



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

BEATRIZ CAROLINE NISHI

**OSMOTINA DE *Plumeria rubra*: IDENTIFICAÇÃO, CLONAGEM MOLECULAR,
MODELAMENTO TRIDIMENSIONAL E POSSÍVEL EFEITO MIMÉTICO DA
ADIPONECTINA**

FORTALEZA

2016

BEATRIZ CAROLINE NISHI

OSMOTINA DE *Plumeria rubra*: IDENTIFICAÇÃO, CLONAGEM MOLECULAR,
MODELAMENTO TRIDIMENSIONAL E POSSÍVEL EFEITO MIMÉTICO DA
ADIPONECTINA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Cléverson Diniz
Teixeira de Freitas

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N638o Nishi, Beatriz Caroline.

Osmotina de *Plumeria rubra*: identificação, clonagem molecular, modelamento tridimensional e possível efeito mimético da Adiponectina / Beatriz Caroline Nishi. – 2016.
112 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2016.

Orientação: Prof. Dr. Cléverson Diniz Teixeira de Freitas.

1. PR proteína. 2. Látex. 3. Modelagem comparativa. I. Título.

CDD 572

BEATRIZ CAROLINE NISHI

OSMOTINA DE *Plumeria rubra*: IDENTIFICAÇÃO, CLONAGEM MOLECULAR,
MODELAMENTO TRIDIMENSIONAL E POSSÍVEL EFEITO MIMÉTICO DA
ADIPONECTINA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em: ____/____/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cléverson Diniz Teixeira de Freitas (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Bruno Lopes de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus, minha família e todos que acreditaram em mim.

FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado com o suporte das seguintes instituições:

Universidade Federal do Ceará (UFC), através do Laboratório de Biotecnologia de Proteases Vegetais, coordenado pelo Prof. Dr. Cléverson Diniz Teixeira de Freitas.

Universidade Federal do Ceará (UFC), através do Laboratório de Plantas Laticíferas, coordenado pelo Professor Dr. Márcio Viana Ramos.

Universidade Federal do Ceará (UFC), através do Laboratório de Genética Molecular, coordenado pelo Professor Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP).

Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO).

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Cléverson Diniz Teixeira de Freitas, por me orientar durante essa jornada turbulenta do mestrado, por toda disposição em me ajudar quando eu estava sem rumo e por toda paciência e dedicação.

Ao Prof. Dr. Márcio Viana Ramos por todos os ensinamentos dados nesses quase 6 anos desde que entrei no laboratório, pelos conselhos, críticas e por ser um exemplo de profissional a seguir.

Ao Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro, pela orientação nos experimentos de clonagem, por dispor da estrutura do Laboratório de Genética Molecular e por ter aceitado participar da banca examinadora.

Ao Dr. Bruno Lopes de Sousa, pela simpatia no dia-a-dia e por ter aceitado compor a banca examinadora.

Ao José Ednézio da Cruz e Sulen Carneiro pela disponibilidade em me esclarecer dúvidas e me ajudarem.

À Carol Viana por toda amizade durante esses 6 anos que estou no laboratório, incentivo, companhia diária e por ajudar na revisão do presente trabalho.

À Zelândia Rocha, por ter me ajudado imensamente durante o mestrado, por toda amizade, apoio e companhia diária.

À Rafaela Oliveira e Camila Tauane por toda a amizade, companheirismo e ajuda durante esse período do mestrado.

A todos meus companheiros de laboratório que não citei anteriormente, mas que são como uma segunda família para mim.

A minha família, em especial minha mãe e minha irmã, por todo amor e me apoiarem durante todo o percurso até aqui.

Aos membros da ZAUN PREDATORS (melhor clã de que já participei): João Victor (Thoudervon I), Renato Marques (Necromon IV), Marília Nunes (Ligeia), João Raphael (Slavert), PV Uchoa (K4IN) e Joatan Lucas (IProtectionI) pela amizade e bons momentos no lolzinho e fora dele.

A todos meus amigos que me apoiaram e acreditaram em mim.

Às minhas gatas: Mimi e Oncinha, por serem as coisas fofas que me trazem alegria diariamente.

Ao David Bowie, cujas músicas me inspiraram durante a maior parte do tempo em que eu escrevia este trabalho.

A Deus, que me deu forças pra completar este trabalho. E por ter colocado pessoas tão especiais na minha vida.

Obrigada.

“Do or do not. There is no try.” (Master Yoda)

RESUMO

Proteínas relacionadas à patogênese (PR proteínas) são expressas em resposta a infecções por patógenos e estresses abióticos. A família PR-5 inclui proteínas relacionadas à taumatina e a osmotina. Neste estudo, a presença de uma proteína do tipo osmotina de aproximadamente 22 kDa, no látex de *Plumeria rubra*, foi confirmada por meio de ensaios de *western blot* utilizando anticorpos anti-CpOsm (osmotina de *C. procera*), como descrito por Freitas e colaboradores (2015). O fragmento de cDNA codificando esta osmotina (PrOsm) foi clonado, a proteína predita foi caracterizada e sua estrutura foi modelada *in silico*. A amplificação do fragmento de cDNA codificante da PrOsm foi realizado por meio de RT-PCR. O fragmento amplificado, de aproximadamente 600 pb, foi ligado a um vetor de clonagem (pGEM-T *Easy*). Células de *E. coli* DH5 α eletrocompetentes foram então transformadas com os plasmídeos recombinantes (pGEM-T *Easy*::PrOsm) e os insertos foram sequenciados. As sequências obtidas foram submetidas a análises *in silico*. As osmotinas de *P. rubra* (PrOsms) são proteínas de aproximadamente 22 kDa, apresentando 16 resíduos de cisteína, envolvidos na formação de 8 ligações dissulfeto. A estrutura das PrOsms exibe uma arquitetura típica de TLPs, composta por três domínios. O mapeamento dos potenciais eletrostáticos mostrou que as PrOsms apresentam, em sua superfície, uma fenda de natureza acídica, localizada entre os domínios I e II. A capacidade potencial das PrOsms de interagir com os receptores de adiponectina humana (AdipoR1 e AdipoR2) foi predita *in silico*. O *docking* molecular sugere que as PrOsms são capazes de interagir com os receptores de adiponectina, de forma similar a AdipoQ, sendo portanto potenciais alvos terapêuticos para o controle de doenças relacionadas à obesidade, incluindo diabetes tipo 2 e síndrome metabólica.

Palavras-chave: PR proteína. Látex. Modelagem comparativa.

ABSTRACT

Pathogenesis-related proteins (PRs) are expressed in response to pathogenic infections and abiotic stresses. PR-5 family includes proteins related to thaumatin and osmotin. In this study, the presence of an ~22 kDa osmotin-like protein in *Plumeria rubra* latex was confirmed by western blot assay using anti-CpOsm antibodies, as described by Freitas *et al.*, 2015. The cDNA fragment encoding this osmotin (PrOsm) was cloned, and then the predicted protein was characterized and modeled *in silico*. The amplification of the cDNA fragment encoding the PrOsm was carried out by RT-PCR. The PCR product was ligated into pGEM-T *Easy* vector and cloned in *E. coli* DH5 α cells. Clones obtained were submitted to sequencing. The computational analysis of the deduced sequences of *P. rubra* osmotins (PrOsms) showed that the proteins have an apparent molecular weight about 22 kDa and contain 16 cysteine residues involved in 8 disulfide bonds, stabilizing the protein structure. The PrOsms structure exhibits a typical architecture of TLPs, composed by three domains. Mapping of the electrostatic potentials showed that PrOsms contain, on its surface, an acidic cleft, between domains I and II. The PrOsms were evaluated for their ability to interact with human adiponectin receptors (AdipoR1 and AdipoR2) *in silico*. Molecular docking suggests that PrOsms are able to interact with adiponectin receptors, similarly to AdipoQ, being potential therapeutic targets for the control of obesity-related diseases, including type 2 diabetes and metabolic syndrome.

Keywords: PR protein. Latex. Comparative modeling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura tridimensional da adiponectina humana (AdipoQ) e seus receptores (AdipoR1 e AdipoR2)	25
Figura 2 - Planta <i>Plumeria Rubra</i> L.....	27
Figura 3 - Mapa e pontos de referência da sequência do vetor de clonagem pGEM-T <i>Easy</i>	30
Figura 4 - Esquema geral do procedimento de <i>blue/white screening</i>	32
Figura 5 - Esquema geral do procedimento de modelagem por homologia.....	33
Figura 6 - Detecção de proteínas do tipo osmotina por <i>western blot</i>	55
Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) do RNA total extraído de folhas de <i>P. rubra</i>	56
Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) do produto de PCR amplificado a partir de cDNA de <i>P. rubra</i>	58
Figura 9 - Colônias azuis e brancas de células de <i>E. coli</i> DH5 α transformadas com pGEM – T <i>Easy</i> ::PrOsm.....	59
Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) dos plasmídeos pGEM-T <i>Easy</i> ::PrOsm extraídos de células de <i>E. coli</i> DH5 α após digestão com EcoRI.....	60
Figura 11 - Sequência consenso de nucleotídeos e aminoácidos predita para a PrOsm1.....	62
Figura 12 - Sequência consenso de nucleotídeos e aminoácidos predita para a PrOsm3.....	62
Figura 13 - Sequência consenso de nucleotídeos e aminoácidos predita para a PrOsm4.....	63
Figura 14 - Alinhamento múltiplo das sequências de cDNA das osmotinas de <i>P. rubra</i>	63
Figura 15 - Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos preditas para as osmotinas de <i>P. rubra</i>	64
Figura 16 - Alinhamento da inserção presente na PrOsm4 e sequência correspondente a duplicação na proteína.....	66

Figura 17 - Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos das osmotinas de <i>P. rubra</i> e outras proteínas do tipo osmotina/taumatina.....	68
Figura 18 - Árvore filogenética das estruturas primárias de diferentes proteínas da família PR-5.....	71
Figura 19 - Modelos tridimensionais obtidos para PrOsm1 usando diferentes plataformas.....	72
Figura 20 - Modelos tridimensionais obtidos para a PrOsm3 usando diferentes plataformas.....	73
Figura 21 - Modelos tridimensionais obtidos para da PrOsm4 usando diferentes plataformas.....	74
Figura 22 - Sobreposição dos modelos tridimensionais obtidos para cada osmotina de <i>P. rubra</i>	75
Figura 23 - Gráfico de Ramachandran dos modelos tridimensionais obtidos para a PrOsm1.....	76
Figura 24 - Gráfico de Ramachandran dos modelos tridimensionais obtidos para a PrOsm3.....	77
Figura 25 - Gráfico de Ramachandran dos modelos tridimensionais obtidos para a PrOsm4.....	78
Figura 26 - Topologia da estrutura secundária das osmotinas de <i>P. rubra</i>	82
Figura 27 - Estrutura secundária deduzida para as osmotinas de <i>P. rubra</i>	83
Figura 28 - Domínios estruturais das osmotinas de <i>P. rubra</i>	84
Figura 29 - Sobreposição dos modelos 3D de cada osmotina de <i>P. rubra</i> com a estrutura tridimensional da CpOsm (4L2J).....	85
Figura 30 - Perfil de hidrofobicidade dos modelos de superfície das osmotinas de <i>P. rubra</i> e CpOsm (4L2J).....	87
Figura 31 - Mapeamento dos potenciais eletrostáticos dos modelos de superfície das osmotinas de <i>P. rubra</i> e comparação com a CpOsm (4L2J).....	88
Figura 32 - Fenda acídica representada em modelos de superfície das osmotinas de <i>P. rubra</i> e comparação com a CpOsm (4L2J).....	89

Figura 33 - Modelos tridimensionais dos complexos PrOsm/AdipoR1 e AdipoQ/AdipoR1.....	91
Figura 34 - Modelos tridimensionais dos complexos PrOsm/AdipoR2 e AdipoQ/AdipoR2.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Hierarquia taxonômica da planta <i>Plumeria rubra</i> L.....	27
Tabela 2 - Comparação das propriedades físico-químicas das osmotinas de <i>P. rubra</i> com outras proteínas do tipo osmotina descritas na literatura.....	65
Tabela 3 - Alinhamento local da sequência de aminoácidos deduzida das osmotinas de <i>P. rubra</i> por meio de BLASTp contra banco de dados de proteínas não-redundante.....	67
Tabela 4 - Avaliação da qualidade dos modelos tridimensionais das osmotinas de <i>P. rubra</i> construídos por diferentes plataformas.....	80

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

BCIP/NBT	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato/ nitroblue tetrazólio
BLAST	<i>Basic Local Alignment search Tool</i>
cDNA	DNA complementar
CpOsm	Osmotina de <i>Calotropis procera</i>
CTAB	Cetiltrimetilamônio
DEPC	Dietilpirocarbonato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilenodiaminotetra-acético
IAA	Iodoacetamida
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
O-GlcNAc	β -N-acetilglicosamina
OLP	Proteínas do tipo osmotina
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PrOsm	Osmotina de <i>Plumeria rubra</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TLP	Proteína do tipo taumatina
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-tiogalactopiranosídeo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Látex	19
1.1.1	<i>Aspectos gerais</i>	19
1.1.2	<i>Papel fisiológico</i>	19
1.2	<i>Proteínas relacionadas à patogênese</i>	20
1.2.1	<i>Proteínas da família PR-5</i>	21
1.2.1.1	Osmotina.....	22
1.3	Adiponectina	23
1.4	Plantas laticíferas	26
1.5	<i>Plumeria rubra</i> L.	26
1.6	Clonagem molecular	27
1.6.1	<i>Escherichia coli DH5α</i>	28
1.6.2	<i>Vetor de clonagem pGEM-T Easy</i>	29
1.6.3	<i>Blue/white screening</i>	31
1.7	Modelagem por homologia	32
1.7.1	<i>Seleção de moldes a partir de proteínas com alta similaridade</i>	34
1.7.2	<i>Alinhamento de sequências</i>	34
1.7.3	<i>Construção de modelos</i>	34
1.7.3.1	CPHmodels 3.2.....	35
1.7.3.2	Modeller.....	35
1.7.3.3	Phyre2.....	35
1.7.3.4	Swiss Model.....	36
1.7.4	<i>Validação dos modelos</i>	37
1.7.5	<i>Aplicações da modelagem por homologia</i>	38
2	HIPÓTESE	39
3	OBJETIVOS	40
3.1	Objetivo geral	40
3.2	Objetivos específicos	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	Materiais	41

4.1.1	<i>Material vegetal</i>	41
4.1.2	<i>Reagentes</i>	41
4.1.3	<i>Células e vetor de clonagem</i>	42
4.2	Métodos	42
4.2.1	<i>Coleta e fracionamento do látex</i>	42
4.2.2	<i>Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (1D SDS - PAGE)</i>	42
4.2.3	<i>Western blot</i>	43
4.2.4	<i>Preparo de material livre de RNase</i>	44
4.2.5	<i>Extração de RNA Total</i>	44
4.2.5.1	Extração de RNA total utilizando o método do CTAB/cloreto de lítio	44
4.2.5.2	Extração de RNA total utilizando o kit <i>SV Total RNA Isolation System</i> (Promega).....	45
4.2.6	<i>Eletroforese em gel de Agarose</i>	46
4.2.7	<i>Análise da integridade do RNA total</i>	46
4.2.8	<i>Tratamento do RNA total com DNase</i>	47
4.2.9	<i>Obtenção da primeira fita de cDNA</i>	47
4.2.10	<i>Amplificação da região codificante da PrOsm</i>	47
4.2.11	<i>Ligação do produto amplificado por PCR ao vetor de clonagem pGEM-T Easy</i>	48
4.2.12	<i>Produção de células de Escherichia coli DH5α eletrocompetentes</i>	49
4.2.13	<i>Transformação de Escherichia coli DH5α</i>	49
4.2.14	<i>Seleção de clones por blue/white screening</i>	50
4.2.15	<i>Purificação de DNA plasmidial</i>	50
4.2.16	<i>Digestão com a enzima de restrição EcoRI</i>	51
4.2.17	<i>Sequenciamento de DNA plasmidial</i>	51
4.2.18	<i>Análises das sequências</i>	52
4.2.19	<i>Análises filogenéticas</i>	52
4.2.20	<i>Modelagem computacional</i>	53
4.2.21	<i>Validação dos modelos</i>	53
4.2.22	<i>Docking molecular</i>	53
5	RESULTADOS	55
5.1	Detecção de proteínas do tipo osmotina no látex de <i>P. rubra</i>	55

5.2	Isolamento e caracterização das sequências codificantes das PrOsms.....	56
5.3	Caracterização <i>in silico</i> das PrOsms.....	61
5.4	Predição da interação das PrOsms com os receptores de adiponectina.....	90
6	DISCUSSÃO.....	93
7	CONCLUSÃO.....	99
	REFERÊNCIAS.....	100
	ANEXO A - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS.....	112

1 INTRODUÇÃO

1.1 Látex

1.1.1 Aspectos gerais

O látex é uma dispersão coloidal estável cujo maior constituinte é o poliisopreno (borracha). Nesta dispersão, também são encontrados proteínas, terpenos, alcalóides, vitaminas, lipídios, amido, taninos, resinas e algumas estruturas subcelulares (HAGEL; YEUNG; FACCHINI, 2008). Na maioria das plantas, o látex apresenta aspecto leitoso, no entanto, algumas espécies exibem cor amarela, laranja e carmesim (DOMSALLA; MELZIG, 2008).

O látex é produzido e armazenado por células vivas especializadas denominadas laticíferos, sendo exsudado quando a planta sofre alguma injúria mecânica ou após ataque por herbivoria (KONNO, 2011). Os laticíferos podem ser classificados em dois grupos principais: articulados e não articulados. Os laticíferos articulados são constituídos por cadeias longitudinais formadas por muitas células, cujas paredes celulares, que as separam individualmente, podem permanecer intactas ou apresentar perfurações, interconectando-as. Os laticíferos não articulados, todavia, se originam de uma única célula que cresce entre os espaços intracelulares, eventualmente se ramificando por todo o tecido da planta, numa disposição que se assemelha às hifas de fungos (KEKWICK, 2001).

1.1.2 Papel fisiológico

Diversas funções têm sido propostas para o látex, tais como: excreção de metabólitos, regulação do balanço de água, cicatrização de tecidos danificados e defesa contra herbívoros e patógenos (FARRELL; DUSSOURD; MITTER, 1991). Quanto ao aspecto de defesa, o látex compreende tanto um mecanismo de defesa físico quanto químico. Físico porque quando a planta sofre uma injúria, o látex é imediatamente exsudado e ao entrar em contato com o ar, esse fluido progressivamente sofre coagulação, formando uma barreira física que impede a

entrada de microrganismos patogênicos, além de ser capaz de imobilizar pequenos insetos (KONNO, 2011; SOUZA *et al.*, 2011). Químico porque várias substâncias químicas foram identificadas como tóxicas para insetos e microrganismos, entre elas as proteínas envolvidas em atividades antioxidativas, enzimas hidrolíticas e proteínas relacionadas à patogênese (HAGEL; YEUNG; FACCHINI, 2008; SYTWALA; GÜNTHER; MELZIG, 2015).

1.2 Proteínas Relacionadas à Patogênese

Proteínas Relacionadas à Patogênese (**PRs proteínas**) são definidas como um conjunto de proteínas relacionadas cuja expressão é fortemente induzida em resposta à infecção por patógenos. Essas proteínas apresentam diversas propriedades bioquímicas em comum, tais como: massa molecular, estabilidade à pH, termoestabilidade e alta resistência a proteólise (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999).

PR proteínas de plantas têm sua expressão induzida por meio de diferentes sinais como síntese de ácido salicílico, ácido jasmônico, ácido abscísico, etileno, auxinas, salinidade, seca, frio, luz UV, ferimentos e infecções por vírus e fungos (CAMPOS *et al.*, 2008). A constatação de que PR proteínas, consideradas anteriormente como planta-específicas, são também expressas em outros organismos (como fungos e animais), sugere que essas proteínas compartilham uma origem evolutiva comum e possuem atividade essencial para o funcionamento e sobrevivência dos organismos que as contêm (EDREVA, 2005).

Atualmente as PR proteínas têm sido classificadas em 18 famílias (PR-1 a PR-18). Contudo, esse número de famílias pode aumentar à medida que novas proteínas são descobertas. Para ser classificada como uma PR proteína, esta deve ser expressa sob condições de infecção, mas não necessariamente em todas as condições patológicas. Indução apenas por estresses abióticos não é critério suficiente para inclusão de uma proteína como “relacionada à patogênese” (EDREVA, 2005). A divisão em famílias pode ser baseada na mobilidade das proteínas em géis nativos, estrutura primária, atividade enzimática e biológica (VIKTOROVA *et al.*, 2012).

1.2.1 Proteínas da família PR-5

Proteínas da família PR-5 são referidas como proteínas do tipo taumatina (TLPs) por compartilharem alta similaridade estrutural com a taumatina, uma proteína de sabor adocicado, isolada do fruto da planta tropical *Thaumatococcus daniellii* (VAN DER WEL; LOEVE, 1972). A doçura desta proteína está associada com as altas quantidades de lisina e certas repetições de lisina em sua estrutura primária. A menor quantidade de resíduos de lisina em outras proteínas PR-5 pode refletir a perda deste sabor doce (RICHARDSON; VALDES-RODRIGUEZ; BLANCO-LABRA, 1987). A família PR-5 inclui ainda as proteínas estreitamente relacionadas: osmotina, permatina e zeamatina (AHMED *et al.*, 2013).

A maioria das TLPs descritas possui uma massa molecular variando de 20 a 26 kDa (PETRE *et al.*, 2011) e estruturas primárias, secundárias e terciárias altamente conservadas na natureza. Outra característica comum às proteínas TLP é a presença de 10-16 resíduos de cisteína, que estão envolvidos na formação de 5-8 ligações dissulfeto (FREITAS *et al.*, 2011b).

Proteínas do tipo taumatina (TLP) têm sido descobertas em uma ampla gama de organismos (SHATTERS *et al.*, 2006), incluindo nematóides (KITAJIMA; SATO, 1999), insetos (BRANDAZZA *et al.*, 2004), fungos (GRENIER *et al.*, 2000; SAKAMOTO *et al.*, 2006), gimnospermas (O'LEARY *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2010) e angiospermas (VAN LOON *et al.*, 2006).

As relações evolutivas dentro da superfamília TLP ainda não são bem compreendidas. Um estudo de relações filogenéticas e estruturais realizado por Shatters e colaboradores (2006) sugere que proteínas PR5 de plantas são parafiléticas em angiospermas e relacionadas à TLPs de insetos e nematóides. No entanto, outro estudo indicou que TLPs são agrupadas em três grandes clados representando os reinos Animal, Vegetal e Fungi (SAKAMOTO *et al.*, 2006).

Mais de 20 membros da família PR-5, incluindo proteínas de animais, fungos e plantas, apresentam atividade antifúngica contra um amplo espectro de fungos fitopatogênicos (REISS; SCHLESIER; BRANDT, 2006; LIU; STURROCK; EKRAMODDOULLAH, 2010). Embora não exista dúvida de que algumas PR-5

proteínas sejam potentes moléculas antifúngicas, outros membros desta família são aparentemente desprovidos de tal atividade (BARRE *et al.*, 2000).

A estrutura tridimensional das PR-5 proteínas é composta principalmente por 3 domínios. O domínio I consiste de um sanduíche de 11 fitas- β achatadas (resíduos 1–53, 82–125 e 175–205) que formam o núcleo compacto da molécula. O domínio II é formado por várias alças que se estendem do domínio I, sendo estabilizado por 4 ligações dissulfeto (resíduos 126-174). O domínio III é formado por uma pequena alça (resíduos 54-81) com 2 ligações dissulfeto. Algumas PR-5 possuem uma fenda em sua superfície, formada pelos resíduos ácidos Glu₈₄, Asp₉₇, Asp₁₀₂ e Asp₁₈₅ que se estendem do domínio I ao II (MIN *et al.*, 2004), enquanto outras possuem uma superfície básica nesta região (SHIH *et al.*, 2001). Essa pequena diferença tem sido associada com a presença ou ausência de atividade antifúngica destas proteínas (MIN *et al.*, 2004; LIU; STURROCK; EKRAMODDOULLAH, 2010).

1.2.1.1 Osmotina

A osmotina é uma proteína catiônica de 244 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 26,4 kDa e ponto isoelétrico de 8,1 ou 7,8, de acordo com sua isoforma (VIKTOROVA *et al.*, 2012). Essa proteína foi isolada originalmente de células de tabaco (*Nicotiana tabacum*) adaptadas a estresse salino (SINGH *et al.*, 1987). A osmotina possui estrutura primária, secundária e terciária muito similar a taumatina e está incluída no grupo das PR-5 proteínas, por isso muitas vezes existe uma confusão na literatura em nomear uma nova proteína como proteína do tipo osmotina (OLP) ou proteína do tipo taumatina (TLP). Apesar da grande similaridade de sequência e conservação estrutural entre a osmotina e a taumatina, a primeira não possui sabor adocicado e a última não exibe atividade antifúngica. (YE *et al.*, 1999). Mesmo assim, muitas proteínas PR-5 com atividade antifúngica têm sido nomeadas tanto como TLPs quanto como OLPs (SHATTERS, *et al.* 2006).

Algumas OLPs são capazes de inibir a germinação de esporos e o crescimento de fungos fitopatogênicos *in vitro*. É proposto que este grupo de proteínas aja por meio da permeabilização da membrana plasmática ou interação com

receptores da membrana dos fungos, causando a lise desta. Entretanto, a atividade antifúngica também pode estar relacionada a outros mecanismos como a indução de apoptose, ação relatada para a osmotina de tabaco (*Nicotiana tabacum*) sobre *Saccharomyces cerevisiae* (CAMPOS *et al.*, 2008).

Recentemente, uma osmotina purificada do látex de *C. procera* apresentou atividade antifúngica. Esta proteína denominada de CpOsm reduziu a germinação de esporos e inibiu o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos: *Fusarium solani*, *Neurospora sp.* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Experimentos com vesículas unilamelares negativamente carregadas (LUVs) de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-1-glicerol (POPG) indicam que a ruptura da membrana envolve uma etapa de interação eletrostática entre CpOsm e cabeças fosfolipídicas negativamente carregadas sobre a superfície da membrana (FREITAS *et al.*, 2011a).

Subsequentemente à descoberta da osmotina de tabaco, diversas proteínas relacionadas, usualmente referidas como proteínas do tipo osmotina (OLPs), têm sido caracterizadas em diferentes espécies de plantas, incluindo os látices de *Hevea brasilienses* (SUBROTO *et al.*, 2001), *Carica papaya* (LOOZE *et al.*, 2009) e *Calotropis procera* (FREITAS *et al.*, 2011a).

Além de serem relacionadas com a defesa contra estresse hídrico, salino e contra diferentes fungos, as proteínas do tipo osmotina podem conferir proteção contra baixas temperaturas, como observado para uma osmotina purificada do caule de *Solanum dulcamara* (NEWTON; DUMAN, 2000). Assim, essas proteínas têm sido utilizadas como potenciais ferramentas biotecnológicas na produção de plantas transgênicas resistentes a esses estresses (GOEL *et al.*, 2010; DAS *et al.*, 2011).

1.3 Adiponectina

A adiponectina (Figura 1A) é o hormônio de natureza proteica mais abundante sintetizado pelos adipócitos. Esta proteína de 30 kDa, secretada pelo tecido adiposo, possui uma concentração no soro humano variando de 1 - 30 µg/mL (MATSUBARA *et al.*, 2002). Altos níveis de adiponectina, no soro, estão associados com o decréscimo do nível de triglicerídeos, aumento da sensibilidade à insulina, aumento dos níveis de colesterol HDL e efeitos anti-vasculares e anti-inflamatórios

(GROSSMANN *et al.*, 2010). Indivíduos obesos apresentam um forte decréscimo nos níveis de adiponectina circulante, o que pode estar associado a várias doenças (JARDÉ *et al.*, 2009). A deficiência em adiponectina está correlacionada com diabetes tipo 2, resistência à insulina, esteatose hepática e desordens vasculares (KUMAR *et al.*, 2015).

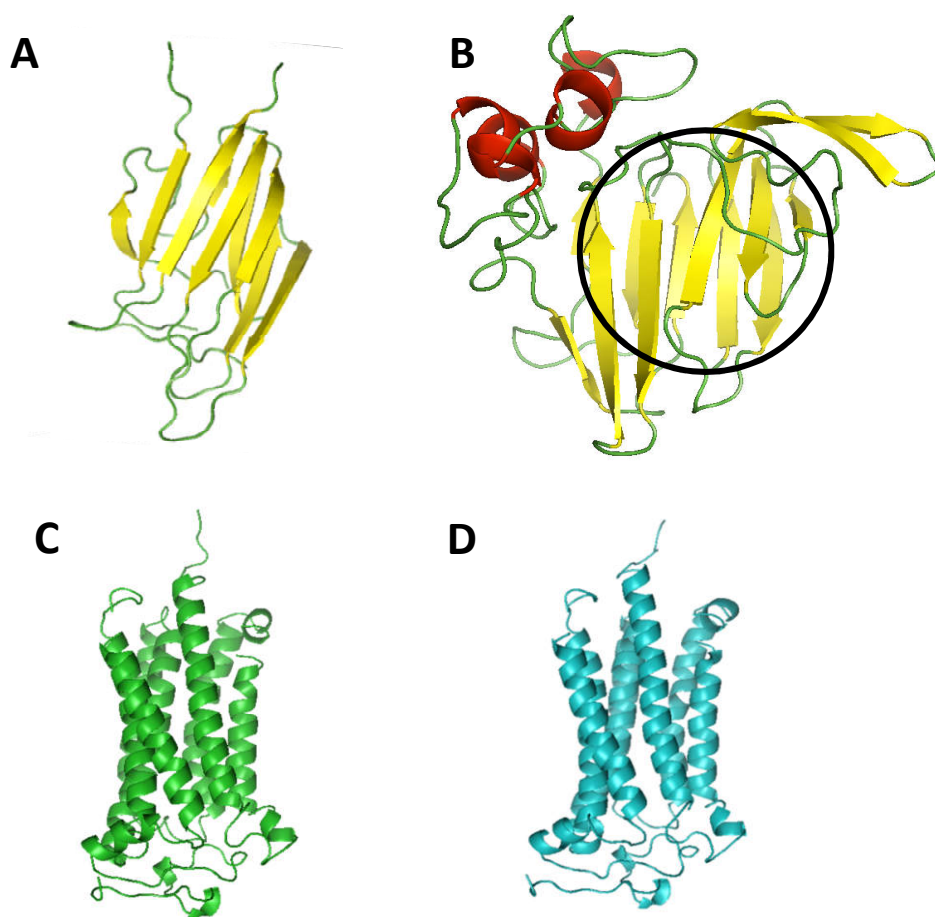
A adiponectina exerce sua atividade pela ligação à receptores de membrana plasmática, chamados de receptores de adiponectina (AdipoRs). Existem dois tipos de receptores de adiponectina: AdipoR1 e AdipoR2. O AdipoR1 (Figura 1C) é um receptor de alta afinidade pela forma globular (clivada) da adiponectina, possuindo também uma afinidade baixa pela proteína completa. Este receptor é expresso ubiquamente, sendo mais abundante no tecido muscular, mas também presente em células do endotélio e outros tecidos. O receptor AdipoR2 (Figura 1D) tem afinidade intermediária por ambas as formas de adiponectina e é predominantemente expresso no fígado (NKHATA *et al.*, 2009; NALABOLU; PALASAMUDRAM; JAMIL, 2014).

Humanos e camundongos compartilham 96% e 95% de identidade entre as sequências do AdipoR1 e AdipoR2, respectivamente. Estudos em camundongos têm confirmado que AdipoR1 e AdipoR2 são os principais receptores de adiponectina *in vivo* e mediam ações metabólicas da adiponectina (YAMAUCHI *et al.*, 2014).

Apesar da adiponectina e as PR-5 proteínas não compartilharem similaridade de sequência de aminoácidos, elas possuem estrutura terciária (Figura 1B) e propriedades funcionais muito similares. *Docking* molecular do complexo osmotina/AdipoR1 revelou que este apresenta uma arquitetura muito similar ao do complexo adiponectina/AdipoR1. Adicionalmente, ensaios *in vivo* demonstraram que a osmotina possui atividade biológica semelhante a da adiponectina, aumentando a concentração de citocinas sinalizadoras ativadas via AdipoR1. Desta forma, a osmotina tem sido recentemente muito estudada como um agonista da adiponectina em vários modelos biológicos (MIELE; COSTANTINI; COLONNA, 2011; KUMAR *et al.*, 2015). Interessantemente, todos os estudos descritos na literatura usaram a osmotina isolada de tabaco como proteína modelo (NARASIMHAN *et al.*, 2005; ARSENESCU *et al.*, 2011; MIELE; COSTANTINI; COLONNA, 2011; TRIVEDI *et al.*, 2012). Apesar das PR-5 proteínas apresentarem estruturas muito similares, elas apresentam pequenas diferenças em suas estruturas primárias, o que pode conferir

pequenas diferenças nas estruturas secundárias e terciárias, resultando em diferentes níveis de afinidade/interação/atividade biológica. Assim, estudar novas osmotinas de outras fontes biológicas é bastante interessante, no aspecto que novas osmotinas com maior especificidade e atividade que a osmotina de tabaco podem ser encontradas, em relação aos seus possíveis efeitos miméticos da adiponectina.

Figura 1 - Estrutura tridimensional da adiponectina humana (AdipoQ) e seus receptores (AdipoR1 e AdipoR2).



Representação em “cartoon” da estrutura tridimensional do monômero da adiponectina humana, AdipoQ – PDB: 4DOU (A), osmotina de *Nicotiana tabacum* - PDB: 1PCV (B) e os dois receptores de adiponectina humana: AdipoR1 - PDB: 3WXV (C) e AdipoR2 - PDB: 3WXW (D). O círculo preto evidencia que o domínio I da osmotina possui uma arquitetura semelhante à da adiponectina,

1.4 Plantas laticíferas

A ocorrência de plantas produtoras de látex é ampla. O látex tem sido reportado em mais de 12.000 espécies de plantas, representando mais de 20 famílias. Contudo, estima-se que existam cerca de 40 famílias e mais de 20 mil espécies (HAGEL; YEUNG; FACCHINI, 2008). Dentre as famílias com maior número de espécies produtoras de látex destacam-se: *Apocynaceae*, *Asteraceae*, *Euphorbiaceae*, *Moraceae*, *Papaveraceae* e *Sapotaceae* (PRYADARSHAN, 2011). As plantas laticíferas se encontram distribuídas por todo o globo, sendo, entretanto, mais abundantes em zonas tropicais (LEWINSOHN, 1991).

1.5 *Plumeria rubra* L.

Plumeria rubra L., conhecida popularmente como jasmim-manga, *frangipani* ou árvore-pagode, é uma árvore tropical nativa do sul do México. É conhecida por suas flores intensamente perfumadas que podem ser de diversas cores, possuindo uso ornamental (YE *et al.*, 2009). Esta planta possui 5-8 metros de altura e apresenta ramificações di ou tricotômicas (Figura 2). Os ramos possuem uma terminação cega que lhe dá uma aparência característica. Possui copa irregular, aberta, com folhas decíduas de 15-30 cm de comprimento, aglomeradas no ápice dos ramos (LINNAEUS, 1753).

Esta planta laticífera, pertencente à família *Apocynaceae* (Tabela 1), possui diversos usos medicinais como: proteção contra úlceras, doenças de pele, inflamação, artrite e constipação (HAMBURGER; CORDELL; RUANGRUNDSI, 1991). O extrato etanólico de flores de *P. rubra* mostrou efeito ansiolítico em camundongos (CHATTERJEE *et. al.*, 2013). Gaban e colaboradores (2013) reportaram efeito anti-hipertensivo e vasodilatador do látex de *Plumeria rubra*. Sobre estudos de identificação, purificação e caracterização de proteínas laticíferas, essa planta ainda é muito pouco estudada. Em 2010, Freitas e colaboradores mostraram que o látex desta planta é rico em proteínas com massas moleculares na faixa de 30 kDa, incluindo enzimas antioxidativas, quitinases e proteases. Recentemente, uma osmotina sem atividade antifúngica foi identificada no látex desta planta (FREITAS *et*

al., 2015). Contudo, a purificação e caracterização estrutural desta osmotina de *P. rubra* ainda não foi descrita na literatura. Assim, o presente trabalho é pioneiro neste aspecto, em estudar um material biológico ainda muito pouco estudado, principalmente em aspectos moleculares, estruturais e de prospecção biotecnológica de novas proteínas.

Figura 2 - Planta *Plumeria rubra* L.



Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 1 - Hierarquia taxonômica da planta *Plumeria rubra* L.

Taxon	Classificação
Reino	Plantae
Sub-reino	Viridiplantae
Infrarreino	Streptophyta
Superdivisão	Embryophyta
Divisão	Tracheophyta
Sub-divisão	Spermatophytina
Classe	Magnoliopsida
Superordem	Asteranae
Ordem	Gentianales
Família	Apocynaceae
Gênero	<i>Plumeria</i> L.
Espécie	<i>Plumeria rubra</i> L.

Fonte: Adaptado do banco de dados "Apocynaceae of North America Update" (2011).

1.6 Clonagem molecular

A clonagem de cDNA é uma das tecnologias fundamentais da biologia molecular. A maior parte do nosso conhecimento sobre transcritos é derivada da habilidade de preparar cópias de cDNA a partir do RNA, inseri-las em vetores e cloná-las em células hospedeiras (HARBERS, 2008). O protocolo convencional de clonagem molecular envolve 7 etapas principais: escolha do vetor de clonagem e organismo hospedeiro, preparação do fragmento de DNA ou cDNA, preparação do vetor, ligação do inserto ao vetor, introdução do DNA recombinante em um organismo hospedeiro e seleção de organismos transformados e identificação de clones contendo o inserto desejado (PADMANABHAN; BANERJEE; MANDI, 2011).

1.6.1 *Escherichia coli* DH5 α

A DH5 α é a estirpe de *E. coli* mais frequentemente usada como célula hospedeira em aplicações de clonagem molecular. Esta estirpe de *E. coli* foi desenvolvida em laboratório, para procedimentos de clonagem e, portanto não possui habitat natural e não existe na natureza. A DH5 α , assim como quase todas as estirpes de *E. coli* atualmente utilizadas, é derivada da estirpe K-12, isolada de fezes de um paciente com difteria em 1922 (CASALI, 2003). O nome DH provém das iniciais de Douglas Hanahan quem desenvolveu a estirpe (BETHESDA RESEARCH LABORATORIES, 1986). O genótipo da *E. coli* DH5 α é apresentado abaixo (MCLAB, 2015):

F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) gal phoA supE44 λ thi1 gyrA96 relA1

A *E. coli* DH5 α foi engenheirada de modo a possuir diversas mutações que a tornam útil para clonagem de DNA recombinante. Tais mutações foram desenvolvidas com o objetivo de gerar 3 características principais: a manutenção da integridade do plasmídeo transformado, possibilidade de identificação de clones positivos (contendo o inserto) e aumento da eficiência de transformação.

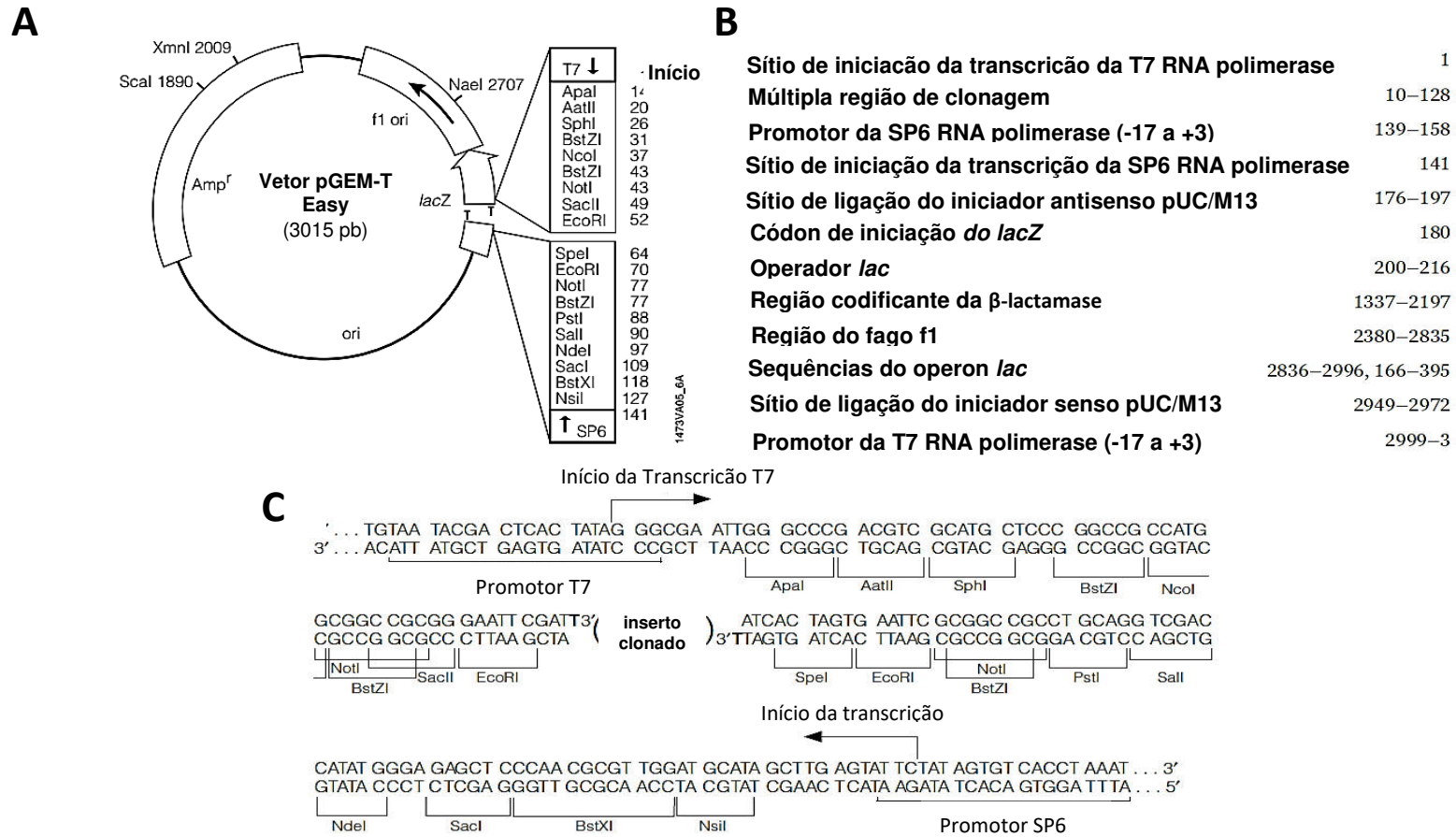
A mutação endA1 inativa uma endonuclease I, eliminando digestões não específicas de DNA plasmidial, melhorando assim o rendimento e qualidade dos plasmídeos (TAYLOR; WALKER, MCLNNES, 1993). A mutação recA reduz recombinações homólogas, reduzindo as chances de deleções e multimerização nos plasmídeos (DURFEE *et al.*, 2008). A mutação lacZ Δ M15 (deleção no gene LacZ, correspondente a região codificante do fragmento α) faz a atividade da β -galactosidase ser dependente da α -complementação do gene, tornando a estirpe DH5 α adequada para *blue/white screening* de colônias transformadas. A deleção LacZYA bloqueia a metabolização de lactose pela β -galactosidase, sendo importante na técnica de *blue/white screening* (HOWE, 2007).

1.6.2 Vetor de clonagem pGEM-T Easy

O vetor pGEM-T *Easy* é um plasmídeo linearizado com uma única timina 3'-terminal em ambas extremidades. Estas timinas 3', localizadas nas bordas do sítio de inserção, melhoram significativamente a eficiência da ligação de produtos de PCR, por prevenir a recircularização do vetor e proporcionar uma extremidade compatível para produtos de PCR gerados por certas polimerases termoestáveis. Estas polimerases frequentemente adicionam uma única deoxiadenosina, de forma independente do molde, às extremidades 3' dos fragmentos amplificados (PROMEGA, 2015). O vetor pGEM-T *Easy* contém numerosos sítios de restrição dentro da região múltipla de clonagem. Esta é flanqueada por sítios reconhecidos pelas enzimas de restrição EcoRI, BstZI e NotI, fornecendo três possibilidades de digestão por um única enzima para liberação do inserto (Figura 2A).

O pGEM-T *Easy* contém o gene Amp^r que codifica a enzima β -lactamase que confere resistência aos antibióticos da classe das penicilinas (como a ampicilina e carbenicilina) (Figura 3A e B). As penicilinas são constituídas por um anel β -lactâmico, o qual está associado com a inibição do *cross-link* de peptídeoglicanos, fazendo com que a parede celular se torne fraca e eventualmente se rompa. Desta forma, células contendo o vetor pGEM-T *Easy* podem ser selecionadas em meio contendo ampicilina ou carbenicilina (HOWE, 2007). Este vetor, de alto número de cópias, contém os promotores T7 e SP6 RNA polimerase flanqueando um múltiplo sítio de clonagem, contido dentro da região codificante do α -peptídeo da enzima β -galactosidase (Figura 3C). A ligação do inserto dentro desta região, torna o α -peptídeo não funcional, permitindo a identificação de clones recombinantes por meio de *blue/white screening*.

Figura 3 - Mapa e pontos de referência da sequência do vetor de clonagem pGEM-T Easy.



Fonte: Adaptado do manual técnico do vetor pGEM-T Easy (Promega). Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy (A), destacando o múltiplo sítio de clonagem, sítios de restrição a diferentes enzimas, o gene Amp^r e o lacZ. Pontos de referência da sequência do vetor (B). Sequência parcial do vetor pGEM-T Easy, indicando a região dos promotores e ligação do inserto (C).

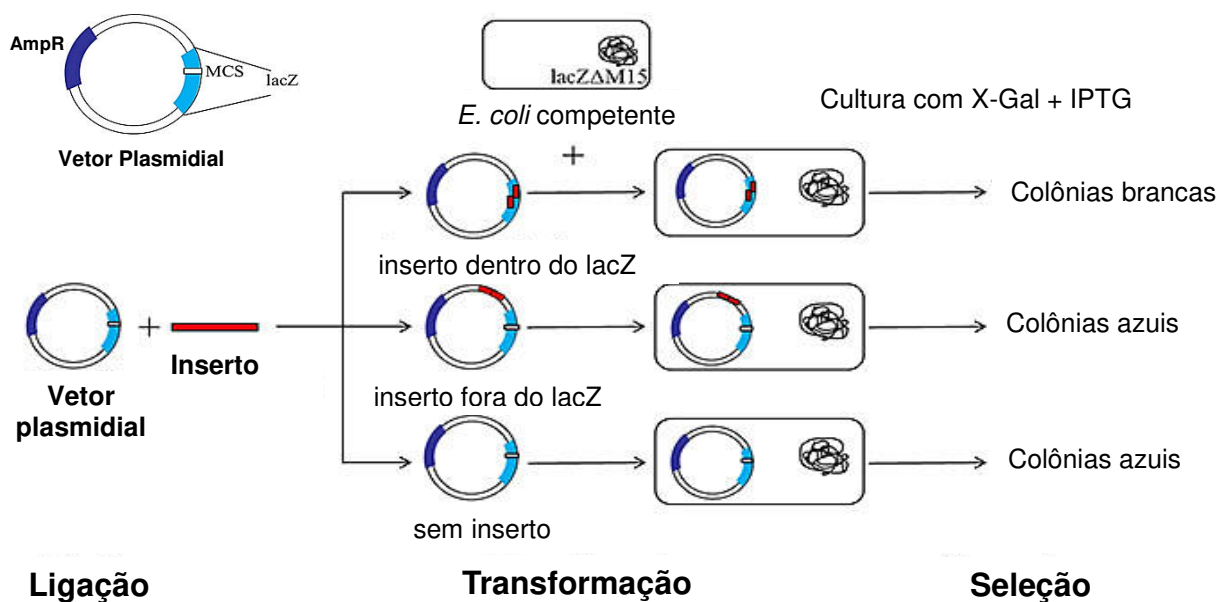
1.6.3 *Blue/white screening*

O *blue/white screening* é uma técnica rápida e eficiente de seleção de colônias transformadas. Tal processo se baseia no fato de que o produto do gene lac-Z (β -galactosidase) apenas forma a enzima funcional após tetramerização e esta é dependente da presença da região N-terminal que abrange os 50 primeiros resíduos de aminoácidos (JACOBSON *et al.*, 1994). Deleções na sequência N-terminal geram um peptídeo chamado de lac-Z ômega que é incapaz de tetramerizar e não apresenta atividade enzimática. Entretanto, a atividade do peptídeo ômega pode ser restaurada se um pequeno fragmento (chamado de peptídeo α), correspondente à porção N-terminal da beta-galactosidase é adicionado *in-trans* via plasmídeo (GALLAGHER *et al.*, 1994). Este processo é denominado de α -complementação.

Para que seja possível a seleção por meio de *blue/white screening*, é necessário o tipo apropriado de células competentes e vetor. Muitas estirpes de *E. coli* usadas como células hospedeiras para clonagem (como a DH5 α e JM109), apresentam em seu genótipo, a deleção lacZ Δ M15 na cópia do gene lacZ, enquanto os vetores de clonagem (como o plasmídeo pGEM-T *Easy*) contêm a sequência codificante do peptídeo α (MCLAB, 2015; PROMEGA, 2015). Desta forma, quando o vetor é inserido em uma célula de *E. coli*, esta expressa funcionalmente a β -galactosidase. No entanto, quando a célula é transformada com plasmídeo+inserto, então a célula expressa β -galactosidase não funcional, pois o inserto interrompe a sequência codificante do peptídeo α .

Quando células transformadas são plaqueadas em meio de cultura contendo IPTG (indutor do operon lac) e X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indoil- β D galactopiranosídeo), a β -galactosidase hidroliza o substrato cromogênico em galactose e 4-cloro-3-bromo-indigo, o qual dimeriza formando um pigmento insolúvel de cor azul. Assim, colônias brancas (β -galactosidase não funcional) indicam clones positivamente transformados (plasmídeo+inserto), enquanto as colônias azuis (β -galactosidase funcional) indicam clones que possuem apenas o plasmídeo íntegro. O esquema da técnica de *blue/white screening* pode ser visualizado na figura 4.

Figura 4 - Esquema geral do procedimento de *blue/white screening*.



Fonte: Adaptado de Sigma Aldrich. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/blue-white-screening.html>

1.7 Modelagem por homologia

O termo modelagem por homologia, também chamado de modelagem comparativa, refere-se ao modelamento tridimensional de uma proteína, utilizando como molde a estrutura de uma proteína de alta identidade de sequência determinada experimentalmente (VYAS *et al.*, 2012). A modelagem por homologia é a mais bem sucedida técnica de predição de estruturas tridimensionais de proteínas (LAUNAY; SIMONSON, 2008). A abordagem se baseia em alguns padrões gerais observados (CHOTHIA; LESK, 1986):

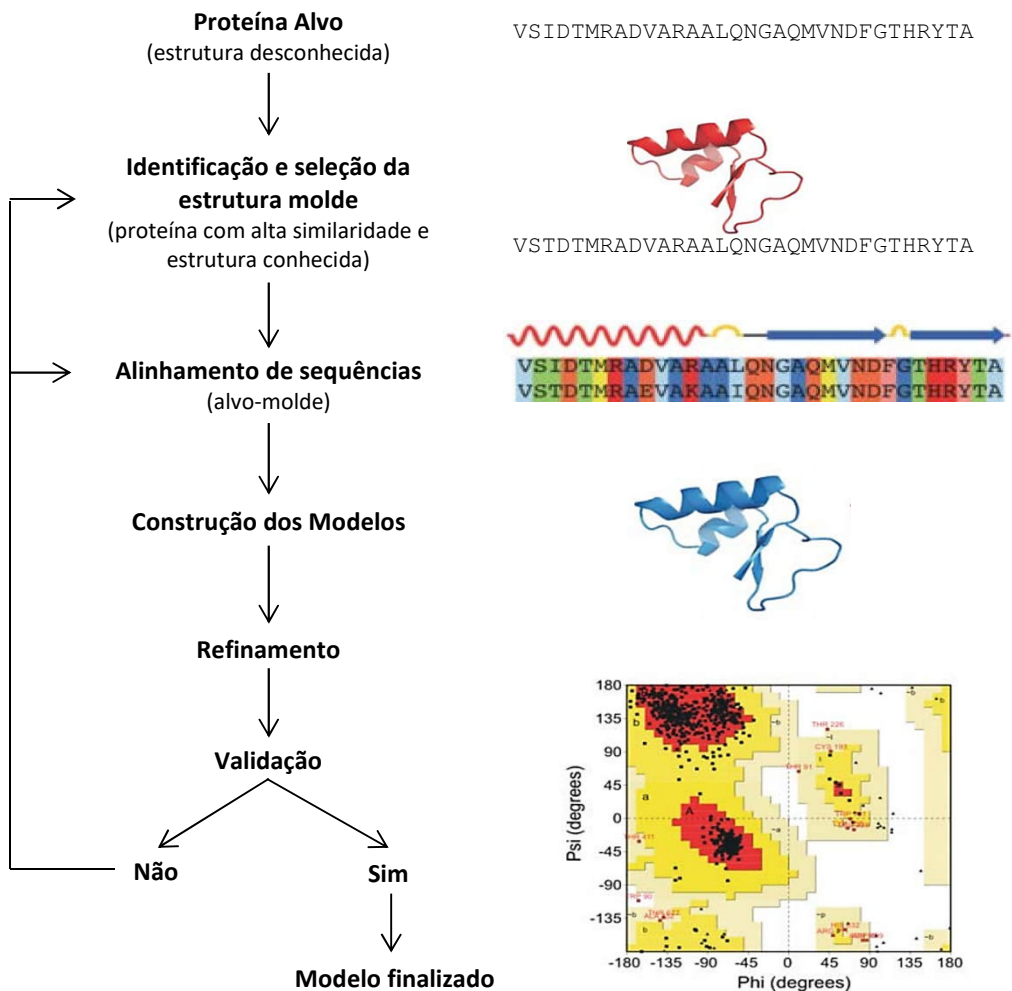
1 – A estrutura tridimensional de uma proteína é determinada por sua sequência de aminoácidos;

2 - A conformação estrutural de uma proteína é mais conservada evolutivamente do que sua sequência de aminoácidos e alterações pequenas ou medianas na sequência, normalmente resultam em pouca variação na estrutura tridimensional;

3 - Proteínas relacionadas evolutivamente compartilham estruturas similares. Proteínas homólogas apresentam regiões internas conservadas (constituídas principalmente por elementos de estrutura secundária: α -hélices e folhas- β). As principais diferenças estruturais entre proteínas homólogas ocorrem em regiões externas, constituídas principalmente por alças (loops), que conectam os elementos de estruturas secundárias.

A técnica de modelagem por homologia compreende 4 etapas principais: identificação e seleção de moldes a partir de proteínas homólogas, alinhamento da sequência alvo com o molde, construção e refinamento de modelos e validação dos mesmos (BISHOP; BEER; JOUBERT *et al.*, 2008). O esquema geral do procedimento de modelagem por homologia é exibido na figura 5.

Figura 5 - Esquema geral do procedimento de modelagem por homologia.



Fonte: Adaptado de (BISHOP; BEER; JOUBERT *et al.*, 2008).

1.7.1 Seleção de moldes a partir de proteínas com alta similaridade

A etapa inicial do modelamento por homologia consiste na identificação de pelo menos uma proteína homóloga, de estrutura tridimensional conhecida. Esta estrutura determinada experimentalmente, geralmente por cristalografia e difração de raios-X ou ressonância magnética nuclear (NMR), servirá de molde para a construção do modelo da proteína alvo.

Para a identificação de moldes, são usados programas/servidores que comparam a sequência alvo com proteínas de estrutura conhecida, armazenadas no PDB. O servidor mais popular é o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), o qual alinha a sequência submetida contra um banco de dados local (no caso, o PDB), gerando uma lista de proteínas com sequências similares ao do alvo (VYAS *et al.*, 2012). O ideal é selecionar como molde, a(s) proteína(s) que possua(m) a(s) maior(es) identidade(s) com a sequência alvo, que tenha(m) a(s) estrutura(s) com maior resolução e que disponha(m) de estruturas com os ligantes adequados (SILVEIRA, 2005).

1.7.2 Alinhamento de sequências

Erros no alinhamento são as principais causas de desvios na modelagem por homologia, mesmo quando um molde adequado é selecionado. Por este motivo, após a identificação de um ou mais moldes possíveis, é necessário o alinhamento das sequências alvo-molde(s) por meio de métodos mais sofisticados, garantindo um alinhamento de melhor qualidade. Alinhamentos de sequências de proteínas divergentes podem ser executados com alta acurácia usando o programa CLUSTAL OMEGA (SIEVERS *et al.*, 2011).

1.7.3 Construção de modelos

Após o alinhamento das sequências alvo-molde, o próximo passo é a construção dos modelos. Uma variedade de servidores/programas pode ser usada para predição de estruturas por meio de modelagem por homologia:

1.7.3.1 CPHmodels 3.2

CPHmodels 3.2 é um web-servidor de predição de estrutura tridimensional de proteínas por modelagem comparativa usando um único molde. O servidor utiliza um *scoring* híbrido de funções do CPHmodel-2.0 e um novo conjunto de algoritmos, computacionalmente mais oneroso, em casos onde o primeiro não conseguiu encontrar um molde adequado para a proteína alvo. Uma vez que o melhor molde é encontrado, as coordenadas dos átomos de C α são extraídas para o alinhamento da sequência e usadas como ponto de partida para o processo de modelagem por homologia. Átomos ausentes são adicionados usando o programa “segmod” e a estrutura é refinada usando o programa “encad” (NIELSEN *et al.*, 2010).

1.7.3.2 Modeller

O Modeller é um programa que realiza modelagem comparativa de estruturas tridimensionais de proteínas por meio de restrições espaciais. O usuário fornece um alinhamento da sequência a ser modelada com uma proteína relacionada, com estrutura conhecida e o Modeller automaticamente calcula o modelo contendo todos os átomos (exceto hidrogênios). O Modeller usa a estrutura molde para construir restrições nas distâncias atômicas, ângulos diedros e outras características espaciais. Estes dados são combinados com distribuições estatísticas derivadas de várias estruturas homólogas catalogadas no PDB (WEBB; SALI, 2014).

1.7.3.3 Phyre2

O Phyre2 (**P**rotein **H**omology/**A**nalog**Y** **R**ecognition **E**ngine) é um dos servidores de predição de estrutura de proteínas mais amplamente utilizado. Serve a cerca de 40 mil usuários únicos por ano, processando cerca de 700 a 1000 submissões de proteínas por dia. O Phyre2 foi projetado para garantir uma interface de fácil utilização para usuários inexperientes em métodos de predição de proteínas. O usuário fornece a sequência da proteína alvo (em formato bruto ou FASTA) e os resultados são enviados via e-mail. A sequência submetida pelo usuário é

primeiramente analisada contra um banco de dados de proteína usando a ferramenta HHblits. O alinhamento múltiplo de sequências resultante é então processado por um programa de predição de estrutura secundária (PSIPRED) e ambos alinhamento e predição da estrutura secundária são combinados em um modelo de Hidden Markov (HMM), um dos métodos mais poderosos e acurados para detecção e alinhamento de sequências remotamente relacionadas. O modelo gerado é então examinado contra um banco de HMMs de proteínas com estrutura conhecidas. Os alinhamentos com maior *scoring* desta pesquisa são usados para construir a cadeia principal bruta dos modelos. *Indels* (inserções ou deleções) nestes modelos são corrigidos por modelagem de alças. Os resíduos de aminoácidos das cadeias laterais são então adicionados para gerar o modelo final (KELLEY *et al.*, 2015).

1.7.3.4 Swiss Model

O Swiss Model é um dos web-servidores de modelagem de estruturas mais amplamente utilizado, com mais de 900 mil requisições por modelos de proteína anualmente, cerca de 1 modelo por minuto. A interface deste servidor permite que o usuário inicie a busca por estruturas moldes a partir da sequência de aminoácidos da proteína alvo ou código de acesso do UniProt. Alternativamente, um alinhamento das sequências alvo-molde pode ser especificado. No primeiro caso, as ferramentas BLAST e HHblits são usadas na identificação de moldes. Estes são então armazenados no banco de dados do Swiss Model (SMTL), que é derivado do PDB. Após a seleção de moldes para a construção do modelo, os alinhamentos alvo-moldes são usados como entrada para a geração de um modelo para a sequência alvo, usando o ProMod-II. No caso da modelagem de alças usando o ProMod-II não fornecer resultados satisfatórios, um modelo alternativo é construído usando o Modeller. Por padrão, os modelos são construídos usando as estruturas oligoméricas dos moldes como anotado no SMTL. Após a construção dos modelos, a qualidade destes é avaliada por uma função de *scoring* chamada QMEAN, que analisa vários padrões estatísticos expressos como potenciais de força média: as características geométricas do modelo (distâncias entre pares atômicos, ângulos torsionais, acessibilidade do solvente) são comparadas com distribuições

estatísticas obtidas a partir de estruturas experimentais. A cada resíduo é atribuído uma pontuação de fiabilidade entre 0 e 1, descrevendo a semelhança esperada para a estrutura nativa (BIASINI *et al.*, 2014).

1.7.4 Validação de modelos

Erros na estrutura modelada são muito comuns, fazendo com que o modelo necessite de refinamento e validação. Os erros são geralmente estimados por uma superposição do modelo e da estrutura molde, cálculo do RMSD de átomos de C α , cálculo de Z-score e análise de parâmetros estereoquímicos como: a exatidão dos ângulos entre as ligações, o comprimento das ligações, a quiralidade dos aminoácidos, a planaridade das ligações peptídicas, os ângulos torcionais da cadeia principal, as conformações das cadeias laterais e o impedimento estérico entre pares de átomos não ligados (VYAS *et al.*, 2012; RAMACHANDRAN *et al.*, 1963; COLOVOS; YEATES, 1993; WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007; CHEN *et al.*, 2010). Uma variedade de servidores e programas gratuitos pode ser usada na validação de modelos tridimensionais, dentre eles estão: Molprobity, ERRAT2 e ProSA.

O MolProbity é um web-servidor de validação de estruturas que fornece um amplo espectro de avaliação baseado na qualidade do modelo, tanto a nível local e global para proteínas e ácidos nucleicos. Na interface da página principal, o usuário pode inserir um código do PDB ou NDB ou carregar um arquivo (formato PDB e outros). O usuário então escolhe quais análises de validação deseja realizar e os resultados são apresentados na forma de resumos, tabelas, gráficos bi e tridimensionais e arquivos para download. Dentre as análises de validação fornecidas pelo Molprobity, está o gráfico de Ramachandran (CHEN *et al.*, 2010).

O gráfico de Ramachandran é um método simples de validação que julga a qualidade da estrutura da proteína, baseada na distribuição dos ângulos diedros da cadeia principal. Os três ângulos torsionais da cadeia principal: ϕ (phi), ψ (psi) e Ω (ômega) são os principais determinantes do dobramento da proteína. (HOOFT; SANDER; VRIEND, 1997). Entretanto, a extensão permitida de ângulos Ω é bem restrita e variações neste ângulo de torção não resultam em muita variedade conformacional (Ramachandran; RAMAKRISHNAN; SASISEKHARAN, 1963). Desta

forma, o Gráfico de Ramachandran define os valores permitidos dos ângulos torsionais ϕ e ψ em estruturas tridimensionais, indicando os resíduos de aminoácidos que se encontram nas regiões energeticamente mais favoráveis e desfavoráveis, prevenindo conflitos estéricos e orientando na avaliação da qualidade dos modelos teóricos ou experimentais de proteínas (KLEYWEGT; JONES, 1996).

O servidor ProSA calcula *scores* de qualidade local (para cada resíduo de aminoácido) e geral (da proteína inteira), os quais são plotados em gráficos: os valores locais geram o gráfico de padrões de energia, enquanto o de valor geral é exibido por meio da comparação com outras estruturas depositadas no PDB (Z-score). Um valor de Z-score negativo é esperado para um bom modelo, porém o mais importante é que o ponto preto representado no gráfico esteja dentro da região azul. Os pontos azuis representam os *scores* de outras proteínas depositadas no PDB que possuem o mesmo tamanho (aproximado) do modelo avaliado (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007).

O ERRAT2 é um programa usado para verificação de estruturas de proteínas. O programa expressa a qualidade global das estruturas modeladas, a qual representa a porcentagem da proteína para qual o valor de erro calculado é menor do que os 95% de rejeição limite. O cálculo do erro é baseado nas estatísticas de interações entre átomos na estrutura analisada (comparada com uma base de dados de estruturas de alta resolução confiáveis) (COLOVOS; YEATES, 1993).

1.7.5 Aplicações da modelagem por homologia

A importância da modelagem por homologia vem aumentando à medida que cresce o número de estruturas disponíveis. Existem várias aplicações comuns para a modelagem por homologia: estudo do efeito de mutantes, identificação de sítios ativos e de ligação (útil para desenho de ligantes); modelamento da especificidade do substrato, predição de epítomos antigênicos, simulações de *docking* proteína-proteína, refinamento de estruturas RMN, substituição molecular em cristalografia de raios-X e planejamento de novos experimentos *in silico* com os modelos obtidos (VYAS *et al.*, 2012).

2 HIPÓTESE

Partindo-se da constatação, em um trabalho anterior, de uma potencial osmotina presente no látex de *Plumeria rubra* e evidência de similaridade desta com uma osmotina purificada do látex de *Calotropis procera* (CpOsm), a qual já foi expressa em sistemas heterólogos, o presente trabalho foi desenvolvido com o propósito de testar as seguintes hipóteses:

- 1- É possível amplificar o fragmento do gene codificante da osmotina de *P. rubra* por meio do uso de iniciadores degenerados desenhados para a CpOsm;
- 2- Sendo a hipótese acima verdadeira, é possível realizar a clonagem desse fragmento amplificado e obter sua sequência.
- 3- De posse das sequências de cDNA codificantes da osmotina, é possível obter a sequência de aminoácidos da proteína e realizar sua modelagem tridimensional.
- 4- Sendo a estrutura das osmotina de *P. rubra* similar à osmotina de *Nicotiana tabacum*, é possível que interaja com os receptores de adiponectina humana, de forma similar à adiponectina.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Clonar um fragmento de cDNA codificando uma proteína do tipo osmotina de *Plumeria rubra*, realizar caracterização molecular, construir um modelo tridimensional da proteína e predizer *in silico* sua capacidade de interagir com os receptores de adiponectina.

3.2 Objetivos Específicos

- Confirmar a presença de uma proteína do tipo osmotina na fração proteica do látex de *P. rubra* por meio de imunoenaios;
- Amplificar a região codificante da proteína PrOsm por meio de RT-PCR;
- Clonar e sequenciar um fragmento de cDNA codificando PrOsm;
- Realizar a caracterização molecular da proteína por meio de análises *in silico*.
- Realizar a modelagem tridimensional da proteína.
- Analisar *in silico* o potencial de ligação entre as proteínas do tipo osmotina caracterizadas neste trabalho e os receptores de adiponectina humana.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Material vegetal

As amostras de látex e RNA utilizadas neste estudo foram coletadas de um espécime de *Plumeria rubra* localizada dentro do campus do Pici, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - CE. O material vegetal foi identificado e catalogado pelo taxonomista Edson Paula Nunes sob a exsicata de número N.15018, depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará.

4.1.2 Reagentes

Ditiotreitol (DTT), Dodecil sulfato de sódio (SDS) e etilenodiaminotetraacético (EDTA) foram obtidos da Amersham Bioscience (EUA). Azul de bromofenol foi obtido da Acros Organics (EUA). Acrilamida, N,N'-metileno bisacrilamida, persulfato de amônio, N,N,N,N tetrametiletilenodiamino (TEMED), dietilpirocarbonato (DEPC), brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), triptona, carbenicilina, isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-tiogalactopiranosídeo (X-Gal) e endonuclease DNase I foram obtidos da Sigma Aldrich (EUA). Ágar bacteriológico foi obtido da HIMEDIA (IND). O kit para isolamento de RNA, kit PCR Master MIX, oligo(dT)₁₈, kit da transcriptase reversa ImProm-II e a enzima de restrição EcoRI foram obtidos da Promega (EUA). O marcador molecular DNA Ladder 1 kb, usado nas eletroforeses em gel de agarose, foi obtido da Sinapse (BRA). O marcador de peso molecular *Low Molecular Weight Markers* e o corante *Coomassie Brilliant Blue R-350* usados nas eletroforeses em gel de poliácridamida foram obtidos da GE Healthcare Life Sciences (EUA).

Todos os demais reagentes usados neste trabalho foram de grau analítico e com elevado grau de pureza.

4.1.3 Células e vetor de clonagem

A estirpe de *Escherichia coli* DH5 α , utilizada como célula hospedeira no experimento de clonagem, foi adquirida da Invitrogen (EUA), enquanto o vetor de clonagem pGEM-T *Easy* foi adquirido da Promega (EUA).

4.2 Métodos

4.2.1 Coleta e fracionamento do látex

O látex de *Plumeria rubra* foi extraído por meio da quebra dos ramos terminais da planta. O fluido exsudado foi coletado em tubos de plástico de 50 mL do tipo “falcon” contendo água destilada, na proporção de 1:2 (v/v), com o objetivo de diminuir o processo natural de coagulação do látex.

O látex coletado foi dialisado exaustivamente, em membranas com poros de 8 KDa, contra água destilada durante 72 horas a 4 °C, a fim de eliminar compostos de baixo peso molecular, como sais e metabólitos secundários. Decorrido este tempo, as frações retidas nas membranas de diálise foram centrifugadas a 10.000 x g, 10 °C, por 10 min, a fim de precipitar compostos insolúveis de alto peso molecular (principalmente borracha). O sobrenadante obtido foi então liofilizado para obtenção das proteínas totais do látex de *P. rubra*.

4.2.2 Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (1D SDS - PAGE)

O perfil das proteínas totais do látex de *P. rubra* foi avaliado por eletroforese unidimensional, metodologia baseada no trabalho de Laemmli (1970), com algumas adaptações. As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%, glicerol 10% e ausência de β -mercaptoetanol.

O gel utilizado tinha as seguintes dimensões: 8,0 x 7,5 x 0,1 cm. O gel de empilhamento continha acrilamida 5% e o tampão utilizado foi Tris-HCl 0,5 M, pH

6,8. O gel de separação, contendo acrilamida 12,5% e SDS 1%, foi preparado em Tris-HCl 3 M pH 8,8. A corrida eletroforética foi realizada à 25 °C, com os parâmetros ajustados para 120 V e 15 mA por placa, por aproximadamente 2,5 horas. Após o término da corrida, o gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-350* 0,1% em solução aquosa com ácido acético e metanol (6:1:3 v/v/v). Em seguida, o gel foi descorado com a mesma solução, mas na ausência do corante.

4.2.3 *Western blot*

Para o ensaio de *western blot*, as proteínas totais do látex de *P. rubra* foram separadas por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida e, posteriormente, transferidas para uma membrana de nitrocelulose, de acordo com o método originalmente descrito por Towbin e colaboradores (1979). Foram realizadas duas eletroforeses, uma para visualização após coramento com *Coomassie Brilhante Blue R-350* e outra para a transferência. A membrana de nitrocelulose foi incubada por 10 min em tampão de corrida, contendo metanol 20%. As proteínas foram transferidas com uma corrente constante de 100 mA, por 2 h a 25 °C usando um sistema de transferência *semi-dry* (GE Healthcare Life Sciences). Após esse período, a membranas foi incubada em tampão PBS (NaCl 0,13 M, KCl 2,6 mM, NaHPO₄ 5,3 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM, pH 7,4) contendo 5% de leite em pó desnatado, sob agitação a 25 °C por 2 horas. A membrana foi então lavada três vezes consecutivas com tampão PBS (sem leite). Em seguida, o anticorpo primário anti-CpOsm (anticorpos policlonais anti-osmotina de *Calotropis procera*) foi adicionado na diluição de 1:5.000 (v/v) em tampão PBS contendo 5% de leite em pó e a membrana foi incubada a temperatura ambiente, sob agitação por 2 horas. Após três lavagens com tampão PBS, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho desenvolvido em cabra, conjugado com fosfatase alcalina), na diluição de 1:10.000 (v/v), por 2 h a 25 °C.

Finalmente, após três lavagens sucessivas idênticas às anteriores, a reação de revelação foi desenvolvida utilizando o substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitro blue tetrazólio (BCIP/NBT), que consistiu de uma solução de Tris-HCl 0,2 M, pH 9,0, NaCl 0,1 M, MgCl 2,5 mM, NBT 10 mg/mL e BCIP 25 mg/mL. A

membrana foi deixada, sob agitação, com a solução do substrato, até o aparecimento de bandas arroxeadas. A reação foi interrompida por lavagem com água destilada.

4.2.4 *Preparo de material livre de RNase*

Para evitar a degradação por RNases, todas as soluções e reagentes usados na extração de RNA, foram preparados com água destilada previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). DEPC foi acrescentado à água destilada para uma concentração final de 0,1% (v/v) e deixada sob agitação por 12 horas, seguida de autoclavagem (121 °C, 1 atm, 15 min). Com a mesma finalidade, todas as ponteiras utilizadas foram incubadas por 12 horas em água com DEPC 0,1% (v/v), sob agitação, e em seguida autoclavadas nas mesmas condições.

4.2.5 *Extração de RNA Total*

Folhas jovens de *P. rubra* foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e maceradas com auxílio de gral e pistilo. Com o tecido pulverizado obtido, seguiu-se a extração do RNA total utilizando dois métodos distintos: o kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega) e o método usando CTAB/cloreto de lítio, baseado no protocolo descrito por Chang e colaboradores (1993), com algumas adaptações. O RNA total obtido foi imediatamente armazenado em ultrafreezer a -80 °C. Cada amostra de RNA total foi quantificada em espectrofotômetro a 260 nm usando a seguinte fórmula:

$$[\text{RNA}] \text{ (ng/}\mu\text{L)} = \text{OD}_{260} \times \text{fator de diluição} \times 40$$

4.2.5.1 *Extração de RNA total utilizando o método do CTAB/cloreto de lítio*

Em um tubo de 15 mL, foram adicionados 5 mL de tampão de extração CTAB [Tris-HCl 100 mM, pH 8.0; NaCl 2 M; EDTA 25 mM; CTAB 2% (m/v)]. Em seguida adicionou-se, paulatinamente, 90 mg de tecido de folha pulverizada e

misturou-se gentilmente por inversão do tubo. Adicionou-se 100 µL de 2-mercaptoetanol e o tubo foi então incubado a 65 °C, em banho-maria por 1 h, e agitado levemente a cada 10 min. Após esta etapa, adicionou-se 1 volume de clorofórmio/IAA (24:1) e deixou-se incubando sob agitação à temperatura ambiente, por 15 min. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 5.000 x *g*, por 10 min, a 25 °C. O sobrenadante foi, então, transferido para um tubo de 15 mL novo e foi adicionado 1/3 volume de cloreto de lítio 10 M. Deixou-se a amostra precipitando overnight a 4 °C. Após este período, centrifugou-se o tubo a 8.000 x *g*, por 45 min, a 4 °C. Retirou-se o sobrenadante, com cuidado, por inversão do tubo e fez-se duas lavagens com etanol 70 % (preparado com água tratada com DEPC). A cada lavagem a amostra foi centrifugada a 8.000 x *g*, por 10 min, a 4 °C. Deixou-se o tubo inclinado sobre um papel durante aproximadamente 1 h. O precipitado foi ressuscitado em 50 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM; pH 8,0; EDTA 1 mM).

4.2.5.2 Extração de RNA total utilizando o kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega)

Para 90 mg de tecido de folha pulverizada, foram adicionados 350 µL de tampão de lise e 500 µL de tampão de diluição, ambos obtidos pelo kit. A amostra foi homogeneizada por inversão e centrifugada a 14.000 x *g*, por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um microtubo de 1,5 mL estéril e foi adicionado 600 µL de etanol 95%. A solução foi misturada por meio de pipetagem (4 vezes) e transferida para uma coluna e centrifugada a 14.000 x *g* por 1 min. O eluído foi descartado e a coluna foi colocada em um novo microtubo estéril. Em seguida, foram preparados 50 µL de um mix de incubação de DNase (40 µL de *Yellow Core Buffer*, 5 µL de MnCl₂ 0,09 M e 5 µL de DNase I). Este mix foi misturado gentilmente, por pipetagem, e aplicado diretamente na membrana da coluna. Esta foi incubada a 25 °C por 15 min. Então, foram adicionados 250 µL de DNase *Stop Solution* e o tubo foi centrifugado a 14.000 x *g* por 1 min. Em seguida, foram adicionados 600 µL de RNA Wash Solution e centrifugou-se a 14.000 x *g* por 1 min. O eluído foi descartado e fez-se outra lavagem, adicionando 250 µL de RNA Wash Solution e centrifugando a 14.000 x *g* por 2 min. Os tubos de coleta foram descartados e as colunas foram transferidas para tubos de 1,5 mL estéreis e livres de RNase.

Foram adicionados a cada coluna, 100 μ L de água livre de nuclease e em seguida foram centrifugados a 14.000 x *g* por 1 min. As colunas foram descartadas e os tubos contendo o RNA total purificado foram devidamente identificados e armazenados em ultrafreezer a -80 °C.

4.2.6 Eletroforese em Gel de Agarose

Eletroforese em gel de agarose foi uma técnica utilizada para avaliar diversos experimentos deste trabalho, dentre eles: integridade do RNA total extraído, amplificação dos produtos de PCR, ligação do inserto no vetor de clonagem, seleção de colônias transformadas e extração de DNA plasmidial.

O gel foi preparado com agarose na concentração de 1% (m/v) em 70 mL de tampão TBE (Tris-Borato 45 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0). A solução foi aquecida até a total solubilização da agarose. Após atingir a temperatura ambiente, brometo de etídio (0,5 μ g/mL) foi adicionado à agarose para confecção do gel. As amostras foram preparadas com o tampão 5X *Green GoTaq Reaction Buffer* (Promega). A corrida eletroforética ocorreu com parâmetros ajustados para uma tensão constante de 100 V, por cerca de 1h 30 min. As bandas de DNA ou RNA foram visualizadas por exposição do gel à luz ultravioleta ($\lambda = 302$ nm) em fotodocumentador MiniBis Pro (DNR).

4.2.7 Análise da integridade do RNA total

A integridade das amostras de RNA total foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 1% como descrito anteriormente. Foi aplicado 1 μ g de cada amostra de RNA total e 500 ng do marcador molecular DNA *Ladder* 1Kb (Sinapse).

4.2.8 Tratamento do RNA total com DNase

Para eliminar a contaminação com DNA genômico, o RNA total extraído através do método do cloreto de lítio foi tratado com DNase I (AMPD1 DNase I, Sigma-Aldrich). Para tal, 8 µL (1 µg) de RNA total foi incubado com 1 µL da enzima DNase I e 1 µL de tampão de reação 10x, à temperatura ambiente por 15 min. Cada alíquota foi tratada com 1 U da enzima DNase I. A reação foi interrompida com a adição de 1 µL da solução de parada (EDTA 50 mM) e incubada a 70 °C por 10 min. Em seguida, o RNA total tratado foi armazenado a – 80 °C.

4.2.9 Obtenção da primeira fita de cDNA

A primeira fita de cDNA foi sintetizada pela enzima transcriptase reversa, em microtubos de 200 µL livres de RNase, e consistiu na adição de 1 µL de oligo(dT)₁₈ (Promega) em 2 µL de RNA purificado (1500 ng) e 8,6 µL de água tratada com DEPC. A mistura foi incubada em termociclador, a 70 °C, por 5 min, seguido a 4 °C por 5 min. Ao fim dessa etapa, o programa do termociclador foi pausado e aos tubos de reação foi adicionada uma solução que consistia de 4,0 µL do tampão da enzima Improm II, 2,4 µL de MgCl₂ 25 mM, 1,0 µL de dNTP 1,0 mM e 1,0 µL da enzima Improm II (transcriptase reversa; 1 U/µL), totalizando 20 µL de volume reacional. A programação no termociclador foi, então, retomada, sendo a reação conduzida de acordo com os parâmetros que se seguem: 25 °C por 5 min, 42 °C por 1 h, 70 °C por 15 min, 4 °C. O produto da RT foi quantificado em espectrofotômetro Genequant (Pharmacia) a 260 nm e utilizado nas reações de PCR subsequentes.

4.2.10 Amplificação da região codificante da PrOsm

A amplificação da região codificante da osmotina de *P. rubra* (PrOsm) foi realizada utilizando PCR convencional e os iniciadores degenerados: 5' CCGGCCACNTTYACNATHCGNAACAAYTGYCC 3' (senso) e 5'

CCGGGRCARAANAYAACYCTRTARTTDGT 3' (antisense), desenhados com base na sequência NH₂-terminal da osmotina de *Calotropis procera* (CpOsm) (OLIVEIRA, 2014). As reações de PCR foram realizadas em microtubo estéril de 200 µL, utilizando o kit PCR *Master MIX*. Para cada reação, foram adicionados 7,5 µL de PCR *Master MIX*, 1,5 µL de cada iniciador (1 µM): CpOsmF (senso) e CpOsmR (antisense), 1,8 µL de cDNA e 2,7 µL de água livre de RNase para um volume final de 15 µL. O processo de amplificação foi realizado em termociclador TX-96 Plus (Amplitherm), programado para um passo inicial de desnaturação (2 min a 95 °C), seguido por 30 ciclos de 45 s a 95 °C (desnaturação), 45 s a um gradiente de temperatura de 45 °C a 63 °C (anelamento) e 1 min a 72 °C (extensão). No último ciclo, realizou-se uma última fase de extensão final a 72 °C por 5 min. As amostras permaneceram a 4 °C no termociclador até a coleta dos produtos de reação. A confirmação da amplificação da sequência codificante da osmotina foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1% como descrito anteriormente. Foram aplicados 8 µL dos produtos de PCR e 500 ng do marcador molecular DNA *Ladder* 1Kb (Sinapse).

4.2.11 Ligação do produto amplificado por PCR ao vetor de clonagem pGEM-T Easy

O produto amplificado por PCR foi ligado ao plasmídeo pGEM-T *Easy* (Promega) de acordo com as especificações do fabricante. Para tanto, 3 µL (~30 ng) do produto de PCR foram misturados a 1 µL (50 ng) do plasmídeo pGEM-T *Easy*, 5 µL de tampão de ligação 2x (Tris-HCl 60 mM pH 7,8, MgCl₂ 20 mM, DTT 20 mM, ATP 2 mM, polietilenoglicol 10%), 1 µL da enzima T4 DNA ligase e água deionizada estéril para um volume final de 10 µL. A ligação procedeu a 4 °C por 16 horas em termociclador TX96 Plus (Amplitherm). O inserto ligado ao plasmídeo, chamado de pGEM-T *Easy*::PrOsm, foi utilizado para transformação de *Escherichia coli* DH5α.

4.2.12 Produção de células de *Escherichia coli* DH5 α eletrocompetentes

Uma cultura de células de *E. coli* DH5 α , retirada de um estoque em glicerol 15% armazenadas em ultra freezer a $- 80^{\circ}\text{C}$, foi plaqueada, por meio de estrias, em placas de petri contendo meio LB ágar e incubadas a 37°C , por 16 horas. Fez-se então um pré-inóculo pinçando uma única colônia isolada da placa incubada e aplicando essa colônia em 5 mL de meio LB. O meio foi então incubado a 37°C , por 16 horas a 200 rpm. Seguiu-se então a realização do inóculo, consistindo na aplicação de uma alíquota de pré-inóculo em meio LB fresco, na razão de 1:100 (v/v). O inóculo foi incubado a 37°C e 200 rpm até o crescimento celular resultar em uma O.D.₆₀₀ de 0,4 – 0,6 . A cultura de células foi imediatamente colocada em gelo por 30 min. Em seguida, a cultura de células foi transferida para tubos de 50 mL previamente resfriados e centrifugada a $6.000 \times g$, por 10 min, a 4°C . O sobrenadante foi então descartado e o pellet foi lavado duas vezes com 20 mL de glicerol 10% gelado. Entre cada lavagem, o pellet foi totalmente ressuspenso e centrifugado novamente a $6.000 \times g$, por 10 min, a 4°C . O precipitado resultante foi então ressuspenso gentilmente em meio GYT gelado e alíquotas de 40 μL foram transferidas para tubos de 1,5 mL estéreis. Estes foram devidamente identificados e armazenados em ultrafreezer a $- 80^{\circ}\text{C}$.

4.2.13 Transformação de *Escherichia coli* DH5 α

O produto da reação de ligação, pGEM-T *Easy::PrOsm*, foi introduzido em células de *E. coli* DH5 α competentes, por meio de eletroporação. Para tanto, 10 μL do produto de ligação foi adicionado a 40 μL de células e a mistura foi então transferida para uma cubeta de eletroporação com ranhura de 2 mm, aplicando-se à suspensão de células um pulso elétrico de 2,5 kV em eletroporador 2510 (Eppendorf). Imediatamente após a aplicação do pulso elétrico, foi adicionado, ao eletroporado, 1 mL de meio SOC pré-aquecido a 37°C . As células foram incubadas a 37°C por 90 min a 200 rpm.

4.2.14 Seleção de clones por blue/white screening

Para a seleção de clones positivamente transformados, 100 µL da cultura de células eletroporadas foram plaqueados, com o auxílio de uma alça de Drigalsky, em placas de Petri contendo meio LB ágar suplementado com carbenicilina 100 µg/mL, IPTG 0,5 mM e X-Gal 80 µg/mL. As placas foram incubadas em estufa de crescimento a 37 °C, por 16 h, até a visualização de colônias. Colônias brancas isoladas foram então selecionadas para purificação do DNA plasmidial.

4.2.15 Purificação de DNA plasmidial

A purificação do DNA plasmidial dos clones obtidos foi realizada por meio do kit *NucleoSpin Plasmid* (MACHEREY-NAGEL), seguindo os passos recomendados pelo fabricante, contidos no protocolo "*NucleoSpin Plasmid QuickPure protocol – isolation of high-copy plasmid DNA from E. coli*". Inicialmente, cada colônia anteriormente selecionada foi inoculada em 10 mL de meio LB suplementado com carbenicilina 50 µg/mL e incubadas a 37 °C por 16 horas a 225 rpm. Após o crescimento, 9 mL da cultura de *E. coli* foram centrifugados por 30 s a 11.000 x *g*. O sobrenadante foi descartado e o pellet obtido foi ressuspenso em 250 µL de tampão A1 (contendo RNase) e agitado em vórtex. Então, foram adicionados 250 µL de tampão de lise A2 (contendo SDS e NaOH) e misturado gentilmente (8 vezes) por inversão. Em seguida, foram adicionados 300 µL de tampão de neutralização A3 (contendo hidrocloreto de guanidina) e novamente misturados gentilmente (8 vezes) por inversão do microtubo. As amostras foram centrifugadas a 11.000 x *g*, durante 5 min, à temperatura ambiente. Os sobrenadantes obtidos (máximo de 750 µL) foram transferidos para colunas (*NucleoSpin Plasmid QuickPure Column*), previamente acopladas a microtubos de coleta de 2 mL, e centrifugados a 11.000 x *g*, durante 1 min, à temperatura ambiente. O material eluído foi descartado e as colunas foram recolocadas em seus devidos microtubos. Após essa etapa, 450 µL de tampão de lavagem AQ (contendo etanol, isopropanol e hidrocloreto de guanidina) foram adicionados às colunas e centrifugados por 3 min a 11.000 x *g*. Novamente o material eluído foi descartado e

as colunas foram colocadas em novos microtubos de 1,5 mL estéreis. O DNA plasmidial foi então eluído em 50 µL de água deionizada por centrifugação a 11.000 x g, por 1 min, à temperatura ambiente e armazenado a -20 °C para uso posterior. O DNA plasmidial de cada clone foi quantificado em espectrofotômetro Pico200 (Picodrop) a 260 nm.

4.2.16 Digestão com a enzima de restrição EcoRI

A digestão dos plasmídeos purificados a partir dos clones obtidos foi realizada com a enzima de restrição EcoRI (Promega) a fim de confirmar a presença do inserto (PrOsm). Para tanto, 1 µg do DNA plasmidial de cada clone foi adicionado a 10 U de EcoRI, tampão e água deionizada estéril para um volume final de 20 µL e incubado a 37 °C por 4 h. A reação de digestão foi interrompida por incubação a 65 °C, por 20 min. Os produtos da digestão foram analisados em gel de agarose 1% (m/v). Os clones positivamente transformados foram selecionados e submetidos ao sequenciamento.

4.2.17 Sequenciamento de DNA plasmidial

O DNA plasmidial dos clones que tiveram sua transformação confirmada foi devidamente aliquotado (100 nm/µL; 30 µL) e enviado para ser sequenciado na empresa MacroGen (<http://dna.macrogen.com/eng/>). Os insertos clonados em pGEM-T *Easy* foram sequenciados em ambas as direções, utilizando os iniciadores universais M13F-pUC (5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3') e M13R (5' GCGGATAACAATTTTCACACAGG 3'). A MacroGen é uma empresa sul-coreana que oferece serviços de sequenciamento automatizado de DNA com alta acurácia e rapidez.

4.2.18 Análises das sequências

Sequências consenso (*contigs*) foram montadas para cada cDNA sequenciado, usando os programas phred/phrap/consed (EWING *et al.*, 1998; EWING; GREEN, 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998). Para obtenção da sequência de aminoácidos deduzida, foi utilizada a ferramenta de tradução TRANSLATE tool ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>). Em seguida, foi realizado um alinhamento local das sequências deduzidas, no formato FASTA, por meio da ferramenta BLASTp que compara sequências de aminoácidos com proteínas presentes em diferentes bancos de dados locais. A massa molecular e ponto isoelétrico teóricos de cada proteína deduzida foram calculados por meio da ferramenta Compute pI/MW (http://web.expasy.org/compute_pi/). Os alinhamentos múltiplos das sequências de aminoácidos deduzidas foram realizados com o programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/Clustalo/>) e posteriormente corrigidos manualmente no com o uso do programa BioEdit 7.2.5 (SIEVERS *et al.*, 2011). A predição dos sítios de glicosilação foi realizada utilizando o servidor YinOYang 1.2.

4.2.19 Análises filogenéticas

Análises filogenéticas foram realizadas utilizando o programa Mega 6.1 a fim de verificar a homologia entre as sequências das osmotinas de *P. rubra* e outras proteínas do tipo osmotina. O alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas foi realizado usando o programa ClustalW. A matriz usada foi BLOSUM com penalidades de gap padrão para alinhamento de pares de base (*gap open*: 10; *gap extension*: 0.1) e múltiplo (*gap open*: 10; *gap extension*: 0.2) e 30% de atraso de cortes divergentes. O alinhamento gerado foi manualmente ajustado de acordo com as assinaturas e posições de resíduos de cisteínas conservadas descritas na família PR-5. Uma árvore filogenética sem raiz foi construída usando o método de Neighbor-Joining com distância-p para substituições de aminoácidos e opção de deleção completa para tratamento de *gaps*. A estabilidade dos clados foi avaliada usando o método bootstrap com 1000 repetições.

4.2.20 Modelagem computacional

Modelos tridimensionais das osmotinas de *P. rubra* foram construídos a partir de quatro plataformas diferentes: CPHmodels 3.2 (NIELSEN *et al.*, 2010), Modeller (KUMAR; VENKATESH, 2014), Phyre2 (KELLEY *et al.*, 2015) e Swiss Model (ARNOLD *et al.*, 2006; BIASINI *et al.*, 2014). A estrutura tridimensional da CpOsm (PDB: 4L2J, cadeia A) resolvida por cristalografia e difração de raios-X foi usada como molde na modelagem tridimensional das osmotinas. Os modelos tridimensionais foram visualizados com auxílio do programa PyMol 1.7. O perfil de hidrofobicidade foi gerado usando o *script* color_h.py, de acordo com a escala definida por Eisenberg e colaboradores, 1984. A estrutura secundária das osmotinas foi predita por meio do servidor PDBsum, <https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/Generate.html> (DE BEER *et al.*, 2014).

4.2.21 Validação dos modelos

Os servidores/programas utilizados na avaliação dos parâmetros estereoquímicos foram o MolProbity, ProSA e ERRAT2 (RAMACHANDRAN *et al.*, 1963; COLOVOS; YEATES, 1993; WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007; CHEN *et al.*, 2010). O programa PyMoL 1.7 foi usado para a sobreposição estrutural entre o modelo obtido por modelagem comparativa e a estrutura resolvida por difração de raio-X utilizada como molde e o programa 3DSS (SUMATHI *et al.*, 2006) foi usado para o cálculo do RMSD.

4.2.22 Docking molecular

Docking molecular entre as osmotinas de *P. rubra* e os receptores de adiponectina foram realizados com o auxílio do servidor PatchDock (DUHOVNY *et al.*, 2002; SCHNEIDMAN-DUHOVNY *et al.*, 2005). Para tal, foram utilizadas as estruturas cristalográficas dos receptores de adiponectina (PDB: 3WXV e 3WXW) e os modelos 3D das PrOsm obtidos no presente trabalho. A região de interação dos

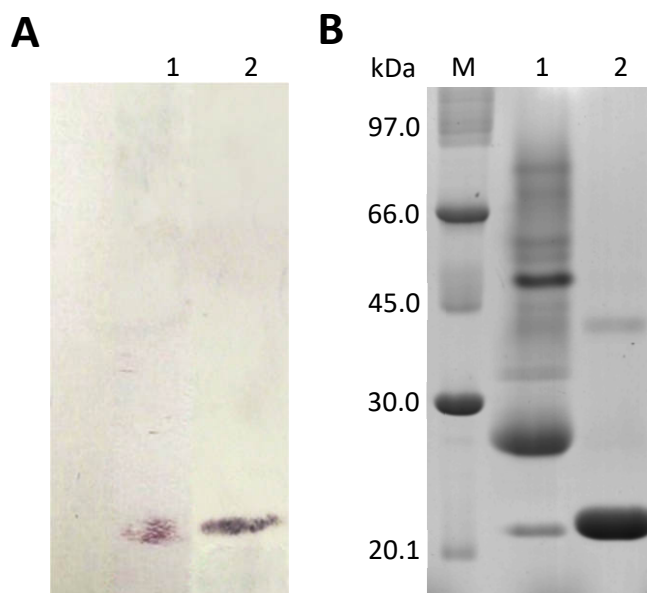
receptores de adiponectina e das PrOsms foram definidas de acordo com o descrito por Miele e colaboradores (2012). Refinamentos das soluções obtidas por *docking* de corpo rígido foram realizados utilizando o servidor FireDock (ANDRUSIER *et al.*, 2007; MASHIACH *et al.*, 2008).

5 RESULTADOS

1.1 Detecção de proteínas do tipo osmotina no látex de *P. rubra*

A fim de confirmar a presença de proteínas do tipo osmotina no látex de *P. rubra*, foi realizado um ensaio de *western blot* usando anticorpos policlonais anti-osmotina purificada do látex de *Calotropis procera* (CpOsm) (Figura 6A). Anticorpos policlonais anti-CpOsm reconheceram uma banda proteica no látex de *P. rubra*, correspondendo a um peso molecular em torno de 21 kDa, visualizada por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida corado com *Coomassie Brilliant Blue* (Figura 6B).

Figura 6 - Detecção de proteínas do tipo osmotina no látex de *Plumeria rubra* por *western blot*.

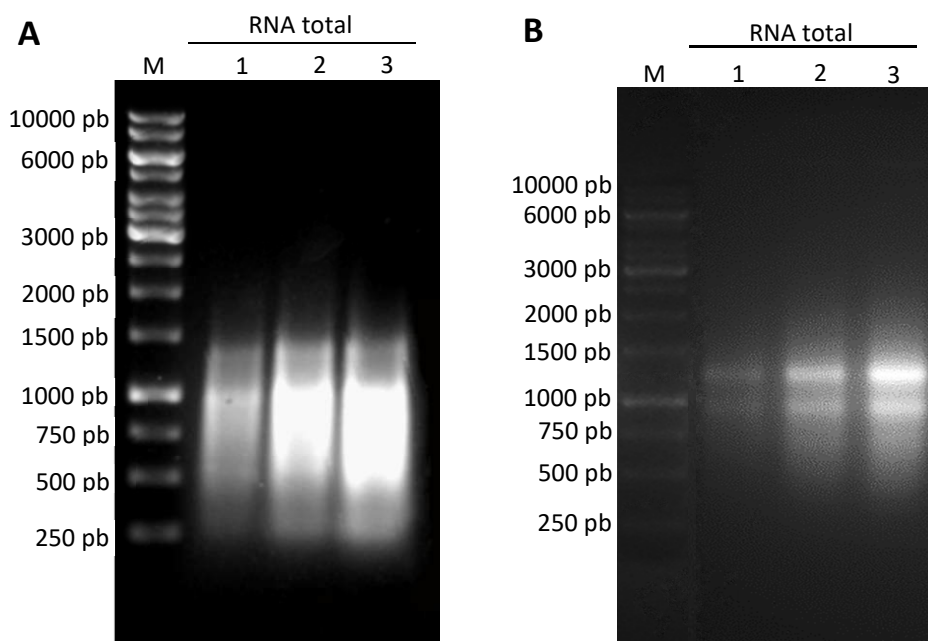


Western blot para detecção de osmotina no látex de *P. rubra* usando anticorpos policlonais anti-CpOsm (A). Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) das proteínas totais do látex de *P. rubra* (B). Linha M: Marcador de massa molecular. Linha 1: Proteínas totais do látex de *P. rubra* (30 µg). Linha 2: CpOsm purificada (10 µg).

1.2 Isolamento e caracterização das sequências codificantes das PrOsm

Após confirmar a presença de pelo menos uma proteína do tipo osmotina no látex de *P. rubra*, o próximo passo foi isolar e caracterizar a sequência do(s) fragmento(s) de cDNA que a(s) codifica(m). Para tanto, inicialmente foram realizadas extrações de RNA total de folhas de *P. rubra*, por que esses tecidos são ricos em látex e são mais fáceis de trabalhar que o látex puro. A partir de 100 mg de tecido vegetal foram obtidos 1,5 µg/µL de RNA total usando o kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega) e 6 µg/µL de RNA total a partir do método usando CTAB/cloreto de lítio. O perfil observado por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) do RNA total mostrou a integridade da amostra extraída por ambos os métodos utilizados (Figura 7).

Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose 1,0 % (m/v) do RNA total extraído de folhas de *P. rubra*.



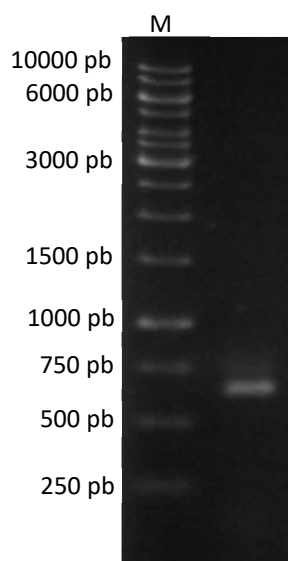
RNA total extraído de folhas de *P. rubra* usando CTAB/cloreto de lítio (A) e kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega) (B). Foram aplicados 1 µg (coluna 1), 2 µg (coluna 2) e 3 µg (coluna 3) de RNA total. Coluna M: Marcador Molecular DNA *Ladder* 1kb (Sinapse). Os géis foram corados com brometo de etídio.

Para eliminar possíveis contaminações com DNA, a amostra de RNA extraída pelo método CTAB/cloreto de lítio foi tratada com DNAase I (Sigma-Aldrich). Após a digestão com DNase I, o RNA total obtido pelo método do CTAB/cloreto de lítio ainda apresentava um rendimento maior (4 µg/µL) em relação ao kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega) e por isso foi utilizado em todos os posteriores ensaios. O kit da promega já possui DNAase, por esse motivo o RNA total isolado por este método não foi tratado com DNAase.

Em seguida, o amostra de RNA total foi utilizada para a síntese da primeira fita de cDNA por meio de transcrição reversa, usando como iniciador oligo dT₍₁₈₎. A amplificação da sequência codificante da PrOsm foi realizada por PCR usando a primeira fita de cDNA como molde e os iniciadores degenerados CpOsmF (senso) e CpOsmR (anti-senso), desenhados para a osmotina purificada do látex da planta *Calotropis procera* (CpOsm).

Reações de PCR foram realizadas fazendo-se gradiente de temperatura de anelamento (45°C; 45,5°C; 47°C; 49,0°C; 51,4°C; 53,8°C; 56,2°C; 58,6°C; 61°C; 63°C), objetivando detectar a melhor temperatura de hibridização dos iniciadores com a fita molde de cDNA. As reações de PCR, realizadas em todas as temperaturas de anelamento testadas, resultaram em um produto amplificado de aproximadamente 600 pb, com exceção das temperaturas de 61 °C e 63 °C, onde não houve amplificação. A temperatura de 53,8 °C (Figura 8) foi a melhor dentre as testadas, pois apresentou uma banda com maior intensidade no gel de agarose 1% (m/v) e desta forma foi a temperatura utilizada nas demais amplificações usando os iniciadores degenerados CpOsmF e CpOsmR.

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) do produto de PCR amplificado a partir de cDNA de *P. rubra*.

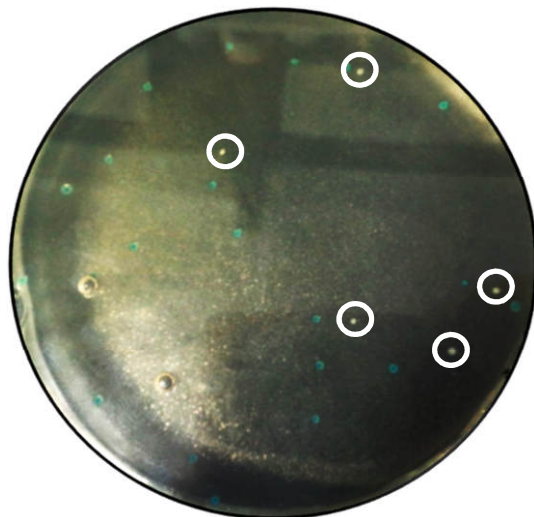


Amplificação realizada usando os iniciadores CpOsmF e CpOsmR. Temperatura de anelamento de 53,8°C. Foram aplicados 8 μ L do produto amplificado. Coluna M: Marcador Molecular DNA Ladder 1kb (Sinapse). O gel foi corado com brometo de etídio.

O produto amplificado por PCR foi ligado ao vetor plasmidial pGEM-T *Easy* e o vetor recombinante (pGEM-T *Easy*::PrOsm) foi utilizado para a transformação de células de *E. coli* DH5 α eletrocompetentes.

A seleção das colônias transformadas foi realizada por meio de *blue/white screening*. Colônias azuis e brancas obtidas após transformação de células de *E. coli* DH5 α com pGEM – T *Easy*::PrOsm são mostradas a seguir (Figura 8).

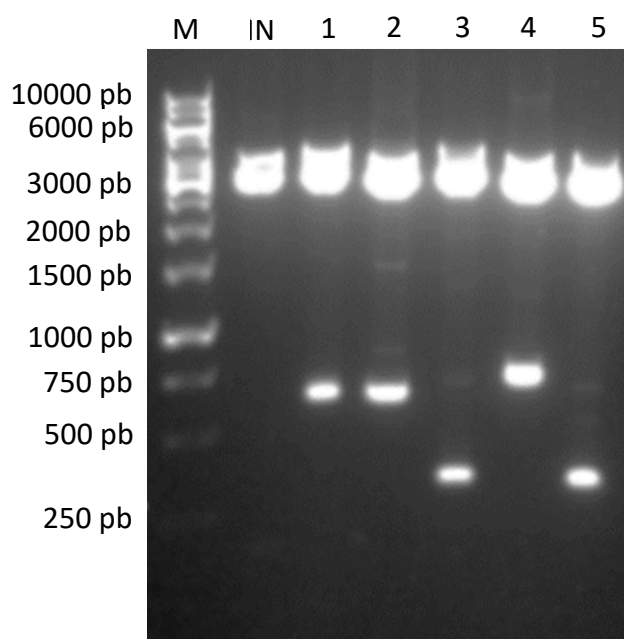
Figura 9 - Colônias azuis e brancas de células de *E. coli* DH5 α transformadas com pGEM – T *Easy*::PrOsm.



Uma cultura de células de *E. coli* DH5 α eletroporadas com o vetor pGEM-T *Easy*::PrOsm foi plaqueada em meio LB ágar (suplementado com carbenicilina 100 μ g/mL, X-Gal 80 μ g/mL e IPTG 0,5 M) e incubada a 37 °C por 16h.

A eletroforese dos produtos da digestão com EcoRI (Figura 10), dos plasmídeos purificados dos clones transformados com o fragmento de cDNA codificante da osmotina de *P. rubra* (PrOsm), revelou um fragmento gerado de aproximadamente 700 pb para os clones 1 e 2, 300 pb para os clones 3 e 5 e 750 pb para o clone 4. Isso confirma a presença do inserto nos cinco clones, apesar dos fragmentos gerados a partir dos clones 3 e 5 serem menor que o esperado para a ORF de PrOsm prevista por PCR (~ 600 pb). A digestão sugere ainda a existência de pelo menos 3 proteínas com sequência distintas.

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) dos plasmídeos pGEM – T *Easy::PrOsm* extraídos de células de *E. coli DH5α* após digestão com *EcoRI*.



Coluna M: Marcador molecular DNA Ladder 1 Kb (Sinapse); Coluna IN: plasmídeo pGEM – T *Easy* íntegro; Colunas 1 a 5: plasmídeo pGEM-T *Easy::PrOsm* extraídos dos clones 1 a 5, respectivamente. O gel foi corado com brometo de etídio.

O DNA plasmidial dos clones que tiveram sua transformação confirmada foram sequenciados na empresa MacroGen (<http://dna.macrogen.com/eng/>) utilizando os iniciadores universais M13F-pUC (5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3') e M13R (5' GCGGATAACAATTTTCACACAGG 3'). Os eletroferogramas resultantes do sequenciamento dos cinco insertos, realizado pela empresa MacroGen, exibiram ótima qualidade, apresentando picos bem resolvidos e sem sobreposições.

1.3 Caracterização *in silico* das PrOsms

As sequências consenso (*contigs*) de cDNA obtidas das PrOsm1 e PrOsm2, usando os programas phred/phrap/consed, apresentaram 100% de identidade, assim como os *contigs* obtidos a partir da PrOsm3 e PrOsm5. Dessa forma, as análises posteriores foram realizadas apenas com as sequências nucleotídicas das PrOsm1, PrOsm 3 e PrOsm4. A PrOsm1 apresentou uma sequência de 609 pb (Figura 11), enquanto a PrOsm4 apresentou uma sequência de 699 pb (Figura 13) corroborando a estimativa observada na eletroforese da digestão dos respectivos plasmídeos com a enzima EcoRI.

Entretanto, a PrOsm3 apresentou uma sequência de 576 pb (Figura 12) que, apesar de ser menor do que as sequências obtidas para as outras duas osmotinas, não é condizente com o tamanho do fragmento obtido da digestão. Após uma análise da sequência de nucleotídeos da PrOsm3, foi observada a existência da sequência palindrômica GAATTC (6pb) que corresponde ao sítio de clivagem da enzima EcoRI. Este sítio de clivagem interrompeu a sequência codificante da PrOsm3, o que explica o fragmento menor que o esperado gerado durante a digestão. A Figura 14 mostra o alinhamento das sequências de nucleotídeos das osmotinas de *P. rubra*.

As sequências de nucleotídeos das osmotinas de *P. rubra* foram traduzidas com o auxílio da ferramenta TRANSLATE tool do ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>) e alinhadas utilizando o software Clustral Omega (Figura 14). As proteínas deduzidas se mostraram únicas, apresentando modificações em várias posições da sequência.

Figura 11 - Sequência consenso de nucleotídeos e aminoácidos predita para a PrOsm1.

```

gccacttttactattcgaaaacaattgtccctacacaatttgggcagcagcagtgccaggc
A T F T I R N N C P Y T I W A A A V P G
ggcgggaagacgcctaaattccggacaaacatggaccatcaacgtggcaccggtaccgct
G G R R L N S G Q T W T I N V A P G T A
ggagcacgtatattggcccagaactaactgcaacttcgacggcgccggacgtggcagatgc
G A R I W P R T N C N F D G A G R G R C
caaacggcgactgcaacggagttctcgaatgcaaaggttacggtcagccgccgaacacc
Q T G D C N G V L E C K G Y G Q P P N T
ttggccgaatacgcattaaatcagttccaaaatttggactttttcgacatatccttagtt
L A E Y A L N Q F Q N L D F F D I S L V
gacgggttcaacgtgcctatggaatttagtccagtttctggttccggtgacaaatgccgt
D G F N V P M E F S P V S G S G D K C R
gctatacgttgtacggcagatataaacggacagtggtccgaatgaacttagagctcccgg
A I R C T A D I N G Q C P N E L R A P G
ggatgtaataatccgtgcacgggtgtttaagaccgataagtattgctgtaattccggtagt
G C N N P C T V F K T D K Y C C N S G S
tgtggaccactacttattcgaaggtttttaaggagaggtgttgggatgcttatagttat
C G P T T Y S R F F K E R C W D A Y S Y
ccgaaagatgatccgaccagtagtcttacttgtcccgggtgggactaattacagagttata
P K D D P T S T F T C P G G T N Y R V I
ttctgcccc 609 pb
F C P 203 aa

```

A sequência de aminoácidos foi deduzida usando a ferramenta *TRANSLATE tool* do ExPASy (<http://expasy.org/tools/>). As regiões sublinhadas indicam as sequências dos iniciadores senso e anti-senso.

Figura 12 - Sequência consenso de nucleotídeos e aminoácidos predita para a PrOsm3.

```

gccacttttactattcgaaaacaattgtccctacacagctctgggcagcagccggtgccagg
A T F T I R N N C P Y T V W A A A V P G
ggcgggaagacgccttgaccgcgccaaacctggactatcaacgtggcaccggtacagct
G G R R L D R G Q T W T I N V A P G T A
ggagcacgtatctggggcagaaccaattgcaacttcgacggcgccggacgtggcagatgc
G A R I W A R T N C N F D G A G R G R C
caaacggcgactgtaacggagttctagaatgcagaggtttcggtcagccgccgaacacc
Q T G D C N G V L E C R G F G Q P P N T
ttagctgaatacgcattaaatcagttccaaaatttggactttttcgatataccttagtt
L A E Y A L N Q F Q N L D F F D I S L V
gacggattcaacgtgcctatggaattcagtcctacttccggttcttgcggggaatacgt
D G F N V P M E F S P T S G S C R G I R
tgtacggcggatataaacgggcagtgctcctaataactcagggctcccggaggatgtaac
C T A D I N G Q C P N Q L R A P G G C N
aatccttgtaccgttttttaaacccgatcagattgttgaattctggaagctgttcgcct
N P C T V F K T D Q Y C C N S G S C S P
acggatttttcgagatttttttaagcaaagggtgcctgatgcttatagttacccaaggat
T D F S R F F K Q R C P D A Y S Y P K D
Gatccaactagtagctttacctgccctggcggtagcaattacagagttgtgttttgcgcc 600 pb
D P T S T F T C P G G T N Y R V V F C P 200 aa

```

A sequência de aminoácidos foi deduzida usando a ferramenta *TRANSLATE tool* do ExPASy (<http://expasy.org/tools/>). Destaque para o sítio de clivagem da enzima de restrição EcoRI (GAATTC) interrompendo a sequência codificante da PrOsm3. As regiões sublinhadas indicam as sequências dos iniciadores senso e anti-senso.

Figura 13 - Sequência consenso de nucleotídeos e aminoácidos predita para a PrOsm4.

```

gccacgtttaccatacgaaacaattgtccctttaccgtctgggctgcatcggtgcctgta
A T F T I R N N C P F T V W A A S V P V
ggtggtggtcgccgcctagacagtgccaaacatggaccattaacgtgcctgccggaaca
G G G R R L D S G Q T W T I N V P A G T
gcacaagctcgaatctgggctagaaccaattgtaacttcgacggtgcaggccgcgccga
A Q A R I W A R T N C N F D G A G R G R
tgcgaaaccggcgattgcaatggacttcttcaatgccaagcatttgggtcaaccaccaaac
C E T G D C N G L L Q C Q A F G Q P P N
accctagcagaatatgcattaaaccaatacagtaacttagacttttttgacatttcctt
T L A E Y A L N Q Y S N L D F F D I S L
gttgatggtttcaacgtacatggacttcagccctacgtccggtgaatatgcatcaaac
V D G F N V P M D F S P T S G E Y A S N
caattcaataacttagacttttttcgacataacccttgttgatggcctcaaaatcctatg
Q F N N L D F F D I T L V D G L K I P M
gacttcagccgtctgtctggtggttgcgcggtatccaatgcaccgcagacattaacgga
D F S R L S G G C R G I Q C T A D I N G
cagtggtccagctgtgcttagggctcctggaggatgcaataatccttgactgtgtttcag
Q C P A V L R A P G G C N N P C T V F Q
actgatcagattgctgcaactccggtagctgtcaaccgacggattattcgaagttttt
T D Q Y C C N S G S C Q P T D Y S K F F
aaggataggtgcccctgatgcttatagttatcctaagatgatccgacaagcacattcact
K D R C P D A Y S Y P K D D P T S T F T
tgccctggaggtactaattatagggttatattctgcccc 699 pb
C P G G T N Y R V I F C P 233 aa

```

A sequência de aminoácidos foi deduzida usando a ferramenta *TRANSLATE tool* do ExPASy (<http://expasy.org/tools/>). As regiões sublinhadas indicam as sequências dos iniciadores senso e anti-senso.

Figura 14 - Alinhamento múltiplo das sequências de cDNA das osmotinas de *P. rubra*.

```

PrOsm1      GCCACTTTTACTATTTCGAAACAATTGTCCCTACACAATTTGGGCAGCAGCAGTGCCAGG- 59
PrOsm3      GCCACTTTTACTATTTCGAAACAATTGTCCCTACACAGTCTGGGCAGCAGCCGTGCCAGG- 35
PrOsm4      GCCACGTTTACCATAACGAAACAATTGTCCCTTACCCTGCTGGGCTGCATCGGTGCCTGTA 60
*****
PrOsm1      --CGGCGGAAGACGCCTAAATTCGGACAAACATGGACCATCAACGTGGCACCCGGTACC 117
PrOsm3      --TGGCGGAAGACGCCTTGACCGCGCCAAACCTGGACTATCAACGTGGCACCCGGTACA 93
PrOsm4      GGTGTTGGTGCCTGACAGTGGCCAAACATGGACCATTAACGTGCCTGCCGGAACA 120
** * * * * *
PrOsm1      GCTGGAGCACGTATTTGGCCCAGAACTAAGTCAACTTCGACGGCGCCGGACGTGGCAGA 177
PrOsm3      GCTGGAGCACGTATCTGGGCCAGAACCAATTGCAACTTCGACGGCGCCGGACGTGGCAGA 153
PrOsm4      GCACAAGCTCGAATCTGGGCTAGAACCAATTGTAAGTTCGACGGTGCAGGCCGGCCGA 180
** * * * * *
PrOsm1      TGCCAAACCGGCGACTGCAACGGAGTTCTCGAATGCAAAGGTTACGGTCAGCCGCCGAAC 237
PrOsm3      TGCCAAACCGGCGACTGTAACGGAGTTCTAGAATGCAGAGGTTTCGGTCAGCCGCCGAAC 213
PrOsm4      TGCGAAACCGGCGATTGCAATGGACTTCTCAATGCAAAGCATTGGTCAACCACCAAAC 240
*** * * * *
PrOsm1      ACCTTGGCCGAATACGCATTAAATCAGTTCAAAATTTGGACTTTTTTCGACATATCCTTA 297
PrOsm3      ACCTTAGCTGAATACGCATTAAATCAGTTCAAAATTTGGACTTTTTTCGATATATCCTTA 273
PrOsm4      ACCCTAGCAGAATATGCATTAAACCAATACAGTAACTTAGACTTTTTTTCGACTTTCCCTT 300
*** * * * *

```



```

PrOsm1      GTTGACGGGTTCAACGTGCCTATGGAATTTAGTCCAGTTTCTGGTTCCGGTG----- 349
PrOsm3      GTTGACGATTCAACGTGCCTATGGAATTCAGTCCTACTCCGGTTCT----- 321
PrOsm4      GTTGATGGTTTCAACGTACCTATGGACTTCAGCCCTACGTCCGGTGAATATGCATCAAAC 360
            ***** ** ***** ** ** ** ** * ** **
PrOsm1      ----- 349
PrOsm3      ----- 321
PrOsm4      CAATTCATAACTTAGACTTTTTTCGACATAACCCTTGTTGATGGCCTCAAAATACCTATG 420
PrOsm1      -----ACAAATGCCGTGCTATACGTTGTACGGCAGATATAAACGGA 390
PrOsm3      -----TGCCGGGAATACGTTGTACGGCGGATATAAACGGG 357
PrOsm4      GACTTCAGCCGTCTGTCTGGTGGTTGCCCGGTATCCAATGCACCGCAGACATTAACGGA 480
            ***** * ** * ** * ** * ** * ** * **
PrOsm1      CAGTGTCCGAATGAACCTAGAGCTCCCGGTGGATGTAATAATCCGTGCACGGTGTTTAAG 450
PrOsm3      CAGTGTCTAATCAACTCAGGGCTCCCGGAGGATGTAACAATCCTTGTACCGTTTTTTAA 417
PrOsm4      CAGTGTCCAGCTGTGCTTAGGGCTCCTGGAGGATGCAATAATCCTTGCACCTGTGTTTTCAG 540
            ***** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
PrOsm1      ACCGATAAGTATTGCTGTAATTCGGTAGTTGTGGACCCACTACTTATTCGAGGTTTTTT 510
PrOsm3      ACCGATCAGTATTGTTGTAATTCGGAAGCTGTTCCGCTACGGATTTTTTCGAGATTTTTT 477
PrOsm4      ACTGATCAGTATTGCTGCAACTCCGGTAGCTGTCAACCGACGGATTTATTCGAAGTTTTTT 600
            ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
PrOsm1      AAGGAGAGGTGTTGGGATGCTTATAGTTATCCGAAAGATGATCCGACCAGTACGTTTACT 570
PrOsm3      AAGCAAAGGTGTCCTGATGCTTATAGTTACCCCAAGGATGATCCAACCTAGTACGTTTACC 537
PrOsm4      AAGGATAGGTGCCCTGATGCTTATAGTTATCCTAAAGATGATCCGACAAGCACATTCACT 660
            *** * ***** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** *
PrOsm1      TGTCCCGTGGGACTAATTACAGAGTTATATTCTGCCCC 630
PrOsm3      TGCCCTGGCGGTACCAATTACAGAGTTGTGTTTGGCCC 597
PrOsm4      TGTCTGGAGGTAATAATTATAGGGTTATATTCTGCCCC 720
            ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

```

O alinhamento foi realizado utilizando o programa Clustal Omega. Destaque para o sítio de clivagem da enzima de restrição EcoRI (GAATTC) presente na sequência da PrOsm3. As regiões sombreadas indicam as sequências dos iniciadores senso e anti-senso.

Figura 15 - Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos preditas para as osmotinas de *P. rubra* utilizando o programa Clustal Omega.

```

PrOsm1      ATFTIRNNCPYTIWAAAVP-GGRRLLNSGQWTINVAPGTAGARIWPRNTNCFDAGRGR 59
PrOsm3      ATFTIRNNCPYTVWAAAVP-GGRRLLDGGQWTINVAPGTAGARIWARTNCFDAGRGR 51
PrOsm4      ATFTIRNNCPFTVWAAAVPVGRRLLDGGQWTINVPAQTARARIWARTNCFDAGRGR 60
            *****:*.***.*** *****: ***** ** * ** * ** *
PrOsm1      CQTGDCNGVLECKGYGQPNTLAEYALNQFQNLDFFDISLVDGFNVPMEFSPVSGS---- 115
PrOsm3      CQTGDCNGVLECKGFGQPNTLAEYALNQFQNLDFFDISLVDGFNVPMEFSPVSGS---- 107
PrOsm4      CETGDCNGVLLQCAFQGPNTLAEYALNQVSNLDFFDISLVDGFNVPMDFSPTSGEYASN 120
            *:*****:*.***:*****:*****:*****:*****:*****:***.***
PrOsm1      -----GDKCRAIRCTADINGQCPNELRAPGGCNPCTVFK 150
PrOsm3      -----CRGIRCTADINGQCPNELRAPGGCNPCTVFK 139
PrOsm4      QFNLLDFFDITLVDGLKIPMDFSRLSGRCRGIQCTADINGQCPAVLRAPGGCNPCTVFK 180
            **.*:***** *****:
PrOsm1      TDKYCCNSGSGGPTTYSRFFKERCWDAISYPKDDPTSTFTCPGGTNYRVIFCP 203
PrOsm3      TDQYCCNSGSGSPTESRFFKRCRCPDAISYPKDDPTSTFTCPGGTNYRVIFCP 192
PrOsm4      TDQYCCNSGSGOPTDYSKFFKRCRCPDAISYPKDDPTSTFTCPGGTNYRVIFCP 233
            **:***** **.*:***:*****:*****:*****:*****:***

```

O alinhamento foi realizado utilizando o programa Clustal Omega. Resíduos de aminoácidos distintos estão destacados em cores diferentes para cada sequência: amarelo (PrOsm1), verde (PrOsm3), rosa (PrOsm4).

As propriedades físico-químicas das sequências deduzidas das osmotinas de *P. rubra* são mostradas na tabela 2. As três osmotinas apresentaram 16 resíduos de cisteína conservados que possivelmente estão envolvidos na formação de 8 ligações dissulfeto, como relatado para a maioria das proteínas da família PR-5. A massa molecular e ponto isoelétrico teóricos de cada proteína foram calculados por meio da ferramenta *Compute pI/MW* (http://web.expasy.org/compute_pi/). A PrOsm1 é uma proteína de 203 resíduos de aminoácidos, apresentando um pI de 8,16 e massa molecular de 22077,68 Da. A PrOsm3 é uma proteína de 200 resíduos de aminoácidos, apresentando um pI de 8,17 e massa molecular de 21730,23 Da. A PrOsm4 é uma proteína de 233 resíduos de aminoácidos e apresenta um pI de 4,64 e massa molecular de 25324,20 Da.

Tabela 2 - Comparação das propriedades físico-químicas das osmotinas de *P. rubra* com outras duas proteínas do tipo osmotina descritas na literatura.

	Organismo	MM (Da)	pI	C _{res}	AA _{res}
PrOsm1	<i>Plumeria rubra</i>	22077,68	8,16	16	203
PrOsm3	<i>Plumeria rubra</i>	21730,23	8,17	16	200
PrOsm4	<i>Plumeria rubra</i>	25342,20	4,63	16	233
CpOsm	<i>Calotropis procera</i>	22107,71	8,16	16	203
CgOsm	<i>Cryptostegia grandiflora</i>	22050,61	7,91	16	203

MM (massa molecular); pI (ponto isoelétrico); C_{res} (resíduos de cisteínas conservados); AA_{res} (número de resíduos de aminoácidos).

É interessante notar que há uma inserção na sequência de aminoácidos deduzida da PrOsm4 que compreende os resíduos Glu₁₁₆ a Gly₁₄₇ (Figura 15). Este fragmento corresponde a uma duplicação da sequência Glu₈₈ a Gly₁₁₅ (ou vice-versa), com algumas modificações, como é demonstrado na figura 16. No entanto, essa duplicação não é o principal responsável pelo pI ácido observado para esta proteína, uma vez que a remoção da sequência Glu₈₈ - Gly₁₁₅ ou Glu₁₁₆ a Gly₁₄₇ para recálculo do pI, resultou no valor de 6,36 e 4,97, respectivamente. A característica ácida da PrOsm4 deve ser originada principalmente por substituições pontuais de resíduos de aminoácidos básicos por resíduos não-carregados ou ácidos, ao longo da sequência.

Figura 16 - Alinhamento da inserção presente na PrOsm4 e sequência correspondente a duplicação na proteína.

```

Inserção_PrOsm4      84 ---EYASNQFNLDFFDITLVDGLKIPMDFSRLSG--- 115
PrOsm4(-)insert     116 TLAEYALNQYSNLDFDISLVDGFNVPMDFSPTSGGCR 147
                    ***  *: :*****:****: :*****  **

```

O alinhamento foi realizado utilizando o programa Clustal Omega.

O alinhamento local (BLASTp) das sequências de aminoácidos das três osmotinas de *P. rubra*, contra banco de dados de proteínas não-redundante, revelou alta identidade das sequências com proteínas do tipo osmotina e taumatina (Tabela 3). A PrOsm1 apresentou 99% de identidade com a osmotina de *C. procera*; a PrOsm3 apresentou 90% de identidade com a osmotina de *Cryptostegia grandiflora* e a PrOsm4 apresentou 73% de identidade com a osmotina de *Piper colubrinum*.

O alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos das osmotinas de *P. rubra* com outras proteínas do tipo osmotina/taumatina (Figura 17) demonstrou alto grau de conservação de sequências entre proteínas deste grupo. A família PR5 possui uma região conservada definida como assinatura deste grupo de proteínas (G-x-[GF]-x-C-x-T-[GA]-DC-x(1,2)-[GQ]-x(2,3)-C), onde os três resíduos de cisteínas estão envolvidos em ligações dissulfeto.

As três osmotinas de *P. rubra* apresentaram os cinco resíduos de aminoácidos pertencentes à fenda acídica, característica de OLPs, conservados. Os dois resíduos de fenilalanina relatados em osmotinas e outras PR5 antifúngicas também se mostraram conservados, com exceção da PrOsm4 que possui uma modificação na posição do primeiro resíduo para uma tirosina (Tyr₉₀).

Tabela 3 - Alinhamento local da sequência de aminoácidos deduzidas das osmotinas das osmotinas de *P. rubra* por meio de BLASTp contra banco de dados de proteínas não-redundante.

Organismo	Classificação	Número de acesso	Cobertura	Identidade	E-value
<i>Plumeria rubra</i>	PrOsm1	-	-	-	-
<i>Calotropis procera</i>	Osmotina	ALA55570.1	100%	99%	4e ⁻¹⁴⁴
<i>Cryptostegia grandiflora</i>	TLP	ALA55569.1	100%	99%	4e ⁻¹⁴³
<i>Cynara cardunculus var. scolymus</i>	Taumatina	KVH95152.1	100%	83%	3e ⁻¹¹⁸
<i>Piper colubrinum</i>	Osmotina	ABX71220.1	100%	83%	2e ⁻¹¹⁷
<i>Jatropha curcas</i>	TLP	XP_012066839.1	100%	82%	1e ⁻¹¹⁷
<i>Plumeria rubra</i>	PrOsm3	-	-	-	-
<i>Calotropis procera</i>	Osmotina	ALA55570.1	100%	90%	3e ⁻¹²⁴
<i>Cryptostegia grandiflora</i>	TLP	ALA55569.1	100%	90%	2e ⁻¹²³
<i>Piper colubrinum</i>	Osmotina	ABX71220.1	100%	88%	3e ⁻¹¹⁸
<i>Eucalyptus grandis</i>	TLP	XP_010024640.1	100%	86%	6e ⁻¹¹⁸
<i>Populus szechuanica</i>	TLP	AJR20992.1	100%	86%	1e ⁻¹¹⁷
<i>Plumeria rubra</i>	PrOsm4	-	-	-	-
<i>Piper colubrinum</i>	Osmotina	ABX71220.1	100%	73%	5e ⁻¹¹⁴
<i>Eucalyptus grandis</i>	TLP	XP_010024640.1	100%	71%	2e ⁻¹¹²
<i>Cynara cardunculus var. scolymus</i>	Taumatina	KVH95152.1	100%	71%	4e ⁻¹¹¹
<i>Populus szechuanica</i>	TLP	AJR20992.1	100%	71%	4e ⁻¹¹¹
<i>Mikania micrantha</i>	TLP	ALI29917.1	100%	70%	4e ⁻¹¹¹

Figura 17 - Alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos deduzidas das osmotinas de *P. rubra* e outras proteínas do tipo osmotina/taumatina.

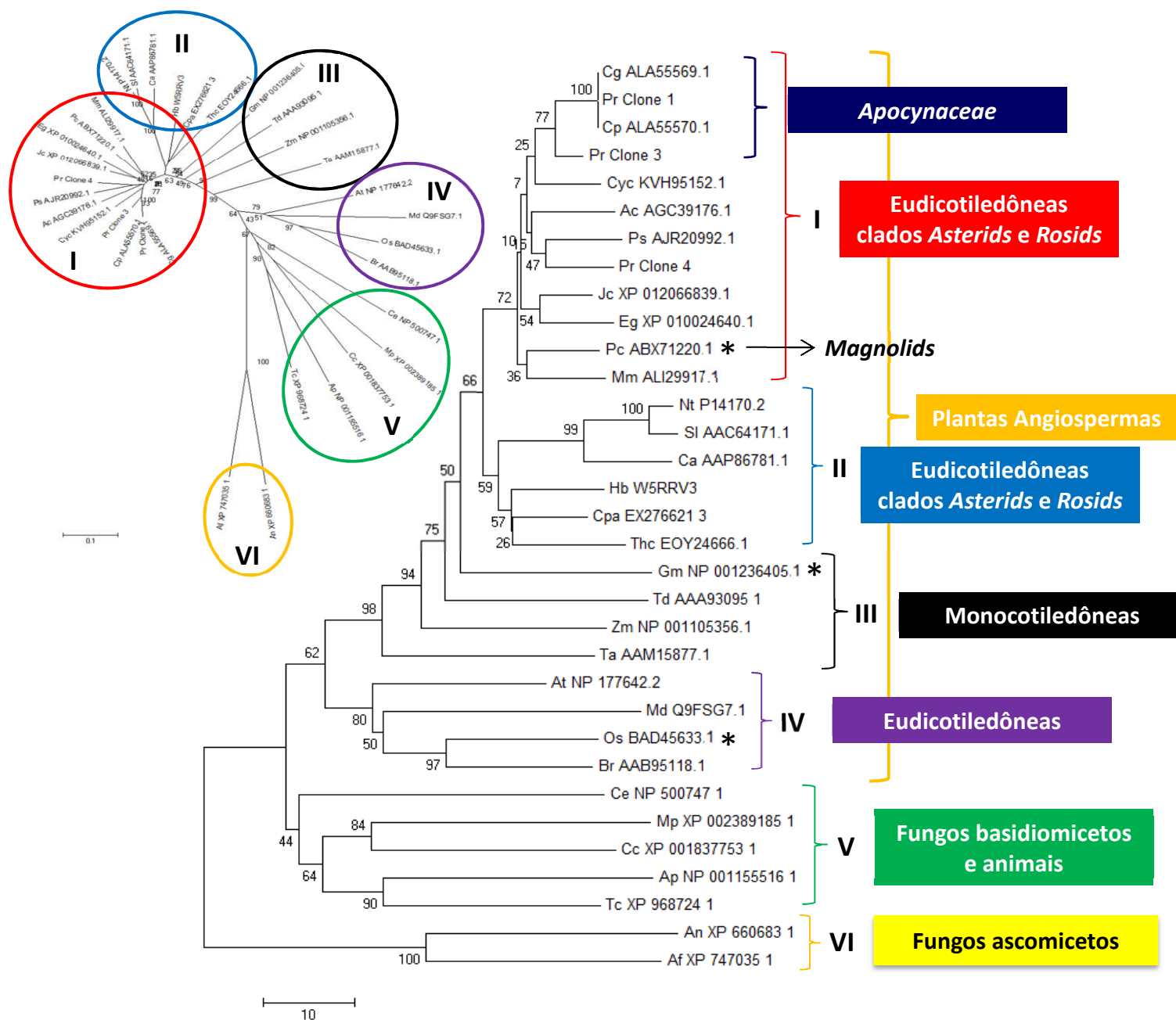


Nt_P14170.2	NNPCTTFGGQYYCCTQG--PCGPTFFSKFFKQRC	PDAYSYPQDDPTSTFTCPGGSTNYRVIFCPNGQAHPNFPLEMPGSDEVAK	225
Td_AAA93095_1	.DA..V.QTSE...T.--K...EY.R...RL...F..VL.K.-T.V...S-S...T...TALELEDE	-----	213
Cp_ALA55570.1	...V.KTDK...NS.--S...TY.R...E.W...K...S-...V...-----	-----	203
Cg_ALA55569.1	...V.KTDK...NS.--S...TY.R...E.W...K...S-...V...-----	-----	203
Hb_W5RRV3	...V.KTNK...E.YGS...E...S.S...S...S...-...V...ARSP.FPLEMVREKDV.---	-----	222
Cpa_EX276621_3	...V.KTNE...N.PGS...I...T...-----RTSP	-----	206
Cyc_KVH95152.1	...V.KTDN...NS.--S.S.E.R.T...K.AS...V...-----	-----	201
Pc_ABX71220.1	...V.KTD...NS.--S.S.DY.R.T...K...V...-----	-----	201
Eg_XP_010024640.1	...V.KTD...NS.--S...N...D...K.Q...V...-----	-----	201
Jc_XP_012066839.1	...V.KTD...NS.--N...DY.R..D.R...K.Q...K.V...-----	-----	201
Ps_AJR20992.1	...V.KTD...NS.--S.E.DY.R...K.Q...V...-----	-----	200
Mm_ALI29917.1	...V.KTD...NS.--N...D.R.T...K...N.V...-----	-----	201
PrOsm1	...V.KTDK...NS.--S...TY.R...E.W...K...-----	-----	203
PrOsm3	...V.KTD...NS.--S.S.D.R...K...V...-----	-----	192
PrOsm4	...V.QTD...NS.--S.Q.DY...D...K...-----	-----	233

O alinhamento foi realizado utilizando o programa Clustal Omega. Edições foram feitas com o auxílio do programa BioEdit 7.2.5. Posições com resíduos conservados em relação à primeira sequência (osmotina de *Nicotiana tabacum*) estão representadas por pontos; Resíduos de cisteína conservados estão sombreados em cinza; Os cinco resíduos de aminoácidos pertencentes à fenda ácida estão sombreados em azul ciano; Os resíduos de Phe₉₁ e Phe₉₆ descritos em proteínas PR-5 com atividade antifúngica estão sombreados em amarelo. As duas/três primeiras letras referem-se à sigla de cada organismo, seguida do número de acesso: Cg (*Cryptostegia grandiflora*), Cp (*Calotropis procera*), Cpa (*Carica papaya*), Cyc (*Cynara cardunculus var. scolymus*), Eg (*Eucalyptus grandis*), Gm (*Glycine max*), Hb (*Hevea brasiliensis*), Jc (*Jatropha curcas*), Mm (*Mikania micrantha*), Nt (*Nicotiana tabacum*), Pc (*Piper colubrinum*), Pr (*Plumeria rubra*), Ps (*Populus szechuanica*), Td (*Thaumatococcus daniellii*).

A árvore filogenética gerada a partir do alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos deduzidas das osmotinas de *P. rubra* e de diversas proteínas do tipo osmotina e taumatina, evidenciou a existência de 6 grupos distintos (Figura 18). A análise filogenética indica que as osmotinas de *P. rubra* estão proximamente relacionadas evolutivamente às osmotinas de *Calotropis procera* e *Cryptostegia grandiflora*. Assim como *C. procera* e *C. grandiflora*, *P. rubra* pertence à família *Apocynaceae*, ordem *Gentianales*. Outras proteínas proximamente relacionadas às PrOsms são de Asterídeas, porém pertencentes a ordens diferentes da *P. rubra*. Os grupos I a IV são formados exclusivamente por sequências de plantas angiospermas. O grupo I, onde estão incluídas as sequências da PrOsm1, PrOsm3 e PrOsm4, é formado por sequências de proteínas de eudicotiledôneas, dos clados *Asterids* e *Rosids*, com exceção da osmotina de *Piper colubrinum* que pertence ao clado *Magnolids*. O grupo II também inclui sequências de Asterídeas e Rosídeas. O grupo III contém sequências de monocotiledôneas, com exceção da osmotina da soja (*Glycine max*). O grupo IV inclui apenas plantas eudicotiledôneas, com exceção da osmotina de *Oriza sativa*. O grupo V inclui fungos ascomicetos sequências de fungos basidiomicetos e animais (insetos e nematódeos). O grupo VI contém sequências de e é o mais distante evolutivamente dos outros grupos de TLPs.

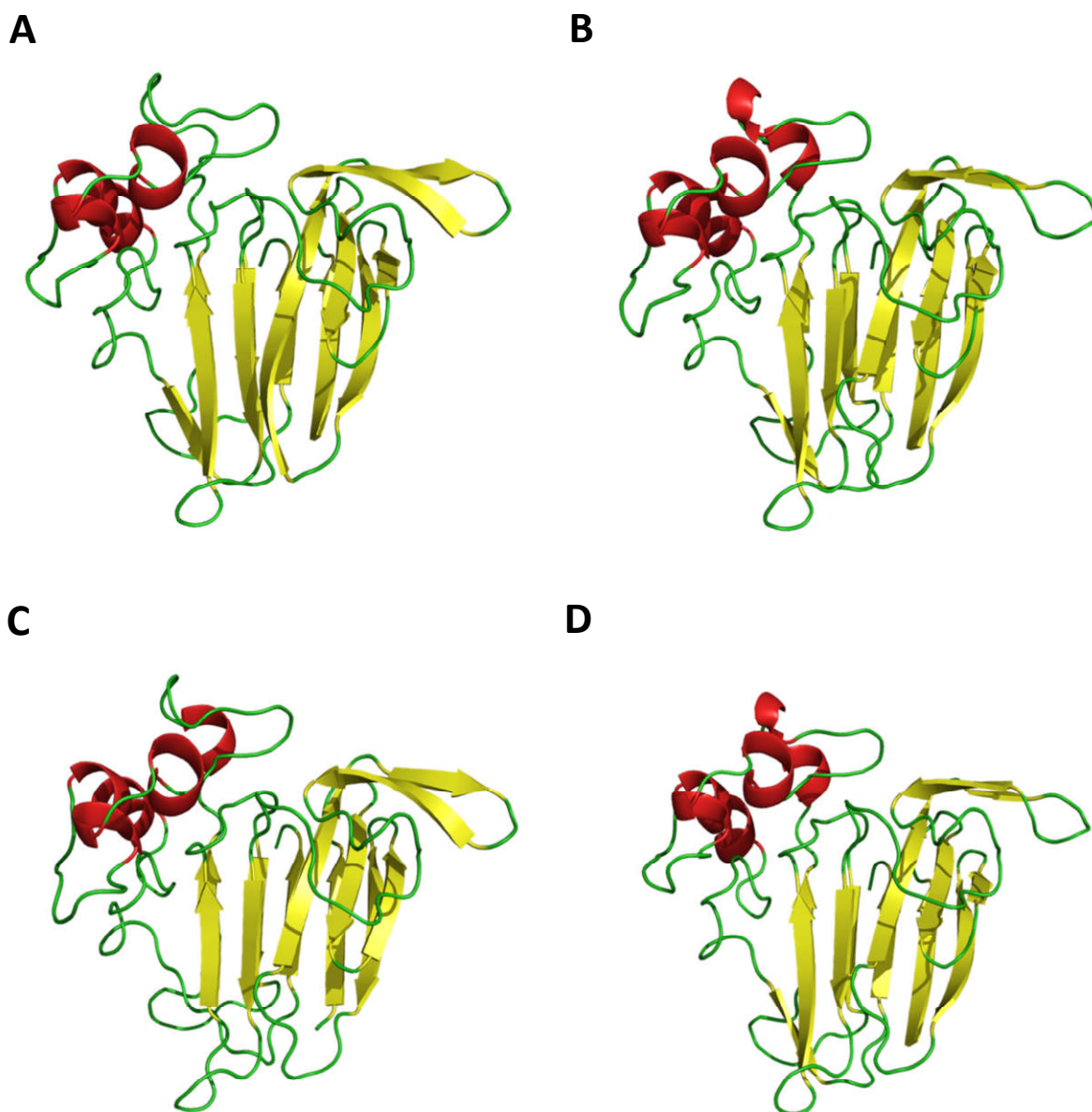
Figura 18 - Árvore filogenética das estruturas primárias de diferentes proteínas da família PR-5.



A árvore filogenética foi construída utilizando o método de Neighbor-Joining no programa Mega 6.1., utilizando um *bootstrap* com 1000 replicações. As duas/três primeiras letras referem-se à sigla de cada organismo, seguida do número de acesso: Ac (*Actinidia chinensis*), Af (*Aspergillus fumigatus*), An (*Aspergillus nidulans*), Ap (*Acyrtosiphon pisum*), At (*Arabidopsis thaliana*), Br (*Brassica rapa*), Ca (*Capsicum annuum*), Cc (*Coprinopsis cinerea*), Ce (*Caenorhabditis elegans*), Cg (*Cryptostegia grandiflora*), Cp (*Calotropis procera*), Cpa (*Carica papaya*), Cyc (*Cynara cardunculus var. scolymus*), Eg (*Eucalyptus grandis*), Gm (*Glycine max*), Hb (*Hevea brasiliensis*), Jc (*Jatropha curcas*), Md (*Malus domestica*), Mm (*Mikania micrantha*), Mp (*Moniliophthora perniciosa*), Nt (*Nicotiana tabacum*), Os (*Oryza sativa*), Pc (*Piper colubrinum*), Pr (*Plumeria rubra*), Ps (*Populus szechuanica*), Sl (*Solanum lycopersicum*), Ta (*Triticum aestivum*), Tc (*Tribolium castaneum*), Td (*Thaumatococcus daniellii*) Thc (*Theobroma cacao*), Zm (*Zea mays*).

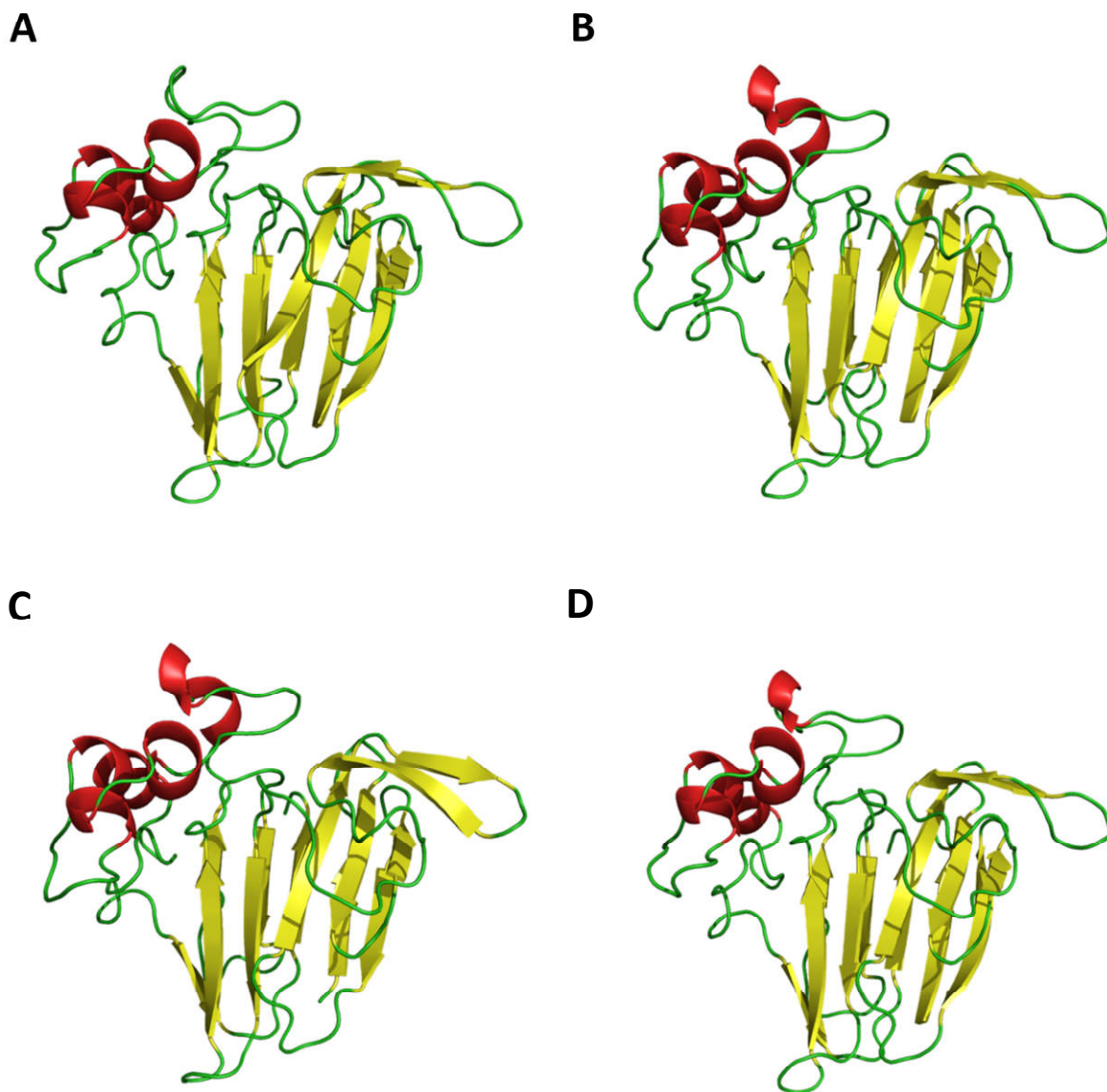
Modelos tridimensionais das osmotinas de *P. rubra* foram construídos a partir de quatro servidores diferentes: CPHmodels 3.2, Modeller, Phyre2 e Swiss Model (Figuras 19, 20 e 21). A estrutura tridimensional da CpOsm (PDB: 4L2J, cadeia A) obtida por cristalografia e difração de raios-X foi selecionada como molde, devido a sua alta similaridade com as sequências de aminoácidos das osmotinas de *P. rubra* e homologia evidenciada nas análises filogenéticas.

Figura 19 - Modelos tridimensionais obtidos para a PrOsm1 usando diferentes plataformas.



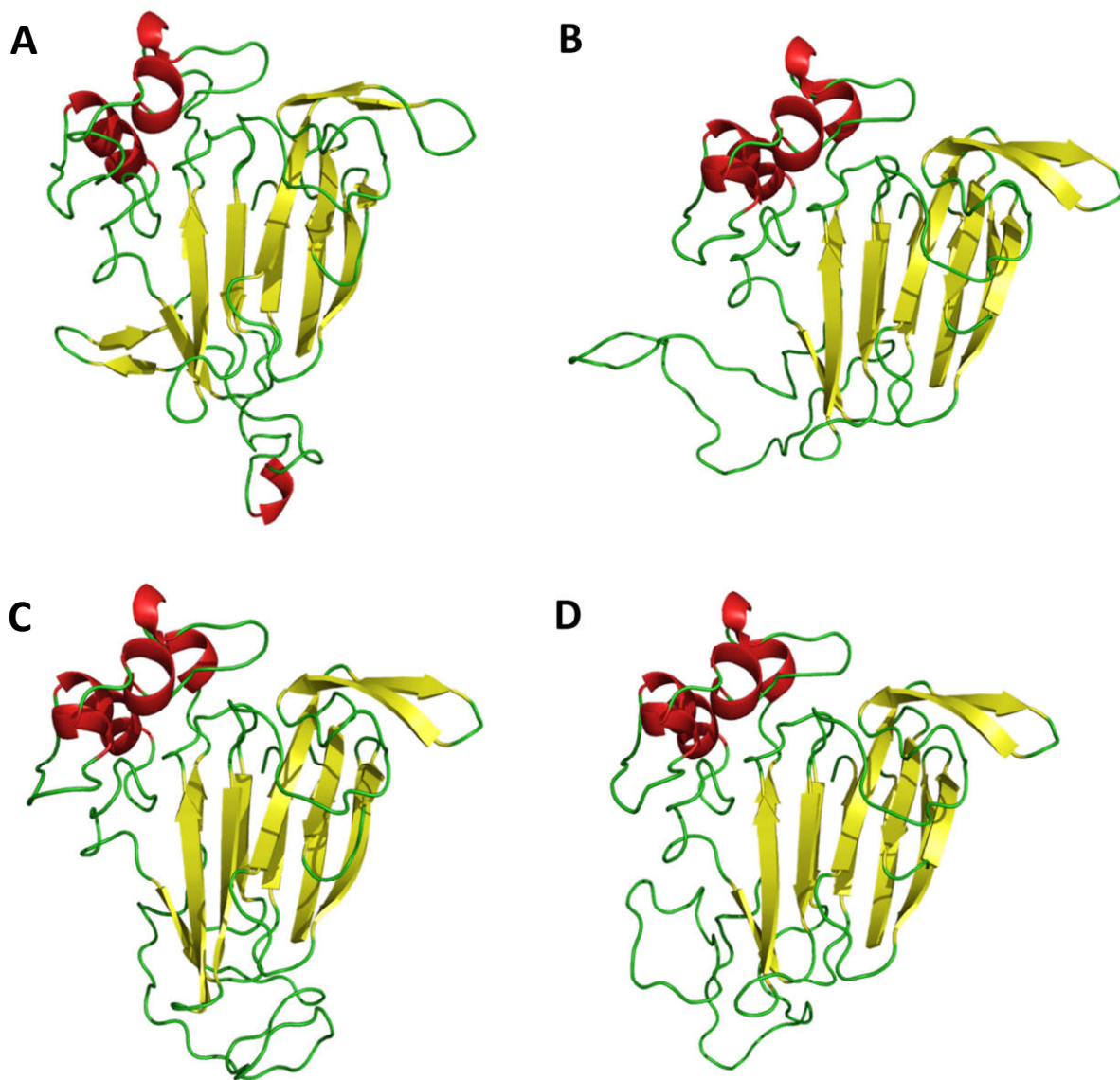
Representação em “cartoon” dos modelos tridimensionais construídos pelos servidores: CPHmodels 3.2 (A); Modeller (B); Phyre2 (C) e Swiss Model (D). Estrutura secundária representada em diferentes cores: α -hélice (vermelho), fita- β (amarelo), alças (verde).

Figura 20: Modelos tridimensionais obtidos para a PrOsm3 usando diferentes plataformas.



Representação em “*cartoon*” dos modelos tridimensionais construídos pelos servidores: CPHmodels 3.2 (A); Modeller (B); Phyre2 (C); Swiss Model (D). Estrutura secundária representada em diferentes cores: α -hélice (vermelho), fita- β (amarelo), alças (verde).

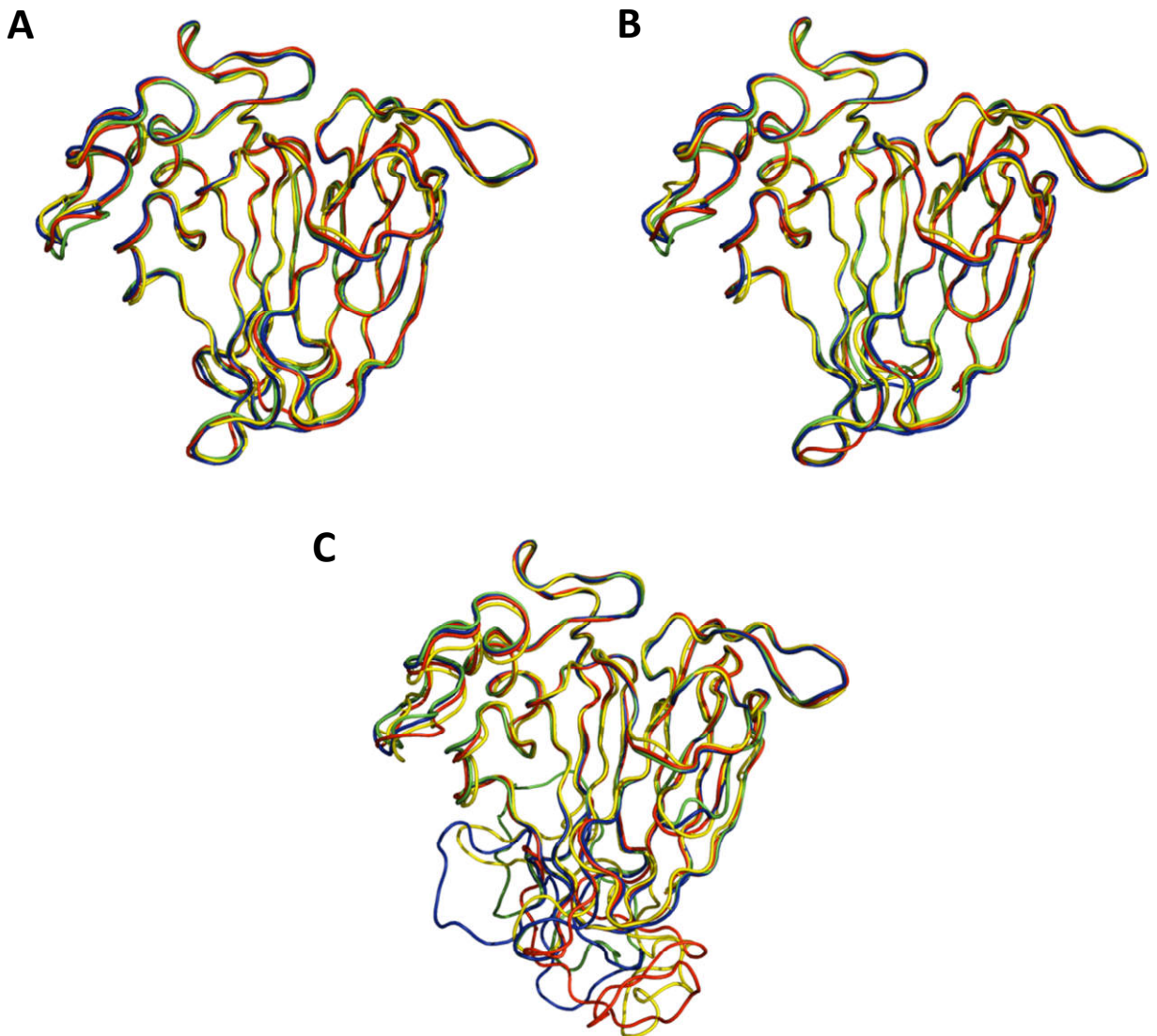
Figura 21 - Modelos tridimensionais obtidos para a PrOsm4 usando diferentes plataformas.



Representação em “*cartoon*” dos modelos tridimensionais construídos pelos servidores: CPHmodels 3.2 (A); Modeller (B); Phyre2 (C); Swiss Model (D). Estrutura secundária representada em diferentes cores: α -hélice (vermelho), fita- β (amarelo), alças (verde).

A sobreposição dos quatro modelos construídos para cada osmotina usando os servidores: CPHmodels 3.2, Modeller, Phyre2 e Swiss Model foi realizada com o auxílio do programa PyMoL 1.7, com o objetivo de visualizar divergências estruturais nos modelos tridimensionais gerados pelas diferentes plataformas e a estrutura da osmotina de *C. procera*, utilizada como molde (Figura 22). Os modelos apresentaram pequena divergência estrutural entre si, com exceção da PrOsm4, onde é observada grande variabilidade no modelamento da região onde há a inserção na sequência.

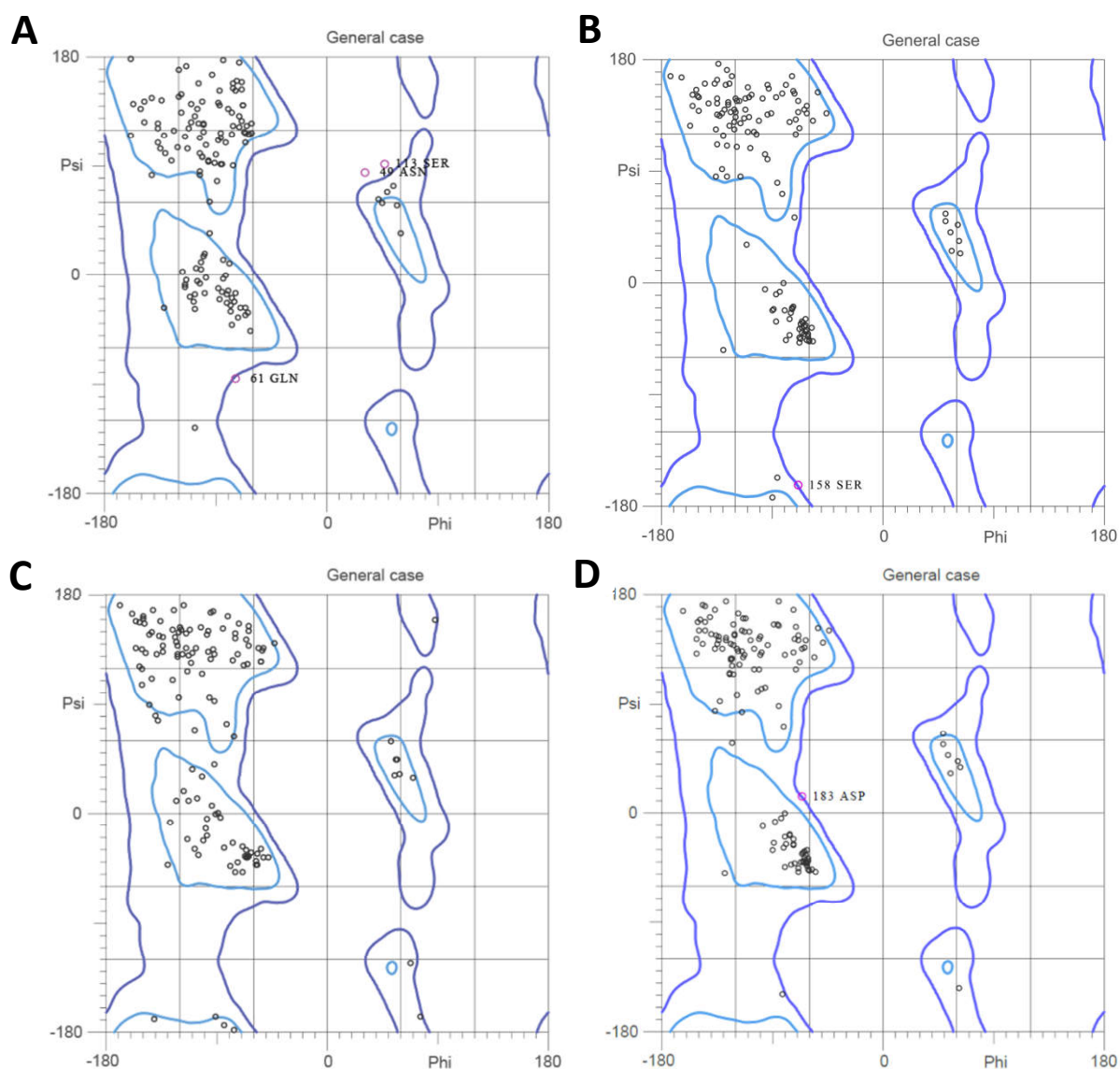
Figura 22 - Sobreposição dos modelos tridimensionais obtidos para cada osmotina de *P. rubra*.



Sobreposição das representações em “*ribbon*” da: PrOsm1 (A), PrOsm3 (B) e PrOsm4 (C). Modelos construídos por cada servidor estão representados em cores distintas: CPHmodels 3.2 (amarelo); Modeller (verde); Phyre2 (vermelho); Swiss Model (azul).

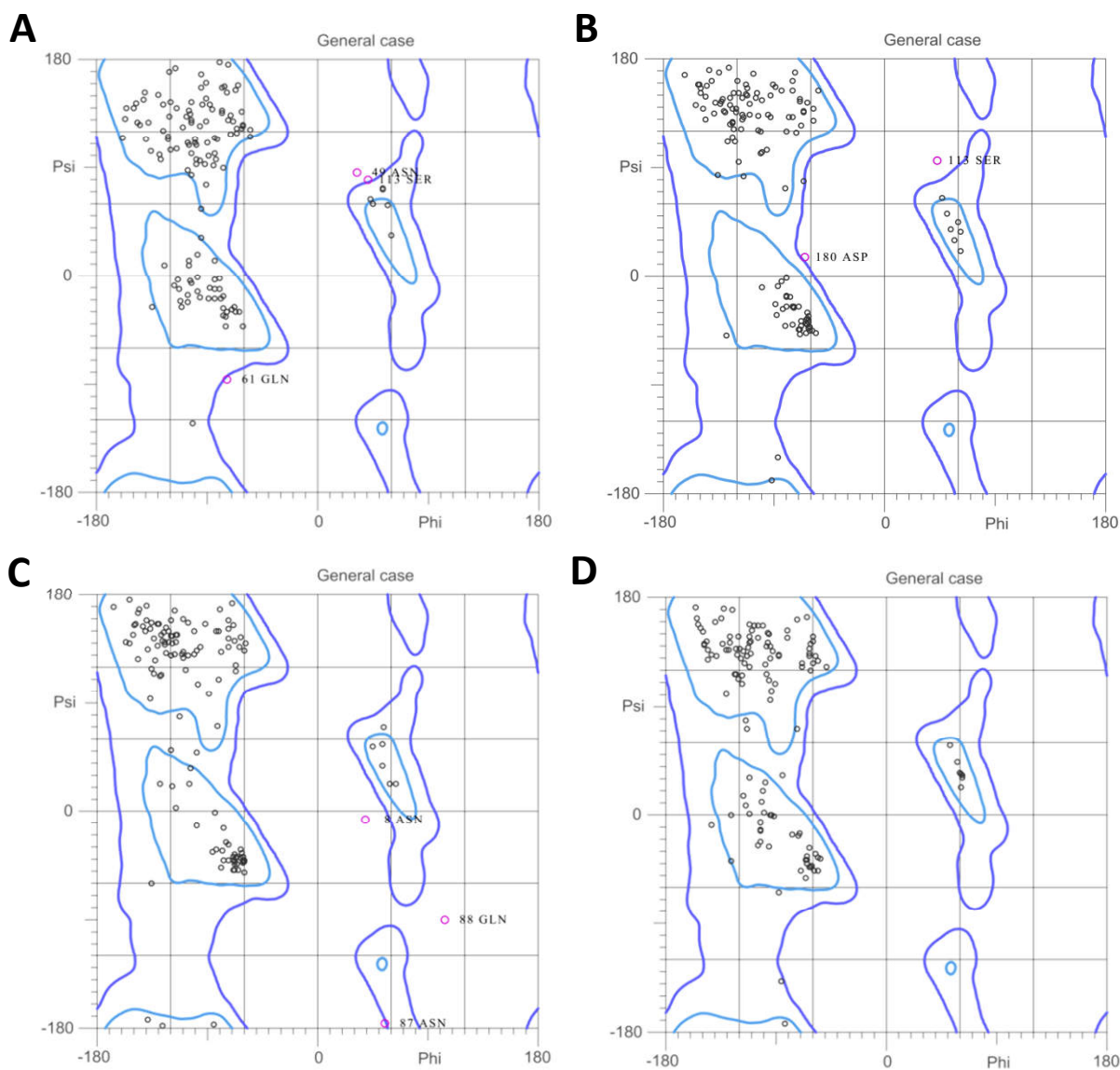
A qualidade dos modelos construídos, por cada um dos servidores para as três osmotinas de *P. rubra*, foi validada por meio do gráfico de Ramachandran, gerado usando o servidor MolProbity (Figuras 23, 24 e 25). Adicionalmente, foram realizadas análises pelos programas ProSA e ERRAT2 (Tabela 4).

Figura 23 - Gráfico de Ramachandran dos modelos tridimensionais obtidos para a PrOsm1.



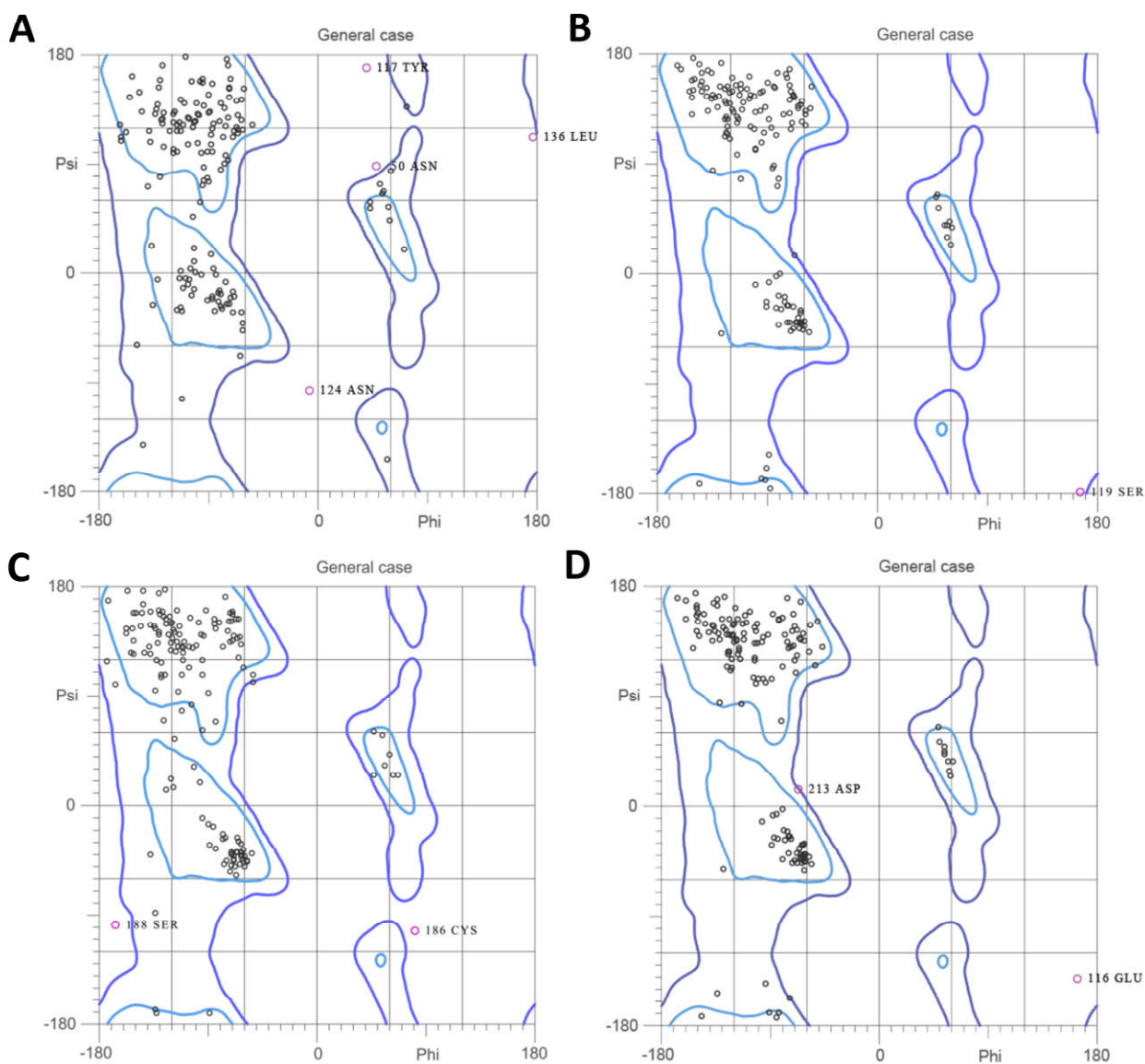
Os gráficos de Ramachandran foram gerados pelo servidor MolProbity, a partir dos modelos tridimensionais construídos pelos servidores: CPHmodels 3.2 (A), Modeller (B), Phyre2 (C) e Swiss Model (D).

Figura 24 - Gráfico de Ramachandran dos modelos tridimensionais obtidos para a PrOsm3.



Os gráficos de Ramachandran foram gerados pelo servidor MolProbity, a partir dos modelos tridimensionais construídos pelos servidores: CPHmodels 3.2 (A), Modeller (B), Phyre2 (C) e Swiss Model (D).

Figura 25 - Gráfico de Ramachandran dos modelos tridimensionais obtidos para a PrOsm4.



Os gráficos de Ramachandran foram gerados pelo servidor MolProbity, a partir dos modelos tridimensionais construídos pelos servidores: CPHmodels 3.2 (A), Modeller (B), Phyre2 (C) e Swiss Model (D).

As análises dos gráficos de Ramachandran revelaram que os modelos que exibiram a melhor qualidade para a PrOsm1 e PrOsm4 foram os construídos pelo programa MODELLER 9.16, enquanto que para a PrOsm3 o melhor modelo foi o gerado pelo servidor Swiss Model, pois tais modelos apresentaram o maior número de resíduos de aminoácidos em regiões fisicamente permitidas (99,5% para as PrOsm1 e PrOsm3 e 99,1% para a PrOsm4). Os dados obtidos pelo programa ERRAT2 mostraram que os modelos construídos pelo servidor apresentaram os maiores fatores de qualidade global, corroborando a análise do Gráfico de Ramachandran. Os valores de Z-score obtidos pelo programa ProSa, a partir dos modelos construídos, foram próximos ao valor de -5,9 encontrado para a estrutura tridimensional da CpOsm resolvida por cristalografia e difração de raios-X. Os dados estatísticos dos de todos os modelos construídos são mostrados na tabela 4. Todas as análises estruturais posteriores foram realizadas usando somente o modelo tridimensional de maior qualidade para cada PrOsm.

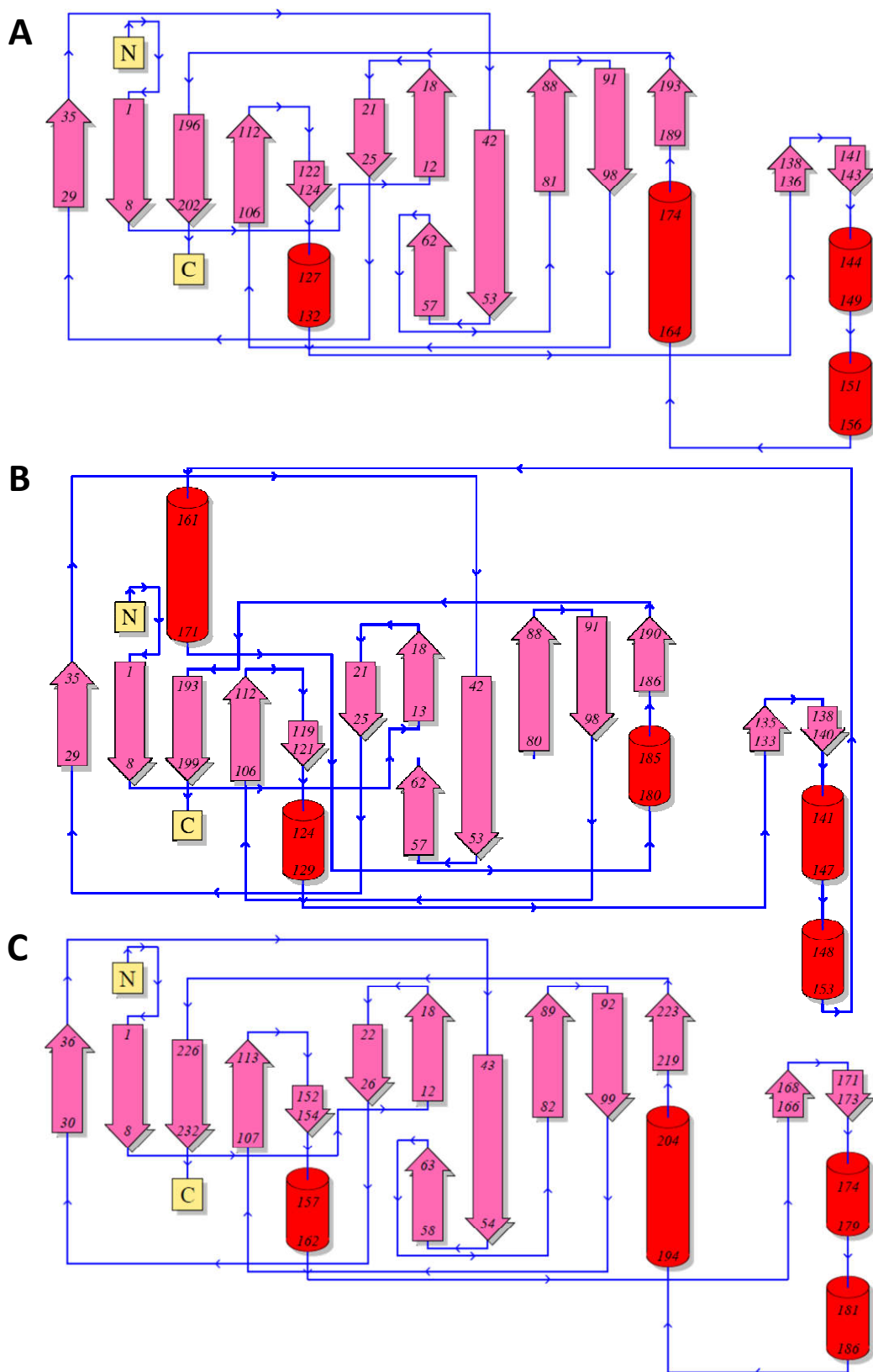
Tabela 4 - Avaliação da qualidade dos modelos tridimensionais das osmotinas de *P. rubra* construídos por diferentes plataformas.

	Plataforma	ProSA (Z-score)	ERRAT2 (fator de qualidade global)	Gráfico de Ramachandran		
				A	B	C
PrOsm1	CPHmodels 3.2	-5,97	72,821	91	98,5	3 (ASN ₄₉ ; GLN ₆₁ ; SER ₁₁₃)
	Modeller	-5,96	84,103	97	99,5	1 (SER ₁₅₈)
	Phyre2	-5,81	85,864	94	99,5	1 (PRO ₄₆)
	Swiss Model	-5,93	75,385	95,5	99	2 (ASP ₁₈₃ ; GLY ₁₉₃)
PrOsm3	CPHmodels 3.2	-5,95	76,471	90,9	98,5	3 (ASN ₄₉ ; GLN ₆₁ ; SER ₁₁₃)
	Modeller	-5,97	77,604	96,5	99	2 (SER ₁₁₃ ; ASP ₁₈₀)
	Phyre2	-5,94	69,792	95,5	98,5	3 (ASN ₈ ; ASN ₈₇ ; GLN ₈₈)
	Swiss Model	-5,96	97,398	95,5	100	0
PrOsm4	CPHmodels 3.2	-5,17	74,091	85,7	96,5	8 (VAL ₂₀ ; ASN ₅₀ ; GLY ₁₁₅ ; TYR ₁₁₇ ; ASN ₁₂₄ ; GLY ₁₃₅ ; LEU ₁₃₆ ; ILE ₁₃₈)
	Modeller	-4,97	68,246	94,8	99,6	1 (SER ₁₁₉)
	Phyre2	-5,34	65,158	93,1	99,1	2 (CYS ₁₈₆ ; SER ₁₈₈)
	Swiss Model	-4,79	66,071	95,2	97,8	5 (VAL ₂₀ ; GLU ₁₁₆ ; ILE ₁₃₀ ; VAL ₁₃₃ ; ASP ₂₁₃)
CpOsm (4L2J)		-5,9	93,909	96,6	100	0

A - Resíduos em regiões favoráveis (%). B - Resíduos em regiões permitidas (%). C - Resíduos em regiões não permitidas. O melhor modelo, de acordo com os parâmetros analisados para cada osmotina, está sombreado em cinza.

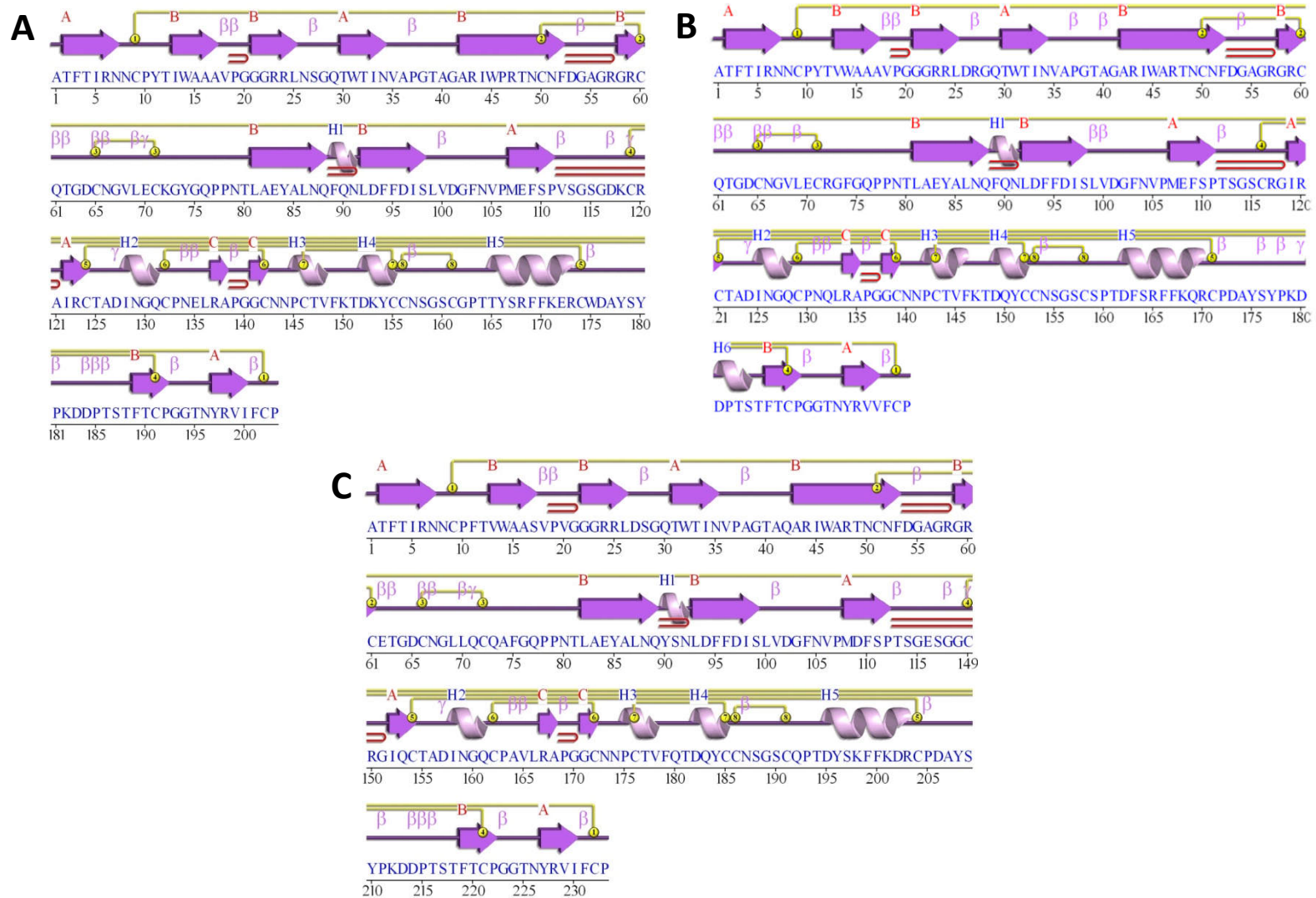
Os elementos de estrutura secundária das três osmotinas de *P. rubra*, preditos pelo servidor PDBsum (<https://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>), revelaram que as proteínas são compostas por α -hélices, fitas- β e alças (loops) (Figura 26), sendo que, a maioria dos resíduos de aminoácidos encontra-se organizada estruturalmente em fitas- β . As estruturas das PrOsms são estabilizadas por 8 ligações dissulfetos (Figura 27). Assim como descrito para outras TLPs (KOIWA *et al.*, 1999), a estrutura das osmotinas de *P. rubra* é composta por 3 domínios distintos (Figura 28). O domínio I é constituído por 10 fitas- β (cinco fitas- β antiparalelas a outras cinco fitas- β) formando uma estrutura similar a um sanduíche, a qual compõe a parte central da molécula. O domínio II é formado principalmente por α -hélices. O domínio III é constituído por uma longa alça e duas fitas- β antiparalelas.

Figura 26 - Topologia da estrutura secundária das osmotinas de *P. rubra*.



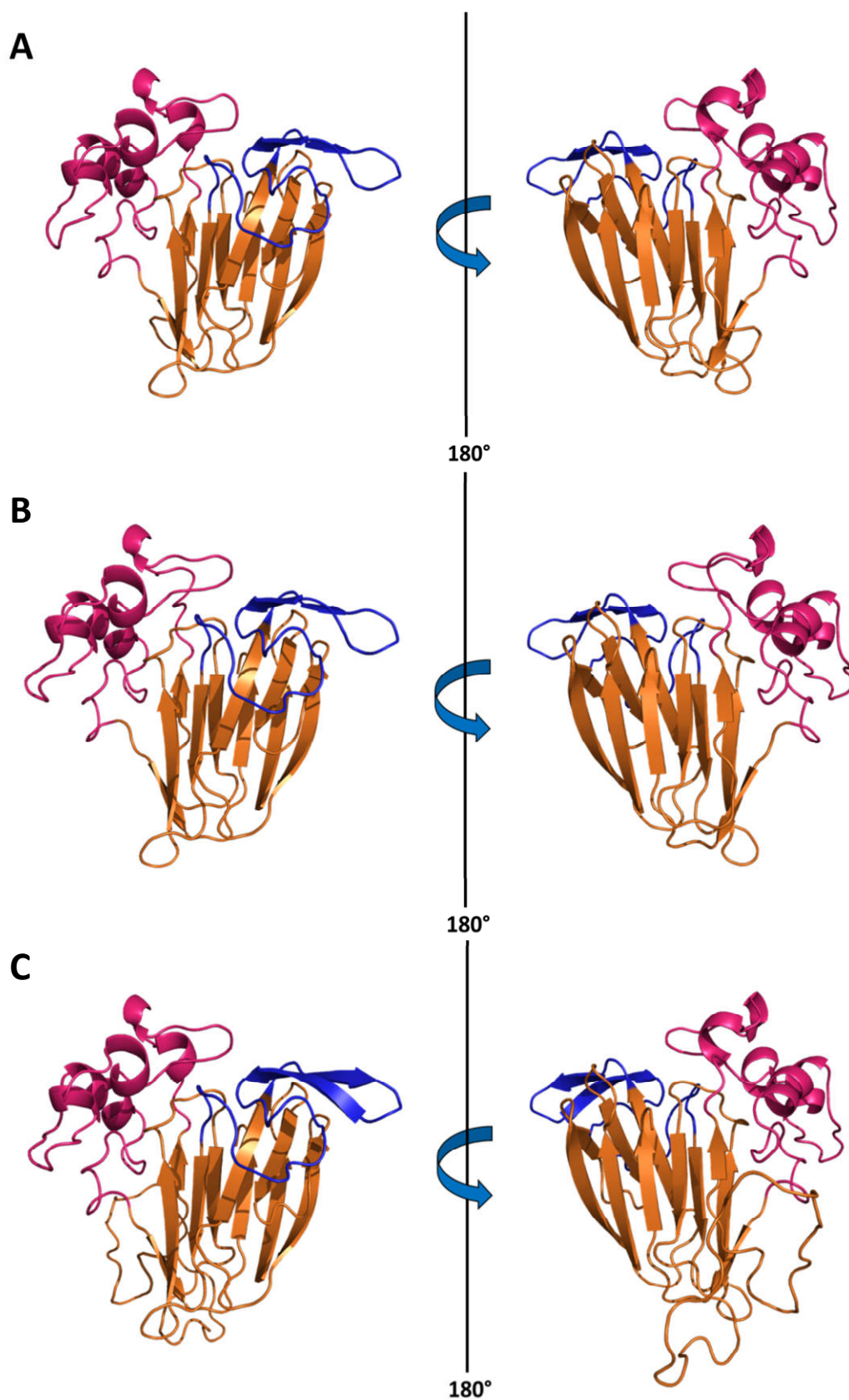
Esquemas gerados usando o servidor PDBsum, a partir da PrOsm1 (A), PrOsm3 (B) e PrOsm4 (C). Elementos de estrutura secundária estão representados por: setas rosa (fitas- β), setas azuis (alças) e cilindros vermelhos (α -hélices).

Figura 27 - Estrutura secundária deduzida para as osmotinas de *P. rubra*.



Esquemas gerados usando o servidor PDBsum a partir da PrOsm1 (A), PrOsm3 (B) e PrOsm4 (C).

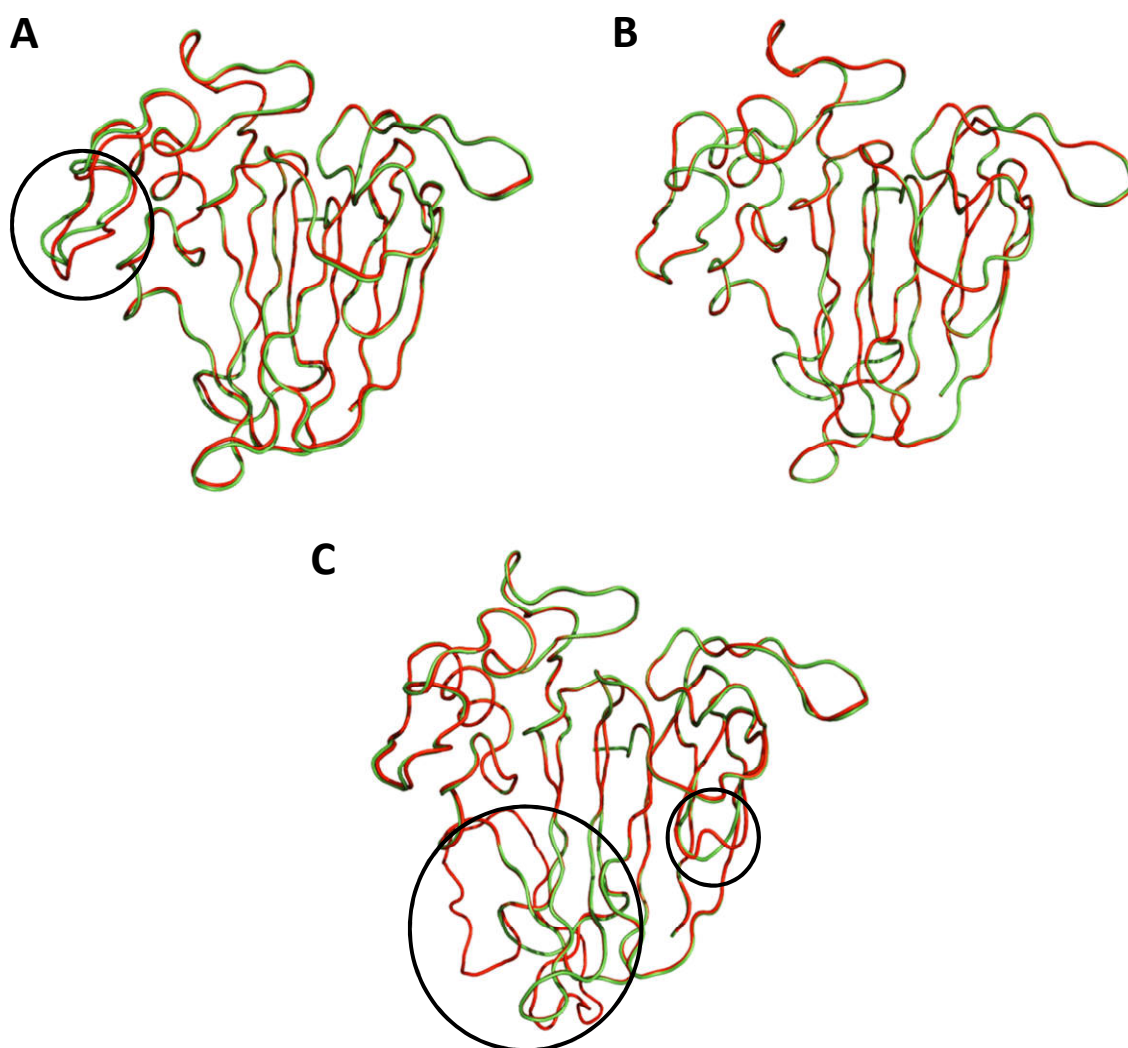
Figura 28 - Domínios estruturais das osmotinas de *Plumeria rubra*.



Modelos tridimensionais em “cartoon” da PrOsm1 (A), PrOsm3 (B) e PrOsm4 (C). Os domínios estruturais estão destacados em diferentes cores: Domínio I (laranja), Domínio II (rosa) e Domínio III (azul).

O desvio estrutural entre a estrutura tridimensional da CpOsm (4L2J) e o melhor modelo de cada osmotina de *P. rubra* (Figura 29) foi mensurado por meio de RMSD (raiz quadrada do desvio médio) correspondente a diferença de posição entre átomos equivalentes (C α e átomos da cadeia principal) superpostos. Os valores de RMSD foram de 0,377 Å para a PrOsm1; 1,013 Å para a PrOsm3 e 0,253 Å para a PrOsm4. Tais valores indicam pequena variabilidade estrutural entre os modelos construídos e a estrutura da CpOsm resolvida por cristalografia e difração de raios-X. Como é mostrado pela sobreposição, as divergências entre as duas estruturas encontram-se principalmente nas regiões compostas por alças.

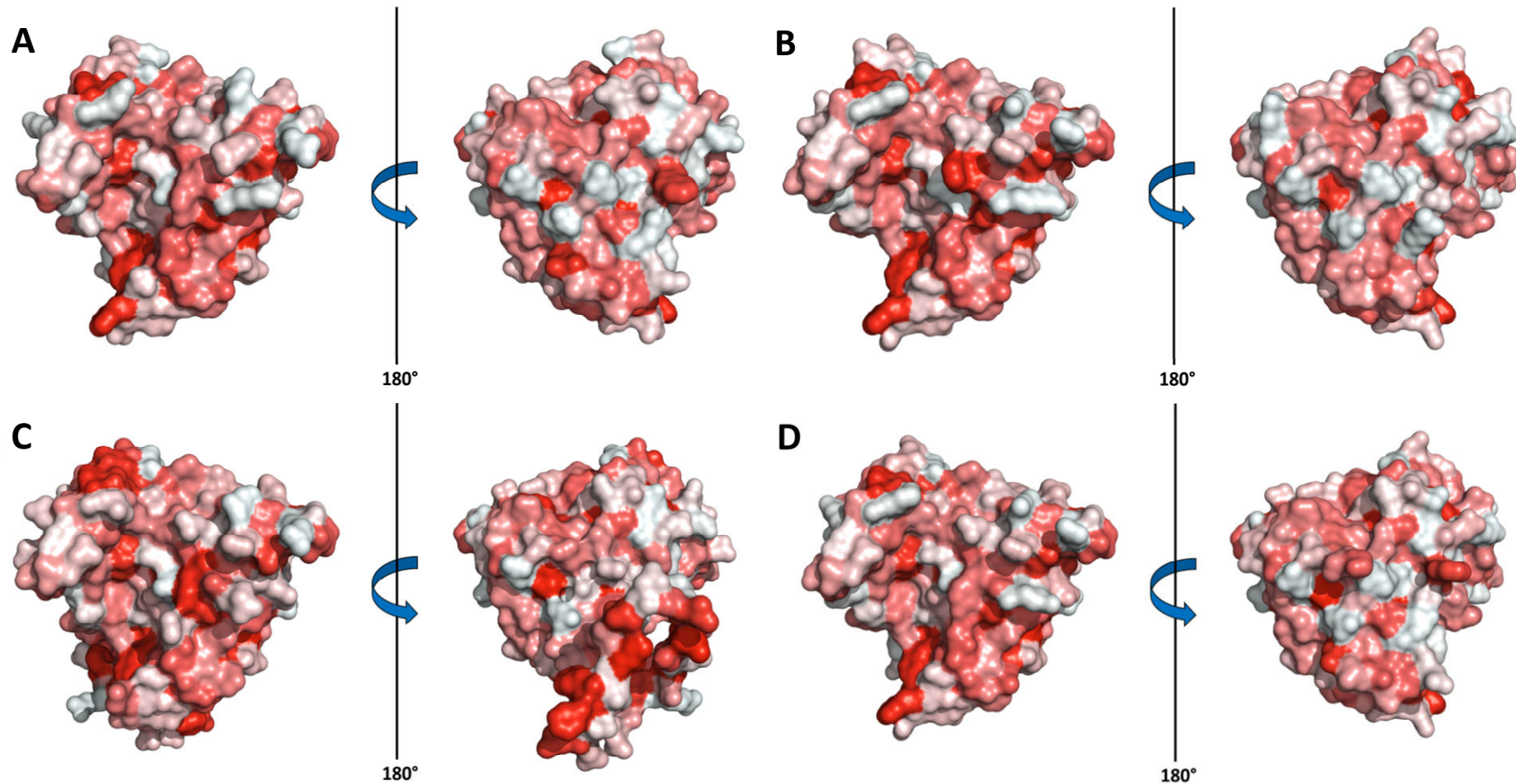
Figura 29 - Sobreposição dos modelos 3D de cada osmotina de *P. rubra* com a estrutura tridimensional da CpOsm (4L2J).



Modelos “*ribbon*” da PrOsm1 (A), PrOsm3 (B) e PrOsm4 (C) representados em vermelho; A estrutura tridimensional da osmotina de *C. procera* (4L2J) está representada em verde. Círculos pretos evidenciam as regiões onde há maior divergência entre as estruturas.

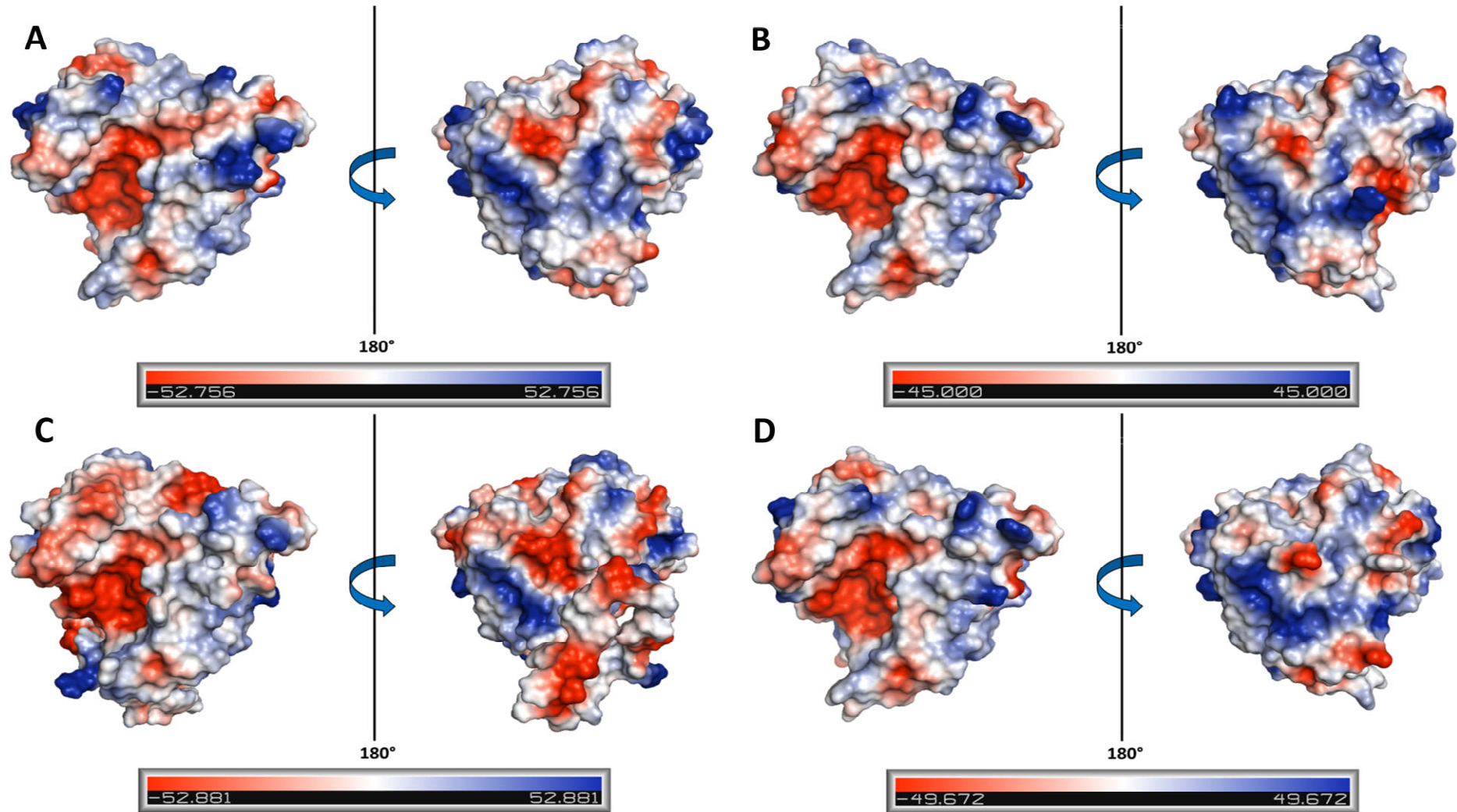
A superfície das osmotinas de *P. rubra* é predominantemente hidrofílica, contudo apresenta algumas regiões hidrofóbicas (Figura 30). O mapeamento dos potenciais eletrostáticos (Figura 31) revelou que as osmotinas de *P. rubra* possuem caráter majoritariamente básico, com exceção da PrOsm4, onde pode ser observada uma redução das regiões com potenciais positivos (azuis) e um aumento de regiões neutras (brancas) e com potenciais negativos (vermelhas), quando comparado com as outras duas osmotinas e a CpOsm. Este resultado é consistente com os pontos isoelétricos preditos para cada osmotina, que foram básicos para a PrOsm1 e PrOsm3 (8,16 e 7,9, respectivamente) e ácido para a PrOsm4 (4,64). Entre os domínios I e II há uma fenda de natureza eletronegativa, característica comumente observada em proteínas do tipo osmotina. A eletronegatividade desta região é originada pela presença de 4 resíduos ácidos (Glu, Asp, Asp, Asp), os quais são destacados na figura 33.

Figura 30 - Perfil de hidrofobicidade dos modelos de superfície das osmotinas de *P. rubra* e 4L2J (CpOsm).



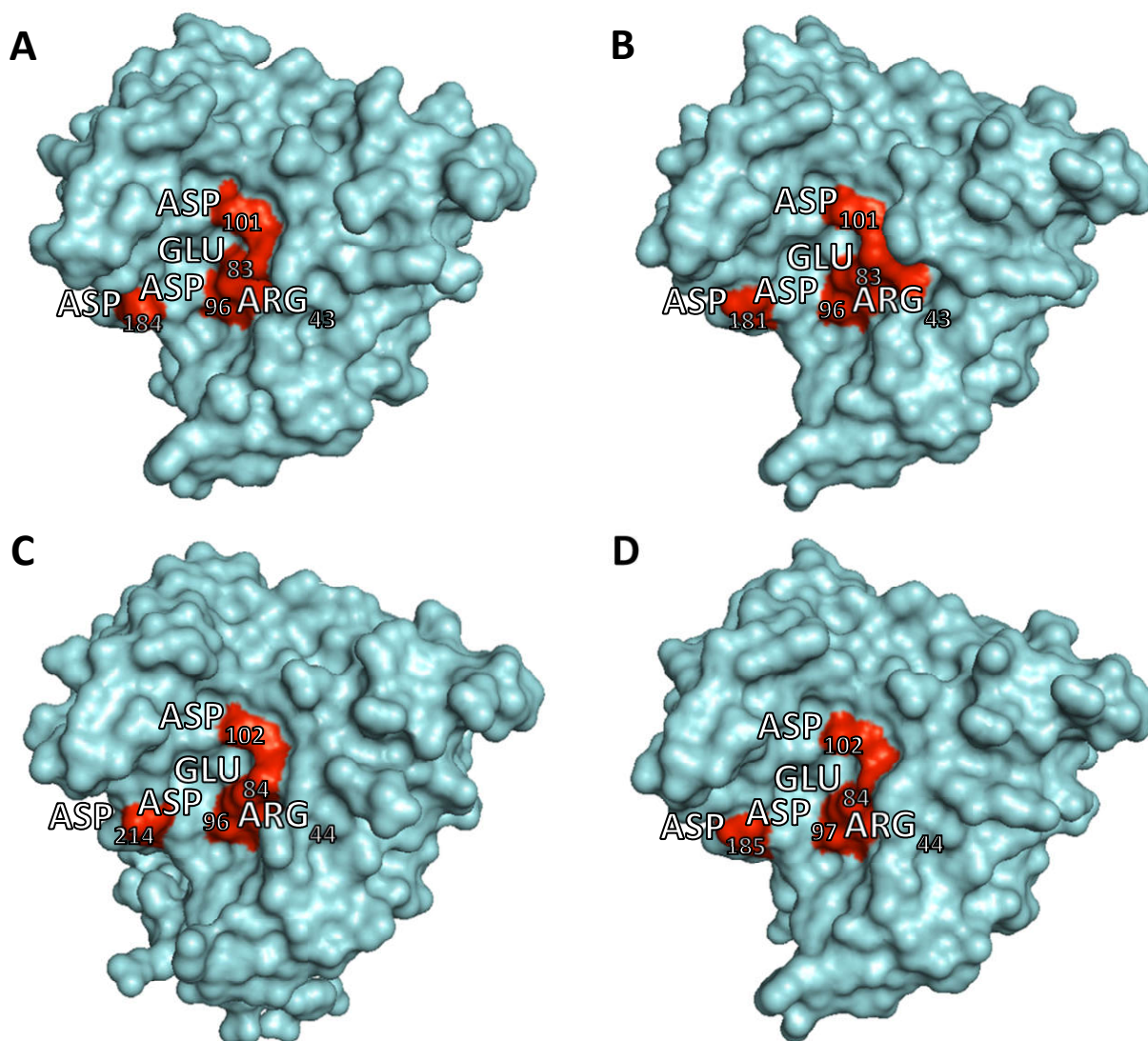
Modelos tridimensionais da PrOsm1 (A), PrOsm3 (B) e PrOsm4 (C). Estrutura da CpOsm (4L2J) (D). Regiões hidrofóbicas estão representadas em vermelho, enquanto regiões hidrofílicas estão representadas em branco, de acordo com a escala de hidrofobicidade de Eisenberg (EISENBERG *et al.*, 1984).

Figura 31 - Mapeamento dos potenciais eletrostáticos das osmotinas de *P. rubra* em comparação com a CpOsm (4L2J).



Modelos tridimensionais da PrOsm1 (A), PrOsm3 (B) e PrOsm4 (C). Estrutura da CpOsm (4L2J) (D). Regiões destacadas em vermelho representam potenciais negativos, enquanto regiões destacadas em azul representam potenciais positivos.

Figura 32 - Fenda acídica representada em modelos de superfície das osmotinas de *P. rubra* e comparação com a CpOsm (4L2J).

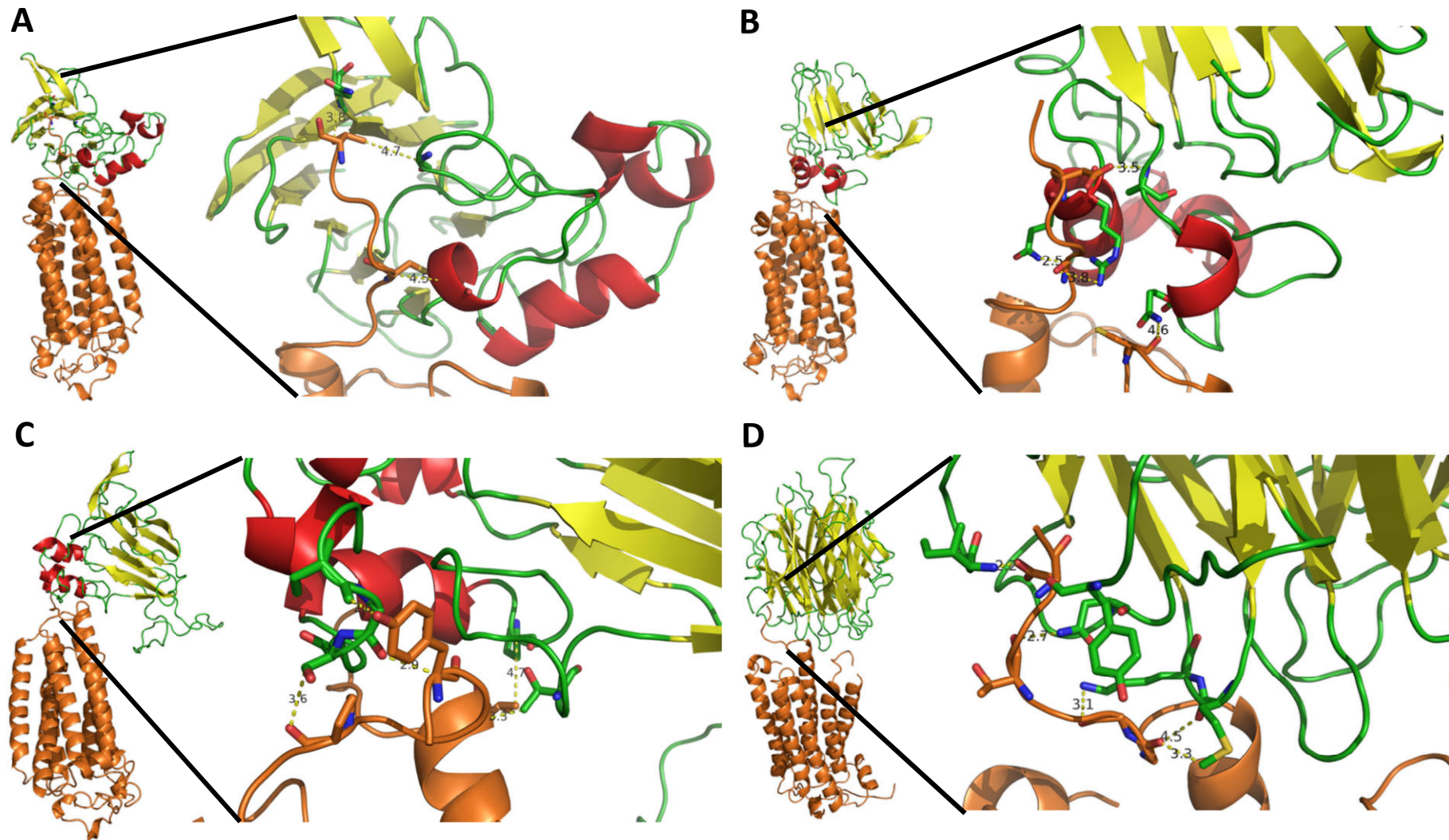


Representação de superfície dos modelos tridimensionais da PrOsm1 (A), PrOsm3 (B) e PrOsm4 (C). Estrutura tridimensional da CpOsm (D). Os cinco resíduos constituintes da fenda acídica estão destacados em vermelho e respectivamente marcados.

1.4 Predição da interação das PrOsms com os receptores de adiponectina

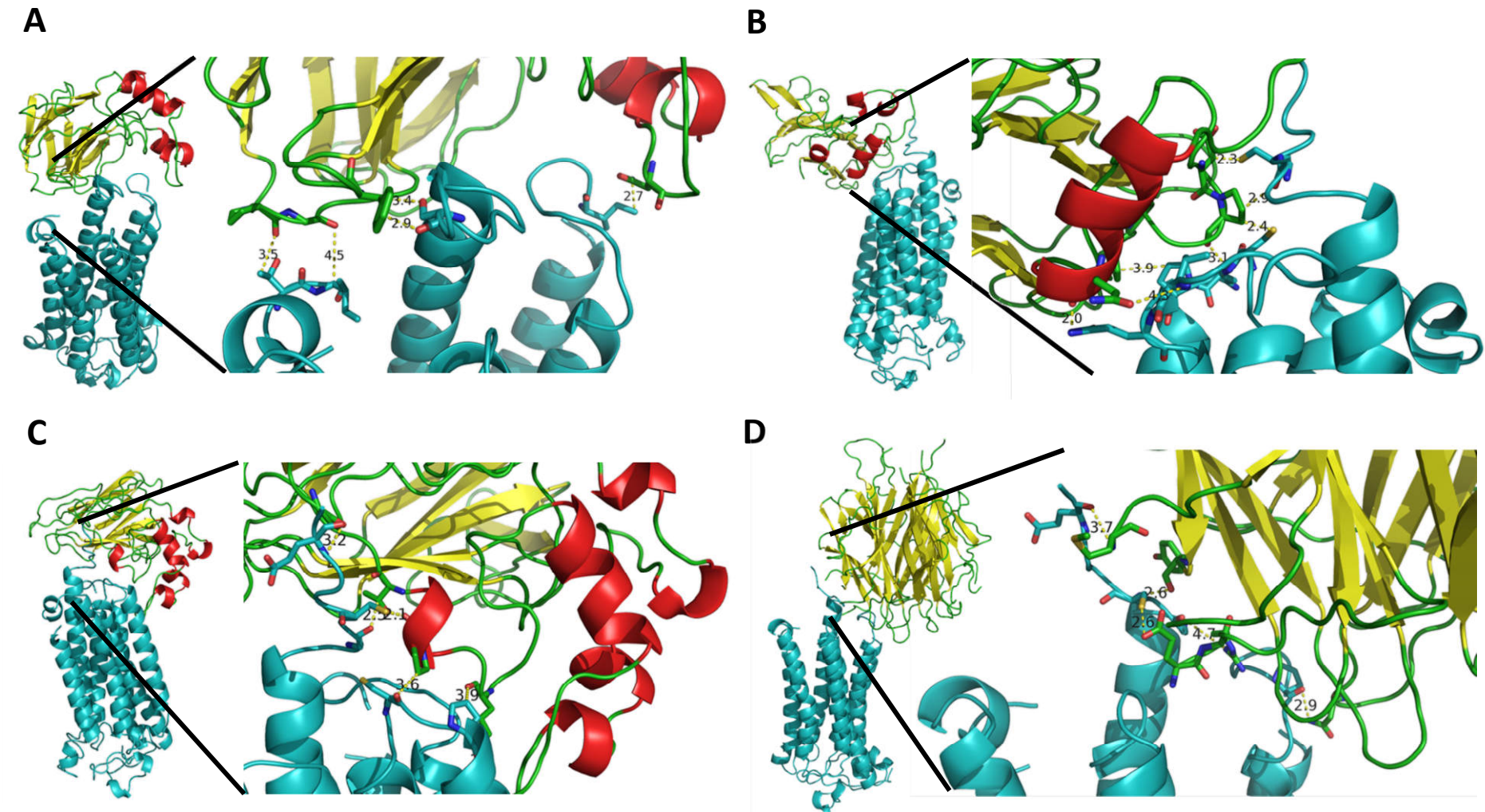
As três osmotinas de *P. rubra* foram avaliadas quanto suas capacidades de interagirem com os dois receptores de adiponectina humana (AdipoR1 e AdipoR2), *in silico*. Os complexos PrOsm/AdipoR mostraram arquitetura global semelhante aos dos complexos AdipoQ/AdipoR (Figura 33). A adiponectina interage com os receptores AdipoR1 e AdipoR2 através de alças presentes no topo do domínio globular (Figura 33D). As três osmotinas de *P. rubra* (Figuras 33A e B) parecem interagir com os receptores de adiponectina por meio de resíduos de aminoácidos compreendidos em regiões de alças e fitas- β . No entanto, os resíduos presentes nessas interações são distintos e poderão gerar diferentes graus de afinidade com os dois receptores de adiponectina. A partir de um estudo mais detalhado da interação entre cada isoforma da osmotina de *P. rubra* e os dois receptores de adiponectina, espera-se desenhar peptídeos que serão sintetizados e avaliados quanto suas atividades biológicas. Assim, gerando um possível fármaco com atividade mimética ao hormônio adiponectina.

Figura 33 - Modelos tridimensionais dos complexos PrOsm/AdipoR1 e AdipoQ/AdipoR1.



A PrOsm1 (A), PrOsm3 (B), PrOsm4 (C) e Adiponectina humana (AdipoQ) (D). O receptor de adiponectina humana AdipoR1 está representado em laranja.

Figura 34 - Modelos tridimensionais dos complexos PrOsm/AdipoR2 e AdipoQ/AdipoR2.



PrOsm1 (A), PrOsm3 (B), PrOsm4 (C) e Adiponectina humana (AdipoQ) (D). O receptor de adiponectina humana AdipoR2 está representado em ciano.

6 DISCUSSÃO

Um grande número de proteínas do tipo osmotina/taumatina tem sido descritas e caracterizadas em diversas espécies de plantas, animais e até mesmo fungos (LIU *et al.*, 2010; PETRE *et al.*, 2011; FRANCO *et al.*, 2015). No entanto, há poucos relatos de osmotinas em fluídos laticíferos. A primeira proteína do tipo osmotina identificada em fluídos laticíferos foi do látex de *Hevea brasiliensis* (SUBROTO *et al.*, 2001). Posteriormente, três proteínas do tipo taumatina foram identificadas, purificadas e caracterizadas nos látices de *Carica papaya* (LOOZE *et al.*, 2009), *Calotropis procera* (FREITAS *et al.*, 2011a; FREITAS *et al.*, 2011b) e *Cryptostegia grandiflora* (SOUZA, 2014). Mais recentemente, Freitas e colaboradores (2015) identificaram outras osmotinas nos látices de *Plumeria rubra* e *Himatanthus drasticus*. A presença de uma proteína do tipo osmotina no látex de *P. rubra* foi confirmada neste trabalho, por meio de ensaios de *western blot* utilizando anticorpos anti-CpOsm, como descrito por Freitas e colaboradores (2015) (Figura 6B).

A purificação de proteínas é um processo laborioso, necessitando, em muitos casos, de várias etapas cromatográficas e, por conseguinte, apresentando baixo rendimento. Nesse sentido, estratégias alternativas têm sido empregadas para possibilitar a caracterização estrutural de proteínas, sendo a clonagem molecular seguida de análises *in silico*, uma das mais utilizadas. Diversos trabalhos reportam a clonagem e caracterização estrutural de osmotinas de diferentes espécies, como: *Arabidopsis thaliana* (CAPELLI *et al.*, 1997), *Solanum nigrum* (JAMI *et al.*, 2007), *Piper colubrinum* (MANI; MANJULA, 2010) e *Ocimum basilicum* (RATHER *et al.*, 2015). Contudo, estudos estruturais de osmotinas laticíferas foram descritos apenas para àquelas de *C. papaya* e *C. procera* (LOOZE *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2015)

Uma vez confirmada a existência de pelo menos uma proteína do tipo osmotina presente no látex de *Plumeria rubra*, o presente estudo teve como objetivo amplificar os seus genes e realizar a clonagem e caracterização estrutural destas proteínas. Inicialmente, para clonagem do(s) fragmento(s) do(s) gene(s) codificante(s) da(s) osmotina(s) de *P. rubra*, foram utilizados iniciadores degenerados desenhados para a osmotina de *Calotropis procera* (CpOsm), devido à possível similaridade estrutural evidenciada por meio do reconhecimento pelo

anticorpo anti-CpOsm. A amplificação a partir do cDNA de *P. rubra* e do par de iniciadores degenerados (CpOsmF e CpOsmR) gerou-se um fragmento de aproximadamente 600 pb, o qual foi ligado a um vetor de clonagem (pGEM-T Easy). Células de *E. coli* DH5 α eletrocompetentes foram então transformadas com os vetores resultantes e os plasmídeos recombinantes (pGEM-T Easy::PrOsm) foram sequenciados.

O alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos mostrou a existência de três osmotinas com sequências únicas (PrOsm1, PrOsm3 e PrOsm4). As sequências de aminoácidos deduzidas das osmotinas de *P. rubra* exibiram alta identidade com proteínas do tipo osmotina e taumatina, apresentando a região conservada definida como assinatura molecular da família PR5 (G-x-[GF]-x-C-x-T-[GA]-D-C-x(1,2)-[GQ]-x(2,3)-C) (LIU; STURROCK; EKRAMODDOULLAH, 2010).

As três osmotinas de *P. rubra* (PrOsm1, PrOsm3 e PrOsm4) caracterizadas neste trabalho apresentaram pesos moleculares distintos: aproximadamente 22 kDa, 21 kDa e 25 kDa, respectivamente, ressaltando que a PrOsm4 possui uma inserção em sua sequência. A maioria das proteínas da família PR-5 possui um peso molecular na faixa de 20-26 kDa, enquanto proteínas atípicas podem ser tanto menores, chamadas de TLPs do tipo-S ou sTLPs (~17 kDa), ou maiores (~70 kDa), apresentando domínios ou funcionalidades adicionais (RATHER *et al.*, 2015).

As PrOsms apresentam 16 resíduos de cisteína, envolvidos na formação de 8 ligações dissulfeto. Essas ligações dissulfetos são altamente conservadas entre as OLPs (proteínas do tipo osmotina) e auxiliam no enovelamento correto da proteína, além de conferirem alta estabilidade estrutural, mesmo sob condições extremas de pH e temperatura, assim como resistência a proteólise (VIKTOROVA *et al.*, 2012).

As relações evolutivas dentro da superfamília de TLP ainda não são bem compreendidas. Um estudo de relações filogenéticas e estruturais realizado por Shatters e colaboradores (2006) sugere que proteínas PR-5 de plantas e animais divergiram a partir de um único gene ancestral, sendo TLPs parafiléticas em angiospermas e relacionadas às proteínas animais de insetos e nematóides. No entanto, outros estudos indicam que TLPs são agrupadas em três grandes clados monofiléticos representando os reinos Animal, Vegetal e Fungi, respectivamente

(SAKAMOTO *et al.*, 2006; PETRE *et al.*, 2011). No estudo filogenético realizado por Rather e colaboradores (2015), as angiospermas formam um grupo monofilético e proteínas PR-5 de animais aparecem mais proximamente relacionadas a fungos basidiomicetos do que ascomicetos.

As análises filogenéticas da relação entre as sequências de proteínas PR-5 de insetos, nematódeos e plantas indicam uma forte pressão evolutiva para conservar a sequência e a estrutura da proteína. Associado a esta pressão está o aumento contínuo do número de cópias desses genes, em plantas e animais, durante a evolução (SHATTERS *et al.*, 2006).

As análises filogenéticas realizadas no presente estudo evidenciaram a existência de 6 grupos distintos e sugerem que as PrOsm são proximamente relacionadas evolutivamente às osmotinas de *Calotropis procera* e *Cryptostegia grandiflora*, todas pertencentes à família Apocynaceae. Os grupos I a IV são constituídos exclusivamente por sequências de plantas angiospermas, formando um táxon monofilético. Ramos e colaboradores (2015) mostram que a estrutura tridimensional da CpOsm é muito similar às estruturas da taumatina e outras TLPs de eudicotiledôneas, assim como espécies de monocotiledôneas. Isto indica uma forte pressão evolutiva para conservar o enovelamento da taumatina em angiospermas, o qual está muito provavelmente relacionado com a função destas proteínas como moléculas de defesa contra agentes patogênicos e seu papel na adaptação ou tolerância das plantas a estresses abióticos (JAMI *et al.*, 2007; DAS *et al.*, 2011; RAMOS *et al.*, 2015). O grupo V inclui sequências de fungos basidiomicetos e animais (insetos e nematóides), formando um grupo (animal) parafilético. O grupo VI é formado por sequências de fungos ascomicetos, sendo o mais distante evolutivamente dos outros grupos de TLPs. Em adição a longa deleção, similar à encontrada em TLPs do tipo-S de cereais e coníferas, sequências de fungos ascomicetos apresentam outras deleções na região NH₂-terminal, apresentando apenas 4 dos 16 resíduos de cisteína conservados, normalmente encontrados em TLPs (LIU *et al.*, 2010). TLPs do tipo-S de fungos aparentam ser monofiléticas, sugerindo que as sTLPs evoluíram independentemente em Pucciniales, monocotiledôneas e coníferas ou que as sTLPs foram perdidas durante a evolução dos outros filós como dicotiledôneas e animais (PETRE *et al.*, 2011). Shatters e colaboradores (2006) sugerem que a nomenclatura que separa proteínas

do tipo taumatina e osmotina não apresenta fundamentos filogenéticos. O estudo realizado por Petre e colaboradores (2011) ratifica que não há diferença clara entre TLPs e OLPs, uma vez que tais proteínas não são separadas em clados filogenéticos distintos.

As estruturas das PrOsms exibem uma arquitetura típica de TLPs, composta por três domínios (KOIWA *et al.*, 1999). O domínio I é constituído por 10 fitas- β (cinco fitas- β antiparalelas a outras cinco fitas- β) formando uma estrutura similar a um sanduíche, a qual compõe a parte central da molécula. O domínio II é formado principalmente por α -hélices. O domínio III é constituído por uma longa alça e uma folha- β antiparalela.

O mapeamento dos potenciais eletrostáticos mostrou que as PrOsms apresentam, em sua superfície, uma fenda de natureza acídica, localizada entre os domínios I e II. Seu carácter eletronegativo é devido à presença de resíduos ácidos (Glu, Asp, Asp, Asp). Esta fenda eletronegativa é usualmente associada à propriedade antifúngica possuída por vários membros da família PR-5, como a osmotina, zeamatina e NP24-I (GHOSH; CHAKRABARTI, 2008). Os dois resíduos de fenilalanina relatados em osmotinas e outras PR5 antifúngicas também se mostraram conservados, com exceção da PrOsm4 que possui uma modificação na posição do primeiro resíduo para uma tirosina (Tyr₉₀). Entretanto, as osmotinas de *P. rubra* são desprovidas de atividade antifúngica, como demonstrado por Freitas e colaboradores (2015).

Mani e colaboradores (2012) expressaram duas isoformas de osmotinas de *Piper colubrinum*, uma de 16,4 kDa e outra de 21,5 kDa. A isoforma menor possui uma deleção de cerca de 50 resíduos de aminoácidos, fazendo com que o domínio III apresente uma conformação incomum. Apesar de ambas as isoformas possuírem a fenda eletronegativa, a isoforma de 16,4 kDa não exibiu atividade antifúngica, enquanto a isoforma de 21,5 kDa foi capaz de inibir a germinação de esporos de *Phytophthora capsici* e conídios de *Fusarium oxysporum*. Desta forma, sugere-se que a atividade antifúngica não é determinada somente pela presença da fenda eletronegativa e que outras características estruturais, ainda desconhecidas, devem ser relevantes para o efeito antifúngico.

A atividade antifúngica da osmotina de *Nicotiana tabacum* está associada com sua ligação a um receptor específico (codificado pelo gene PHO36), presente

na membrana plasmática de fungos, induzindo morte celular programada através de uma via de sinalização RAS2 e inibindo o crescimento do fungo (NARASHIMAN *et al.*, 2005).

O receptor do hormônio adiponectina (ADIPOQ) é um homólogo mamífero do receptor da osmotina (PHO36). A adiponectina é um hormônio proteico que modula vários processos metabólicos, incluindo a regulação da glicemia e o catabolismo de ácidos graxos. A adiponectina é exclusivamente secretada pelo tecido adiposo. Seus níveis no plasma sanguíneo estão inversamente relacionados com o percentual de gordura corporal em adultos, enquanto esta associação não está bem definida em crianças. Esse hormônio possui um papel importante na supressão de eventos metabólicos que podem causar diabetes tipo 2, aterosclerose, esteatose hepática e síndrome metabólica (NEGORO *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2015).

Apesar de não compartilharem similaridade de sequência, a adiponectina e a osmotina apresentam estruturas e funções similares (MIN *et al.*, 2004). O domínio I (núcleo) da osmotina é semelhante ao domínio barril- β da adiponectina. A osmotina de *N. tabacum* é capaz de interagir com o receptor de adiponectina (AdipoR1) induzindo a ativação (via fosforilação) de AMPKs em miócitos C2C12 de mamíferos, atuando como agonista (MIELE; COSTANTINI; COLONNA, 2011). A osmotina exibiu atividade anti-inflamatória *in vitro* similar à adiponectina, aumentando a concentração de citocinas sinalizadoras, em cultura de fibroblastos sinoviais humanos (MIELE; COSTANTINI; COLONNA, 2011). A osmotina também exerceu atividade anti-inflamatória similar à adiponectina em colite de murinos (ARSENESCU *et al.*, 2011). Quando administrada, por via endovenosa, em ratos obesos e diabéticos, a osmotina mimetizou o efeito da adiponectina, reduzindo os níveis de glicose e insulina no soro (TRIVEDI *et al.*, 2012).

Desta forma, o aumento ou mimetização da ação da adiponectina por meio da modulação da expressão e/ou função de seus receptores pode ser uma nova e promissora estratégia terapêutica para controle de doenças relacionadas à obesidade, incluindo diabetes tipo 2 e síndrome metabólica (KADOWAKI *et al.*, 2006). Com base nesses estudos, foi realizada a predição da capacidade das PrOsm de interagir com os receptores de adiponectina humana (AdipoR1 e AdipoR2). Os complexos PrOsm/AdipoR exibiram arquitetura global semelhante

aos dos complexos AdipoQ/AdipoR. A adiponectina interage com os receptores AdipoR1 e AdipoR2 através de alças presentes no topo do domínio globular (MIELE; COSTANTINI; COLONNA, 2011). Os resultados sugerem que as osmotinas de *P. rubra* são capazes de interagir com os receptores de adiponectina, de forma similar a AdipoQ. Estudos adicionais *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados para avaliação do potencial de cada osmotina de *Plumeria rubra* como agonista dos receptores de adiponectina.

7 CONCLUSÃO

A presença de uma osmotina no látex de *Plumeria rubra* foi confirmada por meio de ensaios de *western blot* utilizando anticorpos anti-CpOsm. Análises *in silico* das sequências deduzidas das PrOsms mostraram que essas proteínas possuem um peso molecular de aproximadamente 22 kDa, possuindo 8 ligações dissulfeto estabilizando sua estrutura. A estrutura tridimensional das PrOsms é composta por três domínios, compartilhando um enovelamento altamente conservado entre TLPs. Interações proteína-proteína sugerem que as PrOsms são capazes de interagir com os receptores de adiponectina, de forma similar a AdipoQ, sendo, portanto potenciais alvos terapêuticos para o controle de doenças relacionadas à obesidade, incluindo diabetes tipo 2 e síndrome metabólica.

REFERÊNCIAS

- AHMED NU, PARK J-I, JUNG H-J, KANG K-K, LIM Y-P, HUR Y, NOU I-S (2013) Molecular characterization of thaumatin family genes related to stresses in *Brassica rapa*. **Sci Hortic** (Amsterdam) 152:26–34. doi: 10.1016/j.scienta.2013.01.007
- ANDRUSIER N, NUSSINOV R, WOLFSON HJ (2007) FireDock Fast interaction refinement in molecular docking. **Proteins** 69:139–159. doi: 10.1002/prot
- ARNOLD K, BORDOLI L, KOPP J, SCHWEDE T (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics** 22:195–201. doi: 10.1093/bioinformatics/bti770
- ARSENESCU V, NARASIMHAN ML, HALIDE T, BRESSAN RA, BARISIONE C, COHEN DA, DE VILLIERS WJS, ARSENESCU R (2011) Adiponectin and plant-derived mammalian adiponectin homolog exert a protective effect in murine colitis. **Dig Dis Sci** 56:2818–2832. doi: 10.1007/s10620-011-1692-0
- BARRE A, PEUMANS WJ, MENU-BOUAOUICHE L, DAMME EJM VAN, MAY GD, HERRERA AF, LEUVEN F VAN, ROUGE P (2000) Purification and structural analysis of an abundant thaumatin-like protein from ripe banana fruit. **Planta** 211: 791-799
- Bethesda Research Laboratories**, 1986. BRL pUC host: *E. coli* DH5 α competent cells. Focus 8(2):9
- BIASINI M, BIENERT S, WATERHOUSE A, ARNOLD K, STUDER G, SCHMIDT T, KIEFER F, CASSARINO TG, BERTONI M, BORDOLI L, SCHWEDE T (2014) SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Res** 42:252–258. doi: 10.1093/nar/gku340
- BISHOP AOT, DE BEER TAP, JOUBERT F (2008) Protein homology modelling and its use in South Africa. **S Afr J Sci** 104:2–6.

BRANDAZZA A, ANGELI S, TEGONI M, CABBILLAU C, PELOSI P (2004) Plant stress proteins of the thaumatin-like family discovered in animals. **FEBS Lett** 572:3–7

CAMPOS MD A, SILVA MS, MAGALHÃES CP, RIBEIRO SG, SARTO RP, VIEIRA E A, GROSSI DE SÁ MF (2008) Expression in *Escherichia coli*, purification, refolding and antifungal activity of an osmotin from *Solanum nigrum*. **Microb Cell Fact** 7:7. doi: 10.1186/1475-2859-7-7

CAPELLI N, DIOGON T, GREPPIN H, SIMON P (1997) Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an osmotin-like protein from *Arabidopsis thaliana*. **Gene** 191:51–6.

CASALI N (2003) *Escherichia coli* host strains. **Methods Mol Biol** 235:27–48. doi: 10.1385/1-59259-409-3:27

CHANG S, PURYEAR J, CAIRNEY J (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Mol Biol Report** 11:113–116. doi: 10.1007/BF02670468

CHATTERJEE M, VERMA R, LAKSHMI V, SENGUPTA S, VERMA AK, MAHDI AA, PALIT G. (2013) Anxiolytic effects of *Plumeria rubra* var. *acutifolia* (Poiret) L. flower extracts in the elevated plus-maze model of anxiety in mice. **Asian J Psychiatr** 6(2):113-8. doi: 10.1016/j.ajp.2012.09.005.

CHEN VB, ARENDALL WB, HEADD JJ, KEEDY DA, IMMORMINO RM, KAPRAL GJ, MURRAY LW, RICHARDSON JS, RICHARDSON DC (2010) MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr** 66:12–21. doi: 10.1107/S0907444909042073

CHOTHIA C, LESK AM (1986) The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. **EMBO J** 5:823–826. doi: 060 fehlt

COLOVOS C, YEATES TO (1993) Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. **Protein Sci** 2:1511–1519. doi: 10.1002/pro.5560020916

DAS M, CHAUHAN H, CHHIBBAR A, RIZWANUL HAQ QM, KHURANA P (2011) High-efficiency transformation and selective tolerance against biotic and abiotic

stress in mulberry, *Morus indica* cv. K2, by constitutive and inducible expression of tobacco osmotin. **Transgenic Res** 20:231–46. doi: 10.1007/s11248-010-9405-6

DE BEER TAP, BERKA K, THORNTON JM, LASKOWSKI RA (2014) PDBsum additions. **Nucleic Acids Res** 42:292–296. doi: 10.1093/nar/gkt940

DOMSALLA A, MELZIG MF (2008) Occurrence and properties of proteases in plant latices. **Planta Med** 74:699–711. doi: 10.1055/s-2008-1074530

DUHOVNY D, NUSSINOV R, WOLFSON H (2002) Efficient Unbound Docking of Rigid Molecules. **Algorithms Bioinforma** 185–200. doi: 10.1007/3-540-45784-4_14

DURFEE T, NELSON R, BALDWIN S, PLUNKETT G, BURLAND V, MAU B, PETROSINO JF, QIN X, MUZNY DM, AYELE M, GIBBS RA, CSORGO B, PÓSFAL G, WEINSTOCK GM, BLATTNER FR (2008) The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: Insights into the biology of a laboratory workhorse. **J Bacteriol** 190:2597–2606. doi: 10.1128/JB.01695-07

EDREVA A (2005) Pathogenesis-Related Proteins : Research Progress in the Last 15 Years. **Gen Appl Plant Physiol** 31:105–124.

EISENBERG D, SCHWARZ E, KOMAROMY M, WALL R (1984) Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. **J Mol Biol** 179:125–142. doi: 10.1016/0022-2836(84)90309-7

EWING B, GREEN P (1998) Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. **Genome Res** 186–194. doi: 10.1101/gr.8.3.186

EWING B, HILLIER LD, WENDL MC (1998) Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred.I. Accuracy Assessment. **Genome Res** 175–185. doi: 10.1101/gr.8.3.186

FARRELL B D., DUSSOURD D. E., MITTER C (1991) Escalation of Plant Defense : Do Latex and Resin Canals Spur Plant Diversification ? **American Naturalist** 138 (4): 881-900.

FRANCO S DE F, BARONI RM, CARAZZOLLE MF, TEIXEIRA PJPL, REIS O, PEREIRA GAG, MONDEGO JMC (2015) Genomic analyses and expression evaluation of thaumatin-like gene family in the cacao fungal pathogen *Moniliophthora*

perniciosa. **Biochem Biophys Res Commun** 466:629–636. doi:
10.1016/j.bbrc.2015.09.054

FREITAS CDT DE, LOPES JLDS, BELTRAMINI LM, DE OLIVEIRA RSB, OLIVEIRA JTA, RAMOS MV (2011a) Osmotin from *Calotropis procera* latex: new insights into structure and antifungal properties. **Biochim Biophys Acta** 1808:2501–7. doi:
10.1016/j.bbamem.2011.07.014

FREITAS CDT DE, NOGUEIRA FCS, VASCONCELOS IM, OLIVEIRA JTA, DOMONT GB, RAMOS MV (2011b) Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: biochemical characterization, biological activity and role in plant defense. **Plant Physiol Biochem** 49:738–43. doi: 10.1016/j.plaphy.2011.01.027

FREITAS CDT, SILVA MZR, BRUNO-MORENO F, MONTEIRO-MOREIRA ACO, MOREIRA RA, RAMOS M V. (2015) New constitutive latex osmotin-like proteins lacking antifungal activity. **Plant Physiol Biochem** 96:45–52. doi:
10.1016/j.plaphy.2015.07.012

GABAN SVF, COSTA WS, ASSIS CN DE, ARAÚJO ES, COSTA-LOTUFO LV (2013) Latex Extract of *Plumeria Rubra* Induces Antihypertensive and Vasodilator Effects on Rat Aorta. **International Journal of Indigenous Medicinal Plants** 46:1209–1216.

GALLAGHER C N, ROTH N J & HUBER R E (1994) A rapid method for the purification of large amounts of an alpha-complementing peptide derived from beta-galactosidase (*E. coli*). **Preparative Biochemistry** 24 (34): 297-304.

GHOSH R, CHAKRABARTI C (2008) Crystal structure analysis of NP24-I: a thaumatin-like protein. **Planta** 228:883–90. doi: 10.1007/s00425-008-0790-5

GOEL D, SINGH A K, YADAV V, BABBAR SB, BANSAL KC (2010) Overexpression of osmotin gene confers tolerance to salt and drought stresses in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Protoplasma** 245:133–41. doi: 10.1007/s00709-010-0158-0

GORDON D, ABAJIAN C, GREEN P, GORDON D, ABAJIAN C, GREEN P (1998) Consed : A Graphical Tool for Sequence Finishing. **Genome Res** 8:195–202. doi:
10.1101/gr.8.3.195

- GRENIER J, POTVIN C, ASSELIN A (2000) Some fungi express b-1, 3- glucanases similar to thaumatin-like proteins. **Mycologia** 92:841–848
- GROSSMANN ME, RAY A, NKHATA KJ, MALAKHOV DA, ROGOZINA OP, DOGAN S, CLEARY MP (2010) Obesity and breast cancer: Status of leptin and adiponectin in pathological processes. **Cancer Metastasis Rev** 29:641–653. doi: 10.1007/s10555-010-9252-1
- HAGEL JM, YEUNG EC, FACCHINI PJ (2008) Got milk? The secret life of laticifers. **Trends Plant Sci** 13:631–9. doi: 10.1016/j.tplants.2008.09.005
- HAMBURGER MO, CORDELL GA, RUANGRUNGSI N (1991) Traditional medicinal plants of Thailand XVII Biologically active constituents of *Plumeria rubra*. **J Ethnopharmacol** 33:289–292. doi: 10.1016/0378-8741(91)90091-Q
- HARBERS M (2008) The current status of cDNA cloning. **Genomics** 91:232–242. doi: 10.1016/j.ygeno.2007.11.004
- HOOFT RW, SANDER C, VRIEND G (1997) Objectively judging the quality of a protein structure from a Ramachandran plot. **Comput Appl Biosci** 13:425–430. doi: 10.1093/bioinformatics/13.4.425
- HOWE C (2007) **Gene Cloning and Manipulation**, 2nd edn. Cambridge
- JACOBSON RH, ZHANG XJ, DUBOSE RF, MATTHEWS BW (1994) Three-dimensional structure of β -galactosidase from *E. coli*. **Nature**, Vol. 369, No. 6483, pp 761-766
- JAMI SK, SWATHI ANURADHA T, GURUPRASAD L, KIRTI PB (2007) Molecular, biochemical and structural characterization of osmotin-like protein from black nightshade (*Solanum nigrum*). **J Plant Physiol** 164:238–252. doi: 10.1016/j.jplph.2006.01.006
- JARDÉ T, CALDEFIE-CHÉZET F, GONCALVES-MENDES N, MISHELLANY F, BUECHLER C, PENAULT-LLORCA F, VASSON MP (2009) Involvement of adiponectin and leptin in breast cancer: Clinical and in vitro studies. **Endocr Relat Cancer** 16:1197–1210. doi: 10.1677/ERC-09-0043

- KADOWAKI T, YAMAUCHI T, KUBOTA N, HARA K, UEKI K, TOBE K (2006) Review series Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance , diabetes , and the metabolic syndrome. **J Clin Invest** 116:1784–1792. doi: 10.1172/JCI29126.1784
- KEKWICK RGO (2001) Latex and Laticifers. **Encyclopedia of Life Sciences** 1–6.
- KELLEY LA, MEZULIS S, YATES CM, WASS MN, STERNBERG MJE (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nat Protoc** 10:845–858. doi: 10.1038/nprot.2015.053
- KITAJIMA S, SATO F (1999) Plant pathogenesis-related proteins: molecular mechanisms of gene expression and protein function. **J Biochem (Tokyo)** 125:1–8
- KLEYWEGT GJ, JONES TA (1996) Phi/Psi-chology: Ramachandran revisited **Ways & Means** 4:1395-1400. doi:10.1016/S0969-2126(96)00147-5
- KOIWA H, KATO H, NAKATSU T, ODA J, YAMADA Y, SATO F (1999) Crystal structure of tobacco PR-5d protein at 1.8 Å resolution reveals a conserved acidic cleft structure in antifungal thaumatin-like proteins. **J Mol Biol** 286:1137–1145. doi: 10.1006/jmbi.1998.2540
- KONNO K (2011) Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry** 72:1510–30. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.02.016
- KUMAR HGA, VENKATESH YP (2014) In silico analyses of structural and allergenicity features of sapodilla (Manilkara zapota) acidic thaumatin-like protein in comparison with allergenic plant TLPs. **Mol Immunol** 57:119–128. doi: 10.1016/j.molimm.2013.08.010
- KUMAR SA, KUMARI PH, KUMAR GS, MOHANALATHA C, KISHOR PBK (2015) Osmotin: a plant sentinel and a possible agonist of mammalian adiponectin. **Front Plant Sci** 6:1–16. doi: 10.3389/fpls.2015.00163
- LAEMMLI UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680–685. doi:10.1038/227680a0
- LAUNAY G, SIMONSON T (2008) Homology modelling of protein-protein complexes: a simple method and its possibilities and limitations. **BMC Bioinformatics** 9:427. doi:

10.1186/1471-2105-9-427

LEWINSOHN TM (1991) The geographical distribution of plant latex. **Chemoecology** 2:64–68. doi: 10.1007/BF01240668

LINNAEUS, CV. **Species Plantarum 1**: 209–210, 1753.

LIU J-J, STURROCK R, EKRAMODDOULLAH AKM (2010) The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. **Plant Cell Rep** 29:419–36. doi: 10.1007/s00299-010-0826-8

LOOZE Y, BOUSSARD P, HUET J, VANDENBUSCHE G, VANDENBUSSCHE G, AZARKAN M, RAUSSENS V, WINTJENS R (2009) Purification and characterization of a wound-inducible thaumatin-like protein from the latex of *Carica papaya*. **Phytochemistry** 70:970–8. doi: 10.1016/j.phytochem.2009.05.005

MCLAB (2015) **User Manual: DH5- α Competent E. coli**, 3.0 edn.

MANI T, MANJULA S (2010) Cloning and characterization of two osmotin isoforms from *Piper colubrinum*. **Biol Plant** 54:377–380. doi: 10.1007/s10535-010-0068-1

MASHIACH E, SCHNEIDMAN-DUHOVNY D, ANDRUSIER N, NUSSINOV R, WOLFSON HJ (2008) FireDock: a web server for fast interaction refinement in molecular docking. **Nucleic Acids Res** 36:W229–32. doi: 10.1093/nar/gkn186

MATSUBARA M, MARUOKA S, KATAYOSE S (2002) Inverse relationship between plasma adiponectin and leptin concentrations in normal-weight and obese women. **Eur J Endocrinol** 147:173–80. doi: 10.1530/eje.0.1470173

MIELE M, COSTANTINI S, COLONNA G (2011) Structural and functional similarities between osmotin from *Nicotiana tabacum* seeds and human adiponectin. **PLoS One** 6:e16690. doi: 10.1371/journal.pone.0016690

MIN K, HA SC, HASEGAWA PM, BRESSAN R A., YUN DJ, KIM KK (2004) Crystal Structure of Osmotin, a Plant Antifungal Protein. **Proteins Struct Funct Genet** 54:170–173. doi: 10.1002/prot.10571

NALABOLU MR, PALASAMUDRAM K, JAMIL K (2014) Adiponectin and leptin molecular actions and clinical significance in breast cancer. **Int J Hematol Stem Cell**

Res 8:31–40.

NARASIMHAN ML, COCA MA, JIN J, YAMAUCHI T, ITO Y, KADOWAKI T, KIM KK, PARDO JM, DAMSZ B, HASEGAWA PM, YUN DJ, BRESSAN RA (2005) Osmotin is a homolog of mammalian adiponectin and controls apoptosis in yeast through a homolog of mammalian adiponectin receptor. **Mol Cell** 17:171–180. doi: 10.1016/j.molcel.2004.11.050

NEGORO T, KIN M, TAKUMA A, SAITO K, SHIMIZU S, NAKANO Y (2014) Potentiated macrophage activation by acid sensing under low adiponectin levels. **Mol Immunol** 57:141–150. doi: 10.1016/j.molimm.2013.08.015

NEWTON S, DUMAN JG. (2000) An osmotin-like cryoprotective protein from bittersweet nightshade *Solanum dulcamara*. **Plant Molecular Biology** 44: 581– 589.

NIELSEN M, LUNDEGAARD C, LUND O, PETERSEN TN (2010) CPHmodels-3.0-remote homology modeling using structure-guided sequence profiles. **Nucleic Acids Res** 38:576–581. doi: 10.1093/nar/gkq535

NKHATA KJ, RAY A, SCHUSTER TF, GROSSMANN ME, MARGOT PC (2009) Effects of adiponectin and leptin co-treatment on human breast cancer cell growth. **Oncol Rep** 21:1611–1619. doi: 10.3892/or_00000395

O'LEARY SJ, POULIS BA, VON ADERKAS P (2007) Identification of two thaumatin-like proteins (TLPs) in the pollination drop of hybrid yew that may play a role in pathogen defence during pollen collection. **Tree Physiol** 27:1649–1659

OLIVEIRA RSB (2014) **Expressão heteróloga, caracterização cristalográfica e análise funcional de uma osmotina antifúngica de *Calotropis procera***. Tese (Doutorado em Bioquímica), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

PADMANABHAN S, BANERJEE S, MANDI N (2011) Screening of Bacterial Recombinants: Strategies and Preventing False Positives. **Mol Cloning - Sel Appl Med Biol** 3–20. doi: 10.5772/22140

PETRE B, MAJOR I, ROUHIER N, DUPLESSIS S (2011) Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar. **BMC Plant Biol** 11:33. doi: 10.1186/1471-2229-11-33

PRIYADARSHAN, P. M. **Biology of Hevea rubber**. CABI. 2011. ISBN-13:9781845936662

PROMEGA (2015) Technical Manual: pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems

RAMACHANDRAN GN, RAMAKRISHNAN C, SASISEKHARAN V (1963) Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **J Mol Biol** 7:95–99. doi: 10.1016/S0022-2836(63)80023-6

RAMOS M V., DE OLIVEIRA RSB, PEREIRA HM, MORENO FBMB, LOBO MDP, REBELO LM, BRANDÃO-NETO J, DE SOUSA JS, MONTEIRO-MOREIRA ACO, FREITAS CDT, GRANGEIRO TB (2015) Crystal structure of an antifungal osmotin-like protein from *Calotropis procera* and its effects on *Fusarium solani* spores, as revealed by atomic force microscopy: Insights into the mechanism of action. **Phytochemistry** 119:5–18. doi: 10.1016/j.phytochem.2015.09.012

RATHER IA, AWASTHI P, MAHAJAN V, BEDI YS, VISHWAKARMA RA, GANDHI SG (2015) Molecular cloning and functional characterization of an antifungal PR-5 protein from *Ocimum basilicum*. **Gene** 558:143–151. doi: 10.1016/j.gene.2014.12.055

REISS E, SCHLESIER B, BRANDT W (2006) cDNA sequences, MALDI-TOF analyses, and molecular modelling of barley PR-5 proteins. **Phytochemistry** 67:1856–64. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.06.014

RICHARDSON, M., VALDES-RODRIGUEZ, S., BLANCO-LABRA, A. (1987). A possible function for thaumatin and a TMV-induced protein suggested by homology to a maize inhibitor. **Nature** 327, 432–434. doi: 10.1038/327432a0

SAKAMOTO Y, WATANABE H, NAGAI M, NAKADE K, TAKAHASHI M, SATO T (2006) *Lentinula edodes* tlg1 encodes a thaumatin-like protein that is involved in Lentinan degradation and fruiting body senescence. **Plant Physiol** 141:793–801

SCHNEIDMAN-DUHOVNY D, INBAR Y, NUSSINOV R, WOLFSON HJ (2005) PatchDock and SymmDock: Servers for rigid and symmetric docking. **Nucleic Acids Res** 33:363–367. doi: 10.1093/nar/gki481

SHATTERS RG, BOYKIN LM, LAPOINTE SL, HUNTER WB, WEATHERSBEE A A (2006) Phylogenetic and structural relationships of the PR5 gene family reveal an ancient multigene family conserved in plants and select animal taxa. **J Mol Evol** 63:12–29. doi: 10.1007/s00239-005-0053-z

SHIH C-YT, WU J, JIA S, KHAN A A., TING K-LH, SHIH DS (2001) Purification of an osmotin-like protein from the seeds of *Benincasa hispida* and cloning of the gene encoding this protein. **Plant Sci** 160:817–826.

SIEVERS F, WILM A, DINEEN D, GIBSON TJ, KARPLUS K, LI W, LOPEZ R, MCWILLIAM H, REMMERT M, SÖDING J, THOMPSON JD, HIGGINS DG (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Mol Syst Biol** 7:539. doi: 10.1038/msb.2011.75

SILVEIRA NJF da (2015) **Bioinformática Estrutural Aplicada ao Estudo de Proteínas Alvo do Genoma do do Genoma do Mycobacterium tuberculosis.** Tese (Doutorado em Biofísica Molecular), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

SINGH NK, BRACKER C A., HASEGAWA PM, HANDA AK, BUCKEL S, HERMODSON M A., PFANKOCH E, REGNIER FE, BRESSAN R A. (1987) Characterization of Osmotin. **Plant Physiol** 85:529–536.

SOUZA DP, FREITAS CDT, PEREIRA D A, NOGUEIRA FC, SILVA FD A, SALAS CE, RAMOS M V (2011) Laticifer proteins play a defensive role against hemibiotrophic and necrotrophic phytopathogens. **Planta** 234:183–93. doi: 10.1007/s00425-011-1392-1

SOUZA DP (2014) **Caracterização Molecular e Correlações Estruturais com Adiponectina Humana de uma Proteína Purificada do Látex De *Cryptostegia grandiflora* R. BR.** Tese (Doutorado em Bioquímica), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SUBROTO T, DE VRIES H, SCHURINGA JJ, SOEDJANAATMADJA UM., HOFSTEENGE J, JEKEL P A, BEINTEMA JJ (2001) Enzymic and structural studies on processed proteins from the vacuolar (lutoid-body) fraction of latex of *Hevea brasiliensis*. **Plant Physiol Biochem** 39:1047–1055. doi: 10.1016/S0981-

9428(01)01325-0

SUMATHI K, ANANTHALAKSHMI P, ROSHAN MNAM, SEKAR K (2006) 3dSS: 3D structural superposition. **Nucleic Acids Res** 34:128–132. doi: 10.1093/nar/gkl036

SYTWALA S, GÜNTHER F, MELZIG MF (2015) Lysozyme- and chitinase activity in latex bearing plants of genus Euphorbia – A contribution to plant defense mechanism. **Plant Physiol Biochem** 95:35–40. doi: 10.1016/j.plaphy.2015.07.004

TAYLOR RG, WALKER DC, MCLNNES RR (1993) E.coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. **Nucleic Acids Res** 21:1677–1678.

TOWBIN H, STAEBELIN T, GORDON J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A** 76:4350–4. doi: 10.1002/bies.950190612

TRIVEDI VR, CHORAWALA MR, SHAH GB (2012) Osmotin: A new adiponectin agonist, in Type-II diabetes and obesity. **Int J Pharm Sci Rev Res** 16:70–74.

VAN DER WEL AND LOEVE (1972) Isolation and Characterization of Thaumatin I and II, the Sweet-Tasting Proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth. **Eur J Biochem** 31:221–225. doi: 10.1111/j.1432-1033.1972.tb02522.x

VAN LOON LC, VAN STRIEN E A (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiol Mol Plant Pathol** 55:85–97. doi: 10.1006/pmpp.1999.0213

VAN LOON LC, REP M, PIETERSE CMJ (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annu Rev Phytopathol** 44:135–62. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425

VIKTOROVA J, KRASNY L, KAMLAR M, NOVAKOVA M, MACKOVA M, MACEK T (2012) Osmotin, a pathogenesis-related protein. **Curr Protein Pept Sci** 13:672–81.

VYAS VK, UKAWALA RD, GHATE M, CHINTHA C (2012) Homology Modeling a Fast Tool for Drug Discovery: Current Perspectives. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2012;74(1):1-17. doi:10.4103/0250-474X.102537.

WEBB, B. AND SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**, John Wiley & Sons, Inc., 2014. 47:5.6.5.1-5.6.32. doi: 10.1002/0471250953.bi0506s47

WIEDERSTEIN M, SIPPL MJ (2007) ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Res** 35:407–410. doi: 10.1093/nar/gkm290

YAMAUCHI T, IWABU M, OKADA-IWABU M, KADOWAKI T (2014) Adiponectin receptors: A review of their structure, function and how they work. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab** 28:15–23. doi: 10.1016/j.beem.2013.09.0032

YE G, LI Z, XIA G, PENG H, SUN Z, HUANG C, ACADEMY C, PARK ZH (2009) A New Iridoid Alkaloid from the Flowers of *Plumeria rubra* L . cv . *acutifolia*. **Helv Chim Acta** 92:2790–2794.

ANEXO A - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

LB (para 1 L)

- Triptona 10 g
- Extrato de levedura 5 g
- NaCl 5 g

LB ágar (para 1 L)

- Triptona 10 g
- Extrato de levedura 5 g
- NaCl 5 g
- Ágar 15 g

GYT (para 1 L)

- Glicerol 10%
- Extrato de levedura 1,25 g
- Triptona 2,5 g

SOC (para 1 L)

- Triptona 20 g
- Extrato de levedura 5 g
- NaCl 0,58 g
- KCl 0,2 g
- MgCl₂ 10 mM
- Glicose 20 mM