

Obtenção da proteína N-acetilneuraminato sintase (NANS) de *Homo sapiens* por expressão heteróloga

Homo sapiens N-acetylneuraminate synthase (NANS) protein obtained by heterologous expression

RESUMO

O gene NANS de organismo *Homo sapiens* é responsável pela codificação de enzima N-acetilneuraminato sintase (NANS), que participa da via biossintética dos ácidos siálicos. Essa enzima utiliza os substratos N-acetilmanosamina 6-fosfato e manose 6-fosfato para gerar o ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac, ácido siálico). Estudos indicam que mutações nesse gene afetam a síntese mediada pelo NANS. Por consequência do mau funcionamento da enzima o desenvolvimento do cérebro e esqueleto é afetado, provocando um quadro de nanismo e retardo mental. Diante disso, propõe-se o estabelecimento de um protocolo de expressão de maneira heteróloga em *Escherichia coli* BL21-DE3, da proteína NANS. Adicionalmente a esse trabalho foi feito um estudo teórico estrutural dessa proteína através da modelagem por homologia. Para o teste de expressão, inicialmente foi feita a transformação bacteriana por eletroporação, em que foi utilizado o plasmídeo vetor pET-15b preparado com as enzimas de restrição *Xho* I e *Bam*H I. Como resultado obteve-se que a transformação não foi totalmente efetiva, portanto, não foi possível analisar a expressão da proteína heteróloga até o momento. Porém, o modelo homólogo construído agregou mais conhecimento sobre a estrutura da enzima NANS, bem como pode-se simular as mutações presentes nessa enzima através da construção de um segundo modelo.

PALAVRAS-CHAVE: NANS. Estrutura. Homóloga.

ABSTRACT

The *Homo sapiens* NANS gene is responsible for the coding of the enzyme N-acetylneuraminate synthase (NANS), which participates in the biosynthetic pathway of sialic acids. This enzyme uses the substrates N-acetylmannosamine 6-phosphate and mannose 6-phosphate to generate N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac, sialic acid). Studies indicate that mutations in this gene affect NANS-mediated synthesis. As a result of the enzyme malfunction the brain and skeleton development is affected, causing of dwarfism and mental retardation. Therefore, it is proposed to establish a expression heterologous protocol in *Escherichia coli* BL21-DE3 of NANS protein. In addition to this work a structural theoretical study of this protein was made through homology modeling. For the expression test, bacterial transformation was initially performed by electroporation, using the plasmid vector pET-15b prepared with restriction enzymes *Xho* I and *Bam*H I. As a result, it was found that the transformation was not fully effective, therefore, it has not been possible to analyze the expression of the heterologous protein so far. However, the constructed homologous model added more knowledge about the structure of the NANS enzyme, as well as the mutations present in this enzyme can be simulated by constructing a second model.

KEYWORDS: NANS. Structure. Homolog.

Joyce Araújo de Oliveira
joycearau@outlook.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, Paraná, Brasil.

Robson Rodrigo Miranda
robsonrm18@hotmail.com
Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, Paraná, Brasil.

Marcio Silva
marcios@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, Paraná, Brasil.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

Os ácidos siálicos formam uma família de açúcares que possuem uma estrutura de nove carbonos. Dentre eles, está o ácido N-acetilneuramínico, usualmente chamado apenas de ácido siálico, sintetizado pela enzima N-acetilneuraminato sintase, codificada pelo gene NANS. Esse açúcar é encontrado em muitas glicoproteínas e glicolípídios de superfície celular de animais para de fornecer um sítio de reconhecimento para células ou proteínas extracelulares que ligam carboidratos (NELSON, COX, 2014). Van Karnebeek *et al.* (2017) em seus estudos aponta que o nanismo presente em pessoas com mutações no gene NANS, leva a crer que a síntese mediada pela enzima ácido N-acetilneuramínico sintase exerce um papel fundamental no desenvolvimento do esqueleto relacionada com a cartilagem na placa de crescimento. O cérebro possui uma alta concentração de ácido siálico, presente nos glicoesfingolípídios, encontrados com uma maior concentração no córtex, como é apresentado nos estudos realizados por B Wang e Miller (2003).

Dessa forma, é indicado que por consequência dessa disfuncionalidade enzimática, leva a um quadro de displasia, doença que se manifesta ainda na infância e que afeta diretamente o desenvolvimento do cérebro e esqueleto levando ao nanismo e retardo mental. Diante disso, esse trabalho tem por objetivo o teste de expressão heteróloga, em *Escherichia coli* BL21-DE3, da proteína NANS visando estudos posteriores. Bem como fazer estudo teórico estrutural dessa proteína através da modelagem por homologia.

MATERIAIS E MÉTODOS

A sequência de nucleotídeos do gene NANS de *Homo sapiens*, estão disponíveis no *National Center for Biotechnology Information, Genbank* (NCBI) NM_018946.3. Essa sequência foi utilizada para a definição dos parâmetros de construção do DNA recombinante: definição das enzimas de restrição *Xho* I e *Bam*H I e definição do plasmídeo vetor. Os parâmetros definidos foram encaminhados para a empresa GenScript® que sintetizou o DNA recombinante. (pET15b- NANS). Essa construção, foi inserida em células eletrocompetentes *E. coli* BL21 DE3, preparadas seguindo o protocolo *Current Protocols in Molecular Biology* (AUSUBEL, 2003). Em um tubo de eppendorf foram misturados 40µL de suspensão de células em 2µL de solução de DNA. Após esse processo, foram transferidos para uma cubeta branca de 90µL de volume, sendo essa então levada para o eletroporador, que havia sido preparado de acordo como manual BIO RED® que estipula um pulso a 3.00KV por um segundo. Foram inoculadas duas placas, uma contendo 100µL e outra 400µL de solução de células transformadas, em meio LB sólido contendo 0,05µg/mL de concentração do antibiótico ampicilina, de acordo com as especificações do pTE15b. Estes clones foram testados para a expressão do gene NANS em experimento piloto, em que foram utilizados 5mL do meio de cultura LB líquido e concentração de 1 mM de IPTG.

Foram construídos dois modelos por homologia através do programa MODELLER. Para o modelo 1 obteve-se a sequência de aminoácidos da proteína NANS através do site da GenScript®. Seleção da proteína molde com a ferramenta BLAST *Basic Local Alignment Search Tool* utilizando o PDB *Protein Data Bank* como parâmetro de busca de proteínas homólogas. Para simular os efeitos provocados por mutações na proteína foi construído um segundo modelo seguindo os mesmos passos do modelo 1, alterando apenas dois aminoácidos da sequência da proteína NANS, Lisina (Lys) 131 e Tirosina (Tyr) 188 pelos aminoácidos Glutamina (Gln) 131 e Histidina (His) 188. Com a sequência fasta pode-se editar esses aminoácidos. A análise da qualidade do modelo foi feita através dos programas PROCHECK, WHATIF e PDBsum.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos clones apenas no meio LB seletivo, no qual foi inoculado 400µL de células submetidas a eletroporação (Figura 1). Os resultados apontaram que a transformação não foi totalmente efetiva, pois esperava-se bactérias transformadas também no inóculo de 100µL. No teste de expressão heteróloga dos 10 clones testados (Figura 1) nenhum cresceu no meio líquido LB seletivo, portanto, não foi possível analisar a expressão da proteína heteróloga até o momento.

Figura 1- Meio LB seletivo contendo colônias de células transformadas *E. coli* BL21 DE3 com a construção pET15b-NANS, as colônias inumeradas foram utilizadas para o crescimento em meio LB líquido.

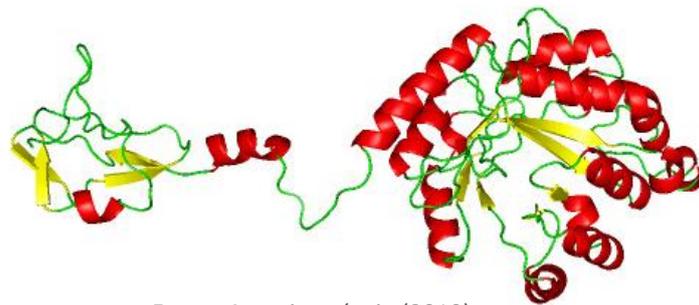


Fonte: autoria própria (2018).

As possibilidades levantadas para a não efetividade da expressão proteica dá-se pelo antibiótico utilizado, que não foi preparado durante os procedimentos, sendo utilizado a ampicilina já disponível no laboratório. Esse talvez não tenha sido preparado da maneira correta ou até mesmo estivesse vencido, pois não havia identificação quanto a data de validade no frasco. Corroborando com esses fatores, durante o processo de eletroporação percebeu-se que a cubeta utilizada apresentava um defeito de fabricação, mas como era a única disponível no momento não havia a possibilidade de troca.

Na construção do modelo homólogo a proteína molde indicou 31,15% de identidade, sendo essa a ácido siálico sintase (Neub) de *Neisseria meningitidis* sob o código PDB: 1XUU. Foram obtidos 5 modelos com o programa MODELLER. Com o programa PROCHEK, verificou-se no gráfico Ramachandran o modelo com mais aminoácidos dentro das regiões mais favoráveis e adicionalmente favoráveis. Sendo que, o modelo escolhido (Figura 2) apresentou o índice no *Coarse Packin Quality Control* normalizado igual -0657, esse considerado como um bom modelo.

Figura 2- Estrutura homóloga da proteína NANS selvagem.

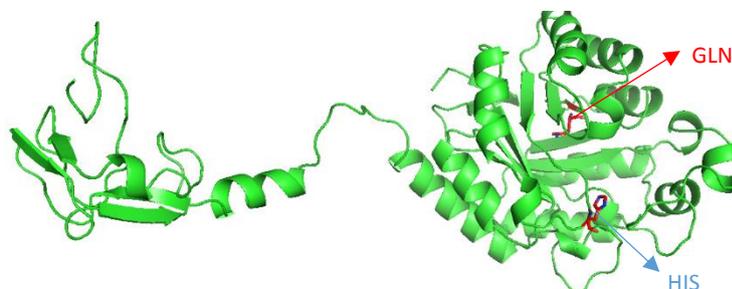


Fonte: Autoria própria (2019).

Para simular os efeitos das mutações na estrutura, causados pela troca dos aminoácidos Lys 131-Gln e Tyr 188-His, discutido por Van Karnebeek *et al.* (2017) foi construído um segundo homólogo no MODELLER (Figura 3), utilizando a sequência primária da proteína NANS para fazer a edição desses aminoácidos. O programa gerou 5 templates, sendo escolhido o modelo que apresentou o melhor índice *Coarse Packin Quality Control* igual -0,824. Correspondente a um bom modelo, mas que apresenta alguns erros.

Esse homólogo produzido *in silico* foi comparado ao modelo NANS sintase selvagem. Ambos foram submetidos ao programa *Pictorial database of 3D structures in the Protein Data Bank (PDBsum)*, no qual oferece um aspecto geral de cada estrutura macromolecular 3D.

Figura 3- Modelo homólogo da proteína NANS com aminoácidos mutados Gln-131 e His- 188

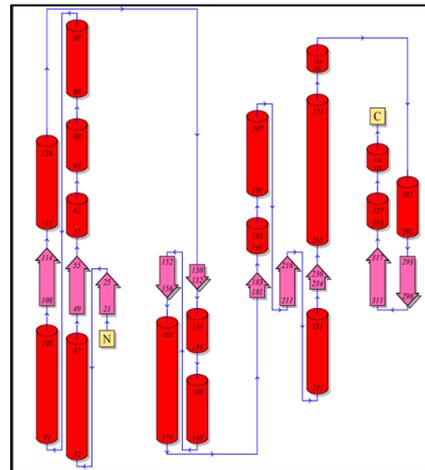


Fonte: Autoria própria (2019).

O homólogo selvagem apresentou uma predição estrutural de 32,9% de hélices- α com 2 folhas- β paralelas e 1 folhas- β antiparalelas. Já o modelo mutado, foi indicado com uma predição estrutural de 33,4% de estrutura hélices- α com

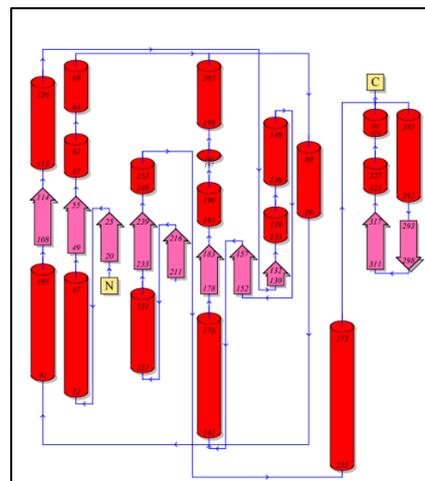
apenas 1 folha- β grande e outra folha- β antiparalela. Essa diferença estrutural foi evidenciada no diagrama de topografia (Figura 4) e (Figura 5). Nesse caso, pode-se perceber que as mutações causaram alterações na estrutura da proteína.

Figura 4- Diagrama de topografia da proteína selvagem.



Fonte: Autoria própria (2019).

Figura 5- Diagrama de topografia da proteína mutada.



Fonte: Autoria própria (2019).

Comparando a estrutura predita do modelo mutado com o homólogo selvagem da enzima NANS, notou-se que a porcentagem de estruturas hélices- α , aumentou. Uma vez que os aminoácidos Gln e His possuem em tendência a assumir essa conformação.

Cada aminoácido em um polipeptídeo tem uma propensão intrínseca em formar uma hélices- α , consequência das propriedades de seu grupo R e como interferem na capacidade de seus átomos de conexão de cadeia principal em aceitar os ângulos φ e ψ característicos. [...] A posição de cada resíduo em relação a seus vizinhos também é importante. Interações entre as cadeias laterais dos aminoácidos podem estabilizar ou desestabilizar a estrutura hélices- α (NELSON, COX, 2014, p. 121-122).

CONCLUSÃO

Dessa maneira pode-se observar que as mutações nesses aminoácidos alteraram a estrutura secundária predita da proteína. Além disso, esses resíduos estão presentes no sítio ativo da enzima, visto que a ação catalítica da mesma é prejudicada conforme é relatado nos estudos de Van Karnebeek *et al.* (2017). O modelo homólogo construído agregou mais conhecimento sobre a estrutura da enzima NANS, uma vez que os estudos quanto a parte estrutural dessa proteína ainda são escassos. Porém, as alterações provocadas pelas mutações ainda serão analisadas. Há a necessidade da retomada dos testes de expressão da enzima N-acetilneuraminato sintase, codificada pelo gene NANS, em que deve ser estabelecidos novos parâmetros ideais visando a otimização para a expressão proteína.

REFERÊNCIAS

- Estrutura Tridimensional de Proteínas. *In*: NELSON, David L.; COX, Michael M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 7ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. v. único.
- KARNEBEEK, Clara Van et al. (2016). NANS-mediated synthesis of sialic acid is required for brain and skeletal development. *Nature Genetics* volume48, pages777–784 (2016). Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ng.3578> Acesso em: 08 set. 2018.
- WANG, B; D-MILLER, J. Brand. The role and potential of sialic acid in human nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition* volume, Europe, 23 out. 2003. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/1601704#Sec2> Acesso em: 15 jul. 2019.
- NCBI (Org.). NANS N-acetilneurominato sintase [Homo sapiens (human)]. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NM_018946.3/ . Acesso em: 08 set. 2018.
- GenScript. NANS cDNA ORF clone, Homo sapiens (humano). 2008. Disponível em: <https://www.genscript.com/gene/homo-sapiens/54187/nans.html#orf>. Acesso em: 08 set. 2018.
- BLAST: Basic Local Alingnm Search Tool. [S./]. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Acesso em: 15 abr. 2019.
- PDB (2004). **Protein Data Bank**. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/1xuu>. Acesso em: 15 abr. 2019.
- UniProt (Org). UniProtKB- Q9NR45SIAS_HUMAN). Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9NR45> . Acesso em: 08 set. 2018.
- AUSUBEL, Frederick M. et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. [S./]: John Wiley & Sons, 2003.
- LASKOWSKI, Roman. PDBsum Generat. [S. /.] 19 jul. 2019. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/Generate.html>. Acesso em: 15 jul. 2019.