

ANÁLISE BIOINFORMÁTICA PRELIMINAR DE CHENOPODINA PROVENIENTE DE *Chenopodium quinoa*

Flávia C. P. Tonelli^{1*}, Fernanda M. P. Tonelli², José M. Granjeiro³, Paulo A. Granjeiro⁴, José Antônio Silva⁵, Alessandro S. Galdino⁵

1. Mestranda do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSJ
2. Pós-doutoranda do Departamento de Biologia Celular da UFMG
3. Pesquisador do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia/INMETRO
4. Pesquisador e docente do curso de Bioquímica da UFSJ/Orientador
5. Pesquisador e docente do curso de Bioquímica da UFSJ

Resumo:

A chenopodina é uma globulina-11S proveniente de sementes de *Chenopodium quinoa* e vem apresentando aplicabilidade biológicas interessantes, como antimicrobiana, adjuvante em vacinas antitumorais e em formulações de quimioterápicos. A extração e purificação desta proteína, diretamente das sementes, é bastante dispendiosa e no geral apresenta baixo rendimento.

Assim, para que ela seja utilizada em processos industriais como um medicamento biológico (larga escala) torna-se fundamental a sua expressão em microrganismos, obtendo-se maior rendimento aliados a menores custos. A primeira etapa para êxito nesse processo é a coleta de informações sobre a chenopodina e outras proteínas homólogas a ela (uma vez que se trata de uma globulina-11S pouco pesquisada), contribuindo para evitar esforços fúteis.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo obter informações bioquímicas, químicas e genômicas da chenopodina, além de predição estrutural, utilizando-se diversas ferramentas *in silico*. Estas informações foram obtidas com sucesso e estão sendo utilizadas para sua expressão em levedura.

Palavras-chave: *Chenopodium quinoa*; chenopodina; globulina-11S.

Apoio financeiro: CAPES, UFSJ.

Introdução:

A quinoa (*Chenopodium quinoa*) é uma dicotiledônea nativa da região dos Andes. Inicialmente estava presente em regiões de altas altitudes, mas devido à facilidade em seu cultivo, espalhou-se por outras regiões do mundo, estando presente também no Brasil (POMPEU *et al*, 2015). Neste país, a quinoa foi introduzida na década de 1990, como parte de um esforço para a diversificação do sistema de produção no cerrado (SPEHAR *et al*, 2005).

A chenopodina é uma globulina-11S proveniente de sementes de quinoa. De acordo com a literatura, é composta por subunidades ácidas de aproximadamente 32 kDa, e básicas de aproximadamente 23 kDa. Elas são unidas por pontes dissulfeto e formam um hexâmetro (BRINEGAR *et al.*, 1993). Além das propriedades antimicrobianas (POMPEU *et al*, 2015) e anti-inflamatória (FERREIRA *et al*, 2014), testes preliminares confirmaram sua capacidade de potencializar atividade de fármacos antineoplásicos. Ela pode ainda ser utilizada como adjuvante em vacinas (MAIA *et al.*, 2016).

Desta forma, sua produção em maior quantidade em microrganismos e independente de extração vegetal via métodos cromatográficos torna-se extremamente interessante. Para isso, é necessário um levantamento prévio em literatura para confirmação do tipo de proteína isolada de sementes de *Chenopodium quinoa*. O objetivo deste trabalho foi obter a simulação da estrutura tridimensional, características bioquímicas e químicas da proteína, enzimas que podem ser utilizadas na produção de chenopodina e sua sequência genômica. Estas informações além de contribuírem para a obtenção da globulina-11S podem evitar possíveis erros durante este processo.

Metodologia:

A partir da sequência N-terminal previamente obtida de uma proteína desconhecida isolada de sementes de quinoa foi feita inicialmente a pesquisa através da ferramenta BLAST. Foi encontrada homologia de 100% com a chenopodina disponível no banco de dados desta plataforma. Checou-se então o alinhamento exato entre as duas sequências N-terminais (sequência do BLAST e sequência da proteína desconhecida). No NCBI, verificaram-se os artigos disponíveis relacionadas às características listadas neste mesmo banco de dados (organismo-origem, quantidade de aminoácidos, trabalhos já

publicados utilizando esta proteína) a fim de se obter maiores informações sobre a chenopodina. Nesta mesma ferramenta, foi pesquisada a estrutura primária completa da proteína.

A etapa seguinte consistiu na simulação de informações bioquímicas desta globulina-11S, tais como ponto isoelétrico (pI) da proteína total e massa molecular na ferramenta "Compute pI/Mw" presente na plataforma "Expasy". Com a estrutura primária da molécula e o N-terminal verificou-se a posição de término da subunidade ácida e o início da subunidade básica através da ferramenta "MultAlin". A partir deste dado, simulou-se o pI e a massa molecular de cada uma das subunidades na ferramenta "Compute pI/Mw".

Para verificação de características químicas e bioquímicas como tempo estimado de meia-vida em levedura, reticulócitos de mamíferos e *Escherichia coli*, composição de aminoácidos e composição atômica de cada uma das subunidades da chenopodina foram utilizadas as suas respectivas estruturas primárias obtidas anteriormente, e a ferramenta "ProtParam" presente no "Expasy". Fez-se então a simulação da estrutura tridimensional desta globulina-11S, uma vez que não há elucidação da mesma descrita em literatura. Para isso, utilizou-se a ferramenta "Phyre2" e a estrutura primária da proteína total.

Utilizando-se a ferramenta UniProt e pesquisando-se o termo "11S-globulin *Chenopodium quinoa*", verificou-se sua função biológica e confirmou-se a ausência da estrutura tridimensional definida. Foi possível ainda verificar a posição do peptídeo sinal na chenopodina, a posição da cadeia proteica e os domínios que a compõe.

Buscou-se ainda a sequência genômica da chenopodina utilizando a sequência primária proteica e a ferramenta "Sequence Manipulation Suite". Foi feita ainda esta busca para a estrutura primária da subunidade básica por apresentar menor peso molecular e, de acordo com a literatura, atividade biológica. Para confirmar as sequências genômicas obtidas, utilizou-se a ferramenta "Translate" presente no "Expasy". Finalmente, verificou-se a preferência de utilização do códon para produção da chenopodina em *Pichia pastoris*, organismo a ser utilizado em etapas posteriores, utilizando-se o termo "*Pichia pastoris*" na ferramenta "Kazuza – Códon Usage Database".

Foi realizada, ainda, a busca de patentes nas ferramentas "Google Patents", "Patentes Online" e "WIPO" utilizando-se os termos: "chenopodina", "*Pichia pastoris*", "*Chenopodium quinoa*", "11S-globulin".

Resultados e Discussão:

Após pesquisa/simulação utilizando as ferramentas mencionadas anteriormente foi verificado que a massa molecular da chenopodina é de 53576,22 Da. Ela é composta por 479 aminoácidos, sua sequência está registrada no Uniprot sob a ID Q6Q385, e apresenta pI de 6,58. Já a estrutura ácida é composta por 291 aminoácidos e apresenta pI de 6,23. Os dados encontrados estão de acordo com os dados obtidos por Brinegar e colaboradores (1993), primeiro artigo que descreveu a estrutura da chenopodina. A subunidade básica é composta por 188 aminoácidos e apresenta pI 8,64. O peptídeo sinal é composto por 25 aminoácidos (posições 1 a 25). De acordo com a ferramenta UniProt, a chenopodina possui função de proteína de reserva e domínios Cuprin, dados que também estão de acordo com o descrito por Brinegar e colaboradores (1993).

A simulação da estrutura tridimensional apresenta um hexâmero com subunidades maiores e menores unidas por pontes dissulfeto. Este dado está de acordo com o que descreveu Singh e colaboradores (2015) para a estrutura de globulina-11S proveniente de sementes de *Murraya paniculata*, homóloga à chenopodina.

Quanto à composição de aminoácidos, obteve-se que glicina representa 8,8%, e arginina, leucina e serina apresentam cada uma 8,1%. Esses aminoácidos são os que apresentam porcentagens mais significativas. A chenopodina apresenta 56 aminoácidos carregados negativamente (Asp e Glu) e 53 aminoácidos carregados positivamente (Arg e Lys). A subunidade básica é majoritariamente composta por alanina (9,6%), arginina (9,0%), glutamato (8,0%) e leucina (8,5%).

Sobre a composição química, ela é composta por 2323 átomos de carbono, 3684 átomos de hidrogênio, 702 átomos de nitrogênio, 720 átomos de oxigênio e 19 átomos de enxofre. Apresenta, portanto, fórmula química $C_{2323}H_{3684}O_{720}N_{702}S_{19}$. A subunidade básica é composta por 925 átomos de carbono, 1477 átomos de hidrogênio, 273 átomos de nitrogênio, 281 átomos de oxigênio e 5 átomos de enxofre.

Dentre as enzimas que não devem ser utilizadas por hidrolisarem a estrutura da chenopodina estão caspases 1 a 10, enteroquinase, granzima B e protease do vírus do tabaco. Já entre as substâncias/enzimas que podem ser utilizadas em ensaios de caracterização estão ácido fórmico, além das enzimas pepsina e tripsina.

Foi verificado que a meia-vida da

chenopodina em reticulócitos de mamífero é de mais de 30 horas, em leveduras o tempo é de mais de 20 horas, e em *Escherichia coli* é de mais de 10 horas. Uma vez que se planeja produzir esta proteína em uma levedura, este tempo contribuirá para este processo pois permitirá sua extração e purificação.

Foram obtidas as sequências genômicas para a proteína total e subunidade básica, além da preferência de códons utilizados pela *Pichia pastoris*. Quando realizada a checagem através da ferramenta "Translate", verificou-se correspondência entre a sequência primária obtida a partir da mesma e a obtida através do NCBI, verificando então o sucesso da pesquisa.

Não foram encontradas patentes depositadas ou concedidas com os termos pesquisados.

Conclusões:

Após a realização deste trabalho, foi possível obter dados sobre a estrutura, composições bioquímica e química da chenopodina que estão de acordo com dados disponíveis em outros trabalhos com globulinas-11S de mesma espécie ou espécies diferentes. Foi possível ainda obter sequências genômicas da proteína completa e da subunidade básica que, espera-se, tenha atividade biológica por si mesma.

Estas informações contribuirão para a produção da chenopodina em levedura em etapa posterior do trabalho bem como para justificar suas atividades biológicas.

Referências bibliográficas

BRINEGAR, C.; GOUNDAN, S.; Isolation and characterization of Chenopodin, the 11S Seed Storage Protein of Quinoa (*Chenopodium quinoa*). **Food Chemistry**, v. 41, p.182-185, 1993.

FERREIRA, E. A. M. ; POMPEU, D.G. ; GONCALVES, D. B. ; SILVA, J. A. ; GRANJEIRO, P. A. Estudo da especificidade a açúcares e avaliação das atividades antiinflamatórias e antinoceptivas da lectina de sementes de *Chenopodium quinoa*. In: V JORNADA ACADÊMICA INTERNACIONAL, 2014, Divinópolis. **V Jornada Acadêmica Internacional**, 2014.

MAIA, F.M; POMPEU, D.G. ; GRANJEIRO, P. A.; THOME, R.; SANTOS, H. B.; FERREIRA, E.; MICHELLIN M. A.; MURTA, E. F. C.; RIBEIRO, R. I. M. A. Lectin potentiates anti-tumor effect of dendritic cell-based vaccine in 4T1 tumor bearing mice. In: VIII SIMPÓSIO IBEROAMERICANO DE PLANTAS MEDICINAIS E III CONGRESSO

IBEROAMERICANO DE INVESTIGAÇÃO EM CÂNCER, 2016, ITAJAÍ/SC. **VIII Simpósio Iberoamericano de Plantas Medicinais e III Congresso Iberoamericano de investigação em câncer**, 2016.

POMPEU, D.G. ; MATTIOLI, M. A. ; RIBEIRO, R. I. M. A. ; GONÇALVES, .B. ; MAGALHAES, J. T. ; MARANGONI, S. ; SILVA, J. A. ; GRANJEIRO, P. A. Purification, partial characterization and antimicrobial activity of Lectin from *Chenopodium Quinoa* seeds. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 35, p. 696-703, 2015.

SINGH, A.; SELVAKUMAR, P.; SARASWAT, A.; TOMAR, P. P. S.; MISHRA, M.; SINGH, P. K.; SHARMA, A. K.; Characterization and cloning of an 11S Globulin with Hemagglutination activity from *Murraya paniculata*. **Protein and Peptide Letters**, v. 22, p. 750-761, 2015.

SPEHAR, C.R., SANTOS, R. L.B. Agronomic performance of quinoa selected in the Brazilian Savannah. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, 2005, v. 40, n.6, p. 609-612, 2005.

Sites:

BLAST: <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>>.

Acesso em 07/01/2017.

ExPASy: <web.expasy.org> Acesso em 07/01/2017.

Google Patents: <<https://patents.google.com/>> Acesso em 12/02/2017.

Kazuza: <www.kazuza.or.jp>. Acesso em 20/12/2016.

Mult Alain: <multalin.toulouse.inra.fr>. Acesso em 07/01/2017.

NCBI: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em 07/01/2017.

Patentes Online: <www.patentesonline.com.br>. Acesso em 12/02/2017.

Phyre2: <www.sbg.bio.ic.ac.uk>. Acesso em 07/01/2017.

Sequence Manipulation Suite: <www.bioinformatics.org>. Acesso em 07/01/2017.

UniProt: <www.uniprot.org>. Acesso em: 07/01/2017.

WIPO: <<https://patentscope.int>>. Acesso em 12/02/2017.