

**7º SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO ACADÊMICA DA FACULDADE DE  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DE UMA PROTEÍNA TRAF-  
LIKE ISOLADA DE BRASSICA OLERACEA SSP. BOTHRYTIS COM  
ATIVIDADE LECTÍNICA**

Christiane Eliza Motta Duarte<sup>1</sup>, Andréa Dias Koehler<sup>2</sup>, Patrick  
Fernandes da Silva<sup>3</sup>, Monise Viana Abranches<sup>4</sup>, Leandro Licursi de Oliveira<sup>5</sup>

**Resumo:** *As lectinas são um grupo de proteínas de ligação a carboidrato encontradas em vírus, bactérias, fungos, plantas e animais, as quais estão envolvidas em vários processos biológicos, como defesa do hospedeiro, interação célula-célula, dobramento de glicoproteínas, entre outros. Nosso grupo de pesquisa recentemente identificou uma nova lectina isolada a partir de Brassica oleracea ssp. botrytis (BOL). Para melhor caracterizar esta proteína, as sequências de cDNA e de aminoácidos deduzida foram determinadas. Primers degenerados 5'-garacncgncntty-3' foram desenhados a partir da sequência N-terminal, obtida pela degradação de Edman. Em seguida, sementes de couve-flor foram germinadas em meio Murashige e Skoog. O RNA total foi extraído das plântulas e o cDNA foi sintetizado utilizando-se a enzima transcriptase reversa M-MLV e oligodT16N como iniciador. Então os fragmentos de PCR foram sequenciados. O polipeptídeo deduzido com 297 aminoácidos consiste de dois domínios MATH em tandem. A sequência de aminoácidos predita não mostrou nenhuma identidade significativa com outras lectinas conhecidas. Por outro lado, BOL mostrou 100% de identidade com proteínas TRAF preditas de B. rapa e B. napus, sugerindo que BOL pertence à família TRAF-like em plantas. Este é o primeiro relato a descrever a caracterização*

---

<sup>1</sup>Doutoranda em Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa. email: christiane.duarte@ufv.br

<sup>2</sup>Pós-doutoranda em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. email: adkbio@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Mestrando em Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa. email: patrick.fernandes@ufv.br

<sup>4</sup>Professora do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, campus Rio Paranaíba. email: monise.abranches@ufv.br

<sup>5</sup>Professor do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa. email: leandro.licursi@ufv.br

*e clonagem do cDNA de uma lectina de Brassica. O passo seguinte neste estudo envolverá a expressão heteróloga de BOL para posterior caracterização das suas funções biológicas.*

**Palavras-chave:** *Couve-flor, domínios MATH, glicobiologia, lectina.*

**Abstract:** *Lectins are a group of carbohydrate-binding proteins found in virus, bacteria, fungi, plants, and animals, which are involved in various biological process, such as host defense, cell-cell interaction, folding of glycoproteins, and other functions. Our research group recently identified a new lectin isolated from Brassica oleracea ssp. botrytis, called BOL. In order to better characterize this protein its cDNA and deduced amino acid sequences were determined and analyzed. Degenerate primers 5'-garacncgngcntty-3' were designed from the N-terminal sequence obtained by Edman degradation. Then, cauliflower seeds were germinated in Murashige and Skoog medium. Total RNA was extracted from seedlings and cDNA was synthesized by M-MLV Reverse Transcriptase with oligodT16N as primer. Subsequent PCR fragments were sequenced. The deduced polypeptide with 297 amino acids consisting of two in tandem arrayed MATH-domain. The predict amino acid sequence of BOL showed no significant sequence identities to other known lectins. On the other hand, BOL showed 100% sequence identity to predicted TRAF proteins of B. rapa and B. napus suggesting that BOL belong to a TRAF-like family in plants. This is the first report to describe the characterization and cDNA cloning of a Brassica lectin. The next step in this study involve the heterologous expression of BOL for further characterization of their biological functions.*

**Keywords:** *Cauliflower, lectin, glycobiology, MATH-domain,*

## Introdução

As lectinas são um grupo de proteínas de ligação a carboidratos encontradas em vírus, bactérias, fungos, plantas e animais, as quais estão envolvidas em vários processos biológicos tais como interação célula-célula, dobramento de glicoproteínas, defesa do hospedeiro e transporte intracelular (De Schutter e Van Damme, 2015). Embora as lectinas tenham muitas propriedades biológicas em comum, elas representam um grupo diversificado de proteínas com respeito ao tamanho, composição e estrutura (Sharon et al., 1974). Nosso grupo de pesquisa recentemente identificou e caracterizou uma nova lectina isolada de *Brassica oleracea* ssp. *botrytis* denominada BOL. A lectina foi extraída a partir de floretes de couve-flor e purificada através de três passos cromatográficos: cromatografia de afinidade, de troca iônica e gel filtração. A sequência N-terminal ETRAFREERPSSKIVTIAG foi obtida pelo método de degradação de Edman (Abranches, 2013). Ensaios preliminares demonstraram grande potencial imunoestimulador da lectina, entretanto, a quantidade de proteína nativa recuperada no processo de purificação limita o número de ensaios biológicos que podem ser realizados. Com um rendimento inferior a 1 % de proteína torna-se notória a necessidade de desenvolver estratégias que visem aumentar a obtenção dessa lectina.

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, tornou-se possível a síntese e purificação de lectinas em larga escala através do isolamento de cDNA, inserção em vetor adequado e posterior expressão em uma célula hospedeira. A expressão heteróloga de lectinas, principalmente em hospedeiros microbianos, é uma maneira interessante de aumentar a disponibilidade, garantir o fornecimento contínuo além de facilitar a purificação de lectinas com atividades de interesse (Oliveira et al. 2013). Portanto, este trabalho teve por objetivo determinar a sequência completa de BOL e então, em etapa subsequente, tornar possível a síntese da proteína recombinante para assim melhor avaliar os efeitos biológicos da lectina BOL sobre a resposta imune adaptativa.

## Material e Métodos

Primers degenerados 5'-garacncgngcntty-3' foram desenhados a partir da sequência N-terminal da lectina de couve-flor. Sementes de *B. oleracea* ssp. *botrytis* foram germinadas em meio Murashige e Skoog por 30 dias. Para extração de RNA total das plântulas, utilizou-se Trizol Reagente e o cDNA foi sintetizado com a enzima transcriptase reversa M-MLV e oligodT16N como primer. Fragmentos de PCR subsequentes foram sequenciados. O programa ClustalX (<http://www.clustal.org/clustal2/>) foi utilizado para determinação da sequência consenso a partir do alinhamento dos produtos obtidos. As estruturas secundária e terciária de BOL foram previstas, respectivamente, com os programas SOPMA ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)) e RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/>).

## Resultados e Discussão

Dentre as nove combinações de primers testadas (Tabela 1), cinco resultaram em amplicons com aproximadamente 800-900 pb (figura 1), os quais foram sequenciados utilizando os primers T7 e SP6 como iniciadores. Após remoção da sequência do vetor, a sequência consenso constituída de 892 pb foi obtida. Análises por BLAST da sequência nucleotídica de BOL não mostraram nenhuma identidade com outras lectinas conhecidas. Por outro lado, BOL mostrou 100% de identidade com proteínas TRAF não caracterizadas de *Brassica rapa* (XP\_009111696.1) e *Brassica napus* (CDY19775.1 e CDX87054.1) sugerindo que BOL pertence à família de proteínas TRAF em plantas. Proteínas TRAF conectam física e funcionalmente receptores da superfície celular a vias de sinalização envolvidos na regulação de diversas respostas celulares, que incluem ativação, diferenciação e sobrevivência da célula (Bradley e Pober, 2001). Esse é o primeiro relato de proteínas TRAF com atividade lectínica. Análises da sequência polipeptídica deduzida revelaram que BOL possui 297 aminoácidos arranjados em dois domínios MATH em tandem (figura 2A). A estrutura secundária predita da proteína contém 15.96% de  $\alpha$ -hélices, 39.41% de folhas- $\beta$  e 35.5% de estruturas secundárias não repetitivas. A estrutura tridimensional da lectina está esquematizada na figura 2B. Com base nos

domínios de dobramento da proteína, BOL tem uma estrutura  $\beta$ -sanduíche típica de lectinas do tipo L, as quais são caracterizadas principalmente por sua estrutura terciária que apresenta folhas- $\beta$  formando uma estrutura semelhante a uma cúpula (Etzler et al. 2009).

Tabela 1: Lista de primers utilizados para amplificação do cDNA de BOL. As combinações se basearam na compatibilidade entre as temperaturas de melting. Em **negrito** os pares que resultaram em amplificação da sequência de interesse.

<i>Primer Forward</i>	<i>Primer Reverse</i>
5'-RMG NCC NWS NWS NAA RAT HG-3'	5'-TRT TNG TNA CNS WNA CYT TNA C-3'
<b>5'-GAR ACN MGN GCN TTY MGN GAR-3'</b>	<b>5'-TGT TGG TCA CAG AGA CCT TAA C-3'</b>
5'-GAR ACN MGN GCN TTY MGN GAR-3'	5'-YTT NAC CAT YTC NGC YTC RAA-3'
<b>5'-GAR ACN MGN GCN TTY MGN GAR-3'</b>	<b>5'-CTT AAC CAT TTC AGC TTC AAA GAT-3'</b>
5'-GAR ACN MGN GCN TTY MGN GAR-3'	5'-TRT TNG TNA CNS WNA CYT TNA C-3'
<b>5'-GGA GCG ACC ATC AAG TAA GAT AG-3'</b>	<b>5'-TGT TGG TCA CAG AGA CCT TAA C-3'</b>
5'-GAG ACA AGA GCG TTT AGA GAG-3'	5'-TGT TGG TCA CAG AGA CCT TAA C-3'
5'-GAG ACA AGA GCG TTT AGA GAG-3'	5'-CTT AAC CAT TTC AGC TTC AAA GAT-3'
<b>5'-GGA GCG ACC ATC AAG TAA GAT AG-3'</b>	<b>5'-CTT AAC CAT TTC AGC TTC AAA GAT-3'</b>

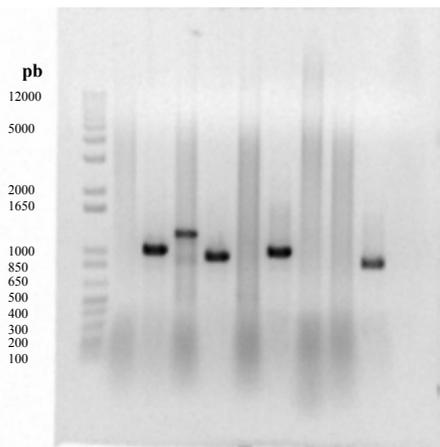


Figura 1: amplificação do cDNA de BOL utilizando diferentes combinações de primers degenerados. A coluna 1 corresponde ao padrão de massa molecular 1 kb Plus DNA Ladder da Gibco.

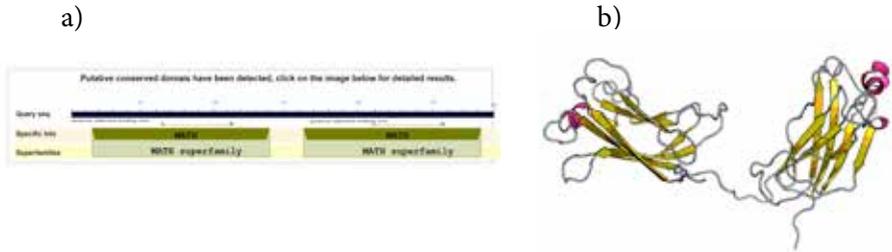


Figura 2: a) Domínios de homologia detectados em BOL. O domínio MATH é uma unidade de dobramento independente, com uma estrutura  $\beta$ -sanduíche com oito cadeias. b) Estrutura tridimensional predita da lectina. Folhas- $\beta$  estão representadas por setas amarelas e  $\alpha$ -hélices em rosa, enquanto loops e voltas são indicados por linhas.

### Considerações finais

O presente estudo é a primeira identificação de uma lectina da espécie *Brassica oleracea* ssp. *botrytis*. BOL é uma proteína TRAF-like, o que reforça a ideia de que os membros do grupo lectina são de fato proteínas multifuncionais e diversas. As próximas etapas desse trabalho envolverão a expressão heteróloga da proteína com subsequentes ensaios biológicos para se determinar as propriedades imunoestimulatórias dessa lectina.

### Referências Bibliográficas

ABRANCHES, M. V. Purificação e caracterização parcial de lectina obtida de couve-flor (*Brassica oleracea* var. *Botrytis*) e potenciais ações biológicas. 2013. 38f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa MG.

BRADLEY J.R.; POBER, J. S. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene*. v. 20, n. 44, p. 6482-6491, 2001.

DE SCHUTTER, K.; VAN DAMME, E. J. Protein-Carbohydrate Interactions

as Part of Plant Defense and Animal Immunity. **Molecules**. v. 20, n. 5, p. 9029-9053, 2015.

ETZLER, M. E.; SUROLIA, A.; CUMMINGS, R. D. L-type Lectins. In: VARKI A, CUMMINGS RD, ESKO JD, et al. (editors). **Essentials of Glycobiology**. 2<sup>a</sup> ed. **Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press**. 2009.

OLIVEIRA, C.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Recombinant lectins: an array of tailor-made glycan-interaction biosynthetic tools. **Crit Rev Biotechnol**. v. 33, n. 1, p. 66–80, 2013.

SHARON, N.; LIS, H.; LOTAN, R. On the structural diversity of lectins. **Colloq. Int. du C.N.R.S.** v. 221, p. 693–709, 1974