

CLONAGEM DO GENE TROPINONA REDUTASE II (*tr2*) RESPONSÁVEL PELA SÍNTESE DE CALISTEGINAS EM BATATA SILVESTRE *Solanum commersonii*

GABRIEL DALMAZO¹; FABIANA NORA²; MAURICIO SEIFERT²; CIRO GUIDOTTI²; LEONARDO NORA³

¹Universidade Federal de Pelotas – gdalmazo@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas

³Universidade Federal de Pelotas – l.nora@me.com

1. INTRODUÇÃO

O metabolismo secundário de plantas constitui uma fonte de moléculas bioativas de grande importância. Os metabólitos secundários presentes em plantas comestíveis podem desempenhar várias funções no organismo humano, tendo-se como exemplo mais marcante e bem estudado, os benefícios de antioxidantes naturais presentes em uma gama de alimentos. Outra aplicação de grande importância reside no uso desses compostos diretamente no tratamento de doenças, o que coloca as plantas em uma posição de destaque como fornecedoras de moléculas complexas.

O processo de descoberta de novos metabólitos secundários encontra-se em curso e em grande expansão. Entretanto, a função dos mesmos, tanto *in planta* quanto *in vivo* tem sido pouco estudada. Nesse contexto, as calisteginas, alcalóides nor-tropânicos originados da rota de poliaminas (putrescina), constituem exemplo de molécula bioativa ainda não caracterizada quanto a função em sistemas biológicos. A síntese das mesmas depende da enzima tropinona redutase 2 (TR2), a qual reduz o substrato tropinona à pseudotropina. Calisteginas estão presentes em várias plantas utilizadas na alimentação humana (batata, batata doce, tomate, repolho, beringela, amora, fisalis, etc.) assim como em plantas medicinais e tóxicas (ASANO, 2000). Esses compostos apresentam atividade inibitória sobre uma série de enzimas glicosidases, (ASANO, 1995, 1997; KATO, 2011). Este fato direcionou os estudos a respeito das calisteginas, concentrando-os principalmente nas possíveis aplicações na área medicinal. Recentemente JOCKOVIĆ et al. (2013) demonstrou a atividade de calisteginas sobre enzimas responsáveis por processos de absorção de carboidratos, abrindo caminho para o entendimento dos efeitos desses compostos sobre o organismo humano.

O uso de engenharia metabólica em estudos que visam o entendimento da função de compostos secundários tem sido amplamente difundido (VEMURI, 2005). Ao alterar-se as concentrações desses compostos, a partir da alteração de expressão dos respectivos genes presentes em suas rotas metabólicas, obtêm-se valiosos discernimentos quanto às suas funções. Neste contexto, o objetivo desse estudo foi dar o primeiro passo em direção ao entendimento da função das calisteginas *in planta*, através da clonagem do gene chave *tr2* em *Solanum commersonii*.

2. METODOLOGIA

Amostras de tubérculos de *S. commersonii* foram colhidos nas localidades da Praia do Laranjal, Pelotas/RS (Lat. 31° 44' 56" S, Long. 52° 13' 25" O), sendo mantidos primeiramente a 4°C por 30 dias para superação de dormência. Após um processo de sanitização, os tubérculos foram plantados em frascos MAGENTA® GA7 contendo vermiculita autoclavada e mantidos a 23°C para a brotação. Segundo NAKAJIMA e HASHIMOTO (1999), as raízes são um dos locais de maior atividade do gene *tr2*, mais especificamente nas ramificações secundárias e terciárias, por esta razão este tecido foi escolhido para ser submetido a extração de RNA total.

O processo de isolamento de RNA foi feito utilizando-se diferentes amostras de raiz provenientes de uma planta selvagem de *S. commersonii*. As raízes armazenadas a -80 °C foram imediatamente transferidas para um recipiente contendo nitrogênio líquido, onde permaneceram até o momento de serem processadas. Cada amostra (100mg) foi transformada em um pó fino utilizando-se grau e pistilo juntamente com nitrogênio líquido. A extração de RNA total foi feita utilizando-se o kit comercial *RNAeasy Plant Mini Kit* (Qiagen®, Cat.: 74903) de acordo com as instruções do fabricante. A remoção de vestígios de DNA foi feita utilizando-se a enzima *DNAse I recombinant, RNAase-free™* (Roche®, Cat.: 04 716 728 001)

A obtenção da região codificante do gene *tr2* foi possível através da síntese de cDNA a partir do RNA total de *S. commersonii*. O RNA proveniente de 5 diferentes extrações foi transcrito a cDNA utilizando-se o kit *SuperScript™ III Reverse Transcriptase* (Invitrogen™, Cat. no: 18080-093) conforme instruções do fabricante com algumas modificações.

A amplificação da região codificante do gene *tr2* foi feita pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando-se oligonucleotídeos específicos. (Forward: ATGGCAGCAGGAAGATGG; Reverse: TGATAAACTTGCAAACCATAGAC).

Como base para a construção destes, foi utilizada a sequência do gene *tr2* de *Solanum tuberosum* (número de acesso no *Gene Bank*: AJ292343), previamente sequenciada. Os oligonucleotídeos foram desenhados utilizando-se a ferramenta *Perl Primer™* (MARSHALL, 2004) A reação de PCR foi feita utilizando-se uma enzima DNA polimerase de alta fidelidade (*Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* Cat.: #M0530) de acordo com instruções do fabricante.

O isolamento do fragmento de interesse foi feito através de eletroforese em gel de agarose a 1%. A região do gel contendo o fragmento de interesse foi excisada com o auxílio de uma lâmina estéril. O DNA contido no gel foi purificado utilizando-se o kit *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen Cat. No. 28704) de acordo com as instruções do fabricante.

Com a finalidade de posterior sequenciamento, o fragmento de DNA correspondente a região codificante de *tr2* de *S. commersonii* foi ligado ao vetor linearizado *pGEM®-T Easy*, sendo posteriormente submetido a sequenciamento a fim de confirmar a inserção do gene *tr2*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado do sequenciamento pode ser visualizado na Figura 1. A sequência de DNA de *Solanum commersonii* obtida (Sc) foi traduzida para a sua respectiva sequência proteica. A comparação foi realizada usando-se como base

sequencias de *tr2* publicadas para *Solanum tuberosum* cv. Liu (StLiu) e *S. tuberosum* cv Desire (StDes).

StLiu	MAAGRWNLEGCTALVTGGS RG IGYGIVEELASLGASVYTC SR NQKELNECLTQWR SKG FK 60
Sc	MAAGRWNLEGCTALVTGGS RG IGYGIVEELASLGASVYTC SR NQKELNECLTQWR SKG FK 60
StDes	MAAGRWNLEGCTALVTGGS RG IGYGIVEELASLGASVYTC SR NQKELNECLTQWR SKG FK 60

	▼
StLiu	VEASVCDLSSRSER EE FIK TV ANHF DG KL NIL VNNAGI VI Y KE AKDYTMEDYSLIMSINF 120
Sc	VEASVCDLSSRSER EE FIK TV ANHF DG KL NIL VNNAGI VI Y KE AKDYTMEDYSLIMSINF 120
StDes	VEASVCDLSSRSER EE FIK NV ANHF DG KL NIL VNNAGI VI Y KE AKDYTMEDYSLIMSINF 120

	▼
StLiu	EAA Y HLSVLAHP FL KASQ RGN VVFI SS ISGASAL PY E AV Y GAT KGAM DQL TRCLAF EWA K 180
Sc	EAA Y HLSVLAHP FL KASQ RGN VVFI SS ISGASAL PY E AV Y GAT KGAM DQL TRCLAF EWA K 180
StDes	EAA Y HLSVLAHP LL KASQ RGN VVFI SS ISGASAL PY E AV Y GAT KGAM DQL TRCLAF EWA K 180

	▼
StLiu	DNIRVNGVAP GV IASS MV EMTIQ DQ EQKEN LDK LIDRCALHRMGEPKELAAV VAF LC FPA 240
Sc	DNIRVNGVAP GV IASS MV EMTIQ DP EQKEN LDK LIDRCALHRMGEPKELAAV VAF LC FPA 240
StDes	DNIRVNGVAP GV IASS MV EMTIQ DP EQKEN LDK LIDRCALHRMGEPKELAAV VAF LC FPA 240

StLiu	ASYVTGQIIYVDGGFMANGGF 261
Sc	ASYVTGQIIYVDGGFMANGGF 261
StDes	ASYVTGQIIYVDGGFMANGGF 261

Figura 1. Comparação entre sequencias de *S. tuberosum* cv Liu (StLiu) *S. Commersonii* (Sc) e *S. tuberosum* cv Desire (StDes). (■) Ligação de co-substrato, NADPH; (■) AA's conservados na família SDR; (■) Sítio de ligação de Tropinona; (■) Região cataliticamente importante (YxxxK); (▼) Alterações de AA's.

Pode-se verificar a grande similaridade entre a sequencia de *S. commersonii* em relação à espécie cultivada *S. tuberosum*. Tanto o sítio de ligação do substrato Tropinona (■) quanto o sítio de ligação do co-substrato NADPH (■), estão totalmente conservados, o que pode indicar a completa funcionalidade da enzima resultante. Curiosamente, as regiões tidas como conservadas na família de proteínas SDR (dehidrogenases/redutases de cadeia curta – *Short chain dehydrogenases/reductases*), grifadas em azul, sofreram alterações de AA's. No entanto, em todos os casos a sequencia de *S. commersonii* foi similar a pelo menos uma das sequencias de *S. tuberosum*, indicando que estas alterações não implicam em perda de função.

4. CONCLUSÕES

O processo de clonagem da região codificante do gene *tr2* de *S. commersonii* foi realizado com sucesso, produzindo uma cópia viável para ser utilizada em experimentos que visem alterações na rota dos tropano alcalóides nesta planta. A utilização do gene em vetores de silenciamento gênico e/ou expressão poderá trazer respostas com relação a função das calisteginas, já que será possível a alteração de suas concentrações em plantas com a rota metabólica alterada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASANO, N., A. Kato, et al. Calystegins of *Physalis-alkkekengi* var *francheti* (Solanaceae) - structure determination and their glycosidase inhibitory activities. **European Journal of Biochemistry**, v.229, n.2, p.369-376, 1995.

ASANO, N., A. Kato, et al. The effects of calystegines isolated from edible fruits and vegetables on mammalian liver glycosidases. **Glycobiology** v.7, n.8, p.1085-1088, 1997.

ASANO, N. Water soluble nortropane alkaloids in crude drugs, edible fruits and vegetables: biological activities and therapeutic applications. **Mechanisms of Ageing and Development** v.116, n.2-3, p.155-156, 2000.

KATO, A., L. WANG, et al. Calystegine B3 as a specific inhibitor for cytoplasmic α -mannosidase, Man2C1. **Journal of Biochemistry** v.149, n.4, p.415-422, 2011.

JOCKOVIĆ, N., W. FISCHER, et al. Inhibition of Human Intestinal α -Glucosidases by Calystegines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v.61, n.23, p.5550-5557, 2013.

MARSHALL, O. J. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. **Bioinformatics** v.20, n.15, p.2471-2472, 2004.

NAKAJIMA, K., Y. OSHITA, et al. Structures and expression patterns of two tropinone reductase genes from *Hyoscyamus niger*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry** v.63, n.10, p.1756-1764, 1999.

VEMURI, G. N. and ARISTIDOU, A. A. (2005). Metabolic Engineering in the -omics Era: Elucidating and Modulating Regulatory Networks. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** v.69, n.2, p.197-216, 2005.