

EXPRESSÃO DA LECTINA rBanlec-like E PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAISS PARA CARACTERIZAÇÃO E ENSAIOS FUTUROS

LAURA JUNQUEIRA DE CAMARGO¹; ANDRÉ ALEX GRASSMANN²; MARA ANDRADES COLARES MAIA³; RAFAEL CAGLIARI⁴; AMANDA SILVA HECKTHEUER⁵; LUCIANO DA SILVA PINTO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – laurajcamargo@gmail.com

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

³Universidade Federal de Pelotas – maracamaia@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – rafael.cagliari@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – amandasheck@hotmail.com

⁶BioPro Lab., Universidade Federal de Pelotas – orientador: ls_pinto@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

As lectinas pertencem a um grupo de proteínas de origem não imune, que reconhecem e ligam carboidratos reversivelmente, sem os modificar e podem ser aplicadas em diferentes processos biológicos. Estão presentes em diferentes organismos, dos mais variados níveis de complexidade (MEAGHER et al., 2005). Recentemente, diversos estudos contribuíram para um maior entendimento da famílias de lectinas conhecidas comumente como Lectinas Relacionadas à Jacalinas (JRLs). Uma das representantes de JRLs é a lectina isolada de frutos de *Musa acuminata*, conhecida popularmente como banana (MEAGHER et.al, 2005). Sua lectina, chamada Banlec é uma proteína homodimérica de aproximadamente 15 KDa que liga à manose e glicose contendo oligossacarídeos (PEUMANS, et al., 2000) A Banlec já demonstrou atividade imunomoduladora, atividades antiviral/antimicrobiana e antiproliferativa, quando testada em células de leucemia (L1210) e também em células de Hepatoma (HepG2) (SINGH et al., 2014). Neste trabalho, foi obtida uma variante de Banlec desenvolvida após análises de sequencias de JCLs, obtendo assim a lectina rBanlec-like (REIS et al.,2014) que já demostrou em trabalho anterior a atividade antiproliferativa quando testada em linhagem celular A375 de melanoma cutâneo (CAMARGO et al., 2015).

As diferentes atividades biológicas de lectinas devem ser investigadas de forma a demonstrar o mecanismo de ação das mesmas em seus respectivos alvos (DURAIYAN et al., 2012). Uma abordagem comum, simples e eficiente é a utilização de anticorpos específicos contra lectinas em técnicas como a imunofluorescência, onde é possível detectar a presença da lectina em diferentes localizações subcelulares de células alvos (DURAIYAN et al., 2012). Esta técnica já foi aplicada, por exemplo, na confirmação da interação entre rBanlec e a superfície da mucosa intestinal de ratos, auxiliando no entendimento de seu efeito imunomodulador (Dimitrijevic et al., 2012) e para a lectina RCA-I, demonstrando que esta pode inibir a adesão, migração e invasão de células de câncer de mama triplo negativo (impedindo sua metástases) (ZHOU et al., 2015). Anticorpos específicos podem ainda ser utilizados em técnicas como Western blotting (WB) e Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para investigações de conservação antigênica e conformacional dentre lectinas relacionadas, ou ainda confirmação de identidade de lectinas. Apesar de que atualmente estão comercialmente disponíveis diversos anticorpos contra diferentes lectinas – com custo para a aquisição elevado (> R\$ 1.000,00 cada 100 µL) – não existem anticorpos específicos para o reconhecimento de BanLec no mercado. O objetivo

deste trabalho foi obter a lectina recombinante rBanLec-like por expressão heteróloga em *Escherichia coli* e utiliza-la para obtenção de anticorpos policlonais para reconhecimento da proteína em aplicações futuras.

2. METODOLOGIA

O vetor recombinante previamente construído (Reis 2014) pAE/Banlec-like foi utilizado foi inserido na cepa de expressão *E. coli* BL21(DE3) Star por transformação por choque térmico e cultivadas em LB líquido com ampicilina. Quando a cultura atingiu fase exponencial de crescimento, a expressão das proteínas recombinantes foi induzida com 1 mM de IPTG. Após 3 h de expressão as células foram coletadas por centrifugação, solubilizadas em tampão de purificação de proteínas recombinantes e lisadas por sonicação. Após nova centrifugação o pellet foi ressuspendido no mesmo tampão, agora contendo uréia, e novamente centrifugado. Ambos sobrenadantes foram avaliados em eletroforese em gel de acrilamida (SDS-PAGE) para identificar a solubilidade da proteína recombinante expressa. Banlec-like recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade ao níquel no sistema automatizado AKTApurifier (GE Healthcare). As alíquotas da eluição da cromatografia foram analisadas em novo SDS-PAGE, e aquelas contendo proteína purificada foram combinadas e dialisadas contra tampão fosfato-salino (PBS). A rBanlec-type purificada foi quantificada pelo método de BCA comercial (Pierce/Thermo Sci.).

Os procedimentos com animais para obtenção de soros heterólogos contra rBanlec-like foram realizados conforme as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para o bem-estar animal. O projeto foi aprovado pelo Conselho de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPel, processo nº 1972-2016.

Dois ratos Wistar fêmeas (*Rattus norvegicus*) de 4-6 semanas foram utilizados para obtenção do anticorpo policlonal contra a lectina recombinante Banlec-like. Foram realizadas três imunizações, por injeções por via intraperitoneal, com intervalo de 3 semanas entre a primeira imunização e primeira dose de reforço, e duas semanas entre a primeira e segunda dose de reforço. Cada dose era composta de 50 µg da proteína recombinante diluída para 300 µl de PBS e emulsificada com o mesmo volume de adjuvante de Freund completo na primeira dose e incompleto nas 2 doses reforço. Por fim, os animais foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia por isofurano, seguido de exsanguinação cardíaca. O sangue foi centrifugado a 5000 xg, 10 min, 4 °C, e o soro contendo anticorpos contra BanLec-like foi separado, aliquotado e armazenado a -20 °C. O soro foi avaliado por *Western Blot* quanto a sensibilidade e especificidade de detecção de rBanLec-like. Para isso, diferentes concentrações da proteína recombinante foram separadas em SDS-PAGE (1,5-100 ng/linha), juntamente com controle negativo composto de extrato bruto de *E. coli*. Após SDS-PAGE as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose. O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado pela incubação em leite em pó 5% por 16h a 4 °C, sob agitação. Em seguida, o anticorpo policlonal foi diluído 1:3000 em solução de bloqueio e adicionado a membrana, com incubação a temperatura ambiente, por 1 h sob agitação. Após 3 lavagens com PBS-T (PBS + 0.05% de Tween 20), uma nova incubação nas mesmas condições foi realizada, desta vez com anticorpo antilgG de rato conjugado com peroxidase na diluição 1:3000. A reação foi desenvolvida pela adição de peróxido de hidrogênio e diaminobenzidina. As sequencias da rBanlec-like e o proteoma de

E. coli foram analisados utilizando o programa BLAST para análise das sequências.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após indução com IPTG, as células de *E.coli* BL21(DE3) Star expressaram uma proteína recombinante de aproximadamente 16.5 kDa, correspondente a rBanlec-like (Figura 1). A proteína rBanlec-like foi eficientemente purificada por cromatografia de afinidade ao níquel. É possível observar uma banda com aproximadamente 32 kDa, o dobro do tamanho do de rBanlec-like, possivelmente correspondente a um dímero desta proteína, característica esperada para a lectina nativa de banana (FIGURA 1).

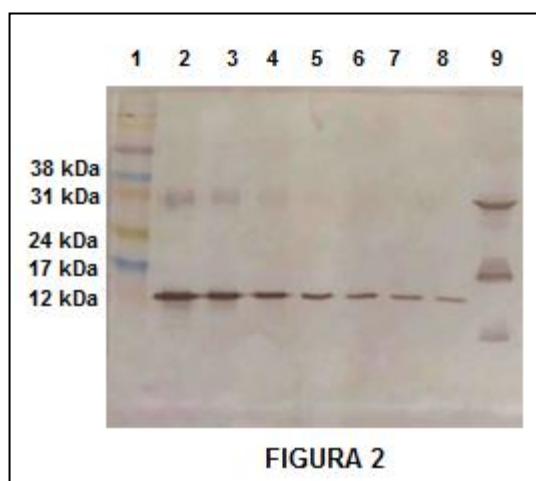
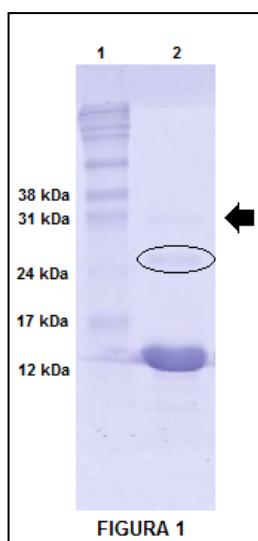


FIGURA 1: Eletroforese em gel de policrilamida 15%: 1- Marcador de peso molecular de proteínas (*Rainbow protein marker full range* – BioRad); 2- Alíquota da purificação de rBanlec-like (16.5 kDa) por cromatografia de afinidade ao níquel. Seu dímero está identificado pela seta a direita (32 kDa), e com aproximadamente 32 kDa se tem a presença de uma possível contaminação com proteínas de *E.coli* Star BL21 (DE3).

Os anticorpos policlonais obtidos contra rBanlec-like foram produzidos com sucesso, e foram capazes de reconhecer a lectina na menor concentração avaliada (1,5 ng/linha). Os anticorpos também reconheceram proteínas de *E.coli* Star BL21 (DE3) (Figura 2). Não foi encontrada similaridade entre as sequências de rBanLec-like e o proteoma de *E. coli*, indicando que não houve reconhecimento cruzado do anticorpo produzido contra rBanLec-like e as proteínas que reagiram no WB. Uma possível explicação pode ser a presença de proteínas de *E. coli* na rBanLec-like purificada, em quantidades não visíveis, mas capazes de induzir uma resposta imune.

FIGURA 2: Western blotting utilizando como anticorpo primário o soro produzido neste trabalho (1:3000), e como secundário antilgG de rato conjugado com peroxidase (1:3000), revelado por método colorimétrico. 1- Marcador de peso molecular de proteínas (*Rainbow protein marker full range* – BioRad); 2-8 rBanlec-like diluída em 100 µg, 50 µg, 25 µg, 12,5 µg, 6,25 µg, 3,12 µg e 1,5 ng/linha respectivamente; 9- *E.coli* Star BL21 (DE3).

4. CONCLUSÕES

Apesar de reconhecer algumas proteínas de *E. coli*, o articorpo produzido é sensível, reconhecendo até 1,5 ng de rBanLec-like em WB. Os próximos passos envolvem purificar a fração do soro específica para a lectina rBanlec-like, e o uso deste em ensaios para investigação de mecanismo de ação da lectina e suas diversas aplicações biológicas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**, p. 1033-1042, 2005.

PEUMANS, W.J., ZHANG, W., BARRE, A., HOULES-ASTOUL, C., BALINT-KURTI, P.L., ROVIRA, P., ROUGE, P., MAY, G.D., VAN LEUVEN, F., TRUFFA-BACHI, P., VAN DAMME, E.J. *Fruit-specific lectins from banana and plantain*. **Planta**, p. 546–554, 2000.

SINGH, S.S; DEVI, S.K; NG, T.B. Banana Lectin: A Brief Review. **Molecules**, Hong Kong, p. 2 – 5, 2014.

REIS, L.B; RIZZI, C; MOREIRA, G; KREMER, F.S; SOARES, A; PINTO, L.S. Expressão heteróloga de uma nova lectina sintética baseada na lectina Banlec de *musa accuminata*. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, 23, Pelotas, 2014. Biológicas, Pelotas: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, 2014. p. 1-2.

CAMARGO, L.J; GRASSMANN, A.A; RIZZI, C; KNABAH, P.F.; CAGLIARI, R; PINTO, L.S. Lectina rBanlec inibe o crescimento da linhagem celular A375 de melanoma maligno cutâneo. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, 24, Pelotas, 2015. Saúde, Pelotas: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, 2015. p. 1.

DIMITRIJEVIC, R; STOJANOVIC, M; MICIC, M; DIMITRIJEVIC, L.J; GAVROVIC-JANKULOVIC, M. *Recombinant banana lectin as mucosal immunostimulator*. **Journal of functional foods**, Belgrado, Sérvia, v.4, p. 636 – 641, 2012.

DURAIYAN, J; GOVINDARAJAN, R; KALIYAPPAN, K; PALANISAMY, M. *Applications of immunohistochemistry*. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, Chennai, Índia, n.2, p. 307-309, 2012.

ZHOU, S; CHENG, L; GUO, S; WANG, Y; CZAJKOWSKY, D; GAO, H; HU, X; TAO, S. *Lectin RCA-1 specifically binds to metastasis-associated cell surface glycans in triple-negative breast cancer*. **Breast Cancer Research**, Xangai, China, p. 1-14, 2015.