ENGENHARIA DE PROTEÍNAS PARA A CONSTRUÇÃO DE UMA LECTINA QUIMÉRICA COM AFINIDADE SIMULTÂNEA PARA ANTÍGENOS TN- E RESÍDUOS DE MANOSE EXPRESSOS EM CÉLULAS TUMORAIS

DANILLO DE OLIVEIRA DELLA SENTA [1]; ALESSANDRA NEIS [2]; LUCIANO DA SILVA PINTO [3]

[1]*Laboratório de Bioinformática e Proteômica, Graduação em Biotecnologia, CDTec, UFPel – danillooddss25@gmail.com*

[2]*Laboratório de Bioinformática e Proteômica, PPGBiotec, CDTec, UFPel alessandraneisbiotec@gmail.com*

[3]*Laboratório de Bioinformática e Proteômica, PPGBiotec, CDTec, UFPel – dmpluc@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

Lectinas são proteínas bioativas de complexidade variável, que estão amplamente distribuídas na natureza. São predominantemente presentes em plantas, as quais são encontradas e estocadas em suas sementes (LAGARDA-DIAZ et al., 2017). Possuem pelo menos um domínio não catalítico com capacidade de se ligar especificamente e reversivelmente a carboidratos (CAGLIARI; KREMER; PINTO, 2018). Essa capacidade de ligação a carboidratos pode ser usada para reconhecer modificações específicas frequentemente associadas a alterações anormais em células e implicadas nas diferentes doenças.

Em células tumorais, por exemplo, as mudanças em seu glicoma são consideradas uma parte essencial da oncogênese. Em células normais e saudáveis, carboidratos como a *high-mannose* – na qual 5-9 moléculas de manose estão ligadas a uma asparagina (N) – são cortadas na jornada através do retículo endoplasmático (ER) e do Golgi. Em células tumorais a manose ramificada não é processada e é apresentada como *high-mannose*, sendo assim reconhecida especificamente por alguns grupos de lectinas. Por outro lado, a O-glicosilação refere-se à ligação de moléculas de açúcar ao átomo de oxigênio de serina ou treonina e, menos frequentemente, tirosina. Certos O-glicanos são apresentados na superfície celular das células cancerígenas como formas anormalmente truncadas. Contrastando com a N-glicosilação, a O-glicosilação no câncer é caracterizada pela presença de estruturas de carboidratos truncadas. As estruturas mais comumente encontradas são o antígeno T (também denominado TF) e o antígeno Tn, que decoram a superfície celular de câncer de cólon, colo do útero, mama, pulmão, bexiga, ovário, estômago e próstata , enquanto as células normais não abrigam essas estruturas (COSTA et al., 2020; MATSUMOTO et al ., 2023).

Com base nestas características, recentemente uma lectina quimérica bi específica foi projetada para ligar-se simultaneamente a glicoconjugados sialilados e fucosilados, sendo denominada Janus lectina. Devido à sua arquitetura multivalente, esta lectina atinge a avidez nano molar para ácido siálico e fucose. A lectina foi projetada para detectar hipersialilação, uma desregulação nos padrões fisiológicos de glicosilação, que promove o crescimento e a progressão tumoral de vários tipos de câncer (SIUKSTAITE et al., 2021). O termo "Janus" é utilizado para descrever essa abordagem, fazendo uma alusão à divindade bifronte da mitologia romana, que possuía duas faces opostas em sua cabeça. Neste trabalho focamos na construção de uma lectina quimérica com dupla especificidade, ligando simultaneamente epítopos de *high-mannose* e de galactose, dois dos principais carboidratos encontrados em células tumorais.

2. METODOLOGIA

2.1. Construção da quimera *in sílico*

Para a construção da nova lectina quimérica, inicialmente foi realizada uma busca em bancos de dados biológicos para lectinas com afinidade para resíduos de *high-mannose* e de antígenos Tn com capacidade de matar células tumorais. As proteínas escolhidas não serão informadas por motivos de proteção intelectual, com isso serão denominadas como Lectina A e Lectina B. A lectina foi construída *in sílico*, sendo conectada por um *linker*, contendo uma cauda de histidina (His6x-tag) na porção C-terminal, assim como um sítio de restrição enzimática para separação das proteínas (Figura 1). Após a definição do melhor arranjo (Lectinas na posição A-B ou B-A) utilizando modelagem 3D pelo software AlphaFold (JUMPER et al., 2021), o gene sintético foi adquirido junto a empresa Epoch Life Science, e clonado em um vetor de expressão em bactérias pET24a(+).

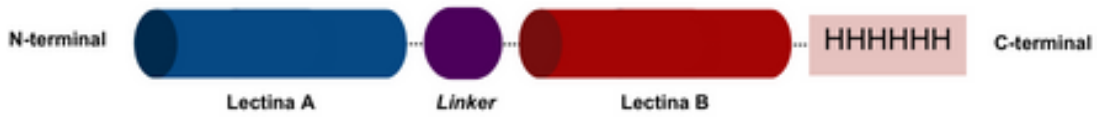

Figura 1. Desenho esquemático da construção da Quimera.

2.2. Expressão recombinante da lectina Janus

O plasmídeo contendo o gene sintético foi introduzido em *Escherichia coli*, para a expressão heteróloga após indução com IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalatopiranosideo) e purificada através da cromatografia de afinidade ao níquel. A amostra final purificada foi submetida à diálise em tampão PBS (Phosphate Buffer Saline) e quantificada por espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm.

2.3 Ensaio de atividade antitumoral

A lectina purificada foi testada na linhagem celular de adenocarcinoma de pâncreas (CFPAC-1). As células foram mantidas em meio IMDM (25 mM hepes + L-glutamina) suplementado com 10% soro fetal bovino e em atmosfera umidificada com 5% de CO2. Para os experimentos, foram utilizadas 3x10⁴ células por poço em placas de 48 poços, em triplicata. No dia do tratamento (dia 0) e a partir do 3º dia do ensaio, foi utilizado o equipamento Countess (Invitrogen) para a contagem das células viáveis através de exclusão pelo corante azul de tripano. O número de células foi analisado estatisticamente por meio do software GraphPad, utilizando análise de variância de dois fatores (two-way ANOVA) e teste de Tuckey, a fim de identificar diferenças entre os grupos nos dias 3, 4, 5 e 6 de tratamento. Foi considerado estatisticamente significante um valor de $p<0.05$. Os dados foram normalizados em relação à porcentagem de proliferação do dia "0".

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foi possível produzir uma nova lectina quimérica (Lectina Janus) com dupla afinidade a resíduos tanto de *high mannose* quanto para antígenos Tn, característicos de células tumorais. Na Figura 2 é possível observar o resultado da

expressão da lectina após a purificação. A lectina quimérica possui massa molecular de aproximadamente 32 kDa (Proteína A 16 kDa e proteína B 16 kDa). Foram utilizadas condições tanto desnaturantes, quanto não desnaturantes, para verificar a formação de dímeros.

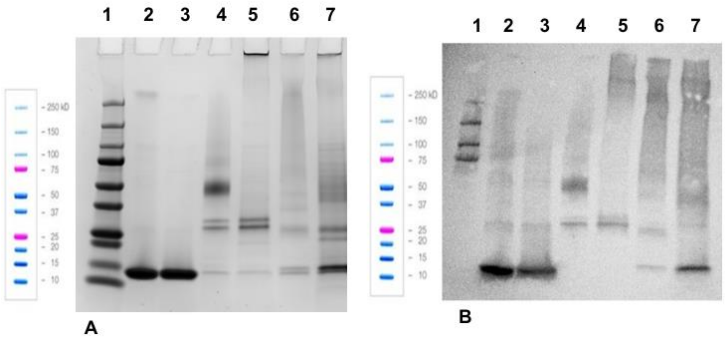

Figura 2. A) Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (20%) e B) *Western Blot* das proteínas A, B e a Lectina quimérica, utilizando anticorpo conjugado com anti-histidina. 1 - Marcador de proteína de massa molecular Biorad 1Kb Plus Dual Color; 2 - Lectina A em condições não desnaturantes (sem a presença de beta mercaptoetanol); 3 - Lectina A em condições desnaturantes ; 4 - Quimera em condições não desnaturantes; 5 - Quimera em condições desnaturantes; 6 - Lectina B em condições não desnaturantes; 7 - Lectina B em condições desnaturantes.

Em relação ao efeito citotóxico resultante do tratamento da lectina Janus e das lectinas isolados na linhagem de CFPAC-1, na concentração de 10 µM, foi possível observar a eficácia da indução do processo de morte celular, caracterizada pela formação de cavidades no tapete celular geradas pelo desprendimento de células mortas, diferente do observado nas células controle, que apresentaram crescimento normal e confluência (Figura 2).

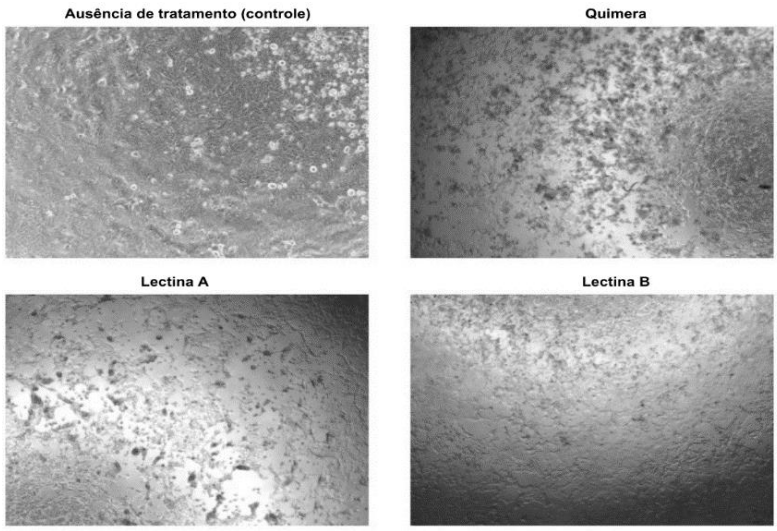

Figura 2. Efeito citotóxico nas células CFPAC-1 tratadas com a quimera e as lectinas que a compõem isoladamente, após 5 dias de incubação.

Conforme observado na Figura 3, a quimera foi capaz de reduzir o crescimento da linhagem celular CFPAC-1 já nos 3 primeiros dias de tratamento, demonstrando diferença estatística significante em relação ao controle e aos demais grupos do tratamento. Além disso, após 4, 5 e 6 dias subsequentes, a quimera continuou a exibir uma alta taxa de inibição do crescimento celular.

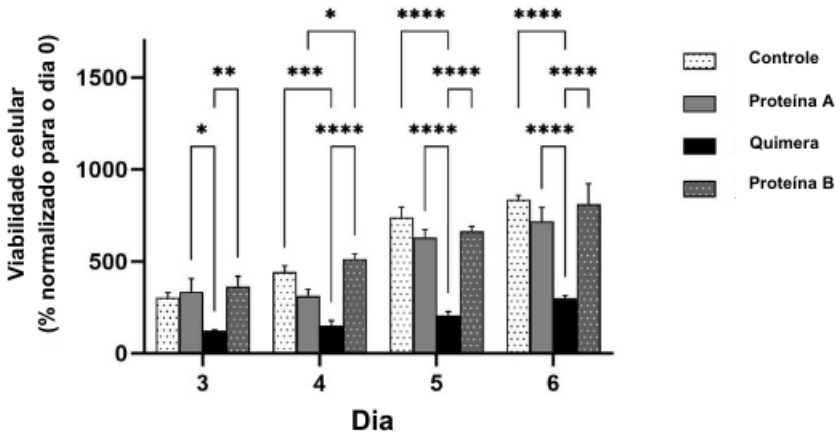

Figura 3. Avaliação da viabilidade celular da linhagem CFPAC-1 em relação ao tratamento com as lectinas Janus, A, B e o controle em períodos de 3, 4, 5 e 6 dias (two way ANOVA, teste post hoc de Tuckey). Valor de $p < 0,05$ considerado estatisticamente significante, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4. CONCLUSÕES

Em síntese, a expressão da lectina quimérica foi obtida com êxito, validando a eficácia de sua construção *in sílico*. Os resultados revelaram a capacidade de induzir seletivamente a morte celular em células de adenocarcinoma de pâncreas, destacando uma notável diferença na eficácia. Portanto, essa quimera demonstra um promissor potencial como tratamento antitumoral, abrindo caminho para sua possível utilização em diversas terapias contra o câncer em um futuro próximo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAGLIARI, R.; KREMER, F. S.; PINTO, L. da S. Bauhinia lectins: Biochemical properties and biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 811–820, 2018.

COSTA, A. F; et al. Targeting Glycosylation: A New Road for Cancer Drug Discovery. **Trends in Cancer**, v. 6, n. 9, p. 757-766, 2020.

JUMPER, J; et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature Journal**, v. 596, p. 583–589, 2021.

LAGARDA-DIAZ, I; et al. Legume Lectins: Proteins with Diverse Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1242, 2017

MATSUMOTO, Y; et al. Aberrant Glycosylation as Immune Therapeutic Targets for Solid Tumors. **Cancers**, v.15, n. 14, p. 3536, 2023.

SIUKSTAITE, L; et al. The Two Sweet Sides of Janus Lectin Drive Crosslinking of Liposomes to Cancer Cells and Material Uptake. **Toxins**, v. 13, n. 11, p. 792, 2021.