

Estudo e simulação *in silico* do metabolismo ligado ao TEAD

Study and *in silico* simulation of metabolic pathways associated to TEAD

RESUMO

Luciane Xavier Ferreira

Luciane.1999@alunos.utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Flavia Regina Oliveira de Barros

flaviabarros@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

A reprodução animal é essencial, desde o estabelecimento de uma vida até a produção de alimentos. A produção pecuária é um campo dependente de técnicas reprodutivas para a manutenção de seus rebanhos geneticamente selecionados. Assim, podemos destacar a importância do sistema de produção de embriões e como os mesmos podem influenciar nas diferenciações celulares de um embrião. TEAD4 é um fator de transcrição crucial para a primeira diferenciação celular da vida. Todavia, em meio *in vitro* o fenótipo de diferenciação celular é diferente do esperado quando estabelecido um *knockout* de TEAD4. Para elucidar tal fenômeno recorreremos ao uso de plataformas e *softwares* de bioinformática para analisar a proteínas da família TEAD e autopalmiteoilação das mesmas. Os resultados indicam uma provável redundância na atividade das proteínas da família TEAD e que a modificação pós-traducional de palmitato pode ser o precursor de tal fenômeno.

PALAVRAS-CHAVE: TEAD. Bioinformática. Palmitato.

ABSTRACT

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

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



Animal reproduction is essential, from establishing a life to producing food. Livestock production is a area dependent on reproductive techniques for its maintenance. Among them, it is necessary to emphasize the importance of cultivation and how it can influence the cellular decisions of an embryo. TEAD4 is a crucial transcription factor for the first cellular differentiation of life. However, in *in vitro* media the cell differentiation phenotype is different from that expected when a TEAD4 knockout is established. To elucidate this phenomenon, we resorted to the use of bioinformatics platforms and software to analyze the proteins of the TEAD family and their autopalmiteoylation. The results indicate a probable redundancy in the activity of proteins of the TEAD family and that the post-translational modification of palmitate may be the precursor of such a phenomenon.

KEYWORDS: TEAD. Bioinformatics. Palmitate.



INTRODUÇÃO

Em torno de 7,25 milhões de cabeças bovinas foram abatidas apenas no primeiro trimestre de 2020 no Brasil, sendo este um dos países que mais produz carne bovina no mundo (BRASIL, 2015). O Brasil também destaca-se por ser um dos países que mais aplica técnicas de técnicas de reprodução assistida em bovinos, sendo assim, necessárias pesquisas voltadas a essa temática (EUCLIDES et al., 2010).

A primeira diferenciação celular no embrião é um fator decisivo para o estabelecimento de qualquer vida, e se algum impedimento ocorre no desenvolvimento da mesma isso será refletido na vida do indivíduo (NISHIOKA et al., 2009). Este evento ocorre no estágio de mórula, onde se tem a polarização das células em contato com a zona pelúcida, em que suas membranas celulares retêm diversas proteínas, sendo uma delas a Lats 1/2. A Lats 1/2 é responsável pela fosforilação de Yap, logo, nas células polarizadas o Yap não é fosforilado, assim, observa-se Yap localizado no núcleo formando um complexo de transcrição com TEAD4. O complexo de transcrição TEAD4-Yap é importante para a transcrição de Cdx2, outro fator de transcrição que media a formação do trofotoderma (TE) nas células polarizadas. O trofotoderma é responsável pela formação da porção fetal da placenta e compartimentos placentários (NISHIOKA et al., 2009; POSFAI et al., 2017). Contudo, nas células internas, onde não ocorre a polarização, não temos Yap nuclear e nem a formação do complexo, sendo assim ativada a transcrição de Sox2 que media a formação da massa celular interna (ICM), um conjunto de células pluripotentes responsáveis pela formação do embrião propriamente dito (POSFAI et al., 2017; RAYON et al., 2014).

Quando estabelecido um embrião *knockout* de TEAD4 pode-se observar que no meio *in vitro* ocorre a formação do trofotoderma, enquanto em *in vivo* isso não ocorre. No SICITE 2019 apresentamos resultados em que por alinhamento de sequências de aminoácidos e nucleotídeos embasou a hipótese de uma atividade redundante da família TEAD em um meio de *in vitro*. Em uma busca bibliográfica encontrou-se dados em que a modificação pós-traducional de palmitoilação é importante para a função e estabilidade das proteínas da família TEAD (KIM; GUMBINER, 2019; NOLAND et al., 2016).

Desta forma, por meio da bioinformática, modelamos as proteínas TEAD e alinhamos suas estruturas, além disso, realizamos uma simulação computacional da palmitoilação do TEAD para embasar futuros experimentos laboratoriais.

METODOLOGIA

SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS E MODELAGEM PROTEICA

No banco de dados biológicos UniProt coletamos as sequências das proteínas TEAD1, 2, 3 e 4, de organismo *Bos taurus*, sendo esta informação armazenada no software *SerialCloner* (versão 2.6.1). A sequência de aminoácidos foi submetida a

uma modelagem tridimensional pela ferramenta online *Swiss Model*, pela qual é possível obter os dados em arquivos em formato PDB. Com os arquivos obtidos e baixados, alinhamos cada uma das estruturas no software *Swiss-PdbViewer 4.1.0* (GUEX; PEITSCH, 1997; WATERHOUSE et al., 2018).

SIMULAÇÃO DA AUTOPALMITOILAÇÃO

Como o objetivo do estudo é entender como o meio de cultivo afeta o fenótipo dos embriões, simulamos, através do *CellDesigner* (versão 4.4.2), como a síntese de palmitato afetaria a autopalmitoilação dos TEADs. Para isso, recorremos ao *plugin SBMLsqueezer 2.1* que gera a cinética das reações, e o modelo de simulação padrão do *CellDesigner* (DRÄGER et al., 2008; FUNAHASHI et al., 2003).

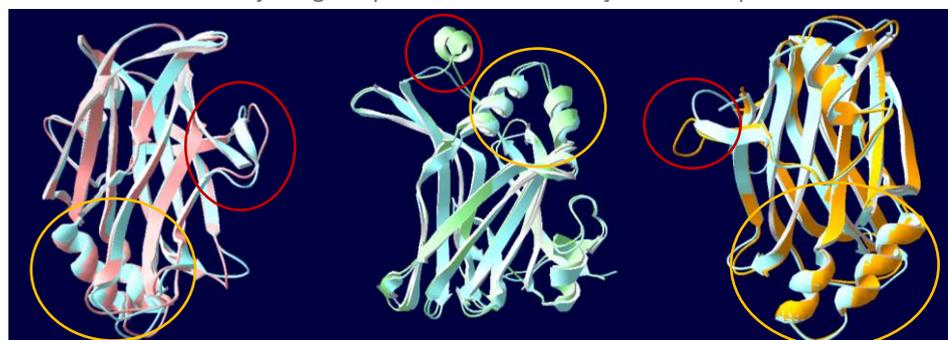
RESULTADOS E DISCUSSÃO

MODELAGEM DAS PROTEÍNAS

De forma que, já relatado antes, por alinhamento de sequência de aminoácidos a região de ligação ao DNA é conservada entre os TEADs. Sendo assim, modelamos e alinhamos parte da estrutura que não apresenta tanta similaridade de sequência. As estruturas apresentadas são responsáveis pela função da proteína na interação TEAD-Yap (LI et al., 2018).

Na figura 1 temos o alinhamento do TEAD4, em azul, e do TEAD1, em rosa. O que se observa é uma alta semelhança estrutural entre eles, mesmo que pela sequência de aminoácidos seja diferente. O círculo vermelho mostra a diferença estrutural entre eles, enquanto o círculo laranja mostra a região proteica que o TEAD interage com o Yap.

Figura 1 – alinhamento estrutural de TEAD4 (azul), TEAD1 (rosa), TEAD2 (verde) e TEAD3 (laranja). Circunferência vermelha: região que não apresenta similaridade. Circunferência laranja: região que acontece a interação TEAD-Yap.



Fonte: autoria própria (2020).

Para TEAD2 seguimos o mesmo procedimento do TEAD1. Na figura 1 o TEAD2 está representado pela cor verde enquanto o TEAD4 continua azul. Também marcamos a região de baixa similaridade e a região de interação TEAD-Yap.

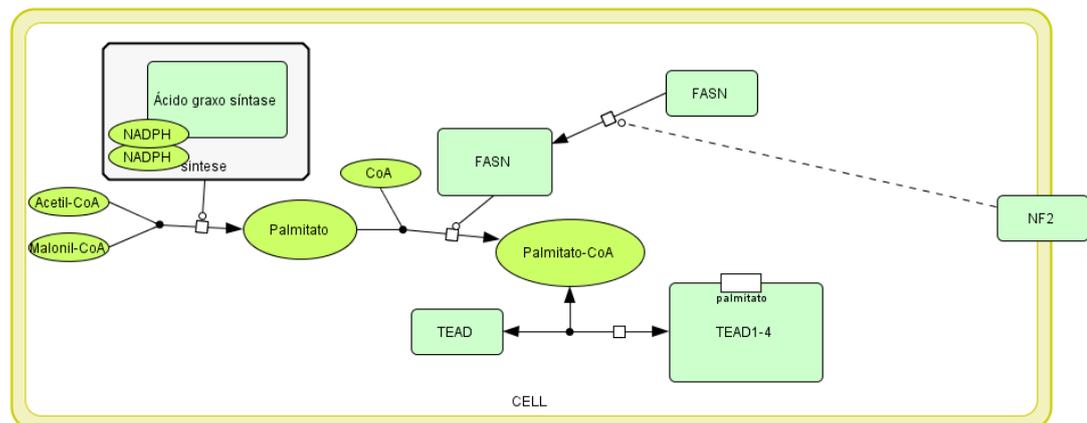
No TEAD3 observamos o mesmo comportamento do TEAD1 e 2 em relação ao TEAD4. Ao estarmos inferindo o seguinte alinhamento podemos propor a hipótese de semelhança na funcionalidade celular.

Apesar de serem proteínas com funções distintas em diferentes situações e apresentarem diferença significativa em parte de sua sequência de aminoácidos, na análise estrutural demonstraram-se significativamente similares, principalmente na região de ligação à Yap, que é fundamental para formação de complexo de transcrição de Cdx2. Portanto, com base nesses resultados, levantamos a hipótese que no ambiente *in vitro*, na ausência de TEAD4, alguma das outras três proteínas da família TEAD sofre modificação pós-traducional que a permite formar o complexo de transcrição de Cdx2.

SIMULAÇÃO DA AUTOPALMITOILAÇÃO

Desenvolveu-se uma simulação de como a disponibilidade constante de Acetil-CoA e Malonil-CoA, produtos do metabolismo energético da célula, afetaria a autopalmiteoilação de TEAD, uma vez que essa modificação pós-traducional é responsável por parte da atividade das proteínas TEAD (CHI et al., 2020; NOLAND et al., 2016). Desta forma, inferindo uma relação entre meio de cultivo, metabolismo e modificação pós-traducional. Na figura 2 temos a representação da simulação de acordo com a documentação do software *CellDesigner*.

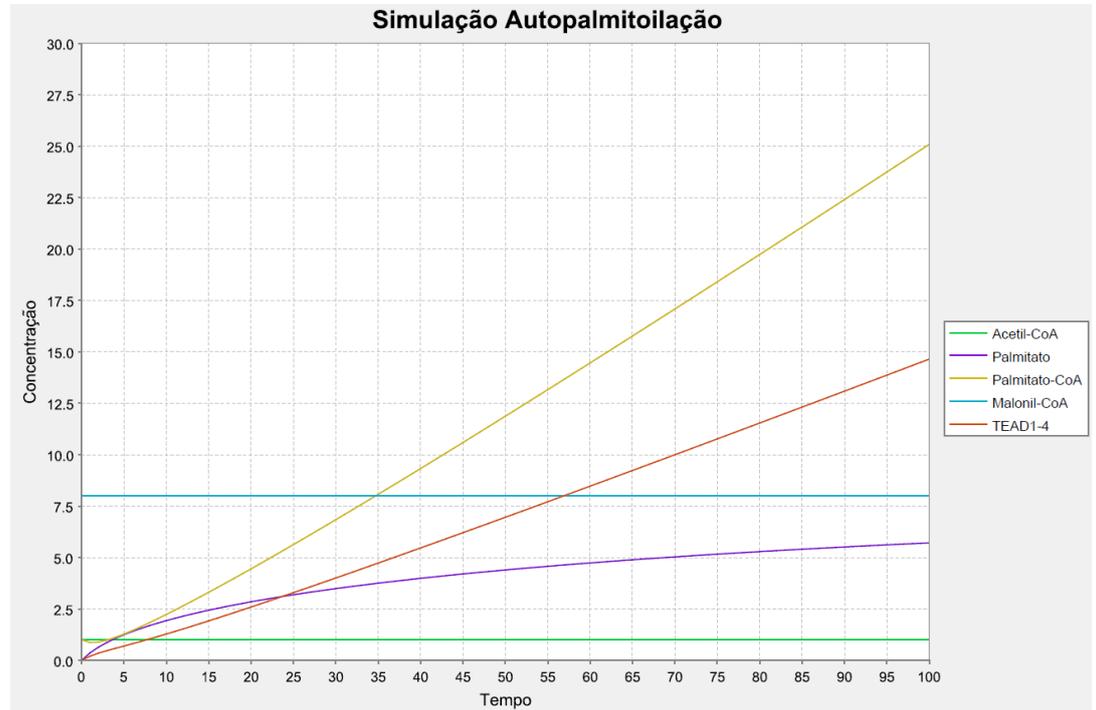
Figura 2 – modelagem da rede bioquímica da autopalmiteoilação.



Fonte: autoria própria (2020).

Estabelecido todos os parâmetros necessários através das leis de taxas geradas pelo *SBMLsqueezer 2.1*, foi gerada a simulação e o software plotou o gráfico da rede bioquímica, representado na figura 3.

Figura 3 – gráfico da simulação da rede bioquímica de autopalmitoilação de TEAD1-4



Fonte: autoria própria (2020).

A partir dos dados, pode-se observar que ao mantermos constante a disponibilidade de Malonil-CoA e Acetil-CoA houve um aumento significativo de até 10 vezes mais na disponibilidade de TEAD palmitoilado na célula, representado pela linha vermelha do gráfico, o que pode afetar fenótipo do embrião pré-implantação.

CONCLUSÃO

Apesar de anos de desenvolvimento de técnicas laboratoriais e o melhoramento das mesmas, ainda existem lacunas desconhecidas pela ciência que afeta diversos tipos cultivos. Focando no desenvolvimento de agronegócios e produção pecuária, sabe-se que, na atualidade as técnicas reprodutivas que utilizam tais sistemas *in vitro* ainda não atingiram o máximo de seu potencial embora haja crescente demanda no mercado. Logo, o presente estudo concentrou-se na discussão de como o meio de cultivo *in vitro* pode afetar a primeira diferenciação celular de um zigoto. Sendo assim, a modelagem e simulações nos demonstraram que existe um viés metabólico que pode afetar a função dos TEAD1-3 na ausência de TEAD4, através da síntese de palmitato e conseqüentemente autopalmitoilação destas proteínas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Fundação Araucária por subsidiar esta pesquisa pelo Programa de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC 2019/2020.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Indicadores IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE**, p. 14–49, 2015.
- CHI, F. et al. Glycolysis-Independent Glucose Metabolism Distinguishes TE from ICM Fate during Mammalian Embryogenesis. **Developmental Cell**, p. 1–18, 2020.
- DRÄGER, A. et al. SBMLsqueezer: A CellDesigner plug-in to generate kinetic rate equations for biochemical networks. **BMC Systems Biology**, v. 2, n. 1, p. 39, 30 dez. 2008.
- EUCLIDES, V. P. B. et al. Brazilian scientific progress in pasture research during the first decade of XXI century. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. suppl spe, p. 151–168, jul. 2010.
- FUNAHASHI, A. et al. CellDesigner: a process diagram editor for gene-regulatory and biochemical networks. **BIOSILICO**, v. 1, n. 5, p. 159–162, nov. 2003.
- GUEX, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v. 18, p. 2714–2723, 1997.
- KIM, N.-G.; GUMBINER, B. M. Cell contact and Nf2/Merlin-dependent regulation of TEAD palmitoylation and activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 20, p. 9877–9882, 14 maio 2019.
- LI, Y. et al. Structural and ligand-binding analysis of the YAP-binding domain of transcription factor TEAD4. **Biochemical Journal**, v. 475, n. 12, p. 2043–2055, 29 jun. 2018.
- NISHIOKA, N. et al. The Hippo Signaling Pathway Components Lats and Yap Pattern Tead4 Activity to Distinguish Mouse Trophectoderm from Inner Cell Mass. **Developmental Cell**, v. 16, n. 3, p. 398–410, mar. 2009.
- NOLAND, C. L. et al. Palmitoylation of TEAD Transcription Factors Is Required for Their Stability and Function in Hippo Pathway Signaling. **Structure**, v. 24, n. 1, p. 179–186, 2016.
- POSFAI, E. et al. Position- and Hippo signaling-dependent plasticity during lineage segregation in the early mouse embryo. **eLife**, v. 6, p. 1–24, 22 fev. 2017.
- RAYON, T. et al. Notch and Hippo Converge on Cdx2 to Specify the Trophectoderm Lineage in the Mouse Blastocyst. **Developmental Cell**, v. 30, n. 4, p. 410–422, ago. 2014.
- WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2 jul. 2018.