

## CLONAGEM E EXPRESSÃO DE DUAS LECTINAS RECOMBINANTES COM POTENCIAL ANTIFÚNGICO

THALITA COLLARES ALVES<sup>1</sup>; GUILHERME FEIJÓ DE SOUSA<sup>2</sup>;  
CAMILA GARCIA DE SOUZA<sup>3</sup>; ISABELA ORTIZ DE TUNES RAMOS<sup>4</sup>;  
LUCIANO DA SILVA PINTO<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – [thalita.collares.alves@gmail.com](mailto:thalita.collares.alves@gmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – [guima.sousa07@gmail.com](mailto:guima.sousa07@gmail.com)

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas – [kaka.garcia.2010@outlook.com](mailto:kaka.garcia.2010@outlook.com)

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas – [ortizrisabela@gmail.com](mailto:ortizrisabela@gmail.com)

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pelotas – [dmpluc@gmail.com](mailto:dmpluc@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

Fungos são organismos eucariontes, quimio-heterotróficos e com exceção das leveduras, são multicelulares (TORTORA, 2017). Estes são envolvidos por uma parede celular composta de N-acetilglucosamina quitina,  $\beta$ -(1,3) e  $\beta$ -(1,6) glucanos e glicoproteínas (GOW; LATGE; MUNRO, 2017).

Os fungos fitopatogênicos representam apenas uma parte dos fungos colonizadores, portanto apenas um número restrito de espécies fúngicas possui a capacidade de invadir e evitar o reconhecimento e resposta de defesa das plantas para obter seus nutrientes e, conseqüentemente, provocar doenças. Estes organismos possuem facilidade de espalhamento pelo vento, solo, água e animais, esses fungos podem infestar colheitas inteiras, levando a perdas significativas na produção agrícola (LAZAROVITS; TURNBULL; JOHNSTON-MONJE, 2014). Dessa maneira, são utilizados principalmente fungicidas químicos os quais têm demasiado uso, levando a efeitos tóxicos ao meio ambiente, saúde humana e animal (HAO et al., 2011). Ademais, o uso excessivo leva ao surgimento de cepas resistentes tornando o tratamento de fungos em plantas cada vez mais complicado, desta maneira é importante a pesquisa para o desenvolvimento de novas alternativas não tóxicas e ecologicamente corretas.

Lectinas são proteínas de origem não imune que possuem ao menos um domínio não catalítico. Elas têm capacidade de reconhecer carboidratos e se ligar de forma reversível a glicanos ou açúcares livres na estrutura das células, sem alterar suas estruturas (KENNEDY et al., 1995). Essas estão amplamente distribuídas em plantas, vírus, bactérias e animais (GERLACH, 2005).

Algumas lectinas apresentam afinidade particular por elementos da parede celular fúngica, como N-acetilglucosamina, carboidrato presente no polímero de quitina. Essa propriedade faz com que as proteínas apresentem papel importante na inibição do crescimento fúngico, através da inibição do crescimento das hifas, desenvolvimento incompleto de esporos e indução de alterações morfológicas (FONSECA, 2022; KONOZY, 2022).

Neste trabalho objetivou-se produzir, de forma heteróloga em bactéria, duas lectinas recombinantes para uso futuro contra fungos fitopatogênicos de interesse agrícola. As duas lectinas possuem afinidade reconhecida para N-Acetilglicosamina, carboidrato encontrado na quitina.

## 2. METODOLOGIA

Para a produção das lectinas, inicialmente as sequências gênicas codificadoras das proteínas foram obtidas no banco de dados GeneBank com base na sua atividade biológica contra fungos fitopatogênicos. As sequências gênicas foram desenhadas para a construção do gene sintético otimizadas para expressão em *Escherichia coli* utilizando o vetor pET28(a) como proteínas de fusão (ligadas a uma sequência de 6 histidinas). Uma análise da estabilidade do RNA mensageiro foi realizada para verificar as características termodinâmicas e estabilidade das estruturas secundárias do mRNA dos genes otimizados foram checadas com o programa RNA-fold. As estruturas das proteínas recombinantes foram determinadas usando o *webserver* AlphaFold Colab e visualizadas com o software PyMol. Além disso, as sequências proteicas preditas foram caracterizadas quanto suas propriedades físico-químicas utilizando a ferramenta ProtParam do ExPasy. O peso molecular, composição dos aminoácidos, índice de estabilidade e hidropaticidade foram avaliados.

Para a produção das proteínas, os genes sintéticos otimizados foram adquiridos comercialmente da Epoch Life Science® (St. Louis, Missouri, Estados Unidos). Os plasmídeos foram inseridos na cepa de expressão *E. coli* BL21 Star (DE3) através de choque térmico (5 min no gelo, 1 min 42 °C e 5 min no gelo) e as células transformadas cultivadas por 1 h (37 °C, 150 rpm) em meio LB. As células transformadas foram cultivadas em meio sólido e armazenadas a 37 °C. Para checar a expressão das proteínas um pré-inóculo com uma colônia da recombinante foi realizado em 10 mL de caldo de Luria-Bertani (LB) suplementados com canamicina (50 mg/mL) durante a noite e transferidos para um inóculo de 100 mL de LB acrescido do respectivo antibiótico e cultivado (37 °C, 180 rpm) até uma DO(595nm) de 0,6-0,8. A expressão da proteína foi monitorada por ensaio rápido de dot-blotting.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram realizadas as etapas iniciais de escolha, caracterização e expressão recombinante de duas lectinas vegetais com a finalidade de utilização como produto biotecnológico para o controle de fungos fitopatogênicos. A primeira etapa do trabalho foi a construção das sequências gênicas e a caracterização do produto da transcrição e expressão. A predição foi realizada usando programas de bioinformática que possibilitaram entender a estrutura do RNA mensageiro e das proteínas de fusão resultantes. A predição do mRNA destas proteínas, após otimização para expressão em bactéria, apresentou parâmetros favoráveis com a energia livre de **-126,75** kcal/mol para Lec1 e **-258.64** kcal/mol para a Lec2, considerados dentro de índices de estabilidade (menor energia livre) e, portanto, favoráveis a bons níveis de expressão recombinante em bactéria. Da mesma forma, para saber se as proteínas de fusão manteriam suas estabilidades estruturais, foram realizadas as análises das estruturas resultantes e os parâmetros físico-químicos de cada uma. A Lec 1 possui 89 aminoácidos, e massa molecular de 9.42 kDa, ponto isoelétrico de 7.53 e índice de instabilidade de 40.59, considerada parcialmente instável, e mais suscetível à degradação quando expressa em bactéria. Além disso, o valor relativamente baixo do índice alifático indica uma baixa estabilidade térmica, o que pode comprometer tanto a conformação estrutural quanto a solubilidade da proteína. Por outro lado, a Lec 2 apresenta 237 aminoácidos, com uma massa

molecular de 25.59 kDa e um ponto isoelétrico de 5.27. O índice de instabilidade desta proteína é inferior ao da Lec 1, enquanto o índice alifático elevado sugere uma maior estabilidade térmica. Essa combinação de características indica que a Lec 2 tende a manter sua estrutura funcional e a resistir à degradação sob condições variáveis. Adicionalmente, ambas as lectinas demonstram um equilíbrio na composição dos resíduos de cargas negativas e positivas, contribuindo para uma maior estabilidade geral. A análise também revelou que ambas as proteínas possuem propensão para serem solúveis quando superexpressas em *Escherichia coli*.

A modelagem das lectinas foi realizada utilizando o servidor AlphaFold Colab, gerando cinco estruturas para cada (Figura 1) que foram ranqueadas através da pontuação pLDDT (Teste de Diferença de Distância Local Predita), que é uma métrica de confiabilidade que avalia as diferenças de distância local de todos os átomos em um modelo, os valores variam de 0 a 100 e valores acima de 90 indicam uma maior confiança na predição da estrutura da proteína. É possível verificar que a Lec 1 e Lec 2 foram modeladas com alta precisão de confiança, apresentando uma pontuação pLDDT de 88.9 e 93.8 respectivamente. As estruturas ajudam a entender como a lectina recombinante se comporta em relação a manutenção da estrutura nativa e atividade de ligação ao carboidrato de interesse.

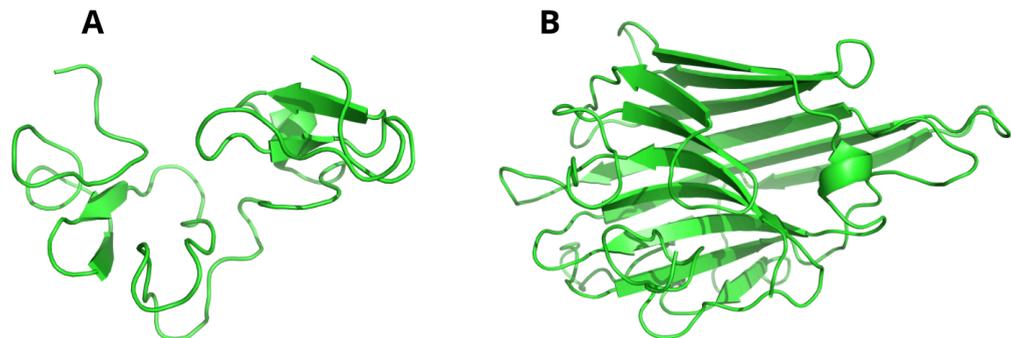


Figura 1: Predições estrutural referente às proteínas de fusão. (A) Lec 1 e (B) Lec 2.

A expressão das proteínas foi realizada como descrito anteriormente e monitorada por dot-blotting. Para isso, uma alíquota de 10 uL do cultivo das bactérias expressando as proteínas Lec1 e Lec2 foi em uma membrana de nitrocelulose e após o bloqueio com leite desnatado foi submetida a hibridização com anticorpo anti-histidina. Um controle positivo (proteína recombinante purificada com cauda de histidina e um controle negativo (*Escherichia coli* não transformada),

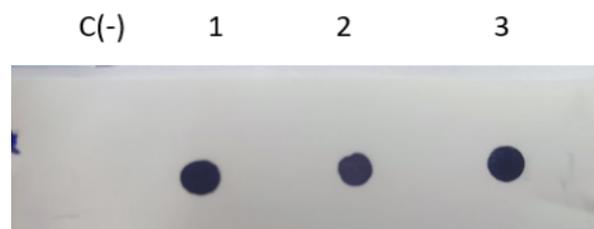


Figura 2: Caracterização da expressão das proteínas recombinantes Lec1 e Lec2 em cultura de *Escherichia coli*. C (-): *Escherichia coli* não transformada (1): Proteína recombinante com

cauda de histidina (C+), (2): Cultura de *E. coli* expressando Lec1 e (3): cultura de *E. coli* expressando Lec2.

#### 4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados prévios, é possível concluir que a expressão das lectinas recombinantes foi realizada com sucesso, como predito *in silico*, sugerindo que a utilização de estratégias de bioinformática para escolha e predição de proteínas recombinantes para uso biotecnológico é uma estratégia interessante. Por outro lado, ainda não é possível saber se estas proteínas manterão sua capacidade de ligar aos carboidratos encontrados nas estruturas fúngicas e inibir seu crescimento.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. MICROBIOLOGIA, 12ª Ed. Artmed, 2017.
- LAZAROVITS, G.; TURNBULL, A.; JOHNSTON-MONJE, D.. Plant Health Management: biological control of plant pathogens. **Encyclopedia Of Agriculture And Food Systems**, [S.L.], p. 388-399, 2014. Elsevier.
- HAO, Weining; LI, Hui; HU, Meiyang; YANG, Liu; RIZWAN-UL-HAQ, Muhammad. Integrated control of citrus green and blue mold and sour rot by *Bacillus amyloliquefaciens* in combination with tea saponin. **Postharvest Biology And Technology**, [S.L.], v. 59, n. 3, p. 316-323, mar. 2011. Elsevier BV.
- KENNEDY, J. F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 219–230, 1995.
- GERLACH, D.; SCHLOTT, B.; ZÄHRINGER, U.; SCHMIDT, K. H. N-acetylDgalactosamine/ N-acetyl-D-glucosamine – recognizing lectin from the snail *Cepaea hortensis*: purification, chemical characterization, cloning and expression in *E. coli*. *Immunology and Medical Microbiology*, v. 43, p. 223-232, 2005.
- DIMITROV, Ivan; FLOWER, Darren R; DOYTCHINOVA, Irini. AllerTOP - a server for in silico prediction of allergens. **Bmc Bioinformatics**, [S.L.], v. 14, n. 6, abr. 2013. Springer Science and Business Media LLC.
- GOW, Neil A. R.; LATGE, Jean-Paul; MUNRO, Carol A.. The Fungal Cell Wall: structure, biosynthesis, and function. **Microbiology Spectrum**, [S.L.], v. 5, n. 3, 19 maio 2017. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0035-2016>.
- FONSECA, Victor Juno Alencar; BRAGA, Ana Lays; RIBEIRO FILHO, Jaime; TEIXEIRA, Claudener Souza; HORA, Gabriel C.A. da; MORAIS-BRAGA, Maria Flaviana Bezerra. A review on the antimicrobial properties of lectins. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 195, p. 163-178, jan. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.209>.
- KONOZY, Emadeldin Hassan E.; OSMAN, Makarim El-Fadil M.; DIRAR, Amina I.; GHARTEY-KWANSAH, George. Plant lectins: a new antimicrobial frontier. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 155, p. 113735, nov. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113735>.