PREDIÇÃO IN SILICO DE DOMÍNIOS FUNCIONAIS DA LECTINA BOL E CLONAGEM MOLECULAR PARA EXPRESSÃO EM SISTEMA MICROBIANO

CAMILA APARECIDA COELHO BRAZÃO; CHRISTIANE ELIZA MOTTA DUARTE

RESUMO

As lectinas apresentam exercem funções de adsorção e infiltração de patógenos em hospedeiros, potencial imunomodulador e imunoestimulador, além da capacidade de se ligarem de forma específica e reversível a carboidratos, devido à presença de um domínio de reconhecimento deles. A lectina BOL, extraída de floretes de couve-flor foi caracterizada por ensaios funcionais e de bioinformática, a fim de predizer futuros ensaios bioquímicos.

Palavras-chave: Lectina BOL; predição *in silico*; lectinas; domínios funcionais.

1 INTRODUÇÃO

As lectinas estão distribuídas na natureza e são encontradas em todas as classes e famílias dos organismos vivos (Sharon e Lis, 1987). Dentre as funções que exercem, destacam-se o favorecimento a adsorção e infiltração de patógenos em hospedeiros (Ngundi *et al*. 2006; Swanson *et al.* 2010; Silva *et al.* 2012), defesa contra insetos, micro-organismos e parasitas (Coelho *et al.* 2007; Erdmann *et al*. 2009; Kuroki *et al*. 2012; Brinkmann *et al.* 2013) e reconhecimento de sítios de ligação específicos para estabelecimento de simbiose (Peumans e Van Damme, 1995).

O isolamento e caracterização de novas lectinas, bem como investigação de seus efeitos biológicos sobre a resposta imune têm sido alvo de diversos estudos em decorrência da ampla aplicabilidade desse tipo de pesquisa nas áreas biomédicas. Recentemente identificou-se uma nova lectina isolada de *Brassica oleracea var. Botrytis* denominada BOL. A proteína foi extraída a partir de floretes de couve-flor e ensaios preliminares mostraram que a fagocitose e a produção de óxido nítrico por macrófagos foram estimuladas na presença de BOL, o que demonstra a possibilidade dessa lectina atuar como agente imunoestimulador capaz de auxiliar na ativação da imunidade inata. (Duarte *et al*. 2017).

Apesar do potencial imunomodulador de BOL, o processo de extração e purificação dessa proteína de fontes vegetais mostrou-se uma etapa limitante para a realização dos ensaios funcionais. Portanto, a clonagem dessa lectina e expressão em sistema heterólogo pode aumentar a disponibilidade e facilitar a purificação da proteína de interesse. Adicionalmente, a predição *in silico* da lectina BOL pode fornecer inferências importantes sobre o papel funcional e os efeitos biológicos dessa proteína. Aqui, nós apresentamos os resultados iniciais de predição *in sílico*, identificação de domínios funcionais e estrutura tridimensional de BOL, bem como

DOI: 10.51161/iii-conbramol/9292

análise de restrição e desenho de *primers*, que são etapas cruciais para a clonagem molecular em vetor de expressão recombinante.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

As estruturas secundária e terciária de BOL foram preditas com os programas SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html), Phyre2 (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index) e RaptorX (http://raptorx.uchicago.edu/ContactMap/). Os domínios funcionais foram selecionados com base na estrutura dos aminoácidos que compõe BOL, determinados via https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/. Para análise de restrição, utilizou-se o programa Nebcutter, (http://nc2.neb.com/NEBcutter2/) e após o desenho de *primers* já incluindo as sequências de restrição, o conteúdo GC e a temperatura de *melting* foram determinados através da OligoAnalyzer (https://www.idtdna.com/calc/analyzer).

3 RESULTADOS E CONCLUSÃO

O acesso on-line ao GenBank do NCBI possibilitou a obtenção da sequência gênica de *Brassica oleracea* var. *Botrytis lectin mRNA*, através do número de acesso: MN937259.1. Os *primers forward* e *reverse* para a clonagem do gene foram desenhados a partir da análise dos sítios de restrição do vetor pGEX-4T-1. Desse modo, foram escolhidas enzimas que não clivam o interior da sequência do gene alvo e geram extremidades coesivas complementares após a clivagem do vetor de destino. A partir da análise do vetor pGEX-4T-1, foram selecionadas as enzimas *Eco*RI e *Sal*I, e os sítios de restrição reconhecidos por essas enzimas foram adicionados aos *primers reverse* e *forward*, respectivamente. Em ambos os *primers* foram acrescidos seis pares de bases - TAA GCA (*Leader Sequence*), com o objetivo de aumentar a eficiência da clivagem. Os *primers* desenhados, *forward* e *reverse*, respectivamente, apresentam conteúdo GC de 43,8% e Temperatura de *Melting* de 60.9 ºC; conteúdo GC de 45,5% e TM de 63.6 ºC.

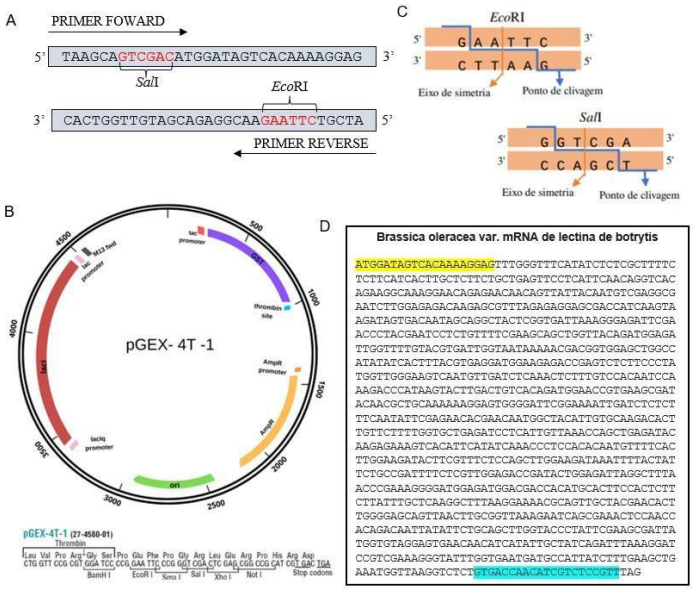

Figura 1: Representação dos primers forward e reverse desenhados para o processo de clonagem. Em A e D estão ilustradas as sequências finais, incluindo, os pares de bases escolhidos, o sítio de restrição e a sequência de oligonucleotídeos complementares ao gene de interesse. Na letra B, com destaque em amarelo está a sequência de bases utilizadas no primer

DOI: 10.51161/iii-conbramol/9292

forward e em azul, a sequência utilizada no primer reverse. A letra C ilustra esquematicamente as enzimas de restrição selecionadas, seus eixos de simetria e pontos de clivagem.

A tabela a seguir apresenta uma relação das sequências dos primers, posições deles no gene e suas respectivas temperaturas de anelamento (TA).

PRIMER	SEQUÊNCIAS	POSIÇÃO	Ta (ºC)
Forward	5'-TAAGCAGTCGACATGGATAGTCACAAAAGGAG-3'	1-20	55,9
Reverse	5'-CACTGGTTGTAGCAGAGGCAAGAATTCTGCTTA-3'	997-1018	58,3

As proteínas são polímeros de aminoácidos que se diferenciam entre si e moldam suas propriedades através de diferentes cadeias laterais, pela capacidade de formação de estruturas secundárias e de interação com íons e água (LEHNINGER, T. M *et al* 2014). A utilização do SOPMA auxilia na predição de estruturas secundárias a partir da estrutura primária. Os níveis estruturais de organização das proteínas dividem-se em: estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias sendo que, as principais estruturas secundárias são a alfa hélice e a folha-beta (BRUICE, Paula Yurkanis. 2006).

De acordo com o programa SOPMA, BOL apresenta 24,86% de probabilidade de formar a estrutura secundária alfa-hélice (Hh), 32,57% de folha-beta, 8,86% de volta-beta e 33,71% de *Random coil*.

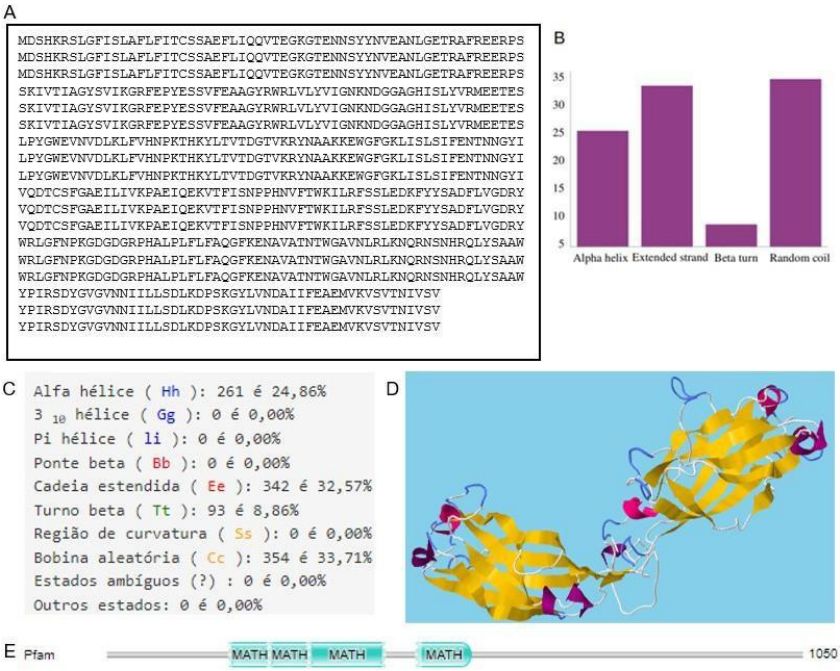

Figura 2: Em A está representado a estrutura primária da proteína Lectina BOL, enquanto nas letras B e C está ilustrada a probabilidade da obtenção de estruturas secundárias através da sequência utilizada. A letra D caracteriza-se por uma representação estrutural do estado nativo da lectina BOL. A informação sobre a estrutura é obtida pelo Protein Data Bank (PDB) com o código de identificação MN937259.1, relativo à estrutura do gene. Através do código

DOI: 10.51161/iii-conbramol/9292

genético foi possível a identificação dos aminoácidos e, por fim, da proteína, por meio do programa.

A predição da estrutura tridimensional foi gerada com o RaptorX usando como modelo a estrutura da proteína 2F1X. As cores indicam os diferentes tipos de estruturas secundárias. Em magenta é representada a estrutura de α-hélice, em amarelo a estrutura de folhas-β, em azul a estrutura de *loops* e em branco as regiões sem estruturas definidas, ditas como *random coil*. Por fim, a letra E indica a análise da sequência através do programa HMMER, obtendo uma visualização de *Sequence Matches and Features*, na qual a lectina apresenta uma estrutura com uma dobra similar a cúpula, típica das lectinas do tipo L, entretanto, contendo apenas domínios MATH em sua estrutura. Proteínas contendo domínios MATH são comuns em mamíferos e participam de vias de sinalização proteína-proteína, sendo responsáveis por diferentes respostas celulares que vão desde ativação, diferenciação e mesmo morte celular (Arch *et al*. 1998; Dhillon *et al*. 2019). Contudo, até o momento, não foram identificadas proteínas com domínios MATH que reconhecem carboidratos. Apesar de requerer validação experimental, esse achado, pode representar um novo modelo de interação ainda não descrito para proteínas com domínios MATH.

REFERÊNCIAS

ADAR R, STREICHER H, ROZENBLATT S, SHARON N. 1997. Synthesis of soybean agglutinin in bacterial and mammalian cells. **Eur J Biochem** 249: 684-689.

ARCH RH, GEDRICH RW, THOMPSON CB. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)—a family of adapter proteins that regulates life and death. **Genes Dev**. (1998) 12:2821–30. 10.1101/gad.12.18.2821

BRINKMANN CR, JENSEN L, DAGNÆS-HANSEN F, HOLM IE, ENDO Y, FUJITA T, THIEL S, JENSENIUS JC, DEGN SE. 2013. Mitochondria and the lectin pathway of complement. **J Biol Chem**. 288(12):8016-27.

BRUICE, Paula Yurkanis. **Química Orgânica.** 4. ed, volume 2. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006).

COELHO MB, MARANGONI S, MACEDO MLR. 2007. Insecticidal action of Annona coriacea lectin against the flour moth Anagasta kuehniella and the rice moth Corcyra cephalonica (Lepidoptera: Pyralidae). **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**. 2007.146(3):406-14.

DHILLON B, ALEITHAN F, ABDUL-SATER Z, ABDUL-SATER AA. The Evolving Role of TRAFs in Mediating Inflammatory Responses. **Front Immunol.** 2019;10:104. Published 2019 Feb 4. doi:10.3389/fimmu.2019.00104

ERDMANN H, STEEG C, KOCH-NOLTE F, FLEISCHER B, JACOBS T. 2009. Sialylated ligands on pathogenic *Trypanosoma cruzi* interact with Siglec-E (sialic acid-binding Ig-like lectin-E). **Cell Microbiol**. 11(11):1600-11.

GHAZARIAN H, IDONI B, OPPENHEIMER SB. 2011. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochem.** 113(3):236-47.

KILPATRICK, D. C. **Mechanisms and assessment of lectin-mediated mitogenesis**. 1999. Mol Biotechnol. 11(1):55-65.

KUROKI K, FURUKAWA A, MAENAKA K. 2012. Molecular recognition of paired receptors in the immune system. **Front Microbiol**. 3:429.

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 6ª Edição, 2014. Ed.).

LI, C.; CHEN, J.; LU, B.; et al. 2014. Molecular switch role of Akt in Polygonatum odoratum lectin-induced apoptosis and autophagy in human non-small cell lung cancer A549 cells. **PLOS One** v.9, e101526.

MAZALOVSKA M, KOUOKAM JC. Plant-Derived Lectins as Potential Cancer Therapeutics and Diagnostic Tools. **Biomed Res Int.** 2020 May 15; 2020:1631394.

NGUNDI MM, TAITT CR, MCMURRYSCOTT A, KAHNE D, LIGLER FS. 2006. Detection of bacterial toxins with monosaccharide arrays**. Biosens Bioelectron**. 21(7):1195-201.

SILVA FL, PIMENTA RS, SILVA JFM, CORRÊA DAN, CORRÊA JUNIOR A. 2012. The influence of carbohydrates in the interaction of Paracoccidioides brasiliensis with CCL-6 cells in vitro. **Rev Soc Bras Med Trop**.45(6):739-744

SWANSON MD, WINTER HC, GOLDSTEIN IJ, MARKOVITZ DM. 2010. A lectin isolated from bananas is a potent inhibitor of HIV replication. **J Biol Chem**. 285(12):8646–55.

DOI: 10.51161/iii-conbramol/9292