

OBTENÇÃO DA LECTINA RECOMBINANTE HELTUBA E INVESTIGAÇÃO INICIAL DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

RAFAEL CAGLIARI¹; ANDRÉ ALEX GRASSMANN²; PAULA KNABAH², LAURA JUQUEIRA DE CAMARGO², CAROLINE RIZZI², LUCIANO DA SILVA PINTO³

¹Universidade Federal de Pelotas – rafael.cagliari@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - grassmann.aa@gmail.com
paulaknabah@gmail.com - laurajcamargo@gmail.com - ccrizzi@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – ls_pinto@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Lectinas são um grupo homogêneo de proteínas ou glicoproteínas, geralmente encontradas em plantas e que se ligam de forma específica e reversível a carboidratos (VAN DAMME et al, 1999). Apesar de inicialmente caracterizadas como tóxicas, muitas lectinas são usadas no diagnóstico de doenças, tipagem sanguínea, identificação de cepas de microrganismos e estimulação mitogênica de células imunes (POVINELI; FINARDI FILHO, 2002).

O grupo das lectinas relacionadas às jacalinas (JRLs) tendem a ligar-se com a manose ou galactose. Dos tubérculos da *Helianthus tuberosus* ou Alcachofra de Jerusalém é extraída a Heltuba, lectina do grupo das jacalinas. A Heltuba é uma proteína citosólica tetramérica, composta por quatro subunidades idênticas de 15.5 kDa (VAN DAMME et al, 1999) e liga-se especificamente a moléculas de Man α 1–3Man ou Man α 1–2Man, dois carboidratos abundantemente encontrados em glicoconjugados expostos na superfície de vírus, bactérias e fungos. Sendo assim provavelmente uma proteína de defesa da planta contra patógenos ou predadores (BOURNE et al, 1999). Algumas lectinas também induzem a apoptose em células cancerígenas através da indução da expressão de caspases, podendo dar origem à medicamentos anticancerígenos (YAU et al, 2015).

O melanoma cutâneo representa hoje cerca de 4% dos casos totais de câncer cutâneo, atingindo majoritariamente pessoas de pele clara e é causado pela exposição exagerada aos raios ultravioletas tipo A (UV-A), um dos principais tipos de radiação solar (CANTO, et al 2007). Apenas nos Estados Unidos estima-se que 9.710 pessoas morreram por conta desta doença em 2014 (PRASHANTH 2015 et al). Os tratamentos disponíveis são muito invasivos, causando desconforto aos pacientes, além de pouco eficazes, tornando urgente o desenvolvimento de novos métodos. Neste trabalho foi produzida a lectina recombinante Heltuba, de *Helianthus tuberosus* em *Escherichia coli*, purificada e avaliada num teste inicial quanto sua capacidade de inibir o crescimento *in vitro* de células de melanoma maligno cutâneo humano.

2. METODOLOGIA

O vetor pAE/*heltuba* para expressão de Heltuba recombinante em *Escherichia coli* utilizado neste trabalho foi construído previamente (SOARES et. Al, 2014). O vetor recombinante pAE/*Banlec-type* foi utilizado para transformar *E. coli* BL21(DE3) pLysS por choque térmico. Estas células foram cultivadas em LB líquido com ampicilina e quando a cultura atingiu fase exponencial de crescimento a expressão das proteínas recombinantes foi induzida com 1 mM de IPTG por 3h. A lise celular foi realizada por sonicação e as proteínas foram inicialmente solubilizadas em tampão de purificação de proteínas recombinantes (20 mM de

fosfato de sódio, 500 mM de cloreto de sódio, 20 mM de imidazol, pH 7,4). Após centrifugação o pellet foi ressuscitado no mesmo tampão, agora contendo 6M de uréia, e novamente centrifugado. A solubilidade da proteína foi avaliada em eletroforese em gel de acrilamida (SDS-PAGE) utilizando ambos sobrenadantes provenientes de centrifugação (com e sem uréia). rHeltuba recombinante foi expressa fusionada a uma calda de seis histidinas, proporcionando a purificação por cromatografia de afinidade ao níquel, realizada no sistema automatizado AKTAprime (GE Healthcare). Após diálise contra tampão fosfato-salino (PBS), rHeltuba foi observada por SDS-PAGE e Western blot (WB) utilizando anticorpo monoclonal anti-6xHis.

A linhagem celular A375, de células de melanoma cutâneo humano, foram mantidas em meio MEM com 10% de soro fetal bovino (SFB) a 37°C em uma atmosfera úmida contendo 5% de dióxido de carbono. As células foram distribuídas em placas de 96 cavidades, com densidade celular inicial de 10^4 céls/poço. Para tratamento rHeltuba foi diluída em MEM/10% SFB para a 0,1, 0,05 e 0,025 mg/ml⁻¹. Como controle negativo foi utilizado albumina sérica bovina (BSA) na concentração de 0,1 mg/ml⁻¹. Após 24, 48 e 72 horas de tratamento, a citotoxicidade de rHeltuba em A375 foi avaliada pelo teste de MTT, conforme as instruções do fabricante. A absorbância foi medida a 492 nm e a porcentagem de inibição foi determinada como descrito anteriormente (BEGNINI et al. 2013).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proteína recombinante rHeltuba foi eficientemente expressa em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS em corpos de inclusão, que foram solubilizados em 6M de Uréia (Fig. 1A). A purificação por cromatografia de afinidade resultou em grande quantidade de proteína recombinante (Fig. 1B), do tamanho de cerca de 15 kDa, o esperado para Heltuba. Após diálise contra PBS uma quantidade considerável da proteína precipitou, e as proteínas solúveis foram coletadas do sobrenadante após centrifugação. É possível observar uma banda adicional na proteína purificada, que representa a oligomerização desta proteína esperada para esta proteína. A proteína foi eficientemente reconhecida por anticorpo anti-6xHis em WB (dados não mostrados), confirmando que a proteína continha a cauda de histidina esperada para a recombinante.

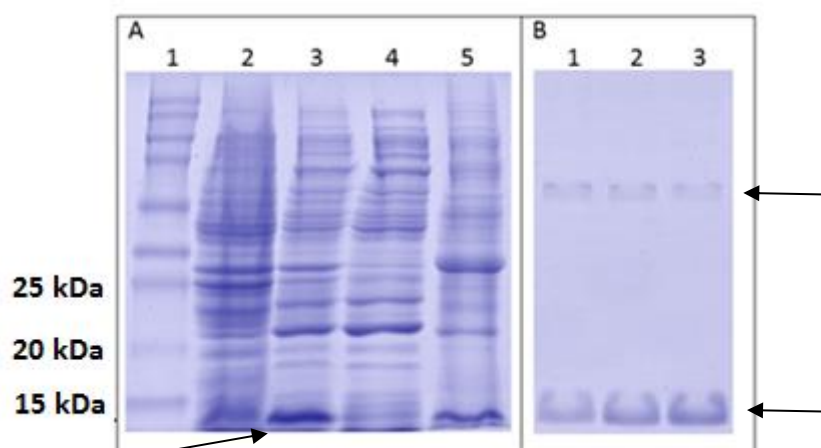


FIGURA 1: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% mostrando o processo para obtenção da lectina rHeltuba (15 kDa). Em A, a expressão e teste de solubilidade, sendo: 1- Marcador de peso molecular de proteínas (*Rainbow protein marker full*

range – BioRad); 2- *E.coli* BL21 (DE3) pLysS; 3- *E. coli* pLysS contendo plasmídeo pAE/*heltuba* não induzida; 4- *E. coli* pLysS contendo plasmídeo pAE/*heltuba* com a expressão de rHeltuba induzida por 1mM de IPTG; 5- Sobrenadante após lise celular com tampão sem desnaturante; 6- Sobrenadante contendo as proteínas solúveis em uréia. B. Alíquotas da purificação de rHeltuba por cromatografia de afinidade ao níquel. A seta indica a posição da proteína recombinante.

A avaliação inicial da atividade biológica da rHeltuba obtida foi realizada em um teste para inibição do crescimento de células A375 *in vitro*. As análises indicam uma redução do crescimento destas células em todos os tempos testados, mas somente na concentração de 0.1 mg.ml⁻¹ da lectina (Figura 2). Assim, há a necessidade de repetição deste experimento e. Para tanto, , para demonstrar a especificidade de ligação, caso haja alguma. Também, outras linhagens celulares serão testadas, uma vez que diversas JRLs apresentaram efeito antiproliferativo em linhagens celulares tumorais.

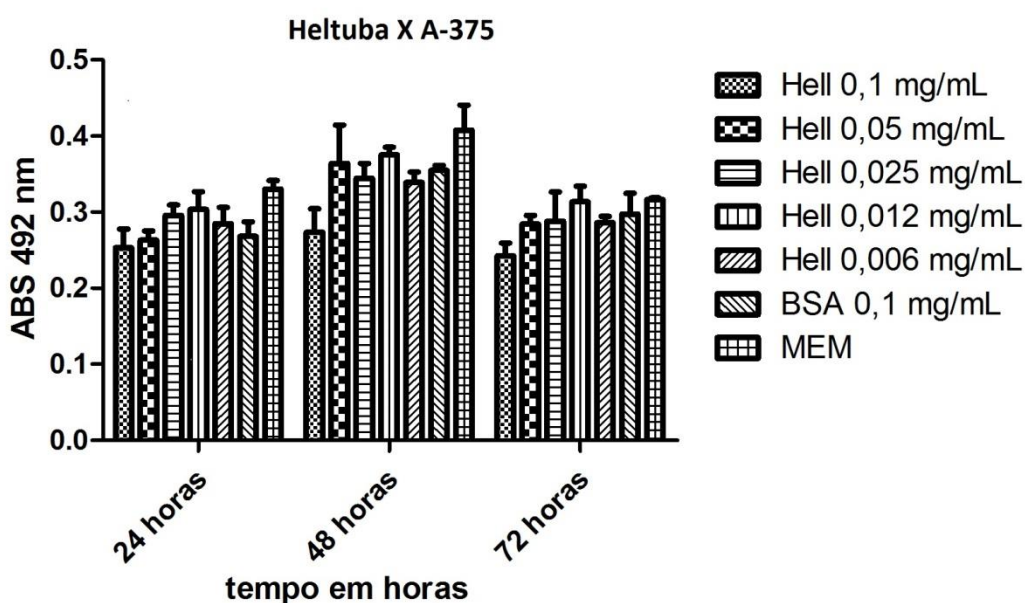


Figura 2: Percentual de sobrevivência das células de melanoma em função do tempo em horas das 4 concentrações de rHeltuba e 2 controles (BSA e MEM).

4. CONCLUSÕES

A lectina recombinante Heltuba expressa em *E. coli* é capaz de inibir o crescimento de células de melanoma, mas precisa ser testada em outras linhagens celulares.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEGNINI KR, Auxotrophic recombinant Mycobacterium bovis BCG overexpressing Ag85B enhances cytotoxicity on superficial bladder cancer cells in vitro. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 97, p. 1543-1552, 2013.

BOURNE, Y. *Helianthus tuberosus* lectin reveals a widespread scaffold for mannose-binding lectins. **ScienceDirect**. v.7, p. 1473–1482, Jan. 1999.

CANTO, A.C.M; OLIVERA, J. Melanoma cutâneo: doença curável? Revisão de literatura e apresentação de um organograma de investigação de tratamento. **AMRIGS**, Brasil, p. 1-5, 2007.

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

POVINELI, K. L.; FINARDI FILHO, F. As múltiplas funções das lectinas vegetais. **Nutrine; rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.** v.24, p.135-156, dez. 2002.

PRASHANTH M. T. Melanoma adjuvant therapy. **Chinese Clinical Oncology**. v.3, Sep. 2014.

SOARES, A. Título do trabalho. In: **CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**, 5., Pelotas, 2014. Anais... Pelotas: Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 2014. v.1. p. 1-2

YAU, T. Lectins with Potencial for Anti-Cancer Therapy. **Molecules**, v.20, p. 3791-3810, Feb. 2015.