



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**“PERFIL PROTEÔMICO E IMUNÔMICO DA LECTINA LIGADORA
DE MANOSE (MBL) EM INDIVÍDUOS PORTADORES DO VÍRUS DA
HEPATITE C”**

DIEGO ARAÚJO PESSOA DE ALBUQUERQUE

RECIFE, FEVEREIRO DE 2010

DIEGO ARAÚJO PESSOA DE ALBUQUERQUE

**“PERFIL PROTEÔMICO E IMUNÔMICO DA LECTINA LIGADORA
DE MANOSE (MBL) EM INDIVÍDUOS PORTADORES DO VÍRUS DA
HEPATITE C”**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Biologia Molecular.

ORIENTADOR: LUIZ BEZERRA DE CARVALHO JÚNIOR

CO-ORIENTADOR: EDUARDO ISIDORO CARNEIRO BELTRÃO

RECIFE, FEVEREIRO DE 2010

N.Cham. DISSERTAÇÃO 570 A345p
Autor: Albuquerque, Diego Araújo Pessoa
Título: "Perfil proteômico e imunômico da lectina



101948400
299084

Ex. I BC

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO	
Biblioteca Central	
Registro	19484 Data 05/05/10

Acervo: 299084

Ex: 101948400

Albuquerque, Diego Araújo Pessoa de
"Perfil proteômico e imunômico da lectina ligadora de manose (MBL) em
indivíduos portadores do vírus da Hepatite C"/ Diego Araújo Pessoa de
Albuquerque . – Recife: O Autor, 2010.

59 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CCB. Biologia Molecular, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Lectina ligadora de manose (MBL) 2. Hepatite C 3. Imunidade I
Título.

572.68

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB – 2010- 082

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
NÍVEL MESTRADO

Parecer da comissão examinadora da Defesa da Dissertação de

DIEGO ARAÚJO PESSOA DE ALBUQUERQUE

PERFIL PROTEÔMICO E IMUNÔMICO DA LECTINA LIGADORA DE MANOSE
(MBL) EM INDIVÍDUOS PORTADORES
DO VÍRUS DA HEPATITE C

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera o mestrando **DIEGO ARAÚJO PESSOA DE ALBUQUERQUE** como

APROVADO

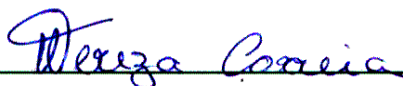
Recife, 26 de fevereiro de 2010



Prof. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior
Departamento de Bioquímica - UFPE



Prof. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão
Departamento de Bioquímica - UFPE



Prof. Maria Tereza dos Santos Correa
Departamento de Bioquímica - UFPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço as duas famílias da qual faço parte. Pela preocupação e carinho oferecidos a mim por nada em troca. **Em especial a minha mãe e minhas irmãs pelo simples amor incondicional** que me faz forte e me dá vontade de querer sempre mais. Aos meus parentes de outros estados que mesmo distante fizeram e fazem questão de participar dos momentos da minha vida, acadêmicos ou não.

A família paterna pela troca constante, pela preocupação e carinho demonstrados. Não foram anos fáceis esses últimos. Obrigado pela troca mesmo que em pequenos ou mal momentos, sempre importantes e divertidos. Fico feliz por fazer parte da geração do meio, poder ver os pais envelhecendo e os filhos crescendo cada vez mais. Um agradecimento especial a um dos seres humanos mais fortes que eu conheci na minha vida, Dona Dida, um exemplo para toda vida. Aos parentes maternos principalmente pelo auxílio, por me acolherem num momento complicado e ajudarem da melhor maneira que puderam. Desculpe os problemas que causo com a convivência e acreditem que cresci muito nos últimos anos.

Agradeço a todo o corpo docente da Universidade de Pernambuco, eles influenciaram positiva e negativamente sobre os caminhos que eu deveria seguir. Por conta dos nossos doutores eu trabalho com Bioquímica.

Um agradecimento especial aos meus orientadores e co-orientadores e professores que auxiliaram de alguma forma nos meus caminhos para esse trabalho. Professor Eduardo Beltrão, Professora Patrícia Moura, Professora Maria do Socorro Cavalcanti, Mestre Igor Teixeira. Um agradecimento especial ao Professor Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, pelos conselhos e convivência nesse período do mestrado. Por ter sido um bom “capanga” durante todo este tempo de convívio.

Agradeço aos professores da Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco. Agradeço também a todos que fazem parte deste programa, Adenilda e diversos estagiários, que lá estiveram e conviveram comigo. Peço também que me desculpem qualquer estresse causado.

Agradeço também aos diversos colegas de curso que influenciaram diretamente na minha formação prática, dividindo o laboratório comigo, e nessa Dissertação de Mestrado.

O pessoal do Grupo Biomarcadores no Câncer, BmC, coordenado pelo Prof. Eduardo Beltrão, que mesmo tentando a todo custo me “tirar” do grupo por trabalhar de maneira diferenciada tiveram que me aguentar. Obrigado pelos bons momentos de convivência laboratorial e por “nunca” me deixarem usar sozinho o espaço reservado para mim no laboratório.

A todos que fazem parte do Setor de Patologia do LIKA, em especial a Carmelita Cavalcanti por ser sempre tão solícita em ajudar com qualquer problema que viesse a ocorrer no laboratório.

Aos companheiros Luydson Richardson, Rodrigo do Carmo, Filipe Silva da UPE. Ao pessoal do LAPED, que sempre foram solícitos e me ajudaram em tudo que precisei.

Ao pessoal da minha sala de pós-graduação, que mesmo não tendo tanta proximidade com alguns fez parte da minha vida durante esses longos dois anos e sempre se mostraram companheiros. Obrigado pelos bons momentos de discussão e crescimento dentro e fora das cadeiras da pós-graduação.

Ao pessoal da minha sala de graduação e em especial a Felipe Lira que participou das duas turmas e sempre foi bastante solícito e camarada nos trabalhos e apresentações. A Juliana Mendes e Moacyr Barreto que também estiveram presentes no momento da graduação e nos momentos laboratoriais do meu mestrado.

Aos meus amigos de curso, que estudaram comigo ou conviveram comigo no D.A da UPE, e nas diversas faculdades pela qual passei na minha vida estudantil. Todos contribuíram para meu crescimento como pessoa e como biólogo.

E aos meus amigos de vida real, os melhores que eu pude obter com esse meu jeito turrão, chato e sarcástico nesses 27 anos de vida...

“Liberte-se da escravidão mental ninguém além de voce pode libertar sua mente, não tenha medo da energia atômica, porque eles não podem parar o tempo. Por quanto tempo vão matar nossos profetas, enquanto nós permaneceremos de lado olhando? Sim, alguns dizem que é apenas uma parte nós termos que cumprir o livro.”

Robert Nesta Marley

SUMÁRIO**RESUMO****ABSTRACT**

1	INTRODUÇÃO	09
2	OBJETIVOS	11
2.1	GERAL	11
2.2	ESPECÍFICOS	11
3	REVISÃO DA LITERATURA	12
3.1	A DESCOBERTA DA MBL	12
3.2	BIOQUÍMICA DA MBL	13
3.3	MBL E O SISTEMA IMUNOLÓGICO	15
3.4	HEPATITE C E MBL	19
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
5	ARTIGO CIENTÍFICO I	
	NEW TECHNIQUE APPLIED TO DETECTION AND QUANTIFICATION OF MBL	32
6	ARTIGO CIENTÍFICO II	
	PURIFICATION AND MOLECULAR MASS PROFILE OF MANNAN-BINDING LECTIN IN HEPATITIS C PATIENTS	45
7	CONCLUSÕES	61
8	ANEXOS	62

RESUMO

A lectina ligadora de manose (*mannan binding lectin* - MBL) é membro das glicoproteínas plasmáticas, um grupo de proteínas que se caracteriza pela interação com um ou mais resíduos de açúcares específicos expressos em vários sistemas biológicos. Concentrações reduzidas de MBL tem sido relacionadas com a diminuição na resposta a varias doenças infecciosas. Inúmeras formas oligoméricas da MBL, com diferentes capacidades funcionais, são encontradas no sangue humano. Estudos controversos lidam com a possível associação entre mutações no gene da MBL e a infecção com o vírus da hepatite C (*hepatitis C vírus* - HCV). Não existem associações significativas entre pacientes com baixos níveis séricos de MBL e as características de desenvolvimento da doença, incluindo a resposta a terapia antiviral. O presente estudo teve como objetivo propor um ensaio prático para purificação de formas moleculares de MBL em amostras de soro de pacientes infectados com HCV visando investigar a estrutura e o genótipo desta lectina. Os resultados do ensaio de dot-N-man demonstraram uma boa eficiência na separação da MBL utilizando membrana de nitrocelulose revestida de manana. A identificação de MBL foi confirmada em todos os genótipos por método convencional de dot-ELISA. Bandas protéicas em gel de eletroforese revelaram diferentes padrões de migração entre os genótipos AA, A0 e 00, entre 50-90 KDa, e 270 KDa, relacionadas com a variação de baixa e alta massa molecular da subunidade estrutural de MBL, respectivamente. Nas amostras de SDS-PAGE não redutora observou-se uma maior variedade de massas moleculares, como dímeros, trímeros, e as unidades estruturais de MBL, principalmente em indivíduos AA. A análise de western blotting confirmou a presença de alta (128 KDa) e baixa (32KDa) massas moleculares da MBL. Foi também observada a presença de MBL com massa molecular de 128 KDa, a qual não é muito comum. Os resultados mostraram que ambas, baixa e alta formas moleculares, foram identificadas e também houve variação com a genotipagem dos pacientes. Os resultados descrevendo o proteoma das formas moleculares de MBL em pacientes com HCV contribuíram para melhor compreensão da estrutura/genótipo da MBL nesta patologia que pode estar associada à resposta ao tratamento.

Palavras-Chave: MBL, HCV, dot-N-man

ABSTRACT

Mannan-binding lectin (MBL) is a plasma glycoprotein, a group of proteins characterized by interaction with more than one specific sugar residue expressed in many biological systems. Reduced MBL concentrations have been linked to diminished responses to several infectious diseases. Numerous oligomeric forms of MBL, with different functional capabilities, have been reported as circulating molecules in human plasma. Controversial studies have dealt with a possible association between mutations in the *MBL* gene and hepatitis C virus (HCV) infection. There are no significant associations between patients with MBL low serum concentration and the disease development, including response to antiviral therapy. The present study aimed to present a practical purification assay for MBL molecular forms from serum samples of HCV-infected individuals to investigate the structure and the genotype of this lectin. The separation assay results showed a good binding efficiency of mannan-coated nitrocellulose membrane and the MBL identification was confirmed to all genotypes by conventional dot-ELISA. Protein gel bands revealed different migration patterns between AA, A0 and 00 genotypes, between 50-90 kDa, and 270 kDa, related to low and high molecular masses of MBL structural subunits, respectively. In non-reducing SDS-PAGE samples showed a greater range of molecular species, such as dimmers, trimmers, and structural units of MBL, mainly in AA individuals. Western blotting analysis confirmed the presence of high (128 kDa) and low (32 kDa) molecular masses of MBL. It was also observed MBL with molecular mass of 128 kDa, which is not very common. Our results indicate that both, low and high molecular forms, were identified and that also varied according to the genotype for MBL. Our results depicted the proteome of MBL molecular forms in HCV patients contributing for the understanding of the structure/genotype of MBL in this pathology which could be associated to the response to treatment.

Keywords: MBL, HCV, dot-N-man

1 INTRODUÇÃO

O termo “proteoma” foi ouvido pela primeira vez em 1993 por de Mark Wilkins e Keith Williams que se referiam à identificação sistemática do complemento protéico total do genoma de um organismo ou tipo celular (BLACKSTOCK & WEIR, 1999; LOPEZ, 1999; HAYNES & YATES, 2000). Entretanto, este termo pode também ser usado em um sentido menos universal, para referir-se ao conjunto de proteínas que está sendo expresso num dado momento da vida da célula (PANDEY & MANN, 2000). A proteômica visa estudar as propriedades das proteínas, seus níveis de expressão, funções, modificações pós-traducionais, interações entre proteínas e mecanismos reguladores (GRAVES & HAYSTEAD, 2002).

Existem duas etapas principais na análise proteômica: a primeira consiste em isolar e separar as proteínas de um sistema biológico, esta pode ser feita através de métodos eletroforéticos. A segunda etapa consiste na identificação das proteínas separadas, geralmente por reações imunológicas, espectrometria de massa e bioinformática (CAHILL *et al.*, 2001).

A interdisciplinaridade que liga imunologia, imunoinformática, genômica, proteômica a seus campos científicos relacionados denomina-se imunômica. O crescimento explosivo da tecnologia molecular, da biologia e da informação transformou radicalmente a pesquisa da imunologia na era da pós-genômica (PETROVSKY, 2005). Os dados da imunômica foram usados com sucesso para identificar marcadores biológicos envolvidos em doenças auto-imune, em alergias, em infecções virais, tais como HIV, HCV, influenza, em diabetes, e em respostas às vacinas do câncer (BRAGA-NETO & MARQUES, 2006).

A lectina ligadora de manose (*mannan binding lectin* - MBL) é uma glicoproteína plasmática pertencente à família das colectinas, as quais são caracterizadas por se ligarem a sacarídicos (PRESANIS *et al.*, 2003). Na região C-terminal da cadeia protéica situa-se o domínio de reconhecimento de carboidratos (*carbohydrate recognition domain* - CRD), caracterizado por apresentar um arranjo compacto, e permitir as ligações seletivas da colectina a carboidratos complexos específicos, na presença do íon cálcio.

Segundo Van de Wetering e colaboradores (2004), o CRD apresenta resíduos de cisteína, os quais seriam responsáveis pela especificidade de ligação a manose. A atividade funcional da MBL é dependente da sua organização molecular. Nos humanos, as formas

plasmáticas predominantes são as diméricas, triméricas e tetraméricas, mas somente as estruturas com massa molecular maiores são capazes de desencadear uma resposta imune eficaz. Pode ocorrer então, a opsonização e a fagocitose dos patógenos e também a ativação do sistema complemento por meio de complexos com serina-proteases específicas, denominadas MASPs, proteína ligadora de mannose associada a serina proteases (SELANDER *et al.*, 2006).

Os níveis de MBL no soro variam desde 50 µg/L até 5.000 µg/L. A deficiência da MBL é comum e atinge cerca de 5% ou mais da população mundial (PRESANIS *et al.*, 2003), estando associada a maior susceptibilidade a infecções severas e repetitivas na infância e na fase adulta (KOCH *et al.*, 2001). Estudos destacam a relação entre os níveis da MBL no sangue e o genótipo, confirmando que as variações na concentração são devido à ocorrência de mutações estruturais no gene da proteína, *MBL2* (DEAN *et al.*, 2005).

A MBL do soro pode ser analisada por diferentes meios, quase sempre com o propósito de estabelecer uma relação causal entre a lectina e a susceptibilidade às doenças (BONIOTTO *et al.*, 2002). Para tal finalidade, técnicas qualitativas e quantitativas são utilizadas para a caracterização da MBL, incluindo ELISA e os ensaios funcionais, tais como a medida da lectina ligada a uma coluna de fase sólida de manana, e a medida da ativação do sistema complemento mediada pela MBL no ensaio de deposição de C4 (THIEL *et al.*, 2006).

Estima-se que cerca de 3% da população mundial, 170 milhões de pessoas, sejam portadores de hepatite C crônica (2 milhões somente no Brasil). É atualmente a principal causa de transplante hepático em países desenvolvidos, e responsável por 60% das hepatopatias crônicas (HEPCENTRO, 2006). A principal estratégia terapêutica contra a hepatite C é a combinação de interferon alfa e ribavirina, IFN α -RIBA (CHEVALIEZ & PWLOTSKY, 2007). Contudo os resultados terapêuticos não são padrão. Assim o estudo descrevendo o proteoma das formas moleculares de MBL em pacientes com HCV contribui para uma melhor compreensão da relação entre as estruturas expressas e as mutações genóticas da MBL nesta patologia podendo auxiliar na resposta ao tratamento.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Estabelecer um perfil proteômico e imunômico da lectina ligadora de manose (MBL) em indivíduos portadores do vírus da Hepatite C.

2.2 ESPECÍFICOS

- Propor a técnica dot-N-mn para separação/purificação de formas moleculares de MBL;
- Estabelecer um perfil físico-químico de oligomerização da molécula de MBL empregando dot-blot, eletroforese SDS-PAGE e western blotting;
- Correlacionar este perfil com a presença de variantes alélicas para o gene MBL.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A DESCOBERTA DA MBL

A descoberta da MBL data da década de 40, quando foi observado que componentes lábeis ao calor, presentes no soro, denominados de β -inibidores, eram capazes de neutralizar o vírus influenza e de inibir a hemaglutinação induzida por esse vírus. Essa capacidade foi atribuída, posteriormente, a lectina ligadora de manose, MBL (MALHOTRA & SIM, 1995). No entanto apenas em 1968 a MBL ganhou importância, quando Miller e colaboradores analisaram o soro de uma paciente com uma deficiência no processo de fagocitose.

Nas duas décadas posteriores, de 70 e 80, foram realizados estudos que mostraram que esse particular defeito de opsonização e fagocitose, funções atribuídas a MBL, predispõe a infecções respiratórias, diarreias e desenvolvimento deficiente durante a infância. Em 1975, Robinson e colaboradores detectaram a presença de uma MBL na purificação da enzima α -manosidase do fígado humano por cromatografia de afinidade. Subseqüentemente, lectinas semelhantes foram isoladas do fígado e do soro de coelho (KOZUTSUMI *et al.*, 1980; LAURSEN *et al.*, 1998a), do fígado e dos linfonodos de camundongo (MIZUNO *et al.*, 1981; ZHANG *et al.*, 1999) e de humanos (WILD *et al.*, 1983; LAURSEN *et al.*, 1998b).

Em 1989, Super e colaboradores associaram a falha na opsonização de *Saccharomyces cerevisiae* no soro de crianças com infecções frequentes e inexplicadas com os baixos níveis plasmáticos de MBL, resultando na maior susceptibilidade a infecções crônicas. A deficiência da MBL tem sido relatada, particularmente comum em crianças desde a década de 90 por Turner (2003).

Evidências mostram que a MBL tem pelo menos quatro funções distintas: ativação do complemento, promoção da opsonização e fagocitose (complemento-independente), modulação da inflamação e promoção da apoptose. Dessas, a ativação do complemento seria a mais extensivamente estudada (TURNER, 2003).

3.2 BIOQUÍMICA DA MBL

Várias formas oligoméricas da MBL, atribuídas às diferentes capacidades funcionais, têm sido relatadas como circulantes no plasma humano. Essas variações estruturais podem consistir desde a observação de uma única unidade estrutural, denominada de monômero, à formação dos altos oligômeros, a exemplo dos hexâmeros, como relatado por Lipscombe e colaboradores em 1995.

Alguns estudos têm indicado que a forma tetramérica da MBL é suficiente para desencadear a ativação do sistema complemento, enquanto as formas diméricas ou triméricas podem opsonizar os patógenos para o reconhecimento e processamento fagocítico. Portanto, a oligomerização da MBL é essencial para a sua atividade biológica no sistema imune por permitir a ligação a carboidratos específicos dispostos na superfície de vírus, bactérias, fungos e parasitas, ativando a ligação de fatores do complemento através da formação de complexos com serina-proteases (MASPs), e promovendo a lise celular e a eliminação de microrganismos (YOKOTA *et al.*, 1995; TURNER, 2003).

Estudos da MBL no plasma humano determinaram a existência de, principalmente, duas formas da proteína, uma forma de alta e outra de baixa massa molecular. Fazendo associação com o genótipo, vários autores observaram que os indivíduos portadores do alelo selvagem (AA) apresentam predomínio das formas oligoméricas da lectina na circulação (tetrâmeros, pentâmeros, hexâmeros, etc), com uma menor identificação das formas de baixa massa molecular (LIPSCOMBE *et al.*, 1995; TERAII *et al.*, 2003; ROOS *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2005).

Entretanto, no soro dos indivíduos heterozigotos é relatado principalmente as formas de baixa massa molecular, com a presença das altas formas oligoméricas da MBL em menor proporção, porém estas são similares as apresentadas pelo genótipo selvagem (LIPSCOMBE *et al.*, 1995; MATSUSHITA *et al.*, 2000; GARRED *et al.*, 2003; TERAII *et al.*, 2003; ROOS *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2005). Nestes indivíduos, os níveis sanguíneos da MBL podem estar reduzidos em até 100 vezes quando comparados ao genótipo selvagem. Nos homozigotos mutantes, os níveis da MBL são quase indetectáveis (GARRED *et al.*, 1992; LIPSCOMBE *et al.*, 1992; MADSEN *et al.*, 1994, 1995, 1998; CROSDALE *et al.*, 2000).

A MBL humana é uma glicoproteína extensa, cuja cadeia peptídica sintetizada tem peso molecular de 32 kDa e compreende uma sequência de 248 aminoácidos. Consiste de quatro domínios distintos: domínio de reconhecimento de carboidrato (*carbohydrate recognition domain*, CRD), pescoço (*neck*), colágeno e N-terminal (Figura 1) (PRESANIS *et al.*, 2003). Na região C-terminal da cadeia peptídica localiza-se o CRD, caracterizado por apresentar um arranjo compacto e permitir as ligações seletivas da MBL a carboidratos complexos específicos, na presença do cálcio (VAN DE WETERING *et al.*, 2004).

Em direção a região N-terminal da cadeia peptídica, tem-se uma região hidrofóbica denominada pescoço, a qual permite o correto alinhamento das cadeias colágenas e, assim, facilita a trimerização da estrutura. A região colágena é a região estrutural mais extensa, caracterizada por conter 19 sequências repetitivas de aminoácidos glicina-X-Y, onde X e Y pode ser qualquer aminoácido, com alta frequência para prolina e hidroxiprolina (DAHL *et al.*, 2001).

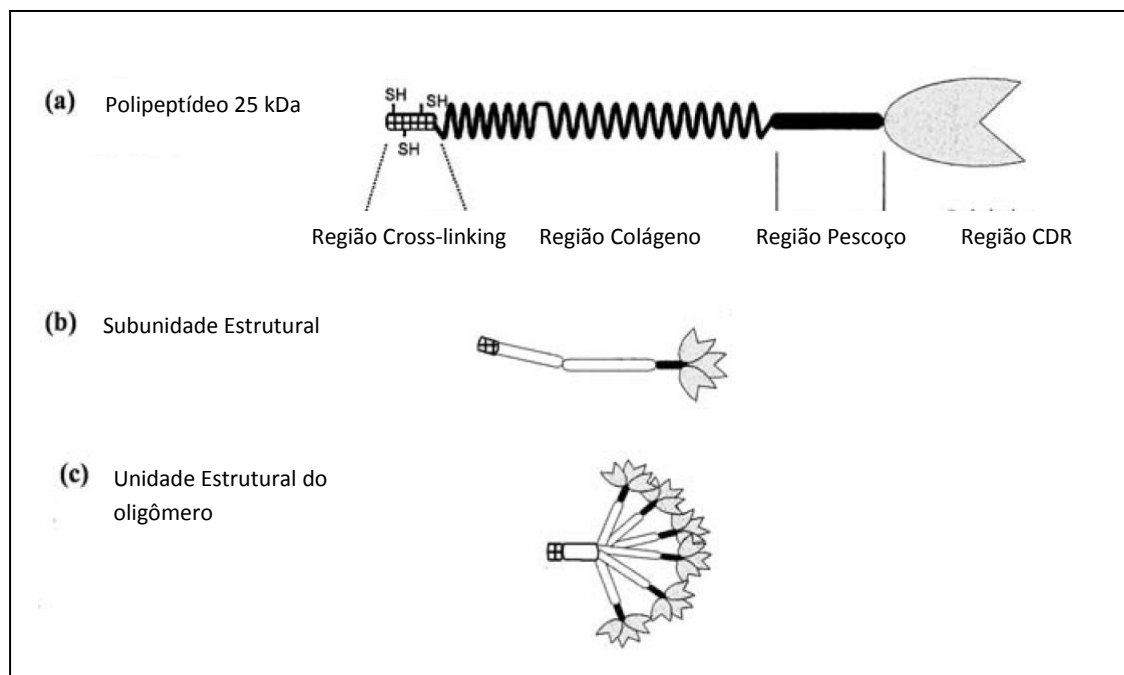


Figura 1: Representações estruturais da MBL (a) unidade polipeptídica, (b) subunidade estrutural trimérica e (c) oligômero das subunidades estruturais. Fonte: PRESANIS *et al.* (2003).

Na porção N-terminal, há um domínio de vinte resíduos de aminoácidos rico em cisteína. Esta região está envolvida na interação covalente entre as três cadeias polipeptídicas da

unidade estrutural e também é responsável pela ligação covalente de muitas unidades na estrutura oligomérica funcional da MBL. Quando ocorre a junção de três a seis dessas subunidades estruturais é formado o oligômero, ou seja, a proteína madura que apresenta uma alta massa molecular (GARRED *et al.*, 2003).

Embora a afinidade de cada interação açúcar-lectina seja muito fraca - somente de 10^{-3} M (IOBST *et al.*, 1994) a MBL é capaz de se ligar a múltiplos sítios simultaneamente, assegurando a essa uma alta funcionalidade (TURNER, 2003). O domínio CRD é açúcar seletivo e cálcio dependente, permitindo que a MBL reconheça preferencialmente a manose, glicose, fucose e N-acetilglicosamina (TURNER, 1996).

É freqüente a ocorrência de polimorfismos no gene *MBL2* em populações de várias regiões do globo, notadamente em países europeus, asiáticos e africanos (MINCHINTON *et al.* 2002; LEE *et al.*, 2005). Tais mutações consistem na mudança de uma única base (*single nucleotide polymorphism* - SNP) afetando com isso três códons específicos (52, 54 e 57) na região estrutural do gene. O polimorfismo acarreta a substituição de um aminoácido diferente na proteína. O indivíduo heterozigoto ou homozigoto para qualquer uma das mutações no gene estrutural é denominado de A0 ou 00, respectivamente, sendo o alelo “A” o selvagem e “0” a anotação para qualquer uma das substituições nos códons 52, 54 e 57 (GARRED *et al.*, 2006). A deficiência na MBL é provocada por três polimorfismos em nucleotídeos específicos situados no éxon 1 do gene da MBL (*MBL2*) localizado no cromossomo 10. Esses polimorfismos são referidos como: alelo B no códon 54 (G54D), alelo C no códon 57 (G57E) e alelo D no códon 52 (R52C) (DEAN *et al.*, 2005).

3.3 MBL E O SISTEMA IMUNOLÓGICO

O sistema imune inato é considerado a primeira linha de defesa do organismo apresentando moléculas diretamente envolvidas no reconhecimento e na eliminação de patógenos. A imunidade inata não age de forma isolada, separada ou paralela à imunidade adaptativa, mas, proporcionalmente, os dois sistemas interagem produtiva e sinergicamente. Podem ser citados exemplos que incluem a amplificação da resposta de anticorpos pelos componentes do sistema complemento, gerados inespecificamente e o papel de anticorpos naturais na neutralização viral (OCHSENBEIN & ZINKERNAGEL, 2000).

Imunologistas têm, por muito tempo, apreciado e explorado lectinas produzidas por microrganismos, plantas e invertebrados. Contudo o achado de maior relevância para a pesquisa dessas proteínas foi à descoberta da função desempenhada por elas na defesa imune dos mamíferos, promovida pelo reconhecimento específico a açúcares (PRESANIS *et al.*, 2003).

Bordet e Streng, em 1906, descreveram a primeira lectina animal, a congulinina, através da sua habilidade para aglutinar eritrócitos cobertos com anticorpos e elementos do complemento. Posteriormente, essa e outras lectinas animais foram caracterizadas como proteínas de reconhecimento a carboidratos dependentes de cálcio e tal característica constituiria um grupo específico de lectinas denominadas colectinas (HOLMSKOV *et al.*, 1994).

As colectinas pertencem a uma super família de lectinas cálcio-dependentes de mamíferos e estão envolvidas no sistema de defesa inata do organismo. Os membros integrantes mais conhecidos são a lectina ligadora de manose (MBL), proteína surfactante A (SP-A), proteína surfactante D (SP-D), colectina do fígado 1 (CL-L1), colectina da placenta 1 (CL-P1), congulinina, colectina de 43 kDa (CL-43) e colectina de 46 kDa (CL-46). A MBL é uma das colectinas humanas mais estudadas (VAN DE WETERING *et al.*, 2004).

A MBL é uma proteína de fase aguda secretada na corrente sanguínea e é principalmente sintetizada pelo fígado (SASTRY *et al.*, 1991). Esta lectina tem importância na promoção da opsonização e na acentuação do processo fagocítico de patógenos, células defeituosas ou células apoptóticas previamente opsonizadas, ativando uma via específica do sistema complemento, a via das lectinas (Figura 2) (GARRED *et al.*, 2006).

A deficiência da MBL tem sido associada com o aumento do risco de infecção em uma variedade de situações clínicas (KILPATRICK, 2002). O status da lectina exibe enorme influência em indivíduos nos quais a imunidade adaptativa esteja imatura, a exemplo de crianças muito novas, ou esteja comprometida, tais como na fibrose cística, após tratamento quimioterápico ou no processo de transplante de medula óssea (GROSDALE *et al.*, 2000; GARRED *et al.*, 2003; SELANDERET *et al.*, 2006).

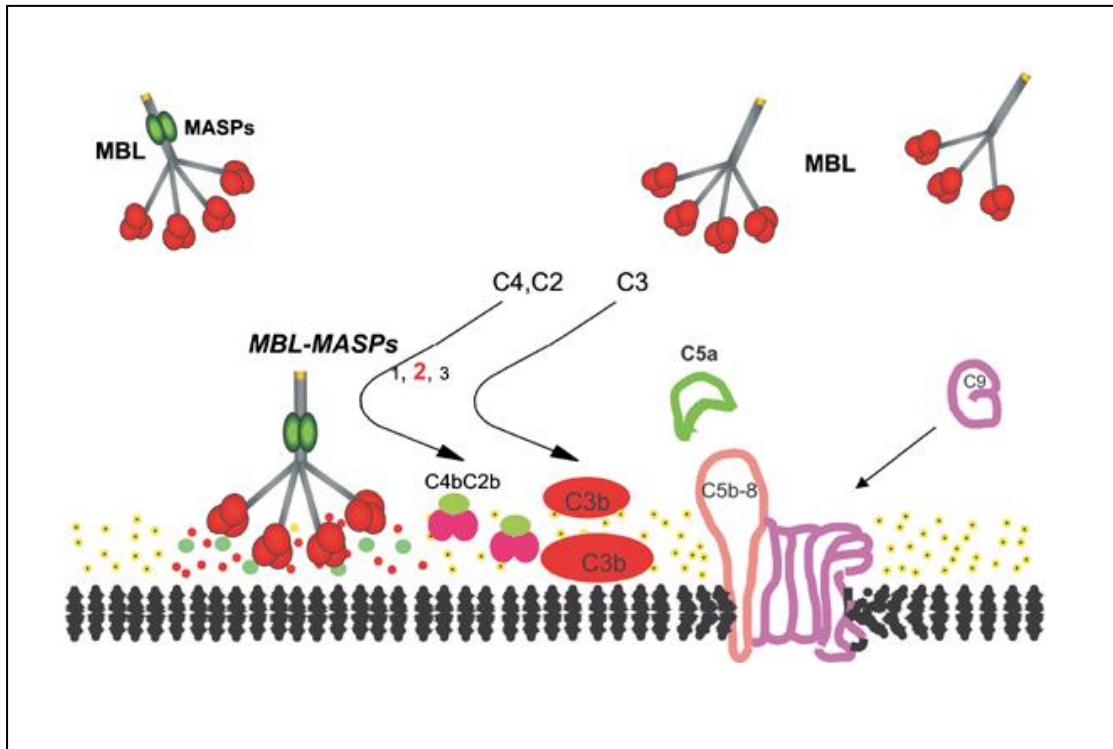


Figura 2: Ativação da via lectina do sistema complemento pela MBL e MASP-2 na superfície de um microorganismo. Fonte: GARRED *et al.* (2006).

Estudos sobre o papel da MBL têm sido conduzidos em condições saudáveis e nas doenças. Em populações pediátricas a detecção de níveis baixos da lectina esteve comumente associada a infecções generalizadas, sobretudo do trato respiratório (KOCH *et al.*, 2001); as concentrações da MBL no sangue do cordão umbilical são geralmente menores do que na circulação de indivíduos adultos (KILPATRICK *et al.*, 2002; THIEL *et al.*, 2006), aumentando rapidamente durante a primeira semana de vida, permanecendo durante a infância, um pouco mais elevados do que em adultos (TERAI & KOBAYASHI, 2003). Acredita-se, portanto, que a alta concentração de MBL coincide com a fase de adaptação ambiental das crianças até três anos e é, provavelmente, uma resposta protetora contra o contato antigênico maciço, reforçando assim, a hipótese de que a lectina atua na defesa contra as infecções, principalmente no período de imaturidade do sistema imune e de maior susceptibilidade aos agentes infecciosos (THIEL *et al.*, 2006).

Os níveis da MBL no soro são extremamente variáveis, desde concentrações menores que 50 µg/L, até maiores que 5000 µg/L em indivíduos saudáveis. A deficiência da MBL é

comum e atinge cerca de 5% ou mais da população mundial (KOCH *et al.*, 2001; PRESANIS *et al.*, 2003).

Estudos destacam a relação entre os níveis de MBL no sangue e o genótipo do indivíduo, confirmando que as variações na sua concentração são atribuídas à ocorrência de mutações estruturais no gene da proteína (MBL2). Estas mutações (figura 3) são caracterizadas por substituições em um único aminoácido nos códons 52, 54 e 57, localizados no éxon 1 e referidos, respectivamente, como variantes D, B e C, sendo A o tipo selvagem (SEGAT *et al.*, 2007)

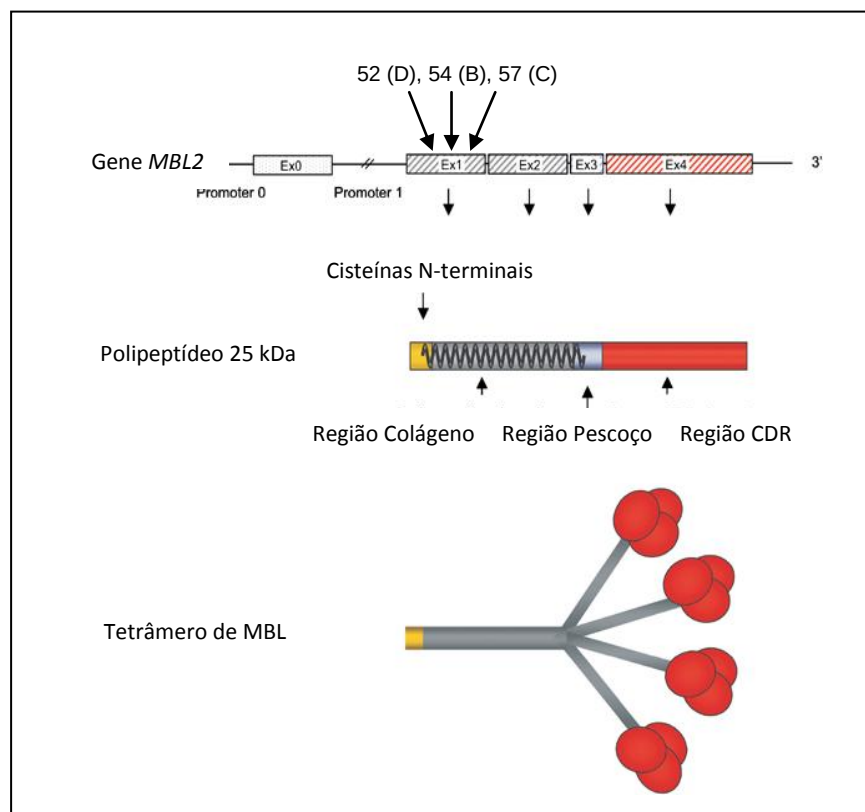


Figura 3: Representação esquemática do gene MBL2 e os códons de mutação no gene. Fonte: GARRED *et al.* (2006).

Os testes de detecção de MBL descritos na literatura são baseados no reconhecimento imunológico dessa molécula por anticorpos monoclonais ou soros policlonais. Muitos dos experimentos realizados que associam a deficiência de MBL com a susceptibilidade a infecções ou com doenças auto-imunes, como à doença celíaca, empregam testes de ELISA (BONIOTO *et al.*, 2002).

Poucas empresas fornecem kits para a dosagem de MBL, e estes utilizam o imuno-reconhecimento como princípio de detecção. Uma desvantagem desta abordagem está no fato de não se poder determinar a atividade da molécula. Por isto, foram desenvolvidos testes de segunda geração visando determinar a atividade de ativação do complemento pela MBL (LEE *et al.*, 2005). Neste último exemplo, os testes podem apresentar como ligante manana imobilizada em placas de ELISA e a clivagem de C4 ou anticorpos monoclonais (GARRED *et al.*, 2003).

São poucas as referências de testes para avaliação da massa molecular da MBL (LIPSCOMBE *et al.*, 1995; GARRED *et al.*, 2003). A maior dificuldade encontrada é a baixa quantidade de MBL no soro. Lipscombe e colaboradores (1995) propuseram o imunoblotting quimiluminescente para aumentar a sensibilidade e especificidade da determinação da massa molecular da MBL. Ourth e colaboradores (2005) investigando MBL na pupa de *Heliothis virescens* empregaram dot-blot após separação da MBL por cromatografia de afinidade.

Apesar da importância da avaliação do arranjo molecular da MBL, percebe-se na literatura uma lacuna quanto a testes que possam estimar a proporção de formas moleculares de alta massa, ditas funcionalmente mais eficientes do que as moléculas de MBL de baixa massa molecular, que em teoria, não seriam capazes de desempenhar totalmente a atividade de ativação de complemento e opsonização (FREDRIKSEN *et al.*, 2006).

3.4 HEPATITE C E MBL

A hepatite C é caracterizada por uma taxa de 75-85% de progressão a cronicidade após a fase aguda. A infecção pelo vírus da hepatite C (hepatitis C vírus – HCV) é altamente prevalente em algumas áreas da África, Tailândia, China, Vietnã e Indonésia, na Europa central e nordeste, parte dos Estados Unidos, América Central, Nova Zelândia e Ásia (BRASS *et al.*, 2006).

Rotas importantes na transmissão do HCV são através do sangue infectado e o contato prévio com produtos contaminados com sangue, havendo também a transmissão por uso de drogas intravenosas, com riscos menores associados com a exposição perinatal e o contato sexual (SHEPARD *et al.*, 2005; SY & JAMAL, 2006). Diagnósticos sorológicos

envolvem a detecção de anticorpos anti-HCV para as proteínas estruturais e não-estruturais e ensaios moleculares para a detecção do RNA-HCV (BROWN *et al.*, 2007).

O HCV é um vírus envelopado de RNA de cadeia simples, com cerca de 9.400 nucleotídeos, membro da família Flaviviridae, e foi inicialmente descoberto por Choo e colaboradores em 1989. O genoma de 9,4 kb codifica proteínas estrutural e não-estrutural, incluindo proteases virais e glicoproteínas de superfície (THOMSON & FINCH, 2005; BRASS *et al.*, 2006). As glicoproteínas E1 e E2 são expressas como heterodímeros não-covalentes no envelope viral. Ambas contêm glicanos N-ligados (GOFFARD & DUBUISSON, 2003) e constituem alvos em potencial para a interação com a MBL.

O HCV existe com uma variedade de genótipos definidos como grupos filogeneticamente distintos que diferem na distribuição geográfica e epidemiológica e aproximadamente em 30% na sequência do genoma. Os seis genótipos (1-6) são subdivididos em subtipos (a-t) (SIMMONDS *et al.*, 2005). As diferenças entre os genótipos no curso clínico e na associação às doenças têm sido investigadas com achados conflitantes. Há também uma significativa variação entre os genótipos e a resposta ao tratamento. Também parecem influenciar a progressão da doença na infecção pelo HCV o gênero, a etnia, o consumo de álcool, a rota de transmissão, a idade, a duração da infecção e a infecção dupla com HIV (human immunodeficiency virus – vírus da imunodeficiência humana) ou HBV (hepatitis B virus) (CHEN & MORGAN, 2006).

Em termos de infecção viral, a MBL tem sido relatada em participar da resposta imune contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV), Influenza A, Ebola, Marburg, Herpes Simplex Vírus 2 e os vírus da hepatite B e C (HBV e HCV, respectivamente) (KILPATRICK *et al.*, 2003; GADJEVA *et al.* 2004; JI & GEWURZ, 2005; JI *et al.*, 2005; CHONG *et al.*, 2005;). No caso do HBV e do HCV, mutações da MBL têm sido ligadas a progressão da doença e a resposta ao tratamento (BROWN *et al.*, 2007).

Poucos estudos têm avaliado a relação entre o polimorfismo da MBL e a infecção pelo HCV. Estudos realizados em pacientes japoneses descreveram associações entre a mutação e a concentração da MBL, a progressão da doença e a resposta ao tratamento (MATSUSHITA *et al.*, 1998a; MATSUSHITA *et al.*, 1998b; SASAKI *et al.* 2000). Contudo outro estudo, utilizando um coorte europeu, não encontrou correlação entre o genótipo da MBL e a doença pelo HCV (KILPATRICK *et al.*, 2003).

Das três mutações estruturais, somente o polimorfismo no códon 54 (alelo B) foi encontrado no coorte japonês e isto foi positivamente associado com a diminuição dos níveis no soro da MBL, progressão da doença e resposta ao tratamento (MATSUSHITA *et al.*, 1998a, 1998b). Sasaki e colaboradores (2000) encontraram que pacientes homozigotos ou heterozigotos para o alelo B apresentaram reduzidas concentrações da MBL comparados com os homozigotos para o tipo selvagem e a presença de mutação no alelo B aumentou a possibilidade de progressão da hepatite crônica ativa ou cirrose.

No estudo de um coorte europeu, Kilpatrick e colaboradores (2003) inferiram o genótipo da MBL quanto aos níveis de expressão da lectina. Contudo nenhuma relação aparentemente significativa foi observada entre a concentração da MBL e a progressão da doença ou resposta ao tratamento. No entanto, uma tendência dos altos níveis da MBL foi observada em pacientes com HCV comparado aos controles.

Dumestre-Perard e colaboradores (2002) relataram um método para calcular a atividade específica da MBL circulante. Segundo os autores, o interesse na determinação da atividade específica da MBL reside no seu uso potencial para a exploração biológica de certas patologias. Foi sugerido então que a redução da atividade do componente C4 não foi dependente da via clássica, mas da via das lectinas, em virtude das concentrações dos componentes C1q, C4, C3 e MBL estarem próximas do normal e nenhum complexo inibidor C1s-C1 ser detectado. Observou-se também uma diminuição significativa na atividade específica da MBL em pacientes com HCV comparados com os controles saudáveis. Além disso, a atividade específica da MBL medida em não-respondedores ao tratamento com interferon- α foi significativamente mais baixa quando comparado aos respondedores.

Yuen e colaboradores (1999) estudaram a relação entre os níveis da lectina no soro e as mutações no gene da MBL em pacientes chineses assintomáticos com hepatite B e portadores de hepatite C. Segundo os autores, apesar das mutações no gene da MBL não aumentarem a susceptibilidade da persistência da infecção pela hepatite B e hepatite C, não se concluiu se essas infecções virais crônicas afetariam os níveis da MBL. Neste estudo foi encontrado que embora a presença de tais hepatites tenda às baixas concentrações da MBL, a principal causa dos níveis baixos verificados seria resultado da mutação. Considerando os pacientes com as hepatites crônicas B e C e os controles sem mutação, foi observado que os níveis da MBL foram significativamente menores nas hepatites, até mesmo em relação aos

portadores assintomáticos com funcionamento bioquímico do fígado normal ou próximo do normal.

Há duas possíveis explicações para a diminuição nos níveis da MBL em pacientes com hepatite B e hepatite C. A primeira é que ao contrário de uma infecção aguda, a infecção viral crônica pode suprimir a produção protéica não - especificamente. A segunda é baseada em um estudo prévio que tem mostrado que o polimorfismo no gene promotor da MBL (HL, XY) pode explicar os baixos níveis da lectina em indivíduos sem mutações estruturais no gene (Madsen *et al.*, 1995, GARRED *et al.*, 2006).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLACKSTOCK, W.P.; WEIR, M.P. **Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins.** Reviews: TIBTECH., 17: 121-127, 1999.

BONIOTTO, M.; BRAIDA, L.; SPANO, A.; PIRULLI, D.; BALDAS, V.; TREVISIOL, C.; NOT, T.; TOMMASINI, A.; AMOROSO, A.; CROVELLA, S. **Variant mannose-binding lectin alleles are associated with celiac disease.** Immunogenet. 54(8): 596-598, 2002.

BRAGA-NETO, U.M.; MARQUES, E.T. **From functional genomics to functional immunomics: new challenges, old problems, big rewards.** PLoS Comput Biol. 28; 2(7): e81, 2006.

BRASS, V.; MORADPOUR, D.; BLUM, H.E. **Molecular virology of hepatitis C virus (HCV).** Int J Med Sci. 3: 29-34, 2006.

BROWN, K.S.; KEOGH, M.J.; TAGIURI, N.; GRAINGE, M.J.; PRESANIS, J.S.; RYDER, S.D. **Severe fibrosis in hepatitis C virus infected patients is associated with increased activity of the mannan-binding-lectin (MBL)/MBL-associated serine protease 1 (MASP-1) complex.** Clin Exp Immunol. 147: 90-98, 2007.

CAHILL, D.J.; NORDHOOF, E.; O'BRIEN, J.; KLOSE, J.; EICKHOFF, H.; LEHRACH, H. **Bridging genomics and proteomics.** In: PENNINGTON, S.R.; DUNN, M.J (Ed.). Proteomics from protein sequence to function. BIOS Scientific Publishers Limited. p.1-22, 2001.

CHEN, S.L.; MORGAN, T.R. **The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection.** Int J Med Sci. 3: 47-52, 2006.

CHEVALIEZ, S.; PAWLOTSKY, J.M. **Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy.** World J Gastroenterol. 13(17): 2461-2466, 2007.

CHONG, W.P.; TO, Y.F.; IP, W.K.; YUEN, M.F.; POON, T.P.; WONG, W.H. **Mannose-binding lectin in chronic hepatitis B virus infection.** Hepatology. 42: 1037-1045, 2005.

CROSDALE, D.J.; OLLIER, W.E.R.; THOMSON, W.; DYER, P.A.; JENSENIUS, J.C.; JOHNSON, R.W.G.; POULTON, K.V. **Mannose binding lectin (MBL) genotype distributions with relation to serum levels in UK Caucasoids.** Eur J Immunogenet. 27: 111-117, 2000.

DAHL, M.R.; THIEL, S.; MATSUSHITA, M.; FUJITA, T.; WILLIS, A.C.; CHRISTENSEN, T.; VORUP-JENSEN, T.; JENSENIUS, J.C. **MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway.** Immunity. 15: 127-135, 2001.

DEAN, M. M.; HEATLEY, S.; MINCHINTON, R. M. **Heteroligomeric forms of codon 54 mannose binding lectin (MBL) in circulation demonstrate reduced in vitro function.** Mol Immunol, 3: 345-350, 2005.

DEMPSEY, P.W.; ALLISON, M.E.D.; AKKARAJU, S.; GOODNOW, C.C.; FEARON, D.T. **C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity.** Science, 271: 348-350, 1996.

DUMESTRE-PERARD, C.; PONARD, D.; ARLAUD, G.J.; MONNIER, N.; SIM, R.B.; M.G.; COLOMB, M.G. **Evaluation and clinical interest of mannan binding lectin function in human plasma.** Mol Immunol. 39: 465-473, 2002.

FREDERIKSEN, P.D.; THIEL, S.; JENSEN, L.; HANSEN, A.G.; MATTHIESEN, F.; JENSENIUS, J.C. **Quantification of mannan-binding lectin.** J Immunol Met. 31,315(1-2): 49-60, 2006.

GADJEVA, M.; THIEL, S.; JENSENIUS, J.C. **The mannan-binding-lectin pathway of the innate immune response.** Curr Opin Immunol. 13(1): 74-78, 2001.

GADJEVA, M.; PALUDAN, S.R.; THIEL, S.; SLAVOV, V.; RUSEVA, M.; ERIKSSON, K. **Mannan-binding lectin modulates the response to HSV-2 infection.** Clin Exp Immunol. 138: 304-311, 2004.

GARRED, P.; MADSEN, H.O.; KURTZHALS, J.A.; LAMM, L.U.; THIEL, S.; HEY, A.S.; SVEJGAARD, A. **Diallelic polymorphism may explain variations of the blood concentration of mannan-binding protein in Eskimos, but not in black Africans.** Eur J Immunogenet. 19(6): 403-412, 1992.

GARRED, P.; LARSEN, F.; MADSEN, H.O.; KOCH, C. **Mannose-binding lectin deficiency-revisited.** Mol Immunol. 40: 73-84, 2003.

GARRED, P.; LARSEN, F.; SEYFARTH, J.; FUGITA, R.; MANDSEN, O. **Mannose-binding lectin and its genetic variants.** Genes Immunity. 7: 85-94, 2006.

GOFFARD, A., DUBUISSON, J. **Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins.** Biochimie. 85: 295-301, 2003.

GRAVES, P.R.; HAYSTEAD, T.A.J. **Molecular biologist's guide to proteomics.** Microbiol Mol Biol Rev. 66: 39-63, 2002.

HAYNES, P.; YATES, J. R. **Proteome profiling – pitfalls and progress.** Yeast. 17: 81-87, 2000.

HEPCENTRO, http://www.hepcentro.com.br/hepatite_c.htm <fev/2010>.

HOLMSKOV, U.; MALHOTRA, R.; SIM, R.B.; JENSENIUS, J.C. **Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system.** Immunol Today. 15(2): 67-74, 1994.

IOBST, S.T.; WORMALD, M.R.; WEIS, W.I.; DWEK, R.A.; DRICKAMER, K. **Binding of sugar ligands to Ca(2+)-dependent animal lectins. I. Analysis of mannose binding by site-directed mutagenesis and NMR.** J Biol Chem. 3; 269 (22): 15505-15511, 1994.

JI, X.; GEWURZ, H.; SPEAR, G.T. **Mannose binding lectin (MBL) and HIV.** Mol Immunol. 42: 145-152, 2005.

JI, X.; OLINGER, G.G.; ARIS, S.; CHEN, Y.; GEWURZ, H.; SPEAR, G.T. **Mannose-binding lectin binds to Ebola and Marburg envelope glycoproteins, resulting in blocking of virus interaction with DC-SIGN and complement-mediated virus neutralization.** J Gen Virol. 86: 2535-2542, 2005.

KILPATRICK, D.C. **Mannan-binding lectin: clinical significance and applications.** Biochim Biophys Acta. 1572(2-3):401-13, 2002.

KILPATRICK, D.C.; DELAHOOKE, T.E.S.; KOCH, C.; TURNER, M.L.; HAYES, P.C. **Mannan-binding lectin and hepatitis C infection.** Clin Exp Immunol. 132: 92-95, 2003.

KOCH, A.; MELBYE, M.; SORENSEN, P.; HOMOE, P.; MADSEN, H. O.; MOLBAK, K.; HANSEN, C. H., ANDERSEN, L. H.; HAHN, G. W.; GARRED, P. **Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood.** JAMA. 285: 1316-1321, 2001.

KOZUTSUMI, Y.; KAWASAKI, T.; YAMASHINA, I. **Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit serum.** Biochem Biophys Res Commun. 95(2): 658-664, 1980.

LAURSEN, S.B.; HEDEMAND, J.E.; NIELSEN, O.L.; THIEL, S.; KOCH, C.; JENSENIUS, J.C. **Serum levels, ontogeny and heritability of chicken mannan-binding lectin (MBL).** Immunology. 94(4): 587-593, 1998a.

LAURSEN, S.B.; DALGAARD, T.S.; THIEL, S.; LIM, B.L.; JENSEN, T.V.; JUUL-MADSEN, H.R.; TAKAHASHI, A.; HAMANA, T.; KAWAKAMI, M.; JENSENIUS, J.C. **Cloning and sequencing of a cDNA encoding chicken mannan-binding lectin (MBL) and comparison with mammalian analogues.** Immunology. 93(3): 421-430, 1998b.

LEE, S.G.; YUM, J.; MOON, S.H.; KIM, M.H.; YANG, J.Y.; KIM, J.H.; YOON, L.Y.; LEE, S.; SONG, K. **Analysis of mannose-binding lectin 2 (MBL2) genotype and the serum protein levels in the Korean population.** Mol. Immunol. 42: 969-977, 2005.

LIPSCOMBE, R.J.; SUMIYA, M.; HILL, A.V.; LAU, Y.L.; LEVINSKY, R.J.; SUMMERFIELD, J.A.; TURNER, M.W. **High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene.** Hum Mol Genet. 1: 709-715, 1992.

LIPSCOMBE, R.J.; SUMIYA, M.; SUMMERFIELD, J.A.; TURNER, M.W. **Distinct physicochemical characteristics of human mannose binding protein expressed by individuals of differing genotype.** Immunol. 85: 660-667, 1995.

LOPEZ, M.F. **Proteome analysis I. Gene products are where the biological action is.** J Chromatography B. 722: 191-202, 1999.

MADSEN, H.O.; GARRED, P.; KURTZHALS, J.A.L.; LAMM, L.U.; RYDER, L.P.; THIEL, S.; SVEJGAARD, A. **A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding lectin.** Immunogenet. 40: 37-44, 1994.

MADSEN, H.O.; GARRED, P.; THIEL, S.; KURTZHALS, J.A.L.; LAMM, L.U.; RYDER, L.P.; SVEJGAARD, A. **Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein.** J Immunol. 155: 3013-3020, 1995.

MADSEN, H.O.; SATZ, M.L.; HOGH, B.; SVEJGAARD, A.; GARRED, P. **Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America.** J Immunol. 161: 3169-3175, 1998.

MALHOTRA, R.; SIM, R.B. **Collectins and viral infections.** Trends Microbiol. 3: 240-244, 1995.

- MATSUSHITA, M.; HIJIKATA, M.; OHTA, Y. **Hepatitis C virus infection and mutations of mannose-binding lectin gene *MBL***. Arch Virol. 143: 645-651, 1998a.
- MATSUSHITA, M.; HIJIKATA, M.; MATSUSHITA, M.; OHTA, Y.; MISHIRO, S. **Association of mannose-binding lectin gene haplotype LXPA and LYPB with interferon-resistant hepatitis C infection in Japanese patients**. J Hepatol. 29: 695-700, 1998b.
- MATSUSHITA, M.; THIEL, S.; JENSENIUS, J.C.; TERA, I.; FUJITA, T. **Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease**. J Immunol 165: 2637-2642, 2000.
- MATSUSHITA, M.; FUJITA, T.; DAHA, M.R. **Antibody-mediated activation of the classical pathway of complement may compensate for mannose binding lectin deficiency**. Eur J Immunol. 34: 2589-2598, 2004.
- MINCHINTON, R.M.; DEAN, M.M.; CLARK, T.R.; HEATLEY, S.; MULLIGHAN, C.G. **Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population**. Scand J Immunol. 56 (6): 630-641, 2002.
- MIZUNO, Y.; KOZUTSUMI, Y.; KAWASAKI, T.; YAMASHINA, I. **Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rat liver**. J Biol Chem. 10; 256 (9): 4247-4252, 1981.
- OURTH D.D.; NARRA M.B.; CHUNG K.T. **Isolation of mannose-binding C-type lectin from *Heliothis virescens* pupae**. Biochem Biophys Res Commun. 335(4): 1085-1089, 2005.
- PANDEY, A.; MANN, M. **Proteomics to study genes and genomes**. Nature. 405: 837-846, 2000.
- PETERSLUND, N.A.; KOCH, C.; JENSENIUS, J.C.; THIEL, S. **Association between deficiency of mannose-binding lectin and severe infections after chemotherapy**. Lancet. 358(9282): 598-599, 2001.

- PETROVSKY N. **Immunome research**. Immunome Res. 20 (1): 134-139, 2005.
- PRESANIS, J. S; KOJIMA, M.; SIM, R.B. **Biochemistry and genetics of mannan-binding lectin (MBL)**. Biochem Soc Transac. 31(4): 167-174, 2003.
- ROOS, A.; GARRED, P.; WILDENBERG, M.E.; LYNCH, N.J.; MUNOZ, J.R.; ZUIVERLOON, T.C.; BOUWMAN, L.H.; SCHLAGWEIN, N.; FALLAUX VAN DEN HOUTEN, F.C.; FABER-KROL, M.C.; MADSEN, H.O.; SCHWAEBLE, W.J.; MATSUSHITA, M.; FUJITA, T.; DAHA, M.R. **Antibody-mediated activation of the classical pathway of complement may compensate for mannose binding lectin deficiency**. Eur J Immunol. 34: 2589-2598, 2004.
- SASAKI, K.; TSUTSUMI, A.; WAKAMIYA, N. **Mannose-binding lectin polymorphisms in patients with hepatitis C virus infection**. Scand J Gastroenterol. 35: 960-965, 2000.
- SASTRY, K.; ZAHEDI, K.; LELIAS, J.M.; WHITEHEAD, A.S.; EZEKOWITZ, R.A. **Molecular characterization of the mouse mannose-binding proteins. The mannose-binding protein A but not C is an acute phase reactant**. J Immunol. 147(2): 692-697, 1991.
- SEGAT, L.; SILVA-VASCONCELOS, L. R.; MONTENEGRO DE MELO, F.; SANTOS-SILVA, B.; ARRAES, L.C.; MOURA, P.; CROVELLA, S. **Association of polymorphisms in the first exon of mannose binding lectin gene (MBL2) in Brazilian patients with HCV infection**. Clin Immunol. 124(1): 13-17, 2007.
- SELANDER, B.; MARTENSSON, U.; WEINTRAUB, A.; HOLMSTROM, E.; MATSUSHITA, M.; THIEL, S.; JENSENIUS, J.C.; TRUEDSSON, L.; SJOHOLM, A.G. **Mannan-binding lectin activates C3 and the alternative complement pathway without involvement of C2**. J Clin Invest. 116(5): 1425-1434, 2006.
- SHEPARD, C.W.; FINELLI, L.; ALTER, M.J. **Global epidemiology of hepatitis C virus infection**. Lancet Infect Dis. 5: 558-567, 2005.

- SIMMONDS, P.; BUKH, J.; COMBET, C.; DELEAGE, G.; ENOMOTO, N.; FEINSTONE, S. **Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes.** Hepatology. 42: 962-973, 2005.
- SUPER, M.; THIEL, S.; LU, J.; LEVINSKY, R.J.; TURNER, M.W. **Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation.** Lancet. 25, 2: 1236-1239, 1989.
- SY, T.; JAMAL, M.M. **Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection.** Int J Med Sci. 3: 41-46, 2006.
- TERAI, I.; KOBAYASHI, K. **Perinatal changes in serum mannose-binding protein (MBP) levels.** Immunol Let. 3(38): 185-187, 2003.
- THIEL, S.; FREDERIKSEN, P.D.; JENSENIUS, J.C. **Clinical manifestations of mannan-binding lectin deficiency.** Mol Immunol. 43(1-2): 86-96, 2006.
- THOMSON, B.J.; FINCH, R.G. **Hepatitis C virus infection.** Clin Microbiol Infect. 11: 86-94, 2005.
- TURNER, M.W. **Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system.** Immunol Today. 17 (11): 532-540, 1996.
- TURNER, M. W. **The role of mannose-binding lectin in health and disease.** Mol Immunol. 40: 423-429, 2003.
- VAN DE WETERING, J.K.; VAN GOLDE, L.M.G.; BATENBURG, J.J. **Collectins. Players of the innate immune system.** Eur J Biochem. 271: 1229-1249, 2004.
- WILD, J.; ROBINSON, D.; WINCHESTER, B. **Isolation of mannose-binding proteins from human and rat liver.** Biochem J. 210(1): 167-174, 1983.

YOKOTA, Y.; ARAI, T.; KAWASAKI, T. **Oligomeric structures required for complement activation of serum mannan-binding proteins.** J Biochem. (Tokyo) 117: 414-419, 1995.

YUEN, M.F.; LAU, C.S.; LAU, Y.L.; WONG, W.M.; CHENG, C.C.; LAI, C.L. **Mannose binding lectin gene mutations are associated with progression of liver disease in chronic hepatitis B infection.** Hepatology. 29: 1248-1251, 1999.

ZHANG, Y.; SUANKRATAY, C.; ZHANG, X.; JONES, D.R.; LINT, T.F.; GEWURZ, H. **Calcium-independent haemolysis via the lectin pathway of complement activation in the guinea-pig and other species.** Immunol. 97(4): 686-692, 1999.

5 ARTIGO CIENTÍFICO I

NEW TECHNIQUE APPLIED TO DETECTION AND QUANTIFICATION OF MBL

Artigo a ser submetido ao **Biotechnology Letters**

NEW TECHNIQUE APPLIED TO DETECTION AND QUANTIFICATION OF MBL

Diego A. P. de Albuquerque^{a,c}; Igor T. Cavalcanti^{a,c}; Patrícia Moura^c; Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão^{a,b}; Luiz Bezerra de Carvalho Júnior^{a,b*}.

^aImunopathology Keizo Asami Laboratory (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil; ^bDepartment of Biochemistry, Biological Sciences Centre, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil; ^cMolecular Biology of Virus Laboratory, Biological Sciences Institute, University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil;

***Corresponding author:** Luiz Bezerra de Carvalho Júnior. LIKA – UFPE. Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, Recife, Pernambuco, Brazil. 50670-901. Telephone: + 55 81 21012504. Fax: + 55 81 21012508. E-mail: lbcj@hotmail.com.br

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; CRD, carbohydrate recognition domain; DAB, Diaminobenzidine; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; GlcNAc, N-acetyl-D-glucosamine; HCV, hepatitis C virus; MASPs, serine-proteases associated proteins; Man, mannose; MBL, mannan-binding lectin; MM, molecular mass; PBS, phosphate buffered saline; Rc, recombinant; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis; SNPs, single nucleotide polymorphisms; TBS, tris-buffered saline.

ABSTRACT

Low levels of MBL have been linked with susceptibility to several infectious diseases. Different assays used to MBL determination haven't been able to identify widely its molecular forms in the circulation. This work evaluated the molecular profile of MBL in serum of hepatitis C patients using lectin separation assay in microplates with nitrocellulose discs followed by immunorecognition and SDS-PAGE (reducing and non-reducing) and Western blot analysis. Results showed that the purification assay was efficient for MBL and the further MBL identification was confirmed to all genotypes. The results suggest a simple and low cost separation method for MBL.

Keywords: MBL, dot-N-Man, HCV.

INTRODUCTION

Currently in experiments conducted with MBL, quantitative analysis is considered something relatively simple, because there are many commercial ELISA kits. Thiel *et al.* (2002) established an in-house test to detect the MBL and compare their results with commercial kits, where noted that all worked satisfactorily.

The MBL was first isolated from human serum in 1983 by affinity chromatography, using a column of Sepharose-mannan (Mannan coupled with a Sepharose matrix) in the presence of calcium ions but it was Laursen (2003) exposed the importance of the MBL purification for medicinal use such as in treatment or prevention of infections in patients with deficiencies of MBL associated with clinical symptoms. Tests carried out by Garred *et al* (2003) and Terai *et al* (2003) have detected forms of low molecular weight of MBL. They indicated three elution pattern types: the type 1 high molecular mass with mannan connection capacity and formation of complex with MASP, the type 2 low molecular weight and without these capabilities and type 3 both forms, corresponding respectively to wild type (AA), a mutation homozygous in codon 54 (b/b) and a heterozygous (a/b).

The analysis by immunoblotting of the MBL oligomers in human plasma, combined with the quantification assay (ELISA) and functional testing of lectin (C4 deposition) allows a better understanding of native structure and the functions associated with the MBL rolling stock. Visible differences were observed in the patterns of immunoblotting between individuals of different genotypes, particularly between A/A individuals and those who tabled the A/C and 0/0 (Dean *et al*, 2005). In these individuals plasma the standard oligomers of MBL changed of single band of 88 kDa, corresponding to structural unit, at the shapes that have a pattern corresponding to the wild type.

Despite numerous studies about the structure of MBL in human plasma, the relationship between the oligomeric structure of the protein expressed by individuals with mutations, and its ability to opsonization and ability to activated the supplement system in human seems has not been fully investigated. This article aims to present a Dot-N-Man methodology for the detection of MBL in patients of HCV.

MATERIALS E METHODS

Samples: Thirty HCV-positive patients' serum samples were genotyped in the Molecular Biology of Viruses Laboratory at the Pernambuco State University. Experiments were approved by the Ethic Committee of the Oswaldo Cruz University Hospital, UPE (No. 021/05).

Dot N-man: This method was modified from the method described by Rogan *et al* (1991) and Romia *et al* (1992). Nitrocellulose membranes (Hybond C, Amersham Pharmacia Biotech.) were cut with paper puncher (disc forms) and put into holes of a microplate (Maxi Sorp, Nunc, Denmark). Mannan solution (300mM/mL; Sigma, St. Louis, USA) in tris-buffered saline solution (TBS) with Tween-20 (100mM, pH 7.4) was added to the membranes and allowed to dry at 25°C. After washes with TBS-Tween 20, membranes were incubated with albumin solution (50mg/mL; BSA, Sigma Chemical Co.) for 1h at 25°C. Six washes with TBS-Tween 20 were done and blood samples (1:2) in TBS-Ca⁺⁺ (140 mM NaCl, 20 mM Tris, 5 mM CaCl₂, pH 7.4) were incubated overnight at 4°C. Membranes were washed with TBS-Tween 20 and MBL elution was performed with a solution of 1M NaCl or mannan solution (varying from 300mM to 600mM) in TBS. Samples with the same genotype were pooled, lyophilized and stored at -20°C until use.

SDS-PAGE: Experiments were carried out according to Laemmli (1970). MBL samples were dissolved in sample buffer (Tris-HCl, pH 6.8; 20% glycerol; 4% SDS; 2% Bromophenol Blue, 5% beta-mercaptoethanol), warmed up to 100° C in water bath for 5 minutes and run on a discontinuous gels SDS-PAGE system with 4% stacking gel and 10% separating gel at 75 V and 40 mA. Sigma Molecular Weight Marker kit (St. Louis, USA) broad range (30-200 kDa) was used for size determination. Bands were visualized with Commassie solution or silver staining.

Western blot: SDS-PAGE MBL bands were transferred to nitrocellulose membranes. After that membranes were incubated with phosphate buffered saline solution (PBS; 0.01M, pH 7.2) supplemented with skimmed milk solution (5%) for 90 minutes at 25°C under gentle stirring. Three PBS-Tween 20 (0.05%) washes were developed for 10 minutes each. MBL was immune recognized with primary antibody, 1:100 (rabbit anti-MBL polyclonal serum; AntibodyShop, Copenhagen, Denmark) was incubated for 16 h at 4° C followed by the secondary antibody, 1:5000 (IgG anti-rabbit conjugated to peroxidase, Sigma, St. Louis, USA) for 1 h at 25°C. Diaminobenzidine (DAB)-H₂O₂ (10mg + 1μL) were used to reveal the immunological reaction.

RESULTS

The MBL separation protocol from human serum, called dot-N-man, showed to be efficient. The method was able to rescue the lectin in sera via binding to immobilized mannan. MBL recovered was SDS-PAGE separated and stained with Coomassie Blue or silver stainings. The silver staining was chosen due to its high sensitivity. These best conditions for MBL separation using dot-N-man are detailed in Table 1.

Table 1: Optimal conditions for MBL separation using dot-N-man

Parameter	Concentration	Time and/or Temperature
Nitrocellulose membrane sensitization	50µL of mannan (300 mg/mL) per plate well	12h
Albumin Incubation	50 mg/mL in TBS-T	1h/25°C
Serum Incubation	100µL (1:2) per well in TBS-Ca ⁺⁺	12h/4°C
MBL elution	500mM mannan solution in TBS	3 washes of 15min each

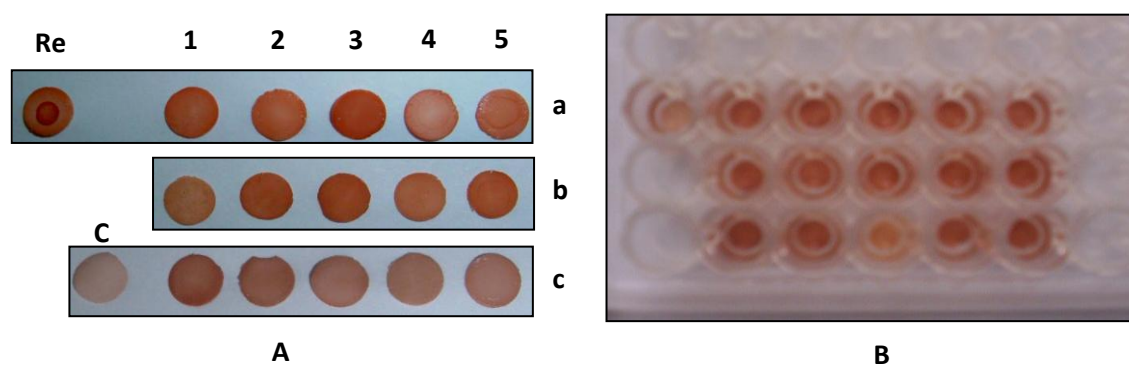


Figure 1: Immune recognition by dot-blot assay on nitrocellulose membranes using anti-MBL polyclonal antibody. A: letters **a**, **b** and **c** represents the genotypes AA, AO and OO of sera samples of HCV patients, respectively. The negative control is designed as **C**. Positive control was the recombinant MBL designed as **Re**. B: microplate view with nitrocellulose membranes during MBL immune recognition.

SDS-PAGE revealed differences among the three genotypes (AA, A0 e 00) regarding MBL molecular masses (MM) (Figure 2). In genotype AA samples bands of 180 kDa, 88, 66, 55 kDa were observed, equivalent to trimeric, dimeric and monomeric forms of lectin. For A0 genotype samples 180 and 88 kDa were expressed in a very low content whereas 55 and 66 kDa had a profile close to the AA genotype. In genotype OO the high and intermediate MM bands, 180 and 88 kDa, respectively, were weak, virtually absent in samples studied.

Western blotting of protein bands separated in electrophoresis using anti-MBL antibody revealed a band of 25 kDa in samples of wild type genotype (AA) besides the ones already observed in SDS-PAGE (Figure 3).

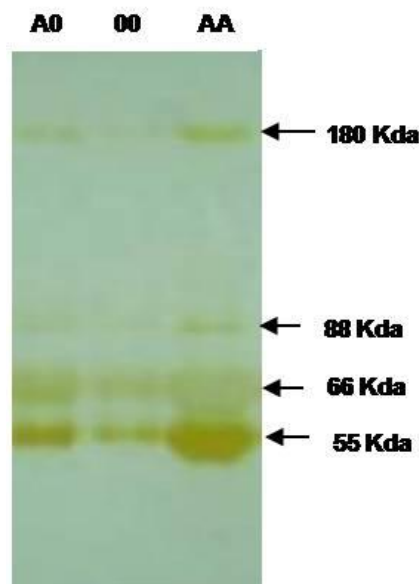


Figure 2: MBL profile for the three genotypes of patients diagnosed with HCV.

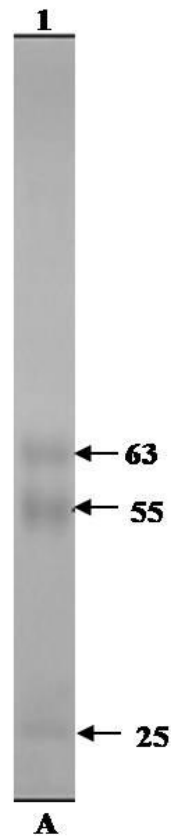


Figure 3. Molecular forms of MBL identified by antibody immune recognition. **(A)** SDS-PAGE under reducing conditions and detected by immunoblot of wild-type (AA) samples after purification assay. It was visualized a weak band of 25 kDa.

DISCUSSION

Comparing the method proposed (dot-N-man) with conventional methods to separate and purify proteins our protocol shows some limitations like as yield and reuse of separation matrix. This method has proved to be effective in separating molecular forms of MBL from HCV patients' sera. However, western blotting did not recognize the high MM band of 180 kDa found in SDS-PAGE.

The dot-N-man method consisted in a nitrocellulose membrane cut in circles of 6 mm in diameter and placed into wells of an ELISA plate. The quantity of mannan for immobilization that yielded the best MBL separation from serum samples was 300 mg/mL. Western blotting of MBL eluates confirmed multiforms of the MBL. It was observed distinct

profiles for its molecular masses in the three genotypes studied. A clear difference was noticed in individuals with AA genotype in comparison to those with 00 homozygous variant genotype, presence and absence of 25 kDa band, respectively. Nevertheless, there was considerable variation in the profiles of the heterozygous individuals (A0 genotype).

For heterozygous patients is observed MBL of low molecular masses. High molecular masses MBL forms are observed in very low quantities resembling those observed in AA genotype (Lipscombe *et al.*, 1995; Garred *et al.*, 2003; Terai *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005). For heterozygous individuals MBL plasmatic level can be found 100 times lower than in wild genotype. In mutant homozygous MBL plasmatic level is quite undetectable (Crosdale *et al.*, 2000).

A key point in MBL studies is the presence of many heteroligomeric forms in human blood circulation which can form dimers to tetramers (Turner, 1996). This oligomerization pattern can be more complex when the allelic variants were also considered. Yokota *et al.* (1995) observed that, in humans and rabbits, trimers, tetramers and pentamers were the main MBL forms and that the last two exhibit complement activation action.

The profile of bands visualized in our study is in accordance with other researches (Garred *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005). Mannan-Sepharose resin was used by Lee *et al.* (2005) to purify human serum MBL they have shown by immunoblot that native MBL molecule presents bands raging from 50 to over 200 kDa and the molecular mass varies according to genotypes. SDS-PAGE and immunoblot profile in reducing conditions for AA genotype revealed bands of 55 and 66 kDa, which were also the predominant bands observed in native SDS-PAGE profile, suggesting that the dot-N-man was able to partially purify the MBL from the patients' serum.

Our results indicated that both, low and high molecular forms, were identified and that also varied with genotyping for MBL. For the samples studied we visualized the incomplete forms of MBL. These variant forms can be related to the instability of the molecule and to the purification process as well as to the electrophoresis preparation. The detection of heteroligomeric forms of MBL in our study can be associated to the chronic condition of the patients (hepatic lesion and intense inflammatory activity). Similar results were observed by Dumestre-Perard (2002) in chronic hepatitis C patients.

Considering that the deficiency of MBL can be associated with pathologies (Presanis *et al*, 2003), detection of oligomeric forms of lectin it's an important tool for the study of MBL biological role in susceptibility and related disease progression.

The approach presented in this work for MBL purification from serum samples is a simple and efficient method for viewing the molecular forms of MBL. The resulted MBL profile can be employed as a complementing analysis for the screening of MBL.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors thank to the Unidade Gastrohepatologica of Hospital Universitário Oswaldo Cruz (UPE) for blood sampling of HCV patients and for CNPq and FACEPE for financial support.

REFERENCES

- Crosdale, D.J.; Ollier, W.E.R.; Thomson, W.; Dyer, P.A.; Jensenius, J.C.; Johnson, R.W.G.; Poulton, K.V., 2000. Mannose binding lectin (MBL) genotype distributions with relation to serum levels in UK Caucasoids. *Eur. J. Immunogenet.* 27, 111–117.
- Dean, M. M., Heatley, S., Minchinton, R. M., 2005. Heteroligomeric forms of codon 54 mannose binding lectin (MBL) in circulation demonstrate reduced in vitro function. *Molecular Immunology*. 43 (7): 950-961.
- Dumestre-Perard, C., Ponard, D., Arlaud, G.J., Monnier, N., Sim, R.B., M.G. Colomb, M.G., 2002. Evaluation and clinical interest of mannan binding lectin function in human plasma. *Molecular Immunology*. 39:465–473.
- Garred, P.; Larsen, F.; Madsen, H.O.; Koch, C., 2003. Mannose-binding lectin deficiency-revisited. *Mol. Immunol.* 40: 73–84.
- Laemmli, U.K., Favre, M., 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J. Mol. Biol.* 80: 575–599.
- Laursen, I. 2003. Mannan-binding lectin (MBL) production from human plasma. *Biochemical Society Transactions*. 31: part 4.
- Lee, S.G., Yum, J., Moon, S.H., Kim, M.H., Yang, J.Y., Kim, J.H., Yoon, L.Y., Lee, S., Song, K., 2005. Analysis of mannose-binding lectin 2 (MBL2) genotype and the serum protein levels in the Korean population. *Molec. Immunol.* 42: 969–977.

Lipscombe, R. J., Sumiya, M., Summerfield, J. A., Turner, M. W., 1995. Distinct physicochemical characteristics of human mannose binding protein expressed by individuals of differing genotype. *Immunology* 85, 660-667.

Presanis, J. S; Kojima, M.; Sim, R.B., 2003. Biochemistry and genetics of mannan-binding lectin (MBL). *Biochemical Society Transactions*; 31: part 4.

Rogan, M.T., Craig, P.S., Zeyhle, E., Romig, T., Lubano, G.M., Deshan, L., 1991. Evaluation of a rapid dot-ELISA as a field test for the diagnosis of cystic hydatid disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 85(6), 773-777.

Romia, S.A., Youssef, M.E., Handoussa, A.E., Rizk, H.M., Sallam, S.M., 1992. Dot-ELISA as a diagnostic test in hydatid disease. *J Egypt Soc Parasitol.* 22(3), 603-610.

Terai, I.; Kobayashi, K.; Matsushita, M.; Miyakawa, H.; Mafune, N.; Kikuta, H., 2003. Relationship between gene polymorphisms of mannose-binding lectin (MBL) and two molecular forms of MBL. *Eur. J. Immunol.* 33: 2755–2763.

Thiel, S., Moller-Kristensen, M., Jensen, L., Jensenius J.C., 2002. Assays for the functional activity of the mannan-binding lectin pathway of complement activation. *Immunobiology.* 205(4-5): 446-454.

Turner, M.W., 1996. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today.* 17 (11): 532-40.

Yokota, Y., Arai, T., Kawasaki, T., 1995. Oligomeric structures required for complement activation of serum mannan-binding proteins. *J. Biochem. (Tokyo)* 117, 414-419.

6 ARTIGO CIENTÍFICO II

**PURIFICATION AND MOLECULAR MASS PROFILE OF MANNAN-BINDING
LECTIN IN HEPATITIS C PATIENTS**

Artigo submetido ao **European Journal of Cell Biology**

**PURIFICATION AND MOLECULAR MASS PROFILE OF MANNAN-BINDING
LECTIN IN HEPATITIS C PATIENTS**

Diego A. P. de Albuquerque ^{a,c}; Igor T. Cavalcanti ^{a,c}; Luydson Richardson Silva Vasconcelos^c, Francisco Montenegro^c; Leila Maria Moreira Beltrão Pereira^d; Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti^c; Patrícia Moura^c; Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão ^{a,b}; Luiz Bezerra de Carvalho Júnior^{a,b*}.

^aKeizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil; ^bDepartment of Biochemistry, Biological Sciences Centre, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil; ^cLaboratory of Molecular Biology of Virus, Biological Sciences Institute, University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil; ^dLiver Institute of Pernambuco - IFP, Medical Sciences Faculty, University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

***Corresponding author:** Luiz Bezerra de Carvalho Júnior. LIKA – UFPE. Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, Recife, Pernambuco, Brazil. 50670-901. Telephone: + 55 81 21012504. Fax: + 55 81 21012508. E-mail: lbcj@hotmail.com.br

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; CRD, carbohydrate recognition domain; DAB, Diaminobenzidine; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; GlcNAc, N-acetyl-D-glucosamine; HCV, hepatitis C virus; MASPs, serine-proteases associated proteins; Man, mannose; MBL, mannan-binding lectin; MM, molecular mass; PBS, phosphate buffered saline; Rc, recombinant; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis; SNPs, single nucleotide polymorphisms; TBS, tris-buffered saline.

ABSTRACT

Mannose-binding lectin (MBL) recognizes carbohydrates via activation of the complement system and modulation of cytokine production by monocytes. Heterogeneity in molecular masses of MBL is due to the impairment of oligomers formation, which is linked to genetic polymorphisms on the exon 1 of the *MBL2* gene. Individuals with genotype AA (wild type) produce high molecular mass (HMM) proteins whereas A0 and 00 ones produce intermediate (IMM) and low molecular mass (LMM) proteins. To get insight to the heterogeneous molecular mass profile of MBL, thirty Hepatitis C Virus (HCV) patients' sera were investigated using a MBL binding assay with mannan-coated nitrocellulose (dot-N-Man). MBL obtained were evaluated by SDS-PAGE and western blotting. The molecules obtained via dot-N-Man assay showed a molecular mass profile associated to MBL after reducing and non-reducing SDS-PAGE. The molecular masses ranged from 25-270 kDa, comparable to low and high molecular mass forms of MBL. Non-reducing SDS-PAGE showed high molecular mass bands in all AA individuals while bands of 270 and 205 kDa were observed in sera of 5 out of 20 patients with A0 and 00 genotypes. The immunoblotting confirmed the MBL samples obtained from the dot-N-Man.

Keywords: MBL, dot-N-Man, HCV.

INTRODUCTION

The immune innate response is a critical determinant of organism susceptibility to infection. This is particularly important when the adaptative immunity is immature or compromised. Mannan-binding lectin (MBL) is a multimeric molecule and an important component of innate immunity which binds pathogens and activates the complement system independently of antibody. Recent studies have shown that the lectin pathway has the potential to generate four times more C3/C5 convertases than the classical pathway and hence the production of pro-inflammatory products C3a, C4a, and C5a required for mounting an effective innate immune response to infections is observed (Rawal *et al.*, 2008). MBL recognizes mannose and N-Acetylglucosamine (GlcNAc) residues, arranged in high density on the surface of bacteria, yeast, protozoans, parasites and virus, but not the normal mammalian cells (Minchinton *et al.*, 2002, Thiel *et al.*, 2006). The binding leads to the change of structure and conformation of MBL, which activates serine-proteases associated proteins (MASPs) and initiates the complement cascade (Petersen *et al.*, 2001).

The *MBL2* is primarily expressed in the liver (Garred *et al.*, 2009), the gene encodes for a 32 kDa protein chain. Three chains form a structural subunit of 96 kDa alfa-helical molecule, consisting of a homopolymer. This structural subunit is stabilized by disulfide linkages through cysteine-rich residues on the N-terminal region. MBL presents a collagen region where the MASPs bind and each chain shows a carbohydrate recognition domain (CRD) on the C-terminal region. MBL is found in different molecular forms in circulation, including single structural units, dimers, trimers and tetramers (Kilpatrick, 2003). The capacity of binding to sugars residues is highly dependent of its oligomerization state. Two or three subunits assemble to form dimmers and trimers respectively, leading to the phagocytosis of the pathogen (Cedzynski, M. *et al.*, 2004). On the other hand MBL high molecular mass forms is ables to form complexes with MASPs and, therefore, activate the complement system, enhancing the inflammatory process (Minchinton *et al.*, 2002; Garred *et al.*, 2003).

MBL levels in serum as well as its functional activity have been linked to common genetic variants in the *MBL2* gene. Three polymorphisms in the exon 1 affect the collagen region of MBL and give rise to allelic variants B, C and D (Lipscombe *et al.*, 1995, Teillet *et*

al., 2005). While A means wild type allele, B, C and D are related with the structural mutations in codons 54, 57 and 52, respectively (Rema, *et al.*, 2009). Proteins presenting these genetic polymorphisms show impaired binding to specific oligosaccharides and diminished ability to MASPs association (Petersen *et al.*, 2001). Besides the B, C and D structural polymorphisms, single nucleotide polymorphism (SNP) at promoter region has been described (Best, *et al.*, 2009). These SNPs correspond to H/Y, X/Y and P/Q alleles in -550, -221 and +4 gene positions. The three loci are closely related and four promoter haplotypes (LXP, LYP, LYQ e HYP) are commonly found (Madsen *et al.*, 1998; Turner, 2003, Terai *et al.*, 2003). In particular, codon 54 mutation of the MBL gene is associated with recurrent infections and autoimmune diseases (Tsutsumi *et al.*, 2005; Mok *et al.*, 2007; Gorgi *et al.*, 2009). In attempt to elucidate the relation between levels, function and MBL genotype many authors have used different approaches. The most common assay for quantify MBL is the ELISA. Mannan binding and C4 deposition assays have also been used for evaluation of functional activity of MBL and complement activation *in vitro* (Holmskov *et al.*, 2003; Minchinton *et al.*, 2002; Garred *et al.*, 2003; Dean *et al.*, 2005).

In the present study Hepatitis C virus sera were used and MBL molecules were screened regarding their molecular masses attempting to associate their molecular profile regarding the polymorphism in the exon 1 of the MBL2 gene.

EXPERIMENTAL

Patient's Samples: Thirty chronic patients positive for Hepatitis C virus (HCV) were genotyped for MBL2 polymorphism at the exon 1 region, previously to experimentation according to Segat et al., 2007, where peripheral blood DNA was extracted and MBL2 was genotyped and classified as AA, wild type (n = 10); A0, mutant type (n = 10); 00, mutant type (n = 10).

Dot-N-man: This method was modified from Rogan et al. (1991) and Romia et al. (1992). Nitrocellulose membranes (Hybond C, Amersham Pharmacia Biotech, USA) were cut with paper puncher (6 mm discs) and placed in a 96 wells microplates – one at each (Maxi Sorp, Nunc, Denmark). Mannan solution (300mMg/mL; Sigma Chemical Company, USA) in 100 mM tris-buffered saline solution, pH 7.4 with 100mM Tween 20, pH 7.4 (TTBS), was added to the membranes and allowed to dry at 25°C. After 3 washes with TTBS, membranes were incubated with albumin solution (50mg/mL; BSA, Sigma Chemical Company, USA) for 1h at 25°C. Six washes with TTBS were done and after that serum samples (1:20) in TBS-Ca⁺⁺ (140 mM NaCl, 20 mM Tris, 5 mM CaCl₂, pH 7.4) were incubated overnight at 4°C. Membranes were then washed 3 times with TTBS. MBL was recovered from membranes using 1M NaCl solution or mannose solution (concentration varying from 300 mM to 600 mM). Recovered MBL molecules were pooled, lyophilized and stored at -20°C until use.

Dot-blot: lyophilized MBL was resuspended in TBS (30 µg/µL) and 30 µL were added to 6 mm discs of nitrocellulose for immobilization by air drying. Membranes were then incubated with 100 µL of 5% BSA for 1 h at 25°. Discs were washed 6 times with TTBS and IgG anti-MBL rabbit antibody (1:300) was added and incubated overnight at 4°C. TTBS washes (3 times) were performed and IgG anti-rabbit conjugated to peroxidase (Sigma, USA) was incubated for 1h at 25°C under gentle stirring. Diaminobenzidine (DAB)-H₂O₂ (10 mg/mL in TBS) was used as peroxidase substrate.

SDS-PAGE: Experiments were carried out according to Laemmli (1970). Lyophilized MBL was resuspended (5µg in 20 µL) in sample buffer (Tris-HCl, pH 6.8; 20% glycerol; 4% SDS; 2% Bromophenol Blue, 5% β-mercaptoethanol), warmed up to 100° C in water bath for 5min and run on discontinuous gels in a SDS-PAGE system (4% stacking gel and 10% separating gel) at 75 V and 40 mA. Molecular Mass marker kit, ranging 30-200 kDa (Sigma, USA) was used. Bands were visualized with Commassie solution and silver staining.

Western blotting: SDS-PAGE bands were transferred to nitrocellulose membranes and incubated with TTBS supplemented with 5% skimmed milk solution for 90 minutes at 25°C under gentle stirring. After three TTBS washes (10 min each) primary antibody (1:100 – rabbit anti-MBL polyclonal serum – Antibody Shop, Denmark) was incubated overnight at 4° C followed by the secondary antibody (1:5000 -IgG anti-rabbit conjugated to peroxidase - Sigma, USA) for 1 h at 25°C. Diaminobenzidine (DAB)-H₂O₂ (10 mg/mL in PBS-T) were used as peroxidase substrate.

Ethical Clearance: the project was approved by the Ethic Committee of the Oswaldo Cruz University Hospital at the University of Pernambuco (UPE), Northeast Brazil (n° UPE/021/05 in 11/05/2005). Blood sample donors agreed in participating the project via a written consent.

RESULTS AND DISCUSSION

The present study used dot-N-man for MBL purification from total blood samples of HCV patients. The assay was carried out using mannan immobilized onto nitrocellulose membrane. MBL was investigated in three genotypes (AA, A0 and 00).

The separation yield of bound mannan-ligant MBL was of 4 to 8% (6% - average value) of the total blood sample (approximately 2 mg/mL). MBL specific recognition was detected and confirmed by dot-blot and western blotting.

MBL SDS-PAGE revealed differences among the three genotypes (AA, A0 e 00). AA individuals presented high molecular forms (180 kDa) as well as molecular forms of 55 to 95 kDa (Figure 1A). Low molecular form of 37 kDa related to the structural subunit of MBL, was not observed in SDS-PAGE, except for one sample of AA (Figure 1A, lane 1).

Three out of ten A0 individuals presented an electrophoresis profile similar to the wild genotype (Figure 1B, lanes 1 and 2). Bands of 55-66 kDa were observed in 00 samples but it was not observed high molecular forms or structural subunit bands (Figure 1C). Recombinant MBL was presented as one band of 55 kDa (Figure 1D, line 1) which indicates that MBL molecules separated by dot-N-man could have undergone structural alterations.

AA individuals presented high molecular forms of 97, 205, 214 and 270 kDa, where the last one is equivalent to the oligomer formed by three monomers of the lectin (Figure 2A). The structural unit of 88 kDa was absent in samples but in lane one (Figure 2A, line 1) where bands of 37 kDa and 25 kDa were also observed. In A0 and 00 individuals it was observed bands of 205, 66 and 55 kDa (Figures 2B, 2C).

Western blotting from reducing gel for AA samples revealed bands of 63 kDa, 55 kDa and 180 kDa bands.

Molecular mass analysis of human serum MBL can bring light to how this lectin functions in homeostasis and pathology. SDS-PAGE and western blotting of MBL samples showed distinct profiles for its molecular masses in the three genotypes studied. A clear difference was observed in individuals with AA genotype in comparison to the 00 homozygous variant genotype. Nevertheless, there was a considerable variation in the profiles of the heterozygous individuals (A0 genotype).

A key point in MBL studies is the presence of many heterologous forms in human blood circulation which can form dimers to tetramers (Rajagopalan et al., 2009). This oligomerization pattern can be more complex when the allelic variants are also considered. Yokota et al. (1995) observed that, in humans and rabbits, trimers, tetramers and pentamers were the main MBL forms and that the last two exhibit complement activation action.

Population specific and non-homeostatic differences in MBL molecular mass profile were also observed by other researches (Garred et al., 2006; Lee et al., 2005). For the Korean samples Lee et al. (2005) observed that native MBL molecule presents bands ranging from 50 to over 200 kDa and the molecular mass varies according to genotypes. In the present work we analyzed MBL from HVC patients in both native and reducing conditions. Under reducing conditions AA genotype MBL revealed bands of 55, 66 and 95 kDa. Under non-reducing conditions AA patients presented a broad range of bands were observed between 55 and 270 kDa in contrast to patients with A0/00 genotypes where a 205 kDa band was the main one. Such observation may be explained due to the purification process or to the great diversity of oligoforms of MBL in patients presenting wild genotype. In western blotting from native gel it was also observed a weak band of 128 kDa for one AA genotype sample, but not for A0/00 patients. Such band is not very common to MBL being considered as anomalous monomeric form which probably presents extra peptide chains in their structure. Lipscombe et al. (1995) reported similar findings.

In the analysis of native SDS-PAGE molecular profile of 00 patients we observed a band of 205 kDa differently from what was reported by Garred et al. (2003) and Dean et al. (2005). It is known that the purification method can influence these differences. The 205 kDa band indicates the formation of a dimer which may be responsible for the binding of MBL from A0/00 patients. Dean et al. (2005) demonstrated that depending upon the specific allele of MBL (B, C or D), the oligomerization process can be differentially affected and that the allele D exerts minor influence comparing to the others. Also the A0 genotype can generate molecules of high molecular weight due the presence of the wild allele.

Dumestre-Perard et al. (2002) questioned the possible relationship between structural polymorphism of MBL and its oligomerization state. They also reported the difficulties to evaluate MBL profile based in the protein content and genotyping. Lipscombe et al. (1995) reported that wild type MBL presented a molecular mass of 500 kDa while mutant was characterized by molecular forms of 240-380 kDa.

Our results indicated that MBL of both, low and high molecular masses, were identified in sera of HCV patients and that also the profile varied with the genotyping for *MBL2*. The incomplete forms of MBL may be related to the diversity of oligomerization process in either heterozygous or homozygous individuals. Also these observations are related to the molecule stability and normal or pathologic state as well as to the purification process. MBL serum concentration can be very low in normal individuals with A0/00 genotypes. In HCV patients we were able to obtain significant amounts of MBL using dot-N-man as a consequence, in part, of the chronic condition of HCV patients studied (hepatic lesion and intense inflammatory activity). Such conditions leads to higher levels of circulating MBL when compared to normal sera (Dumestre-Perard et al., 2002; Kilpatrick et al., 2003; Segat et al, 2007).

In conclusion our results depicted the molecular forms of MBL in HCV patients what could contribute to further analysis of the influence of the structure/genotype of MBL in the progression of infection and also in the response to the hepatitis C therapy.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors thank to the Gastrohepatology Unit of Oswaldo Cruz University Hospital for blood sampling of HCV patients and for CNPq and FACEPE for financial support.

REFERENCES

Best, L.G., Ferrell, R.E, Decroo, S., North K.E., Maccuer, J.W., Zhang, Y., Lee, E.T., Howard, B.V., Umans, J., Palmieri, V., Garred P., 2009. Genetic and other factors determining mannose-binding lectin levels in American Indians: the Strong Heart Study. *BMC Medical Genetics*. 10(5), 1-8.

Cedzynski, M., Szemraj, J., Swierzko, A. S., Bak-romaniszyn, L., Banasik, M., Zeman, K., Kilpatrick, D. C., 2004. Mannan-binding lectin insufficiency in children with recurrent infections of the respiratory system. *Clin. Exp. Immunol*. 136(2), 304–311.

Dean, M. M., Heatley, S., Minchinton, R. M., 2005. Heteroligomeric forms of codon 54 mannose binding lectin (MBL) in circulation demonstrate reduced in vitro function. *Molec. Immunol*. 43(7), 950-961.

Dumestre-Perard, C., Ponard, D., Arlaud, G.J., Monnier, N., Sim, R.B., M.G. Colomb, M.G., 2002. Evaluation and clinical interest of mannan binding lectin function in human plasma. *Molec. Immunol*. 39, 465-473

Garred, P., Larsen, F., Madsen, H.O., Koch, C., 2003. Mannose-binding lectin deficiency-revisited. *Molec. Immunol*. 40, 73-84.

Garred, P., Larsen, F., Seyfarth, J., Fujita, R., Madsen, H.O., 2006. Mannose-binding lectin and its genetic variants. *Genes Immunol*. 7(2), 85-94.

Garred, P., Honoré, C., Ma, Y.J., Munthe-Fog, L., Hummelshøj, T., 2009. MBL2, FCN1, FCN2 and FCN3-The genes behind the initiation of the lectin pathway of complement. *Mol*

Immunol. 46(14), 2737-44.

Gorgi, Y., Sfar, I., Aouadi, H., Makhlouf, M., Abderrahim, E., Jendoubiayed, S., Bardi, R., Ben Abdallah, T., Ayed, K. , 2009. Mannose binding lectin (+54) exon 1 gene polymorphism in Tunisian kidney transplant patients. *Transplant Proc.* 41(2), 660-662.

Holmskov, U., Thiel, S., Jensenius, J. C., 2003. Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 547-578.

Kilpatrick, D.C., 2003. Introduction to mannan-binding lectin. *Biochem. Soc. Trans.* Vol. 31(4), 745-747.

Laemmli, U.K., Favre, M., 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J. Mol. Biol.* 80: 575–599.

Lee, S.G., Yum, J., Moon, S.H., Kim, M.H., Yang, J.Y., Kim, J.H., Yoon, L.Y., Lee, S., Song, K., 2005. Analysis of mannose-binding lectin 2 (MBL2) genotype and the serum protein levels in the Korean population. *Molec. Immunol.* 42, 969-977.

Lipscombe, R. J., Sumiya, M., Summerfield, J. A., Turner, M. W., 1995. Distinct physicochemical characteristics of human mannose binding protein expressed by individuals of differing genotype. *Immunology* 85, 660-667.

Lissilour, S., Godinot, C., 1990. Influence of SDS and methanol on protein electrotransfer to Immobilon P membranes in semidry blot systems. *Biotechniques* 4(397-8), 400-1.

Madsen, H.O., Satz, M.L., Høgh, B., Svejgaard, A., Garred, P., 1998. Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. *J. Immunol.* 161, 3169-3175.

Minchinton, R.M., Dean, M.M., Clark, T.R., Heatley, S., Mullighan, C.G., 2002. Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population. *Scand. J. Immunol.* 56 (6), 630-641.

Mok, M.Y., Ip, W.K., Lau, C.S., Wong, W.H., 2007. Mannose binding lectin and susceptibility to infection in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 34, 1270-1276.

Petersen, S.V., Thiel, S., Jensenius, J.C., 2001. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. *Molec. Immunol.* 38, 133.

Rajagopalan, R., Salvi VP, Jensenius JC, Rawal N., 2009. New insights on the structural/functional properties of recombinant human mannan-binding lectin and its variants. *Immunol Lett.* 123(2), 114-24.

Rawal, N., Rajagopalan, R., Salvi, V.P., 2008. Activation of complement component C5: comparison of C5 convertases of the lectin pathway and the classical pathway of complement. *Journal of Biological Chemistry.* 283, 7853–63.

Rogan, M.T., Craig, P.S., Zeyhle, E., Romig, T., Lubano, G.M., Deshan, L., 1991. Evaluation of a rapid dot-ELISA as a field test for the diagnosis of cystic hydatid disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 85(6), 773-777.

- Romia, S.A., Youssef, M.E., Handoussa, A.E., Rizk, H.M., Sallam, S.M., 1992. Dot-ELISA as a diagnostic test in hydatid disease. *J Egypt Soc Parasitol.* 22(3), 603-610.
- Segat, L., Silva Vasconcelos, L. R., Montenegro de Melo, F., Santos Silva B., Arraes, L.C., Moura P., Crovella, S., 2007. Association of polymorphisms in the first exon of mannose binding lectin gene (MBL2) in Brazilian patients with HCV infection. *Clin. Immunol.* 124(1), 13-17.
- Teillet, F., Dublet, B., Andrieu, J.P., Gaboriaud, C., Arlaud, G.J., Thielens, N.M., 2005. The two major oligomeric forms of human mannan-binding lectin: chemical characterization, carbohydrate binding properties, and interaction with MBL-associated serine proteases. *J. Immunol.* 174, 2870.
- Terai, I., Kobayashi, K., Matsushita, M., Miyakawa, H., Mafune, N., Kikuta, H., 2003. Relationship between gene polymorphisms of mannose-binding lectin (MBL) and two molecular forms of MBL. *Eur. J. Immunol.* 33, 2755-2763.
- Thiel, S., Frederiksen, P.D., Jensenius, J.C., 2006. Clinical manifestations of mannan-binding lectin deficiency. *Molec. Immunol.* 43, 86.
- Tsutsumi, A., Takahashi, R., Sumida, T., 2005. Mannose binding lectin: genetics and autoimmune disease. *Autoimmun Rev.*, 4, 364-372.
- Turner, M.W., 1996. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today* 17(11), 532-540.
- Yokota, Y., Arai, T., Kawasaki, T., 1995. Oligomeric structures required for complement activation of serum mannan-binding proteins. *J. Biochem. (Tokyo)* 117, 414-419.

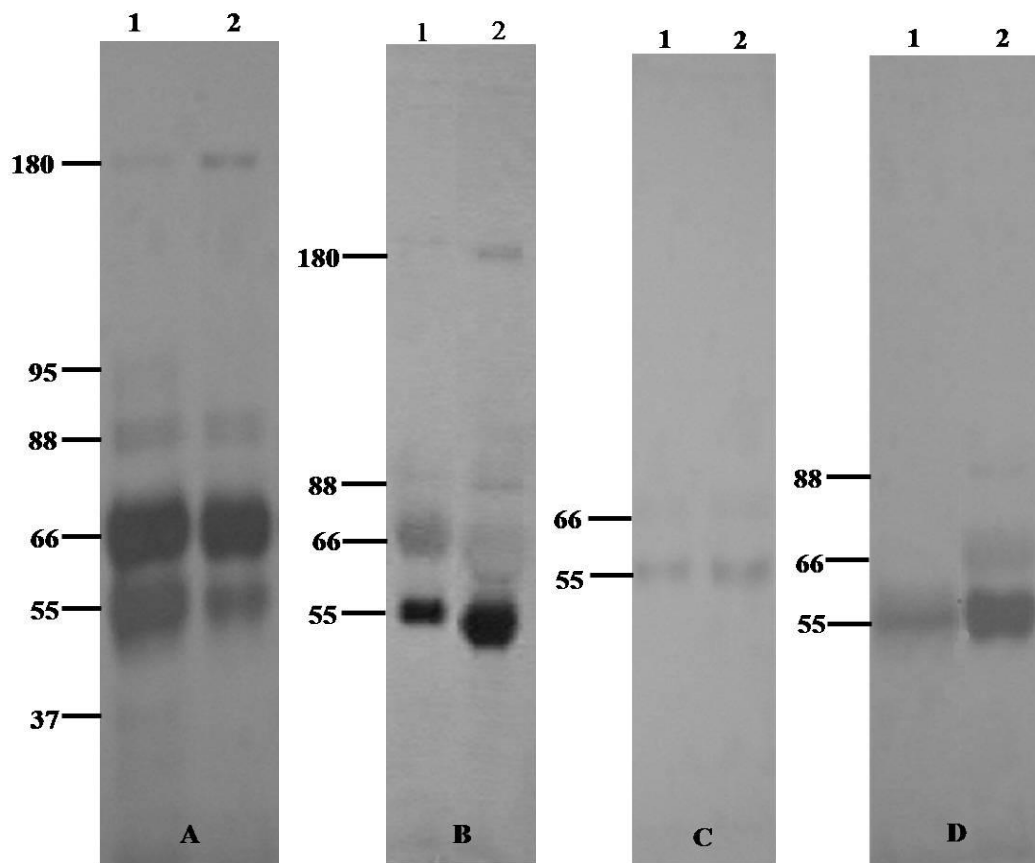


Figure 1. MBL molecular mass identified by reducing SDS-PAGE. **(A)** Individuals with AA genotype where more intense bands were visualized. Arrows show the 37 and 95 kDa bands, corresponding monomeric and dimeric forms variations. **(B)** Individuals with AO genotype reveals few high molecular mass forms. **(C)** Individuals with OO genotype. **(D)** A 55 kDa band of MBL recombinant was visualized in 1 (**rec**).

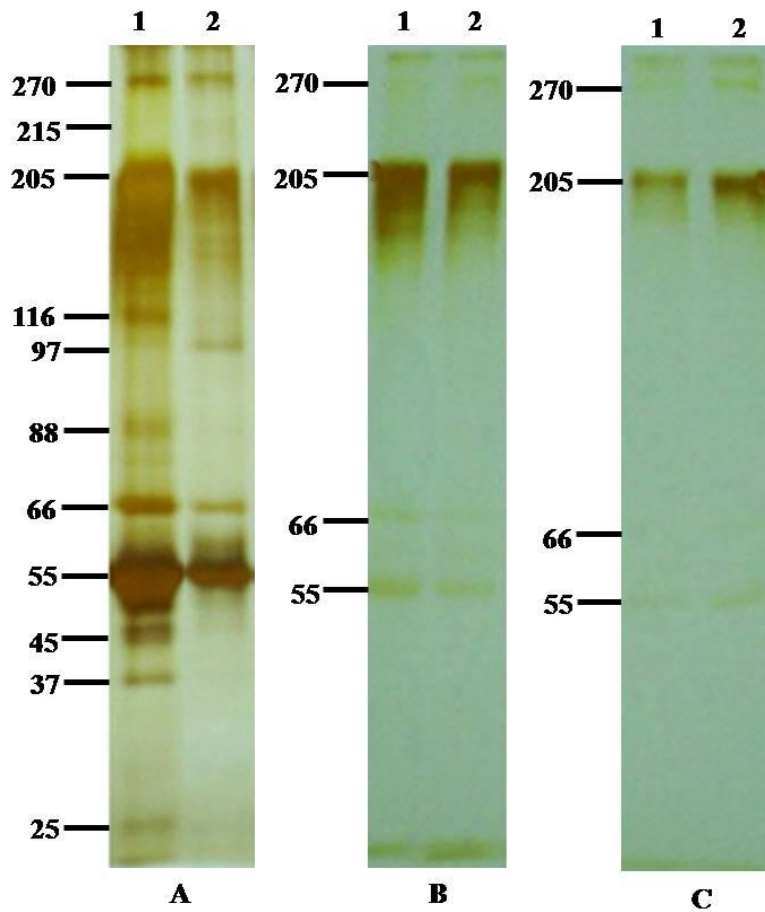


Figure 2. Molecular forms of MBL identified by non-reducing SDS-PAGE. **(A)** AA samples with presence of a high range of molecular mass. A 25 kDa band also was observed at the number 2. **(B)** A0 (1,2) and **(C)** 00 (1,2) samples. It was observed bands with less intensity, but for all A0 and 00 samples were detected high molecular bands.

7 CONCLUSÕES GERAIS

- O ensaio dot-N-man mostrou-se eficiente na separação de lectina ligadora de manose (MBL) do soro de pacientes com hepatite C;
- O ensaio dot-N-man mostrou-se uma técnica simples, prática e reprodutiva para separação de formas de baixa massa molecular da MBL através do reconhecimento por anticorpos específicos, evidenciando principalmente as estruturas anômalas da lectina;
- A caracterização estrutural da MBL em relação aos genótipos (AA, AO e OO) apresentou resultados consistentes com variações pronunciadas entre os indivíduos com o gene selvagem e os que apresentaram o gene mutante, com a observação de um perfil molecular característico para cada genótipo;
- As estruturas diméricas e triméricas da MBL foram as formas predominantes nos diferentes genótipos de pacientes positivos para HCV;
- Observamos que as formas de alta massa molecular podem está associadas à fase crônica da hepatite C.