLIVEIRA, J. T. A., & GRANGEIRO, T. B. Expression of a *Canavalia brasiliensis* lectin (ConBr) precursor in *Pichia pastoris*. **Protein and peptide letters**, v. **15**, n. 4, p. 327-332, 2008.

CAVADA, B. S., BARI, A. U., PINTO-JUNIOR, V. R., LOSSIO, C. F., SILVA, M. T. L., SOUZA, L. A. G., OLIVEIRA, M. V., SOUZA-FILHO, C. H. D., CORREIA, S. E. G., VITAL, A. P. M. S., LIMA, L. D., OSTERNE, V. J. S. & NASCIMENTO, K. S. Purification and partial characterization of a new lectin from *Parkia panurensis* Benth. ex HC Hopkins seeds (Leguminosae family; Mimosoideae subfamily) and evaluation of its biological effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. **145**, p. 845-855, 2020a.

CAVADA, B. S., OSTERNE, V. J. S., OLIVEIRA, M. V., PINTO-JUNIOR, V. R., SILVA, M. T. L., BARI, A. U., LIMA, L. D., LOSSIO, C. F. & NASCIMENTO, K. S. Reviewing Mimosoideae lectins: A group of under explored legume lectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. **154**, p. 159-165, 2020b.

CAVADA, B. S., OSTERNE, V. J., PINTO-JUNIOR, V. R., & NASCIMENTO, K. S. ConBr, the lectin from *Canavalia brasiliensis* Mart. seeds: forty years of research. **Current Protein and Peptide Science**, v. **20**, n. 6, p. 600-613, 2019a.

CAVADA, B. S., PINTO-JUNIOR, V. R., OSTERNE, V. J., & NASCIMENTO, K. S. ConA-like lectins: high similarity proteins as models to study structure/biological activities relationships. **International journal of molecular sciences**, v. **20**, n. 1, p. 30, 2019b.

CAVADA, B. S., MORENO, F. B., DA ROCHA, B. A., DE AZEVEDO JR, W. F., CASTELLÓN, R. E., GOERSCH, G. V., NAGANO, C. S., SOUZA, E. P., NASCIMENTO, K. S., RADIS-BAPTISTA, G., DELATORRE, P., LEROY, Y., TOYAMA, M. H., PINTO, V. P. T., SAMPAIO, A. H., BARETTINO, D., DEBRAY, H., CALVETE, J. J. & SANZ, L. cDNA cloning and 1.75 Å crystal structure determination of PPL2, an endochitinase and N-acetylglucosamine-binding hemagglutinin from *Parkia platycephala* seeds. **The FEBS journal**, v. **273**, n. 17, p. 3962-3974, 2006.

CAVADA, B. S., BARBOSA, T., ARRUDA, S., GRANGEIRO, T. B., & BARRAL-NETTO, M. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein and Peptide Science**, v. **2**, n. 2, p. 123-135, 2001.

DA SILVA, M. F., DO CARMO, M. D. N. L., & GURGEL, E. S. C. Phaseoleae (Leguminosae-Papilionoideae) Nas Restingas Amazônicas. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. **5**, n. 3, p. 14-22, 2015.

DEMAIN, A. L., & VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology advances**, v. **27**, n. 3, p. 297-306, 2009.

- EDELMAN, G. M., CUNNINGHAM, B. A., REEKE, G. N., BECKER, J. W., WAXDAL, M. J., & WANG, J. L. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. **69**, n. 9, p. 2580-2584, 1972.
- FERRER, M., CHERNIKOVA, T. N., YAKIMOV, M. M., GOLYSHIN, P. N., & TIMMIS, K. N. Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. **Nature Biotechnology**, v. **21**, n. 11, p. 1266-1267, 2003.
- GEMEINER, P., MISLOVIČOVÁ, D., TKÁČ, J., ŠVITEL, J., PÄTOPRSTÝ, V., HRABÁROVÁ, E., KOGAN, G. & KOŽÁR, T. Lectinomics: II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. **Biotechnology Advances**, v. **27**, n. 1, p. 1-15, 2009.
- GLICK, B. R., PASTERNAK, J. J. & PATTEN, C. L. **Molecular biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA**. 4th ed. Washington, DC: ASM Press, 2010.
- GODISKA, R., PATTERSON, M., SCHOENFELD, T., & MEAD, D. A. Beyond pUC: vectors for cloning unstable DNA. **DNA Sequencing: Optimizing the Process and Analysis**, v. **1**, p. 55-76, 2005.
- GRÄSLUND, S., et al. Protein production and purification. **Nature methods**, v. **5**, n. 2, p. 135, 2008.
- HARDMAN, K. D., & AINSWORTH, C. F. Structure of concanavalin A at 2.4-Å resolution. **Biochemistry**, v. **11**, n. 26, p. 4910-4919, 1972.
- HIRABAYASHI, J., & KASAI, K. I. Human placenta β -galactoside-binding lectin: Purification and some properties. **Biochemical and biophysical research communications**, v. **122**, n. 3, p. 938-944, 1984.
- JONASSON, P., LILJEQVIST, S., NYGREN, P. A. K., & STÅHL, S. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. **35**, n. 2, p. 91-105, 2002.
- JOSEPH, B. C., PICHAIMUTHU, S., SRIMEENAKSHI, S., MURTHY, M., SELVAKUMAR, K., GANESAN, M., MANJUNATH, S. R. An overview of the parameters for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Cell Science & Therapy**, v. **6**, n. 5, 2015.
- JUDD, W. S., CAMPBELL, C. S., KELLOGG, E. A., STEVENS, P. F., & DONOGHUE, M. J. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2009.
- KVENNEFORS, E. C. E., LEGGAT, W., HOEGH-GULDBERG, O., DEGNAN, B. M. & BARNES, A. C. An ancient and variable mannose-binding lectin from the coral *Acropora millepora* binds both pathogens and symbionts. **Developmental & Comparative Immunology**, v. **32**, n. 12, p. 1582-1592, 2008.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. **227**, n. 5259, p. 680-685, 1970.

- LAGARDA-DIAZ, I., GUZMAN-PARTIDA, A. M., & VAZQUEZ-MORENO, L. Legume lectins: proteins with diverse applications. **International journal of molecular sciences**, v. **18**, n. 6, p. 1242, 2017.
- LEE, C. Griffithsin, a highly potent broad-spectrum antiviral lectin from red algae: from discovery to clinical application. **Marine drugs**, v. **17**, n. 10, p. 567, 2019.
- LEWIS, G., SCHRIRE, B., MACKINDER, B., & LOCK, M. **Legumes of the World**. Kew, UK: Royal Botanic Gardens, 2005.
- LONGSTAFF, M., POWELL, K. S., GATEHOUSE, J. A., RAEMAEEKERS, R., NEWELL, C. A., & HAMILTON, W. D. Production and purification of active snowdrop lectin in *Escherichia coli*. **European journal of biochemistry**, v. **252**, n. 1, p. 59-65, 1998.
- MARTÍNEZ-ALARCÓN, D., BLANCO-LABRA, A., & GARCÍA-GASCA, T. Expression of lectins in heterologous systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v. **19**, n. 2, 2018.
- MEAGHER, J. L., WINTER, H. C., EZELL, P., GOLDSTEIN, I. J., & STUCKEY, J. A. Crystal structure of banana lectin reveals a novel second sugar binding site. **Glycobiology**, v. **15**, n. 10, p. 1033-1042, 2005.
- MIROUX, B., & WALKER, J. E. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. **Journal of Molecular Biology**, v. **260**, n. 3, p. 289-298, 1996.
- MOREIRA, R. D. A., & PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. **59**, n. 5, p. 783-787, 1977.
- MOURA, R. M., MELO, A. A., CARNEIRO, R. F., RODRIGUES, C. R., DELATORRE, P., NASCIMENTO, K. S., SAKER-SAMPAIO, S., NAGANO, C. S., CAVADA, B. S. & SAMPAIO, A. H. Hemagglutinating/Hemolytic activities in extracts of marine invertebrates from the Brazilian coast and isolation of two lectins from the marine sponge *Cliona varians* and the sea cucumber *Holothuria grisea*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. **87**, n. 2, p. 973-984, 2015.
- NAGANO, C. S., CALVETE, J. J., BARETTINO, D., PÉREZ, A., CAVADA, B. S., & SANZ, L. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer–tetramer equilibrium through crystallographic analysis of recombinant Diocleinae lectins. **Biochemical Journal**, v. **409**, n. 2, p. 417-428, 2008.
- NASCIMENTO, K. S., ANDRADE, M. L., SILVA, I. B., DOMINGUES, D. L., CHICAS, L. S., SILVA, M. T. L., BRINGEL, P. H. S. F., MARQUES, G. F. O., MARTINS, M. G. Q., LÓSSIO, C. F., NASCIMENTO, A. P. M., WOLIN, I. A. V., LEAL, R. B., ASSREUY, A. M. S. & CAVADA, B. S. Heterologous production of α -chain of *Dioclea sclerocarpa* lectin: Enhancing the biological effects of a wild-type lectin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. **156**, p. 1-9, 2020.
- NASCIMENTO, K. S., SILVA, M. T. L., OLIVEIRA, M. V., LOSSIO, C. F., PINTO-JUNIOR, V. R., OSTERNE, V. J. S., & CAVADA, B. S. Dalbergieae lectins: A review of

lectins from species of a primitive Papilionoideae (leguminous) tribe. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p. 509-526, 2019.

NASCIMENTO, K. S., CUNHA, A. I., NASCIMENTO, K. S., CAVADA, B. S., AZEVEDO, A. M., & AIRES-BARROS, M. R. An overview of lectins purification strategies. **Journal of Molecular Recognition**, v. 25, n. 11, p. 527-541, 2012.

NELSON, D. L., & COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2014.

NOGUEIRA, N. A., GRANGEIRO, M. B., DA CUNHA, R. M., RAMOS, M. V., ALVES, M. A., TEIXEIRA, E. H., BARRAL-NETTO, M., CALVETE, J. J., CAVADA, B. S. & GRANGEIRO, T. B. Expression and purification of the recombinant ConBr (*Canavalia brasiliensis* lectin) produced in *Escherichia coli* cells. **Protein and Peptide Letters**, v. 9, n. 1, p. 59-66, 2002.

NOVAGEN. pET System Manual Novagen pET System Manual Novagen. **Biosystems**, p. 1–68, 2003.

OLIVEIRA, C., TEIXEIRA, J. A., & DOMINGUES, L. Recombinant lectins: an array of tailor-made glycan-interaction biosynthetic tools. **Critical reviews in biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 66-80, 2013.

OLIVEIRA, A. S., LOSSIO, C. F., RANGEL, A. J., MARTINS, M. G., NASCIMENTO, F. E., ANDRADE, M. L. L., CAVADA, B. S., LACERDA, S. R. & NASCIMENTO, K. S. Detection, purification and characterization of a lectin from freshwater green algae *Spirogyra* spp. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 2113-2117, 2017.

OSTERNE, V. J. S., SILVA-FILHO, J. C., SANTIAGO, M. Q., PINTO-JUNIOR, V. R., ALMEIDA, A. C., BARRETO, A. A. G. C., WOLIN, I. A. V., NASCIMENTO, A. P. M., AMORIM, R. M. F., ROCHA, B. A. M., DELATORRE, P., NAGANO, C. S., LEAL, R. B., ASSREUY, A. M. S., NASCIMENTO, K. S. & CAVADA, B. S. Structural characterization of a lectin from *Canavalia virosa* seeds with inflammatory and cytotoxic activities. **International journal of biological macromolecules**, v. 94, p. 271-282, 2017.

OSTERNE, V. J. D. S. **Estudos de estrutura-função da lectina de sementes de *Canavalia virosa* com atividade inflamatória e citotóxica**: uma potencial ferramenta anticâncer. 2016. 93 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

OSTERNE, V. J., SANTIAGO, M. Q., PINTO-JUNIOR, V. R., CAJAZEIRAS, J. B., CORREIA, J. L., LEITÃO, C. C. F., CARNEIRO, R. F., PEREIRA-JUNIOR, F. N., VASCONCELOS, M. A., ROCHA, B. A. M., ASSREUY, A. M. S., BRINGEL, P. H. S. F., NAGANO, C. S., NASCIMENTO, K. S. & CAVADA, B. S. Purification, partial characterization, and CNBr-Sepharose immobilization of a vasorelaxant glucose/mannose lectin from *Canavalia virosa* seeds. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, n. 7, p. 3342-3353, 2014.

PEUMANS, W. J., & VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, n. 2, p. 347-352, 1995.

POIROUX, G., BARRE, A., VAN DAMME, E. J., BENOIST, H., & ROUGÉ, P. Plant lectins targeting O-glycans at the cell surface as tools for cancer diagnosis, prognosis and therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. **18**, n. 6, p. 1232, 2017.

RAEMAEEKERS, R. J., DE MURO, L., GATEHOUSE, J. A., & FORDHAM-SKELTON, A. P. Functional phytohemagglutinin (PHA) and Galanthus nivalis agglutinin (GNA) expressed in *Pichia pastoris*: Correct N-terminal processing and secretion of heterologous proteins expressed using the PHA-E signal peptide. **European Journal of Biochemistry**, v. **265**, n. 1, p. 394-403, 1999.

RANGEL, T. B. A., ASSREUY, A. M. S., PIRES, A. D. F., CARVALHO, A. U. D., BENEVIDES, R. G., SIMÕES, R. D. C., SILVA, H. C., BEZERRA, M. J. B., NASCIMENTO, A. S. F., NASCIMENTO, K. S., NAGANO, 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**, v. **16**, n. 6, p. 5087-5103, 2011.

RODRIGUEZ-ARANGO, E., ARANGO, R., ADAR, R., GALILI, G., & SHARON, N. Cloning, sequence analysis and expression in *Escherichia coli* of the cDNA encoding a precursor of peanut agglutinin. **FEBS letters**, v. **307**, n. 2, p. 185-189, 1992.

ROSANO, G. L., & CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in microbiology**, v. **5**, p. 172, 2014.

ROSANO, G. L., MORALES, E. S., CECCARELLI, E. A. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. **Protein Science**, v. **28**, n. 8, p. 1412-1422, 2019.

SAHASRABUDDHE, A. A., GAIKWAD, S. M., KRISHNASASTRY, M. V., & KHAN, M. I. Studies on recombinant single chain Jacalin lectin reveal reduced affinity for saccharides despite normal folding like native Jacalin. **Protein science**, v. **13**, n. 12, p. 3264-3273, 2004.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W.. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed., v. 1, 2, 3. New York: Cold Springs Harbor Laboratory Press, 2001.

SAMUELSON, J. C. Recent developments in difficult protein expression: a guide to *E. coli* strains, promoters, and relevant host mutations. *In*: EVANS JR., T. C., XU, M-Q. **Heterologous Gene Expression in E. coli: Methods and Protocols**. New Jersey: Humana Press, p. 195-209, 2011.

SANZ-APARICIO, J., HERMOSO, J., GRANGEIRO, T. B., CALVETE, J. J., & CAVADA, B. S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. **FEBS Letters**, v. **405**, n. 1, p. 114-118, 1997.

SHARON, N., & LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. **14**, n. 11, p. 53-62, 2004.

SHARON, N., & LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Scientific American**, v. **268**, n. 1, p. 82-89, 1993.

SHARON, N., & LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, v. **246**, n. 4927, p. 227-234, 1989.

SØRENSEN, H. P., & MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. **115** n. 2, p. 113-128, 2005.

SONG, J. M., AN, Y. J., KANG, M. H., LEE, Y. H., & CHA, S. S. Cultivation at 6–10 C is an effective strategy to overcome the insolubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Protein expression and purification**, v. **82**, n. 2, p. 297-301, 2012.

STREICHER, H., & SHARON, N. Recombinant plant lectins and their mutants. *In: Methods in Enzymology*. Cambridge: Academic Press, v. **363**. p. 47-77, 2003.

STUBBS, M. E., CARVER, J. P., & DUNN, R. J. Production of pea lectin in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. **261**, n. 14, p. 6141-6144, 1986.

SUMNER, J. B., & HOWELL, S. F. Identification of hemagglutinin of jack bean with concanavalin A. **Journal of Bacteriology**, v. **32**, n. 2, p. 227-237, 1936.

SUZUKI, T., DOHRA, H., OMAE, S., TAKESHIMA, Y., CHOI, J. H., HIRAI, H., & KAWAGISHI, H. Heterologous expression of a lectin from *Pleurocybella porrigens* (PPL) in *Phanerochaete sordida* YK-624. **Journal of Microbiological Methods**, v. **100**, p. 70-76, 2014.

VAN DAMME, E. J., PEUMANS, W. J., BARRE, A., & ROUGÉ, P. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. **17**, n. 6, p. 575-692, 1998.

VAREJÃO, N., ALMEIDA, M. S., DE CICCO, N. N., ATELLA, G. C., COELHO, L. C., CORREIA, M. A., FOGUEL, D. Heterologous expression and purification of a biologically active legume lectin from *Cratylia mollis* seeds (CRAMOLL 1). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. **1804**, p. 1917–1924, 2010.

VARKI, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. **Glycobiology**, v. **3**, n. 2, p. 97-130, 1993.

VINCENTELLI, R., CIMINO, A., GEERLOF, A., KUBO, A., SATOU, Y., & CABBILLAU, C. High-throughput protein expression screening and purification in *Escherichia coli*. **Methods**, v. **55**, n. 1, p. 65-72, 2011.

WAKANKAR, M. S.; KRISHNASASTRY, M. V.; JAOKAR, T. M.; PATEL, K. A. & GAIKWAD, S. M. Solution and in silico studies on the recombinant lectin from *Cicer arietinum* seeds. **International journal of biological macromolecules**, v. **56**, p. 149-155, 2013.

WINGFIELD, P. T. Overview of the purification of recombinant proteins. **Current protocols in protein science**, v. **80**, n. 1, p. 6-1, 2015.

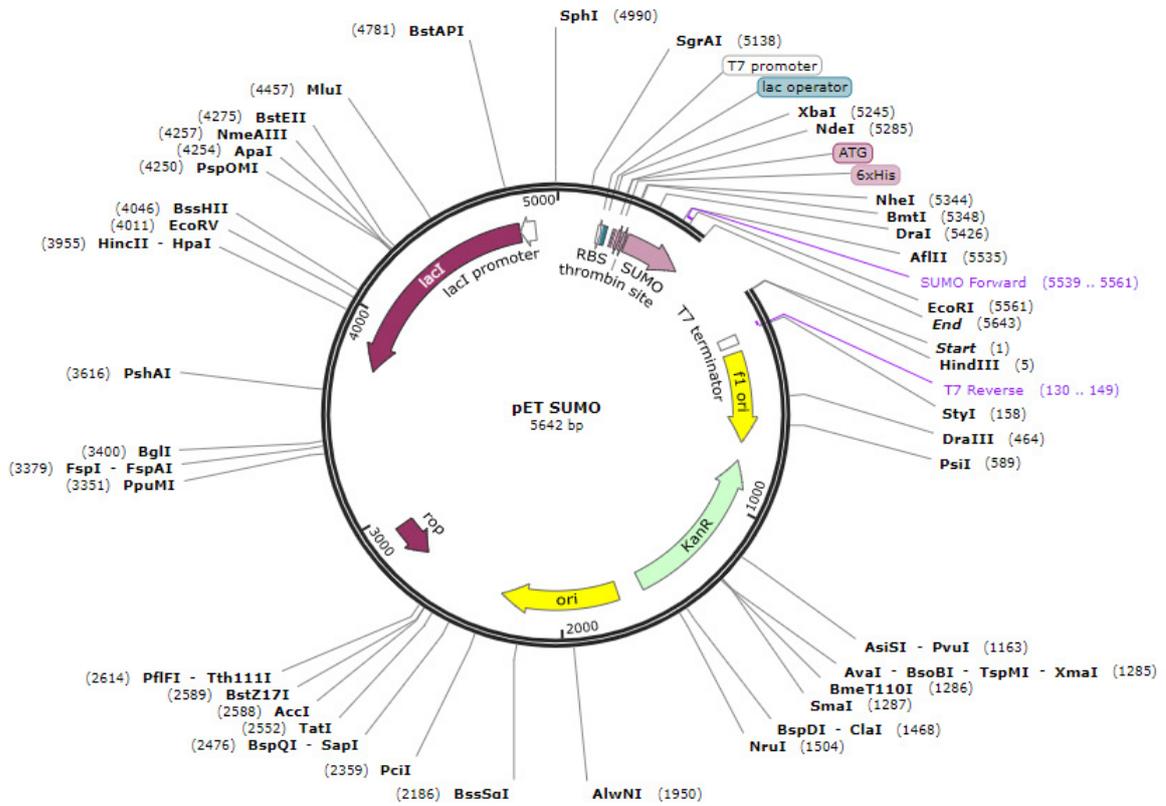
WOOD, D. W. New trends and affinity tag designs for recombinant protein purification. **Current Opinion in Structural Biology**, v. **26**, p. 54-61, 2014.

YESILIRMAK, F., & SAYERS, Z. Heterologous Expression of Plant Genes. **International Journal of Plant Genomics**, v. **2009**, p. 1-16, 2009.

YIN, J., LI, G., REN, X., & HERRLER, G. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. **Journal of Biotechnology**, v. **127**, n. 3, p. 335-347, 2007.

YOUNG, C. L., BRITTON, Z. T., & ROBINSON, A. S. Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. **Biotechnology journal**, v. **7**, n. 5, p. 620-634, 2012.

ANEXO A – MAPA DO VETOR PLASMIDIAL pET-SUMO



Fonte: Invitrogen