



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo da interação entre galectina-1 e actina sarcomérica

Fábio Roque Kubata

Ribeirão Preto

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo da interação entre galectina-1 e actina sarcomérica

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia.

Orientado(a): Fabio Roque Kubata

Orientador(a): Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia no dia 20/04/2021.

A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Kubata, Fábio Roque

Estudo da interação entre galectina-1 e actina sarcomérica.
Ribeirão Preto, 2021.

64 p: il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências

Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:

Imunologia e Fisiopatologia

Orientador: Prof Dr. Dias-Baruffi, Marcelo

1. Actina Sarcomérica. 2. Galectina-1. 3. Músculo Esquelético

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Fábio Roque Kubata

Estudo da interação entre galectina-1 e actina sarcomérica

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientador(a): Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho a toda minha família, especialmente minha irmã, Beatriz

Minha mãe, Marília e ao meu querido falecido pai, Ricardo.

Também dedico especialmente ao meu padrinho de coração, Murilo, que sempre incentivou uma busca pela formação e conhecimento, e a minha namorada e companheira, Livia, que me apoia nos momentos ruins e bons da vida.

Gostaria também de dedicar este trabalho ao meu orientador e amigo, Prof Dr. Marcelo Dias Baruffi, que é a pessoa mais apaixonada pela pesquisa que eu já conheci, e sempre buscou incentivar e estimular este sentimento nos entes mais próximos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi, pela oportunidade de trabalhar neste laboratório desde projetos de iniciação científica, até o projeto de mestrado, dando suporte por todo o trabalho desenvolvido no mestrado, sendo a pessoa responsável fundamental pela concretização deste estudo.

Ao Carlos Alessandro Fuzo, Pós-Doutorando no programa de Biociências e Biotecnologia, que teve uma participação fundamental no trabalho nos experimentos de bioinformática, e sempre disposto a colaborar no estudo antes e durante o momento de pandemia em 2020.

Ao laboratório de Parasitologia Molecular da FCFRP-USP, Profa. Dra Ana Patrícia Yatsuda Natsui, e Dra Luciana Baroni, pela recepção no laboratório e auxílio nos ensaios e importante colaboração.

Ao laboratório de Análise do metabolismo mitocondrial do exercício, Profa. Dra Luciane Carla Alberici e Msc Gustavo Duarte Ferrari, pelos trabalhos realizados com camundongos, os quais não foram incluídos neste trabalho pelo desafiadas análises, porém foram solícitos em todo o tempo de contribuição.

Aos amigos do Laboratório de Glicoimunologia da FCFRP-USP, Lílian Cataldi, Rubens Eduardo, Carlos Fuzo, Thaís Canassa, Martin Amstalden, Luísa Mestriner e Cássia Sales. Vocês fizeram companhia durante o trabalho de mestrado, auxiliando com idéias e suporte emocional a finalização deste trabalho. Também a todos os companheiros que fizeram parte desta família, especialmente a Thalita Riul, que sempre mostrou disponibilidade para ensinar tanto processos teóricos quanto práticos no início de minha iniciação científica.

Ao programa de Biociências e Biotecnologia, que proporcionou um enorme engrandecimento e expansão do horizonte de conhecimento, através dos journal meetings, palestras e workshops.

Ao serviço de Biotério da FCFRP-USP, sempre solícitos e auxiliando na manutenção dos animais utilizados neste experimento.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, que proporcionou minha formação desde a graduação até a pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

E a todos que contribuíram de alguma forma para meu crescimento e para a conclusão deste trabalho. Muito obrigado!

RESUMO

KUBATA, F.R. **Estudo da interação entre galectina-1 e actina sarcomérica**. 2021. 64f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

A contração muscular é um processo vital, complexo e multimediado. As duas principais proteínas que atuam neste processo são a actina e a miosina. Os mecanismos moleculares envolvidos na fisiologia da contração muscular ainda não estão totalmente esclarecidos. A galectina-1 (Gal-1) é uma proteína multifuncional que se liga a β -galactosídeos por meio de seu domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD). Esta proteína está envolvida em vários eventos associados ao tecido muscular como a fusão de miotubos, desenvolvimento e reparo deste tecido. Interessantemente, foi demonstrando que a expressão de Gal-1 na musculatura, esquelética e cardíaca, apresenta um padrão estriado caracterizado por sua co-localização com a actina sarcomérica, o que sugere uma interação direta entre estas moléculas. Este trabalho teve com objetivos a confirmação da ocorrência e a caracterização da interação entre Gal-1 e actina sarcomérica. Neste estudo foram utilizadas as formas recombinantes humana de Gal-1 e de Gal-3 (galectina controle) e preparações das formas monomérica (Actina-G) e filamentosa (Actina-F) de actina purificada de músculo de coelho. A análise experimental da potencial interação entre estas moléculas, em solução, foi monitorada por análises eletroforéticas em condições nativas; dissociantes e redutoras na presença ou ausência de agente de ligação cruzada. A investigação da interação entre Gal-1 e estas duas formas de actina sarcomérica, em fase sólida, foi feita por ELISA. Além disso, foram realizados ensaios de viscosimetria a partir de soluções contendo Gal-1 e Actina-G ou Actina-F. Após a constatação de ligação entre Gal-1 e actina sarcomérica, foram construídos modelos de interação com o uso de estratégias *in silico* de modelagem e ancoragem moleculares. As análises eletroforéticas indicaram que Gal-1 e Gal-3 não se ligaram à Actina-G, porém, com o uso do teste de ELISA foi demonstrado que Gal-1 interage apenas com Actina-F. A adição de Gal-1 em soluções destas duas formas de actina, provocou aumento de viscosidade apenas na solução de Actina-F. A propriedade de Gal-1 reconhecer carboidratos não participa do mecanismo molecular de sua interação com Actina-F, uma vez que a lactose não inibiu a ligação entre estas proteínas. As análises de bioinformática indicaram que Gal-1 pode se ligar na extremidade “barbed end” de Actina-F e, de forma termodinamicamente mais favorável, na interface entre subunidades adjacentes desta proteína filamentosa. Em conclusão, Gal-1 pode se ligar nas extremidades e interfaces das subunidades de Actina-F e promover a formação de retículos e/ou o favorecimento da polimerização desta proteína muscular em solução. Este conjunto de resultados sugere que a Gal-1 pode participar do mecanismo de contração muscular por meio de uma interação direta com a Actina-F de modo independente de sua atividade lectínica.

Palavras-chave: Galectina-1; Actina Sarcomérica; Músculo Esquelético

ABSTRACT

Kubata, F.R. **Study of the interaction between galectin-1 and sarcomeric actin..** 2021. 64f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Muscle contraction is a vital, complex and multi-mediated process. The two main proteins that act in this process are actin and myosin. The molecular mechanisms involved in the physiology of muscle contraction are not yet fully understood. Galectin-1 (Gal-1) is a multifunctional protein that binds to β -galactosides through its carbohydrate recognition domain (CRD). This protein is involved in several events associated with muscle tissue such as the fusion of myotubes and the development and repair of this tissue. Interestingly, it was demonstrated that the expression of Gal-1 in muscle, skeletal and cardiac, presents a striated pattern characterized by its collocation with sarcomeric actin, which suggests a direct interaction between these proteins. This study aimed to confirm the occurrence and characterize the interaction between Gal-1 and sarcomeric actin. In this study, human recombinant forms of Gal-1 and Gal-3 (control galectin) and preparations of the monomeric (G-Actin) and filamentous (F-Actin) forms of purified rabbit muscle actin were used. The experimental analysis of the potential interaction between these molecules, in solution, was monitored by electrophoretic analysis under native conditions; dissociating and reducing agents in the presence or absence of a cross-linking agent. The investigation of the interaction between Gal-1 and these two forms of sarcomeric actin, in solid phase, was carried out by ELISA. In addition, viscosimetry assays were performed using solutions containing Gal-1 and G-Actin or F-Actin. After finding a link between Gal-1 and sarcomeric actin, interaction models were built using molecular modeling and docking strategies. Electrophoretic analyzes indicated that Gal-1 and Gal-3 did not bind to Actin-G, however, using the ELISA test it was shown that Gal-1 interacts only with F-Actin. The addition of Gal-1 in solutions of these two forms of actin, caused an increase in viscosity only in the solution of F-Actin. The property of Gal-1 to recognize carbohydrates does not participate in the molecular mechanism of its interaction with F-Actin, since lactose did not inhibit the binding between these proteins. Bioinformatics analyzes indicated that Gal-1 can bind to the "barbed end" end of F-Actin and, thermodynamically more favorably, to the interface between adjacent subunits of this filamentous protein. In conclusion, Gal-1 can bind to the ends and interfaces of the F-Actin subunits and promote the formation of reticles and / or favor the polymerization of this muscle protein in solution. This set of results suggests that Gal-1 can participate in the muscle contraction mechanism through a direct interaction with F-Actin independently of its lectin activity.

Keywords: Sarcomeric Actin; Galectin-1; Skeletal Muscle

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do músculo esquelético com seus principais componentes.	03
Figura 2. Visão esquemática das junções neuromusculares (Esquerda) e Microscopia eletrônica de varredura de um músculo esquelético de sapo (Direita).	03
Figura 3. Como a ativação nervosa leva à liberação de íons cálcio no interior da fibra muscular.	05
Figura 4. Mecanismo molecular da contração muscular, do ponto de vista de um único sarcômero.	06
Figura 5. Classificação das galectinas segundo a disposição dos domínios de reconhecimento de carboidratos (CRD).	08
Figura 6. Co-localização entre Gal-1 e Actina Sarcomérica, por imunohistoquímica.	10
Figura 7. Estrutura do sarcômero, de acordo com a co-localização entre gal-1 e actina.	11
Figura 8. SDS-PAGE das preparações de galectinas humanas recombinantes purificadas.	23
Figura 9. Avaliação da atividade lectínica das preparações de Gal-1 e de Gal-3 purificadas, por hemaglutinação.	24
Figura 10. SDS-PAGE da preparação de Actina sarcomérica de músculo de coelho purificada.	25
Figura 11. Análise do perfil eletroforético de preparações compostas por Gal-1 e Actina-G ou Ga-3 e Actina-G.	26
Figura 12. SDS-PAGE de soluções de Gal-1 ou Gal-3 contendo Actina-G e EDC.	27

Figura 13. Análise de interação entre Gal-1 e Actina-F, por ensaio imunoenzimático (ELISA).	28
Figura 14. Análise viscosimétrica de soluções contendo Actina-F ou Actina-G adicionadas de Gal-1 e na presença ou ausência de carboidratos.	29
Figura 15. Estruturas de Gal-1 e Actina-F utilizadas nos estudos in sílico.	30
Figura 16. Agrupamento das estruturas dos complexos obtidos das análises de ancoragem molecular entre a Gal-1 dimérica e Actina-F.	32
Figura 17. Modelos dos complexos entre Gal-1 e Actina-F obtidos no estudo de ancoragem molecular.	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Planejamento do uso de animais em experimentação.	18
Tabela 2 – Avaliação da viabilidade estrutural dos modelos moleculares de Gal-1 e Actina-F cujas estruturas foram reparadas utilizando modelagem molecular.	31
Tabela 3 – Análise preditiva das energias de afinidade (ΔG) e as constantes de dissociação (KD) dos modelos moleculares.	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔG – Energia Livre

$^{\circ}C$ – Graus Celsius

μg – Microgramas

μL – Microlitros

μM – Micromolar

Actina-G – Actina monomérica

Actina-F – Actina Filamentosa ou Actina Polimérica

ADP – Adenosina Difosfato

ATP – Adenosina Trifosfato

DAPI – 4',6'-diamino-2-fenil-indol

DCR – Domínio de reconhecimento de carboidratos

D.O – Densidade óptica

EDC – 1-etil-3-(3-cloridrato) dimetilaminopropil carbodiimida (Crosslinker)

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

g – Gramas

Gal-1 – Galectina-1

Gal-3 – Galectina-3

HRP – Marcador com enzima peroxidase

kDa – Kilodaltons

L – Litros

LB – Meio Luria Bertani

mL - Mililitros

mM – Milimolar

nm – nanômetros

PBS – Tampão Fosfato Salino

rpm – Rotações por minuto

s – Segundos

SDS-PAGE – Gel de eletroforese de poliacrilamida em condições desnaturantes

TMB – 3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina

Tris – Tampão com hidroximetil aminometano

Sumário

Dedicatória	v
AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Estrutura e função do músculo esquelético.....	2
1.2 A fibra muscular esquelética	4
1.3 Processo de contração muscular	4
1.4 Principais efetores moleculares da contração muscular	5
1.5 Galectinas-1 (Gal-1) e o tecido muscular	6
2 OBJETIVO	13
3 METODOLOGIA	15
3.1 Produção de Gal-1 e Gal-3 recombinantes humanas	15
3.2 Purificação das proteínas recombinantes Gal-1 e Gal-3 por cromatografia de afinidade	15
3.3 Purificação de Actina-G a partir de músculo esquelético de Coelho	16
3.4 Determinação da atividade lectínica das proteínas recombinantes purificadas Gal-1 e Gal-3, por ensaio de hemaglutinação	17
3.5 Análise viscosimétrica de preparações contendo Gal-1 e Actina sarcomérica	18
3.6 Análise de formação de complexos moleculares entre galectinas e Actina-G, por eletroforese em condições nativas	19
3.7 Análise de formação de complexos moleculares entre galectinas e Actina-G tratadas com agente indutor de ligações cruzadas, por eletroforese em condições desnaturantes e redutoras	19
3.8 Análise de ligação entre Gal-1 e Actina-F, por ensaio imunoenzimático (ELISA)	19
3.9 Obtenção de modelos moleculares de Gal-1 e Actina-F utilizados nos estudos <i>in silico</i>	20
3.10 Construção de modelos para o complexo molecular composto de Gal-1 e Actina-F, por ancoragem molecular	21
4 RESULTADOS.....	23

4.1	Análise eletroforética e determinação da atividade hemaglutinante de preparações de Gal-1 e Gal-3 recombinantes humanas purificadas	23
4.2	Purificação e teste funcional da Actina sarcomérica de músculo de Coelho	24
4.3	Análise de ligação entre Gal-1 ou Gal-3 com Actina-G por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas	25
4.4	Análise eletroforética de soluções de Gal-1 ou Gal-3 adicionadas de Actina-G, na presença de EDC	26
4.5	Análise da potencial ligação entre Gal-1 e as formas monomérica e filamentosa de Actina sarcomérica, por ensaio imunoenzimático (ELISA)	27
4.6	Análise funcional da interação Gal-1 e Actina-F com o uso do ensaio de viscosimetria	28
4.7	Construção do modelo do complexo molecular entre Gal-1 e Actina-F	30
4.7.1	Construção do modelo do complexo molecular Gal-1 dimérica e Actina-F, por ancoragem molecular	31
5	DISCUSSÃO	37
6	CONCLUSÃO	42
7	REFERÊNCIAS.....	44

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estrutura e função do músculo esquelético

Dentre os três tipos de musculatura (esquelética, cardíaca e lisa), os músculos esqueléticos são responsáveis pela locomoção, postura ereta, sustentação dos órgãos internos e compõe 40-45% da massa corpórea humana (KRAEMER; SPIERING, 2006; PORTO, 2005). Os músculos são formados por um conjunto de células alongadas conhecidas como fibras musculares, as quais estão envolvidas em um tecido conjuntivo- o endomísio e limitadas pelo mesmo tecido com estrutura mais densa- o perimísio, constituindo um fascículo. Finalmente, vários fascículos são envolvidos por uma camada do mesmo tecido conjuntivo, o epimísio- formando o músculo esquelético (Fig 1) (KRAEMER; SPIERING, 2006; MENSE, 2010; PORTO, 2005). Em um contexto funcional, o controle da contração muscular será ditado por neurônios motores, que se originam na medula espinhal e interconectam-se ao sistema muscular por meio das junções neuromusculares (Fig 2). Algumas patologias afetam a composição e/ou função deste tecido são atreladas inexoravelmente a dificuldades ou perda de movimentos (LEWIS; HALLER, 1989); como exemplo pode-se citar a Distrofia Muscular de Duchenne- a qual é caracterizada por degeneração progressiva da musculatura esquelética e gravidade variável e é altamente incapacitante (BLAKE et al., 2002; EMERY, 2002), afetando 1 em cada 3.600-6.000 meninos nascidos vivos (BUSHBY et al., 2010).

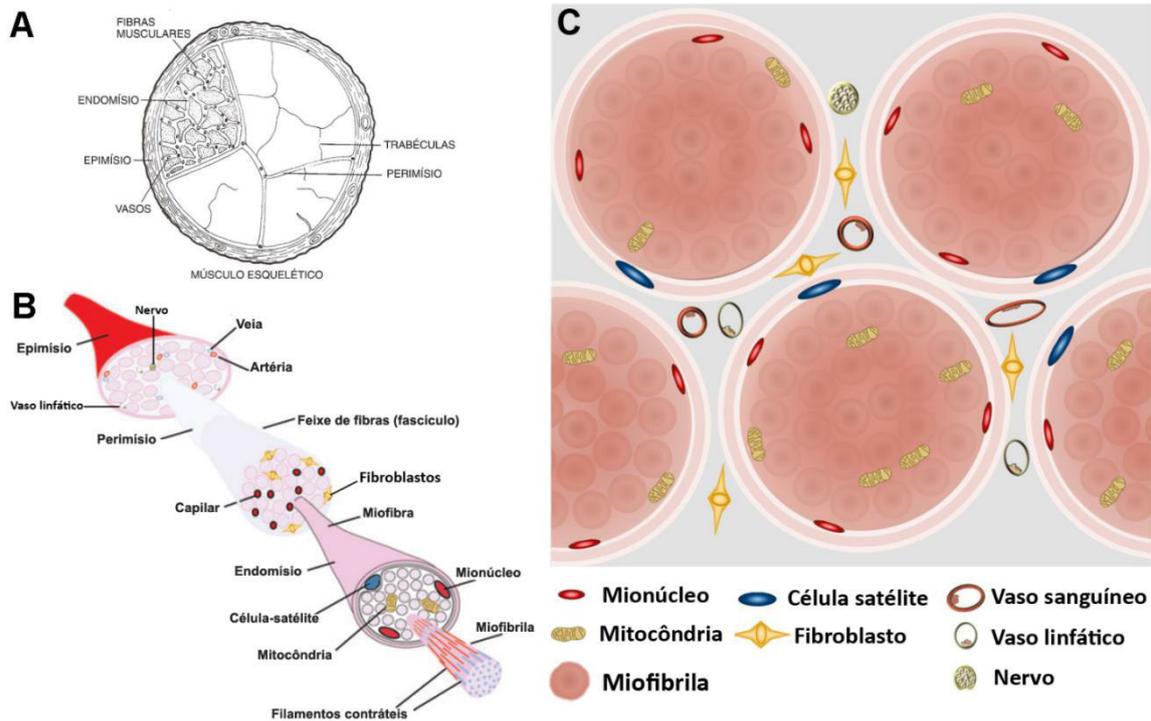


Figura 1. Estrutura do músculo esquelético com seus principais componentes- Em (A)- Disposição dos elementos constituintes do músculo esquelético (fibras musculares, tecido conjuntivo e vasos) em corte transversal (extraído de Porto, 2005). Em (B), esquematização tridimensional de um músculo esquelético- Os fascículos musculares são recobertos por uma matriz extracelular (epimísio) e compostos por feixes de miofibras, cada qual separada pelo perimísio e bem irrigada por vasos/ artérias. As miofibras individuais são recobertas pelo endomísio e compostas de múltiplos mionúcleos, mitocôndrias e miofibrilas (de centenas a milhares/ fibra) que contêm os elementos contráteis (actina e miosina). As células-satélite residem na região subsarcolemal- entre a lâmina basal (endomísio) e o sarcolema das fibras (figura extraída e traduzida de Otto *et al.*, 2009). Em (C)- Detalhamento de um grupo de miofibras com os principais componentes intra e extrafibrilares (extraído e ligeiramente modificado de Zouraq *et al.*, 2013).

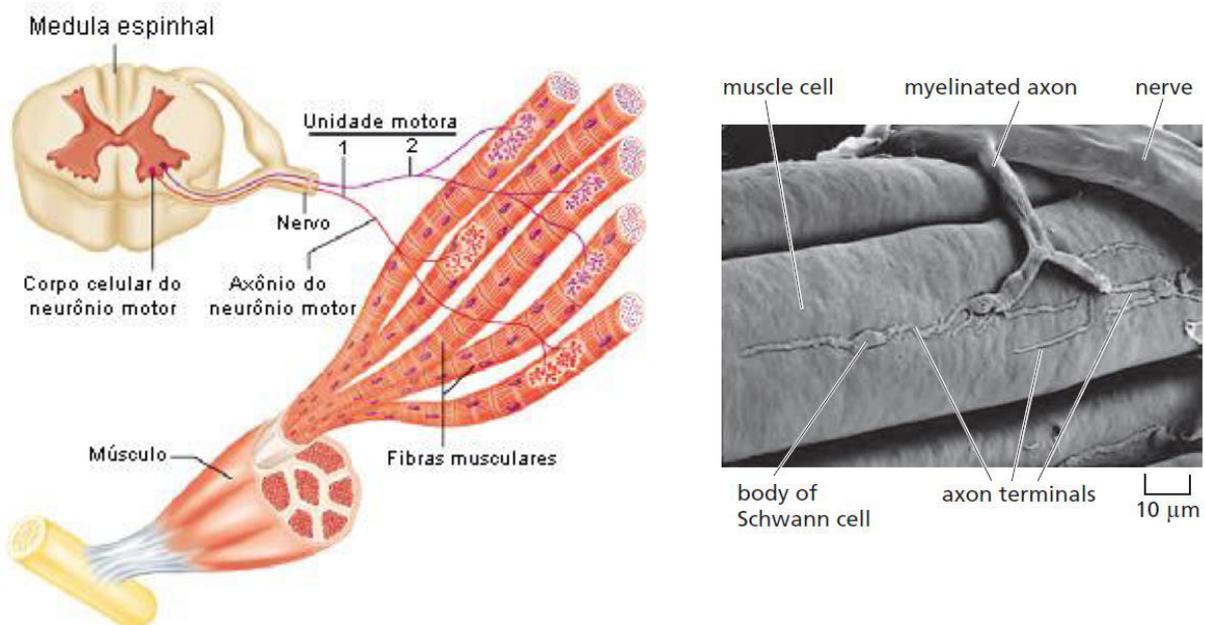


Figura 2. Visão esquemática das junções neuromusculares (Esquerda) e Microscopia eletrônica de varredura de um músculo esquelético de sapo (Direita)- As fibras musculares tem a contração coordenada pelo sistema nervoso, através dos neurônios motores, por fendas subneurais denominadas junções neuromusculares (figura da esquerda extraída e traduzida de [http://faculty.etsu.edu/forsman/Histology %20of%20musclefor%20web_files/image015.jpg](http://faculty.etsu.edu/forsman/Histology%20of%20musclefor%20web_files/image015.jpg) e figura da direita extraída de Alberts et al., 2015)

1.2 A fibra muscular esquelética

A fibra muscular é a unidade morfofuncional do músculo. É uma célula cilíndrica, alongada e multinucleada, com os núcleos dispostos em sua periferia. O retículo sarcoplasmático é o equivalente ao retículo endoplasmático liso das demais células. Além dos componentes celulares usuais, as fibras contêm grandes quantidades de fibrilas delgadas, dispostas ao longo de seu eixo maior, conferindo-lhe uma leve estriação longitudinal (as miofibrilas). Tais estruturas são compostas de filamentos espessos de miosina e filamentos finos de actina- os quais permitem a contração e o relaxamento do músculo (para revisão molecular da interação entre actina e miosina muscular, vide Alberts et al. 2015). Outra característica da fibra é que o sarcolema possui invaginações de membrana que atravessam perpendicularmente a fibra, formando os túbulos T, responsáveis pela transmissão do potencial de membrana que leva à contração coordenada dos feixes musculares- conforme será explicado a seguir (KRAEMER; SPIERING, 2006; PORTO, 2005).

1.3 Processo de contração muscular

A figura 3 mostra os princípios básicos que levam à contração muscular. A contração muscular inicia-se logo após a sinalização pelos neurônios motores. A onda de despolarização atravessa os axônios motores e libera nas fendas subneurais o neurotransmissor acetilcolina (ACh). A ACh, por sua vez, interage com seus receptores (canais iônicos de Na⁺). O influxo de Na⁺ provoca uma onda de despolarização no sarcolema, que através da porção do retículo sarcoplasmático mais próxima aos túbulos T (cisterna terminal) detecta o potencial de ação gerado pelo sistema nervoso e libera o Ca²⁺, o qual permite a interação do filamento espesso de miosina com os filamentos de actina, culminando com o processo de contração muscular dependente de ATP. Quando o Ca²⁺ é recapturado para o retículo

sarcoplasmático (transporte ativo com troca por Mg^{2+}), as fibras relaxam (KRAEMER; SPIERING, 2006; PORTO, 2005).

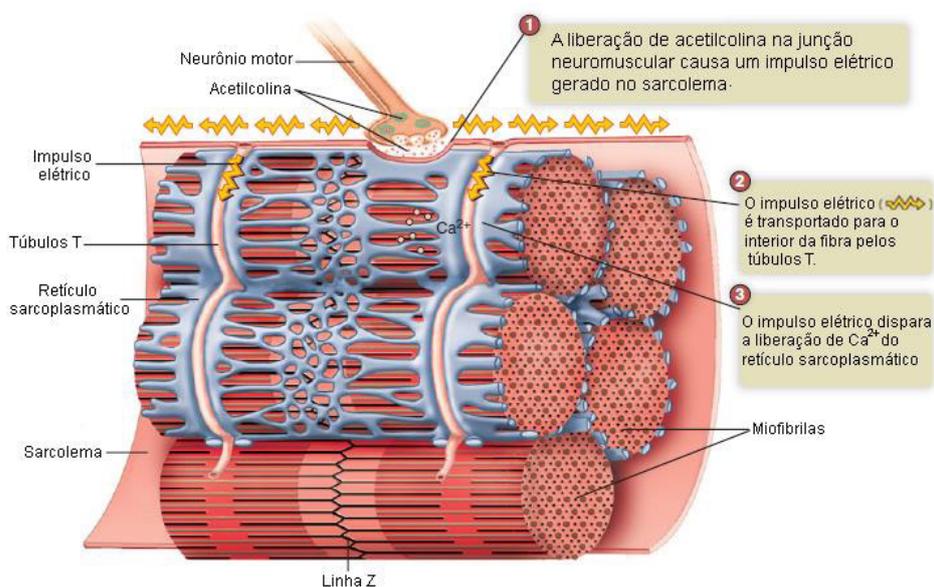


Figura 3. Como a ativação nervosa leva à liberação de íons cálcio no interior da fibra muscular (extraído e traduzido de Johnson, 2012)

1.4 Principais efetores moleculares da contração muscular

Embora o mecanismo de contração muscular seja complexo e envolva várias proteínas, as proteínas protagonistas deste evento são miosina e actina, presentes em feixes denominados de miofibrilas como demonstrado na figura 3, porção inferior (ALBERTS, 2017). O modelo do filamento deslizante foi descrito inicialmente por Huxley em 1953, na Universidade de Cambridge, pelo mecanismo de ponte cruzada entre actina e miosina muscular. Estas últimas pertencem a uma superfamília de proteínas com atividade motora; entretanto, das 17 classes apenas as denominadas Miosinas II (ou convencionais) participam da contração muscular (ALBERTS, 2017). A Miosina II possui 2 cadeias pesadas idênticas, de aproximadamente 200 kDa cada, e quatro cadeias leves de aproximadamente 20 kDa cada. Seu peso molecular é em torno de 480 kDa, proteína esta que é codificada pelo gene *MYH2* (CHEN; THOMPSON; SNOW, 2017; HARTMAN; JAMES, 2011; JIN et al., 2018).

Já a actina apresenta massa molecular de aproximadamente 42 kDa, e possui várias isoformas que variam de acordo com o tipo de célula e tecido em que estão presentes (ALBERTS, 2017). No tecido muscular ela pode ser encontrada nos

sarcômeros, e sua isoforma predominante é a actina- $\alpha 1$ ou actina- α esquelética, codificada pelo gene *ACTA1* (CHEN; THOMPSON; SNOW, 2017; PERRIN; ERVASTI, 2010). Em miofibrilas maduras, o feixe de actina é considerado um componente estrutural muito estável (Ono, 2010), com meia-vida na ordem de dias (ZAK et al., 1977) com ordem de troca de monômeros de G-actina de horas (MARTONOSI; GOUVEA; GERGELY, 1960).

O mecanismo molecular simplificado da contração muscular, a actina-F é deslocada internamente sobre os filamentos de miosina, fazendo com que suas extremidades se sobreponham e a actina filamentosa traciona os discos Z para as extremidades dos filamentos de miosina, como demonstrado na Figura 4 (SWEENEY; HAMMERS, 2018). Para a ocorrência da contração muscular, os íons de cálcio liberados irão criar uma força atrativa entre a molécula de actina e a molécula de miosina, e também é necessária uma fonte energética, proveniente da molécula de ATP (Adenosina Trifosfato), a qual é degradada em ADP (Adenosina Difosfato) para gerar a energia necessária para a contração muscular. A quebra da molécula de ATP é realizada pela cabeça da molécula de miosina, que possui função de ATPase.(GUYTON; HALL, 2006; SWEENEY; HAMMERS, 2018).

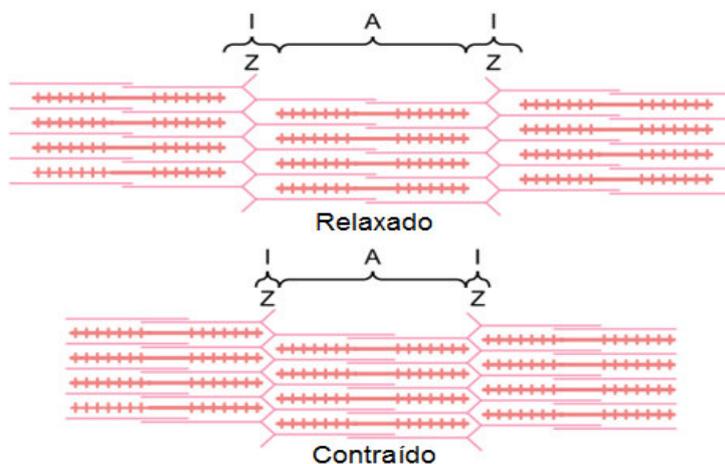


Figura 4. Mecanismo molecular da contração muscular, do ponto de vista de um único sarcômero (adaptado de Guyton et al. 2006).

1.5 Galectinas-1 (Gal-1) e o tecido muscular

Proteínas que reconhecem carboidratos de modo específico e reversível, e não pertencem as classes de anticorpos e enzimas, são conhecidas como lectinas (do Latim *legere*, escolher)(BOYD; SHAPLEIGH, 1954; LIS; SHARON, 1998). As lectinas

interagem com carboidrato por meio de seus domínios de reconhecimento de carboidratos (CRD- *Carbohydrate Recognition Domain*- (LIS; SHARON, 1998). Galectinas são lectinas multifuncionais de origem animal que se ligam à carboidratos compostos por β -galactosídeos que contêm preferencialmente sequências de N-acetilactosaminas. Além disso, os resíduos terminais β -galactose e o tamanho da cadeia de polilactosamina são elementos críticos para a interação entre galectina e carboidrato (BARONDES et al., 1994; CUMMINGS; LIU, 2008; STOWELL et al., 2004).

Atualmente, 15 membros da família das galectinas foram identificados em vertebrados, e eles compartilham similaridades significativas na sequência de aminoácidos que compõem sua estrutura, fato que caracteriza um baixo grau de seletividade de anticorpos capazes de reconhecer estas proteínas, facilitando a reação cruzada destes com diferentes tipos de galectinas (COOPER, 2002). Estes membros podem ser encontrados tanto em ambientes extracelulares quanto intracelular, e apresentam uma diversidade na especificidade de seus ligantes (ANDREWS et al., 2020; HONG et al., 2019; QUEROL CANO et al., 2019). Entretanto, as galectinas apresentam diferenças estruturais entre seus CRDs e estrutura quaternária, o que permite a classificação dessas proteínas em três grupos distintos, ilustrados na Figura 5 (HIRABAYASHI; KASAI, 1993). As galectinas podem ser classificadas em:

1) Prototípicas: estas proteínas apresentam um único CRD, podendo existir tanto na forma de monômeros quanto na forma de homodímeros formados por ligações não-covalentes. Neste grupo estão as galectinas-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13 e -14).

2) Quimera: são caracterizadas pela presença de um CRD e uma região N- terminal (domínio não lectínico). O único representante deste grupo é a galectina-3.

Repetições em *tandem*: são caracterizadas pela presença de dois CRDs (sendo um N-terminal e o outro C-terminal), conectados por um peptídeo ligador (peptídeo *linker*) rico em prolina. Neste grupo encontram-se as galectinas-4, -8, -9 e -12 (ARTHUR et al., 2015).

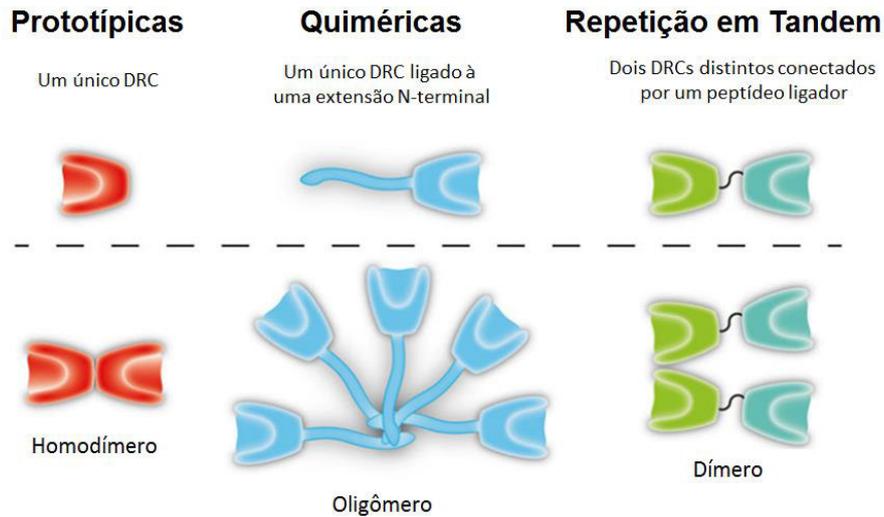


Figura 5. Classificação das galectinas segundo a disposição dos domínios de reconhecimento de carboidratos (CRD) (adaptado de ARTHUR et al., 2015).

As duas galectinas mais estudadas são a Gal-1 e Gal-3 e do ponto vista biológico estas lectinas podem apresentar redundância e/ou antagonismo funcional (MENDEZ-HUERGO et al., 2019; STOWELL et al., 2014). Nesse sentido, Gal-1 diferentemente de Gal-3 favorece a formação de miofibroblastos que expressam actina muscular em carcinomas (VALACH et al., 2012).

A galectina-3 (Gal-3) humana é uma proteína com peso molecular de aproximadamente 30 Kda, codificada pelo gene *LGALS3* no cromossomo 22 região q21-q22 com aproximadamente 17.000 pares de base (ODA et al., 1991; RAZ et al., 1991). Esta galectina possui 250 aminoácidos, onde cerca de 130 aminoácidos são referentes ao domínio de reconhecimento de carboidrato C-terminal, e o restante constituem uma cadeia não lectínica N-terminal (BARONDES et al., 1994b; DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006).

A Gal-3 é descrita como uma lectina expressa em diversos tecidos como baço, estômago, cólon, útero e pâncreas, sendo altamente expressa principalmente por monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e fibroblastos (KIM et al., 2007). Esta proteína também apresenta um papel chave durante o reparo do tecido muscular após miolesões agudas (CERRI et al., 2020; KIM et al., 2007; RANCOURT et al., 2018), apresentando expressão transiente apenas durante a fase de proliferação dos mioblastos e formação dos miotubos iniciais, localizando-se no

núcleo, membrana plasmática e sarcoplasma destas células/ tecido (CERRI et al., 2020).

A galectina-1 (Gal-1) humana é uma proteína com peso molecular de aproximadamente 14 kDa, constituída por 135 aminoácidos, codificada pelo gene *LGALS1* de 4397 pares de bases, o qual está inserido na região cromossomo 22 região q12 (CAMBY et al., 2006; CHIARIOTTI et al., 2002). A Gal-1 é expressa por diversos tecidos, tanto em condições fisiológicas como patológicas, e participa de vários processos biológicos, como controle da adesão celular, sinalização celular, proliferação e ciclos celulares, apoptose, gênese de tumores, fagocitose, processos alérgicos, interações patógeno-hospedeiro, regulação imunológica, diferenciação hematopoiética, embriogênese e ciclo menstrual (BACIGALUPO; CARABIAS; TRONCOSO, 2017; BRINCHMANN; PATEL; IVERSEN, 2018; JIANG et al., 2019; MENDEZ-HUERGO et al., 2019; SHIH et al., 2019; TSAI et al., 2018; VERGETAKI et al., 2014; WANG et al., 2020; YANG et al., 2018). Essa proteína também está intrinsecamente relacionada a funções de neutrófilos, tais como a regulação quimiotática destas células para o sítio inflamatório, exposição reversível de fosfatidilserina em neutrófilos ativados, e reconhecimento fagocítico sem indução de apoptose (DIAS-BARUFFI et al., 2003; RODRIGUES et al., 2019; STOWELL et al., 2014).

A Gal-1 participa de diferentes processos associados a fisiologia do tecido muscular como sua diferenciação e desenvolvimento do músculo; ao processo de fusão do miotubo e ao evento da transdiferenciação de fibroblasto para mioblasto (AHMED; DU; VASTA, 2009; CERRI et al., 2008; DIAS-BARUFFI et al., 2010; WATT; JONES; GOLDRING, 2002). Além disso, Gal-1 esta envolvida com a regeneração do tecido muscular por induzir diferenciação de mioblastos *in vitro* e regular o processo inflamatório em músculos lesionados e também na modulação (BENATAR et al., 2015; CERRI et al., 2008). Tem sido descrito que a Gal-1 pode participar do processo de regeneração muscular por induzir a diferenciação de células primitivas mesenquimais, mediar a fusão de mioblastos e modular a interação de alfa7/beta 1 integrina com fibronectina e laminina durante a diferenciação muscular (CHAN et al., 2006; GEORGIADIS et al., 2007; GU et al., 1994).

De modo interessante, foi reportado que Gal-1 é constitutivamente

expressa em músculo esquelético e lesões musculares em camundongos *mdx* ou induzidas por cloreto de bário em camundongos selvagens, promovem um elevado aumento dos níveis de Gal-1 no músculo (CERRI et al., 2008). Além disso, após a resolução total ou parcial das lesões musculares desses camundongos as taxas de expressão de Gal-1 retornam aos níveis basais. Segundo estes autores, a Gal-1 pode auxiliar no processo da regeneração muscular pela indução de diferenciação de mioblastos, ou por meio de sua atividade anti-inflamatória. Nessa linha, foi demonstrado que o tratamento de camundongos *mdx* com Gal-1 recombinante pode prevenir ou melhorar o quadro de lesão muscular destes animais (VAN RY et al., 2015).

Vale a pena ressaltar que a literatura tem demonstrado a interação de várias proteínas com as miofibrilas. Nessa linha, nosso grupo de pesquisas se deparou com um dado surpreendente: A co-localização de galectina-1 (Gal-1) com actina sarcomérica em músculo esquelético suíno (Figura 6) (DIAS-BARUFFI et al., 2010). Esta proteína é expressa em diferentes tecidos e abundantemente expressa em tecido muscular esquelético (DIAS-BARUFFI et al., 2010; KAMI; SENBA, 2005). Em outras publicações também foi relatado que lectinas provenientes do cérebro se ligavam em actina proveniente de músculo, e que Gal-1 humana de plaquetas se ligavam com actina com alta afinidade e inclusive colocalizavam nas plaquetas (JOUBERT; AVELLANA-ADALID; MORNET, 1992; WOLFENSTEIN-TODEL, 2012).

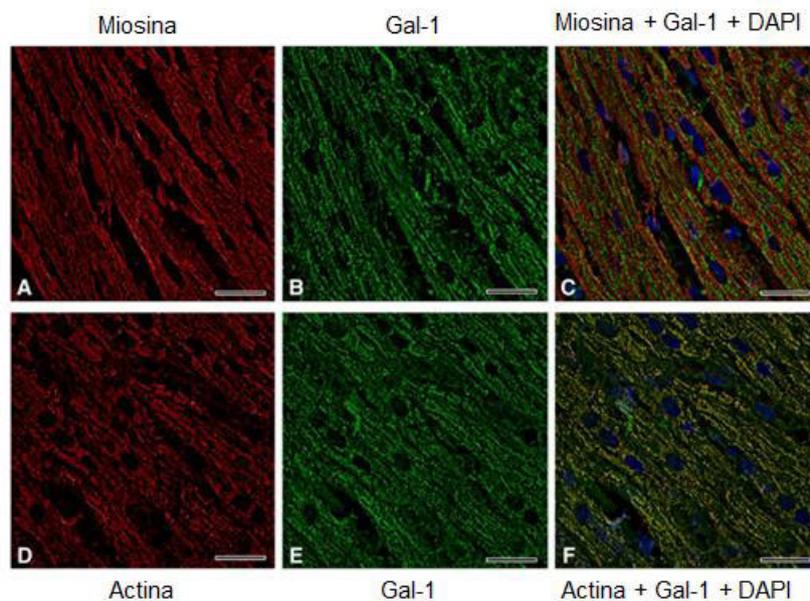


Figura 6. Colocalização entre Gal-1 e Actina Sarcomérica, por imunohistoquímica (adaptado de DIAS-BARUFFI et al., 2010).

A hipótese de DIAS-BARUFFI 2010 e colaboradores é que na estrutura do sarcômero, a galectina-1 esteja no espaço das bandas I, entre a linha Z e a banda A. Estando assim, colocalizada apenas com actina, e não miosina (Figura 7).

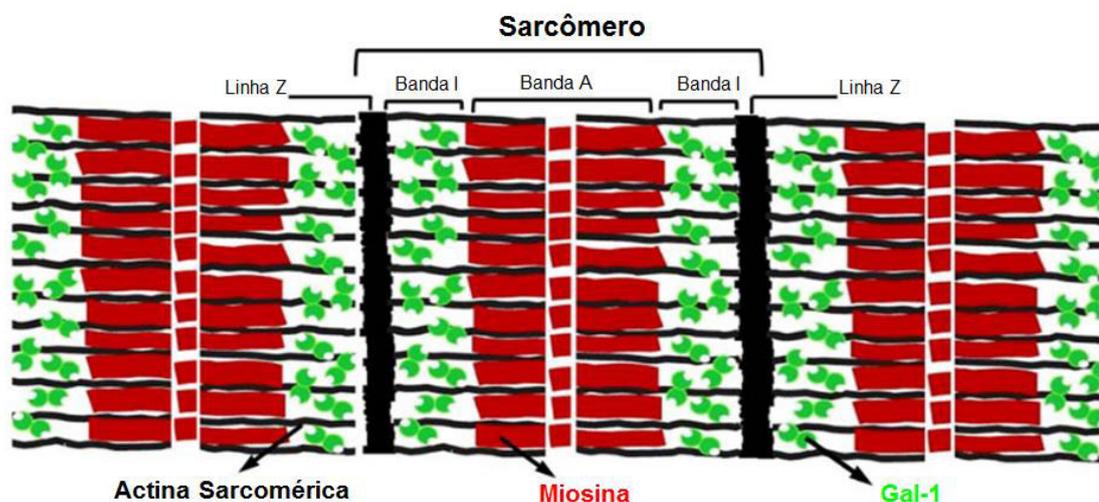


Figura 7. Estrutura do sarcômero, de acordo com a co-localização entre galectina-1 e actina (adaptado de DIAS-BARUFFI et al., 2010).

Porém, os dados de co-localização entre Gal-1 e actina sarcomérica sugerem que esta galectina pode além de promover a regeneração muscular e a modulação da inflamação deste tecido, ela pode participar do mecanismo molecular da contração muscular.

Objetivo

2 OBJETIVO

Os principais objetivos deste trabalho foram (i) estudar a potencial interação entre Gal-1 e actina sarcomérica (Actina-G e Actina-F); e (ii) Se confirmada esta interação, propor um modelo para o complexo molecular composto por Gal-1 e actina sarcomérica.

Metodologia

3 METODOLOGIA

3.1 Produção de Gal-1 e Gal-3 recombinantes humanas

As galectinas recombinantes Gal-1 e Gal-3 humanas foram produzidas com base em procedimentos previamente descritos (CHO; CUMMINGS, 1995, 1996; STOWELL et al., 2014) e com modificações. Basicamente, foram utilizadas bactérias *Escherichia coli* M15 transformadas com o gene de Gal-1 (*LGALS1*) ou Gal-3 (*LGALS3*) completos e não mutados. Os procedimentos descritos a seguir foram utilizados para obtenção de ambas galectinas. Inicialmente, foi feito um pré-inóculo em um tubo cônico de 15 mL com 10 mL de meio LB (Luria-Bertani) e Ampicilina (100 µg/ml), em condições estéreis. Este pré-inóculo foi incubado em um agitador com rotação de 180 rpm, à 37°C por 18 horas. Após este período, foi realizado outro pré-inóculo, utilizando 100 µL do primeiro pré-inóculo, 10 mL de meio LB e Ampicilina (100 µg/mL). Quando a densidade óptica (600 nm) do segundo pré-inóculo atingiu valores entre 0,4 e 0,5, o mesmo foi transferido para um erlenmeyer de capacidade de 2 L contendo 1 L de meio LB e Ampicilina 100 µg/mL e incubado a 37°C em um agitador com rotação de 180 rotações por minuto. Quando a densidade óptica (600 nm) desta cultura bacteriana atingiu a faixa entre 0,4 a 0,5, foi iniciada a indução da expressão proteica, pela adição de IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida - 0,36 g/L), sendo incubado novamente a 37°C em um agitador com rotação de 180 rpm durante 4 horas. Após período, todo o conteúdo do erlenmeyer foi centrifugado a 5.000 x g por 15 minutos a 4°C, onde o sobrenadante foi descartado e os *pellets* transferidos para um único tubo e o material foi armazenado a -80 °C até o momento da purificação.

3.2 Purificação das proteínas recombinantes Gal-1 e Gal-3 por cromatografia de afinidade

A purificação de Gal-1 e Gal-3 foi baseada em metodologia descrita por Dias-Baruffi e colaboradores (2003). Inicialmente, o “*pellet*” bacteriano previamente produzido foi descongelado em gelo e ao mesmo foi adicionado 8 mL do tampão de lise (7 mL de tampão PBS, 14mM de β-mercaptoetanol, 1 tablete de inibidor de protease, 1 ml de lisosima (1mg/mL), 10 µL de RNase 10 mg/mL e 10 µL de DNase

10 mg/mL, pH 7.4). Em seguida, a suspensão bacteriana foi incubada em gelo por 30 minutos e posteriormente submetida a lise mecânica com o uso de um sonicador entre 5 e 8 vezes, utilizando a programação de 30 segundos ativos / 30 segundos inativo com amplitude de 40%. Ao término da sonicação, o lisado bacteriano foi transferido para um tubo cônico de 50 mL e centrifugado a 10.000 x g por 50 minutos a 4°C. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante submetido a etapa de cromatografia de afinidade em colunas contendo a resina de lactosil-agarose (Sigma Aldrich), em câmara fria. A coluna foi previamente equilibrada em tampão de lavagem composto por uma solução de salina tamponada com fosfato (PBS) adicionada de β -mercaptoetanol (14 mM). Em seguida, o sobrenadante das culturas de bactérias foi aplicado na coluna e o *flow through* foi coletado e aplicado novamente na coluna visando aumentar a eficiência do processo de purificação por afinidade. Após a coleta do *flow through*, o material não-retido na resina de lactosil-agarose foi removido com o uso do tampão de lavagem. O material retido foi removido com tampão de eluição composto do tampão de lavagem acrescido de 100 mM de lactose e foram coletadas frações de 500 μ L. O procedimento cromatográfico foi monitorado pela leitura de absorbância (280 nm) e por eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) em condições dissociantes e redutoras para análise do grau de homogeneidade das preparações de galectinas purificadas. A determinação das concentrações proteicas destas preparações foi realizada com o auxílio dos coeficientes de extinção molar de cada galectina ou pelo uso do sistema BCA (Biorad). Após a determinação das concentrações proteicas das preparações de galectinas purificadas, as mesmas foram estocadas a -80°C na presença de tampão de eluição, uma vez que a lactose e o β -mercaptoetanol desfavorecem a oxidação destas proteínas e preservam as suas propriedades lectínica (capacidade de reconhecer carboidratos) e de dimerização (ARTHUR et al., 2015). Imediatamente antes do uso, as preparações de galectinas foram submetidas ao procedimento de remoção da lactose e o β -mercaptoetanol por cromatografia de exclusão molecular em colunas PD-10 (GE Healthcare).

3.3 Purificação de Actina-G a partir de músculo esquelético de Coelho

A purificação da Actina-G (monomérica) foi realizada a partir de preparação liofilizada de músculo esquelético de coelho em base de acetona (Muscle

Acetone Powder from Rabbit) (Sigma-Aldrich) (PARDEE; ASPUDICH, 1982). Este liofilizado foi ressuspenso em um tampão A (Tris 2mM, pH 8,0; ATP 0,5 mM; CaCl₂ 0,2 mM; DTT 0,5 mM; NaN₃ 0,02%) e a actina foi isolada pela indução da polimerização com adição de 50 mM de KCl. Foi adicionado posteriormente 800 mM de KCl para separar a Actina-F (filamentosa) da tropomiosina, e então ultracentrifugado a 100.000 x g por 1 hora (Ultracentrífuga Beckman Coulter). Após isto, a proteína foi quantificada por métodos espectrofotométricos (GeneQuant Pro, GE Healthcare).

3.4 Determinação da atividade lectínica das proteínas recombinantes purificadas Gal-1 e Gal-3, por ensaio de hemaglutinação

Para verificar a integridade funcional do CRD das galectinas, foi realizado um ensaio de hemaglutinação. Inicialmente, adicionou-se Gal-1 e Gal-3 aos poços de uma placa de titulação com fundo em U, de modo a garantir uma faixa de concentração final entre 0,62 a 10 µM. Em seguida, foram adicionados em alguns poços da placa uma solução do carboidrato hapteno inibidor de galectinas (lactose, 20 mM) e a sacarose (20 mM) foi utilizada como carboidrato hapteno controle. Com a finalidade de favorecer a ligação entre as galectinas e a lactose, a placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado a todos os poços da placa uma suspensão de sangue heparinizado de camundongos C57BL/6 diluído em PBS (concentração final de 2%). Após 1h de incubação a temperatura ambiente, a positividade da reação de hemaglutinação foi feita por inspeção visual da ocorrência da formação de malha de hemácias. A reação negativa foi identificada pela sedimentação da suspensão eritrocitária na forma de um “botão” no fundo dos poços. O PBS foi utilizado como controle negativo. O resultado foi expresso considerando a menor concentração das galectinas que provocou a formação da malha eritrocitária.

Planejamento do uso de camundongos para coleta de sangue utilizada para hemaglutinação

O número amostral de camundongos utilizados neste trabalho obedeceu aos valores previstos no processo da Comissão de Ética no uso de Animais de

Experimentação da FCFRP-USP (Processo nº 19.1.608.60.2), com base no método estatístico descrito por ARMITAGE, P.; BERRY, G. A base de dados utilizada será: http://www.lee.dante.br/pesquisa/amostragem/qua_1_media_est.html. O tamanho amostral previsto e utilizado foi de 10 animais por grupo, assim representado na tabela 1.

Experimento	Camundongo	Nº de Experimentos	Quantidade de camundongos x Nº de experimentos
Retirada de sangue para hemaglutinação	C57BL/6 n=1	10	C57BL/6 n=10

Tabela 1. Planejamento do uso de animais em experimentação.

3.5 Análise viscosimétrica de preparações contendo Gal-1 e Actina sarcomérica

Para a análise viscosimétrica, a Actina-G diluída em Tampão G (Tris 5 mM pH8; CaCl₂ 0,2 mM; ATP 0,2 mM; DTT 0,5 mM) foi adicionada em microtubos de 1,5 mL contendo Gal-1 (0,625 a 40 µM) na presença ou ausência de açúcar hapteno específico (lactose, 20 mM) ou não específico para galectinas (sacarose, 20 mM). Para indução da polimerização da Actina-G foi utilizado o tampão KMET (KCl 500 mM ; MgCl₂ 20 mM; EGTA 10 mM; Tris 100 mM pH 8) que será responsável por induzir a polimerização da Actina-G, como descrito por Kang e colaboradores (KANG et al., 2013). Após a adição de KMET, as soluções foram transferidas para capilares (Pyrex 100 µL, Corning) incubadas por 1 h a 22°C em banho seco. As variações de viscosidade das preparações proteicas foram determinadas pelas medidas de tempo de queda de uma esfera de aço inoxidável, em um segmento de 4 cm demarcados no capilar angulado contendo as soluções de Actina e Gal-1. Este tempo de queda é proporcional a viscosidade das soluções testadas.

3.6 Análise de formação de complexos moleculares entre galectinas e Actina-G, por eletroforese em condições nativas

Solução de Actina-G (5 μ M) foi incubada por 2 horas com preparações de Gal-1 ou Gal-3 na concentração de 20 μ M em tampão G contendo glicerol (concentração final de 15%), a temperatura ambiente. As preparações proteicas foram analisadas por eletroforese gel de poliacrilamida nativo [Tris (150 mM), pH 8,8; MgCl₂ (0,2 mM); ATP (0,2 mM); DTT (0,5 mM)] com tampão de corrida Tris/glicina [Tris (25 mM); glicina (192 mM), MgCl₂ (0,2 mM); ATP (0,2 mM); DTT (0,5 mM)] a 150 V no sistema GE Healthcare Life Sciences. O gel foi corado por *Brilliant Coomassie G-250*, e também com prata.

3.7 Análise de formação de complexos moleculares entre galectinas e Actina-G tratadas com agente indutor de ligações cruzadas, por eletroforese em condições desnaturantes e redutoras

Soluções de Gal-1 (10 μ M) e Gal-3 (10 μ M) foram incubadas por 30 minutos com Actina-G (10 μ M), à temperatura ambiente, em 70 μ L de tampão de interação [HEPES (50 mM), pH 8,2; NaCl (150 mM); EDTA (0,1 mM); ATP (0,2 mM)]. No início da incubação das soluções proteicas e após 15 minutos, foi adicionada à esta mistura uma solução (concentração final de 4%) de um agente indutor de ligações cruzadas [EDC: 1-etil-3-(3-cloridrato) dimetilaminopropil carbodiimida]. Ao final dos 30 minutos de incubação, as amostras foram submetidas à análise eletroforética por SDS-PAGE em condições desnaturantes e redutoras. Os géis foram corados com *Brilliant Comassie Blue G-250*.

3.8 Análise de ligação entre Gal-1 e Actina-F, por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Poços de microplacas de ELISA foram sensibilizados com soluções (5 μ g - 50 μ L por poço) de Actina-F, em tampão de indução de polimerização de actina (50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,1 mM ATP), ou de Actina-G em tampão G (5 mM Tris pH 8,0, 0,2 mM CaCl₂, 0,2 mM ATP, 0,5 mM DTT). Após um período 24 horas de

sensibilização, a 4°C, as microplacas foram lavadas gentilmente com PBS-Tween 20 0,05 % (v/v), por três vezes. Em seguida, os poços foram submetidos à etapa de bloqueio com 200 µL de uma solução gelatina a 3% (p/v) (Amresco ® Pork Skin Gelatin), por 2h a 37 °C. Após o final desta etapa, as microplacas foram lavadas novamente, e em seguida foi distribuída uma solução de Gal-1 (10 µM - 50 µL por poço) na presença ou ausência de lactose (10 mM) ou sacarose (10 mM). Após 1 hora de incubação a 37°C, as microplacas foram submetidas a outra etapa de lavagem e incubadas com soro policlonal de coelho anti-Gal-1 (1:5000), por 1h a 37 °C. Posteriormente, foi realizada outra etapa de lavagem e as microplacas foram incubadas com anticorpo secundário de cabra anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (HRP - Invitrogen ®) na diluição de 1:15000, por 1h a 37 °C. Após outra etapa de lavagem, os poços foram incubados com uma solução de TMB (3',5,5'-tetrametilbenzidina) em DMSO (1%), e a reação foi interrompida após 2 minutos com HCl (0,1 N). A leitura da densidade ótica das imunorreações foi realizada a 450 nm com auxílio de um espectrofotômetro de microplacas (SpectraMax-350, Molecular Device).

3.9 Obtenção de modelos moleculares de Gal-1 e Actina-F utilizados nos estudos *in silico*

As estruturas utilizadas nos estudos computacionais foram obtidas a partir do repositório Protein Data Bank (PDB) (BERMAN et al., 2000). Foi escolhida a forma homodimérica da Gal-1 humana depositada com código PDB 2KM2 (NESMELOVA et al., 2010) e a forma hexamérica da Actina-F de coelho com código 2Y83 (NARITA; ODA; MAÉDA, 2011). As sequências observadas em estruturas cristalográficas foram comparadas com as utilizadas neste trabalho a partir do alinhamento de sequências de Gal-1 humana (gene *LGALS1* com código Uniprot P09382) e de Actina hexamérica de coelho (gene *ACTA1* com código Uniprot P68135) com o programa *MUSCLE* (EDGAR, 2004). A validação das estruturas modeladas foi realizada a partir da análise do gráfico de Ramachandran construído com o programa PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993) onde a disposição da maioria dos resíduos (> 98%) em regiões favoráveis e permitidas indicam um enovelamento adequado e dentro do esperado para estruturas protéicas investigadas.

3.10 Construção de modelos para o complexo molecular composto de Gal-1 e Actina-F, por ancoragem molecular

A busca por possíveis complexos entre Gal-1 e Actina-F foi realizada por ancoragem molecular empregando o servidor *ClusPro 2.0* (KOZAKOV et al., 2017). As ancoragens foram realizadas utilizando as formas modeladas de Actina-F hexamérica, como estrutura de referência, e o homodímero de Gal-1, como ligante. O algorítmico empregado neste programa gera um conjunto de possíveis estruturas para o complexo molecular em questão, as quais são avaliadas com o uso de critérios energéticos em quatro categorias (KOZAKOV et al., 2017): (1) *Balanced*, (2) *Electrostatic-favored*, (3) *Hydrophobic-favored* e (4) *VdW+Elec*. Complexos com estruturas semelhantes são então agrupados em conjuntos (*clusters*) que são elencados como base no número de complexos presentes em cada conjunto, onde são também indicadas as energias da estrutura do centro de cada conjunto e do complexo com energia mais negativa para cada uma das categorias. Como critério para escolha do melhor modelo, por categoria, foi escolhido o conjunto com energia mais atrativa (maior valor negativo) para os maiores conjuntos. Os modelos escolhidos foram submetidos à predição da energia livre de ligação com o programa PRODIGY (XUE et al., 2016). Complexos da Actina-F com outras proteínas depositadas no PDB foram também submetidas à predição das suas energias livre de ligação com esta mesma metodologia e as predições foram comparadas às identificadas para os modelos dos complexos de Actina-F e Gal-1 obtidos por ancoragem molecular.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Análise eletroforética e determinação da atividade hemaglutinante de preparações de Gal-1 e Gal-3 recombinantes humanas purificadas

As preparações purificadas de Gal-1 e Gal-3 foram obtidas a partir de procedimento cromatográfico composto por duas etapas. A primeira foi baseada na cromatografia de afinidade em resinas de agarose-lactose, seguida de uma etapa de cromatografia de exclusão molecular para remoção de conservantes (2-ME e lactose) destas preparações proteicas. A figura 8 ilustra as análises eletroforéticas das preparações de Gal-1 (Figura 8A) e Gal-3 (Figura 8B) obtidas na primeira etapa cromatográfica e mostra o elevado grau de homogeneidade das preparações de galectinas utilizadas neste trabalho. As análises eletroforéticas das preparações obtidas da etapa de exclusão molecular apresentaram padrão de homogeneidade similar ao indicado na figura 8 (dados não mostrados).

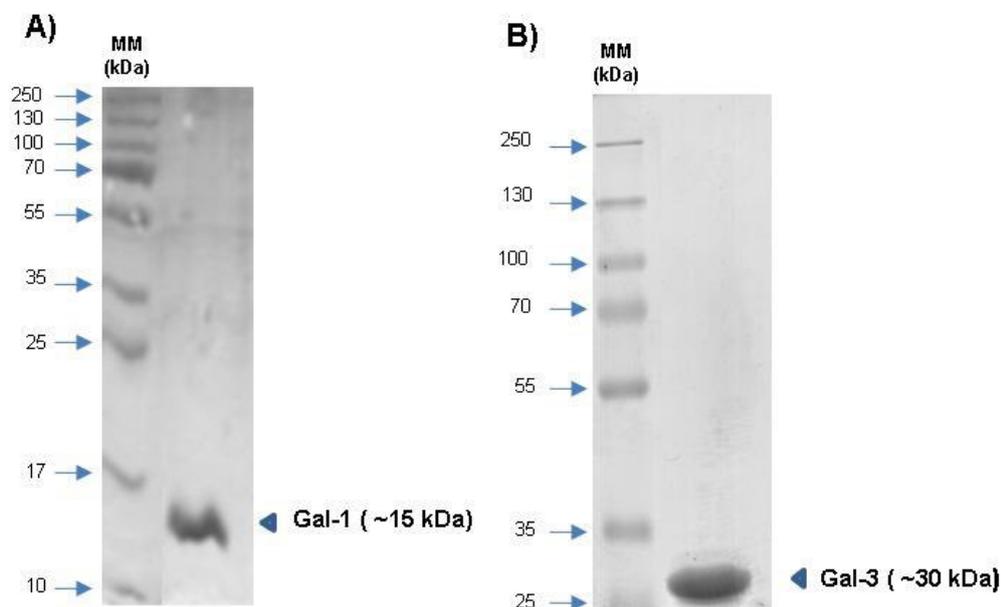


Figura 8. SDS-PAGE das preparações de galectinas humanas recombinantes purificadas. Perfil eletroforético de alíquotas (1,0 µg/pista) da preparação de Gal-1 (A) ou de Gal-3 (B), as cabeças de setas indicam os pesos moleculares aparentes de Gal-1 (~15 kDa) ou de Gal-3 (~30 kDa). As análises de SDS-PAGE (12%) foram feitas em condições dissociantes e redutoras. As alíquotas analisadas foram obtidas de “pool” de frações da cromatografia de afinidade em agarose-lactose, conforme

descrito no item 3.2. Os géis foram corados por *Comassie Blue G-250*. MM: mistura de marcadores de peso molecular (10 a 250 kDa).

Com o objetivo avaliar o impacto dos procedimentos de purificação na atividade lectínica (capacidade de reconhecer carboidratos) das preparações de galectinas purificadas, amostras de tais preparações foram submetidas a testes de hemaglutinação na presença ou ausência de carboidratos haptenos [específico (lactose, Lac) ou inespecífico (sacarose, Sac)]. Para a Gal-1 o título foi de 1,25 μM (Figura 9A) e para Gal-3 foi de 0,62 μM (Figura 9B). Este conjunto de resultados mostram que as preparações de galectinas além de puras estavam ativas.

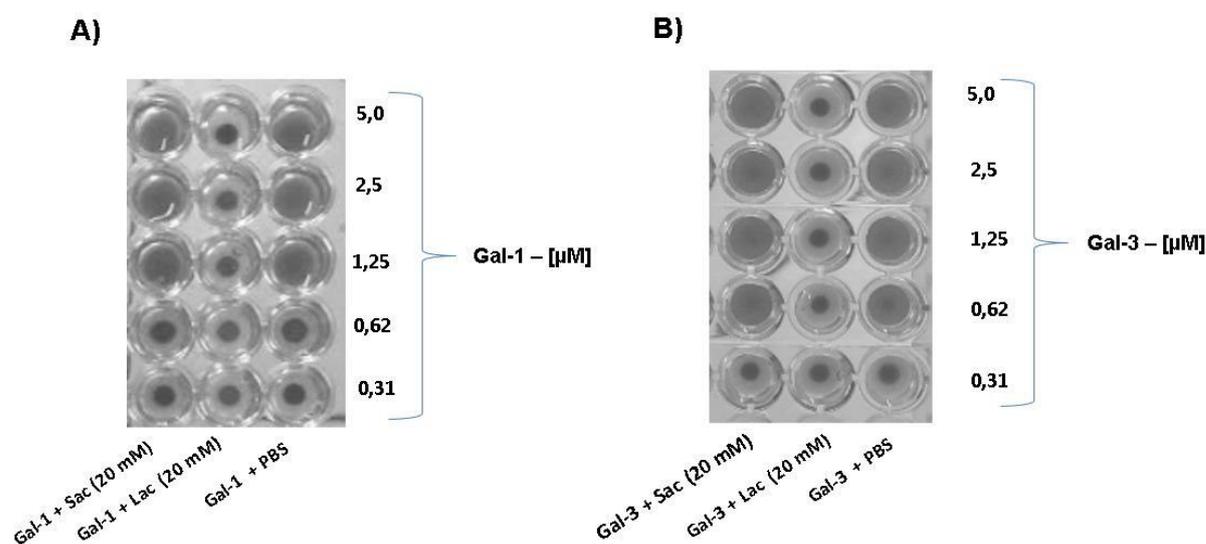


Figura 9. Avaliação da atividade lectínica das preparações de Gal-1 e de Gal-3 purificadas, por hemaglutinação. Alíquotas de suspensão de hemácias de camundongos (2%, concentração final) foram distribuídas em microplacas, e em seguida misturadas com soluções de Gal-1 (A) ou de Gal-3 (B) nas concentrações finais de 0,31 a 5,0 μM . Após, 1 hora a temperatura ambiente, foram realizadas as inspeções visuais quanto a formação de malhas (hemaglutinação positiva) ou formação de botão (hemaglutinação negativa).

4.2 Purificação e teste funcional da Actina sarcomérica de músculo de Coelho

O procedimento de purificação de Actina sarcomérica de extrato de músculo de coelho foi eficiente e possibilitou a obtenção de preparações com elevada homogeneidade. Como ilustrado na Figura 10, por meio SDS-PAGE, foi possível detectar apenas uma banda proteica nestas preparações na faixa de peso molecular

aparente da Actina-G (~42 KDa). Além disso, as preparações purificadas de actina sarcomérica estavam ativas, conforme indicado pelos testes de viscosidade (Figura 10).

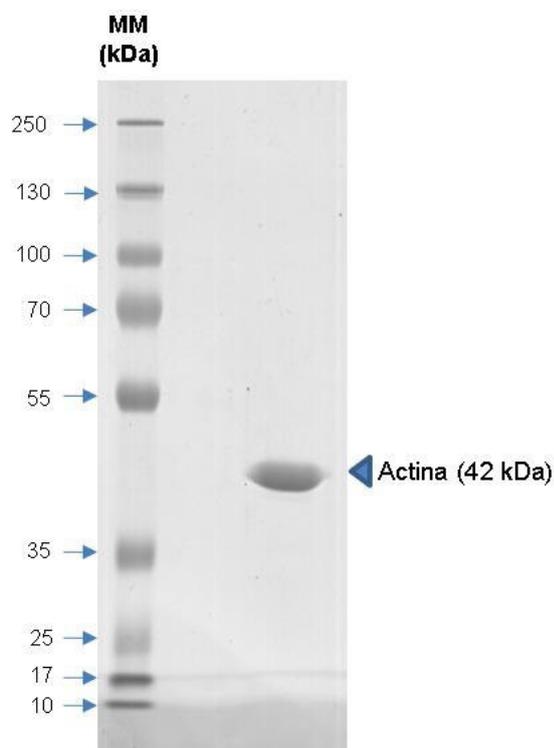


Figura 10. SDS-PAGE da preparação de Actina sarcomérica de músculo de coelho purificada. Perfil eletroforético de alíquota da preparação de actina sarcomérica purificada de extrato de músculo de coelho (2,0 µg/pista). A cabeça de seta indica o peso molecular aparente de Actina-G (~42 kDa). A análise de SDS-PAGE (12%) foi feita em condições dissociantes e redutoras. O gel foi corado por *Comassie Blue G-250*. MM: mistura de marcadores de peso molecular (10 a 250 kDa).

4.3 Análise de ligação entre Gal-1 ou Gal-3 com Actina-G por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas

Nos ensaios de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas e com uso do corante *Brilliant Comassie Blue G-205* (Figura 11 A) não foi possível detectar banda representativa do complexo molecular Gal-1 monomérica com Actina-G ou do complexo Gal-3 monomérica com Actina-G). Além disso, com o uso de um método mais sensível de coloração de proteínas, o procedimento com prata, foram detectadas apenas bandas correspondentes as galectinas ou actina-G isoladas nas soluções contendo a mistura de Gal-1 e actina-G ou Gal-3 e Actina-G

(Figura 11 B). Estes dados sugerem que a Actina-G parece não formar complexos moleculares com Gal-1 ou Gal-3 em solução, suficientemente estáveis, para serem detectados por PAGE em condições nativas.

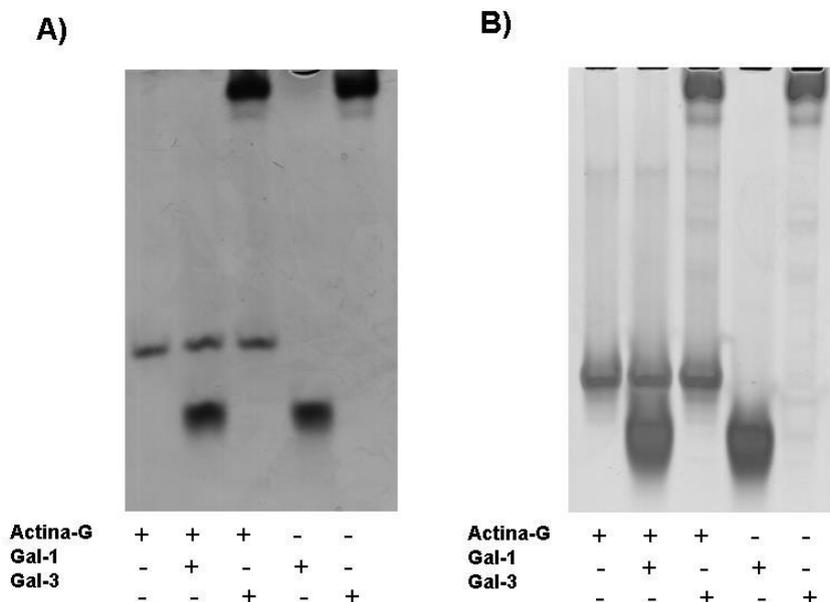


Figura 11. Análise do perfil eletroforético de preparações compostas por Gal-1 e Actina-G ou Ga-3 e Actina-G. Amostras de soluções contendo Gal-1 (3,0 µg/pista); Gal-3 (6,0 µg/pista); Actina-G (2,1 µg/pista); Gal-1 (3,0 µg/pista) + Actina-G (2,1 µg/pista); e Gal-3 (6,0 µg) + Actina-G (2,1 µg/pista) foram submetidas a eletroforese de poliacrilamida (12%) em condições nativas. Os géis foram corados por *Brilliant Comassie Blue G-250* (A) ou por prata (B). Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes.

4.4 Análise eletroforética de soluções de Gal-1 ou Gal-3 adicionadas de Actina-G, na presença de EDC

Como o objetivo de dar continuidade a investigação da ocorrência de uma possível interação entre galectinas e Actina-G e considerando que ligações proteína-proteína podem ser transientes, foram realizados experimentos com soluções de Gal-1 ou Gal-3 adicionadas de Actina-G na presença de um agente indutor de ligações cruzadas (EDC) (BARONI et al., 2018). Como ilustrado na figura 12, mesmo na presença de EDC, não foi possível detectar a formação de complexos entre as galectinas e Actina-G. Foram detectadas apenas as bandas proteicas com pesos moleculares aparentes correspondentes a Gal-1 monomérica (~15 kDa), Gal-3 monomérica (~30 kDa) e actiba-G (~42 kDa). Entretanto, uma banda tênue de aproximadamente 30 kDa, correspondente ao peso molecular aparente do dímero de

Gal-1, foi observada apenas na pista que continha esta galectina.

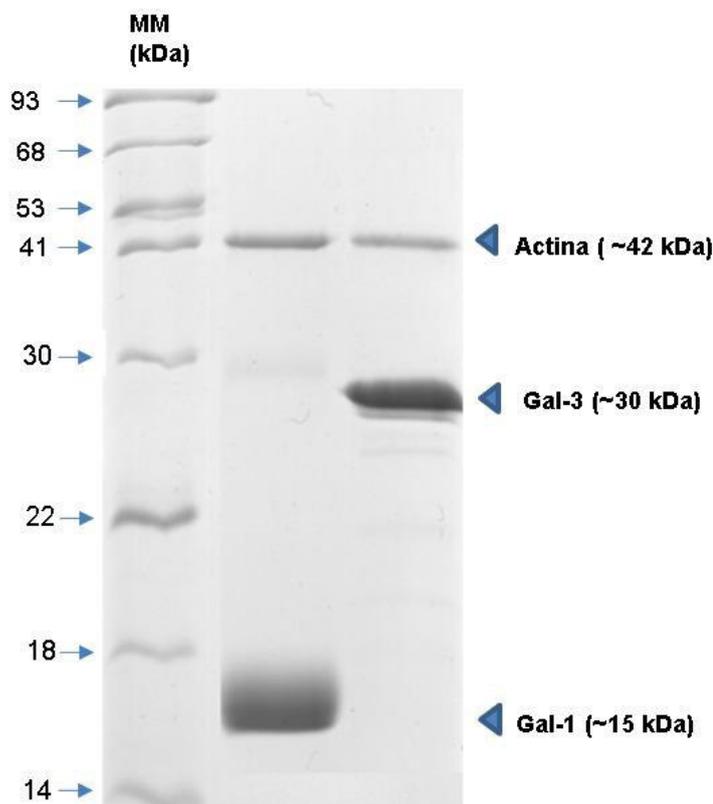


Figura 12. SDS-PAGE de soluções de Gal-1 ou Gal-3 contendo Actina-G e EDC. Amostras de soluções contendo Gal-1 (3,0 μg), Actina-G (2,1 μg) e EDC; ou Gal-3 (1,5 μg), Actina-G (2,1 μg) e EDC foram submetidas a eletroforese de poliacrilamida (12%) em dissociantes e redutoras. O gel foi corado por *Brilliant Comassie Blue G-250*. As bandas com pesos moleculares aparentes de 15, 30 e 42 kDa correspondem a Gal-1 monomérica, Gal-3 monomérica e Actina-G, respectivamente. MM = mistura de marcadores de peso molecular conhecidos (14 a 93 kDa).

4.5 Análise da potencial ligação entre Gal-1 e as formas monomérica e filamentosa de Actina sarcomérica, por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Com o uso da técnica de ELISA foram confirmados os achados obtidos anteriormente, referentes a não detecção da interação entre Gal-1 e Actina-G (Figura 11; Figura 12). Entretanto, o ensaio imunoenzimático analisando a interação entre Gal-1 e Actina-F demonstrou uma ligação entre Gal-1 e Actina-F, tanto na ausência de Lactose e Sacarose quanto na presença destes açúcares (Fig 13).

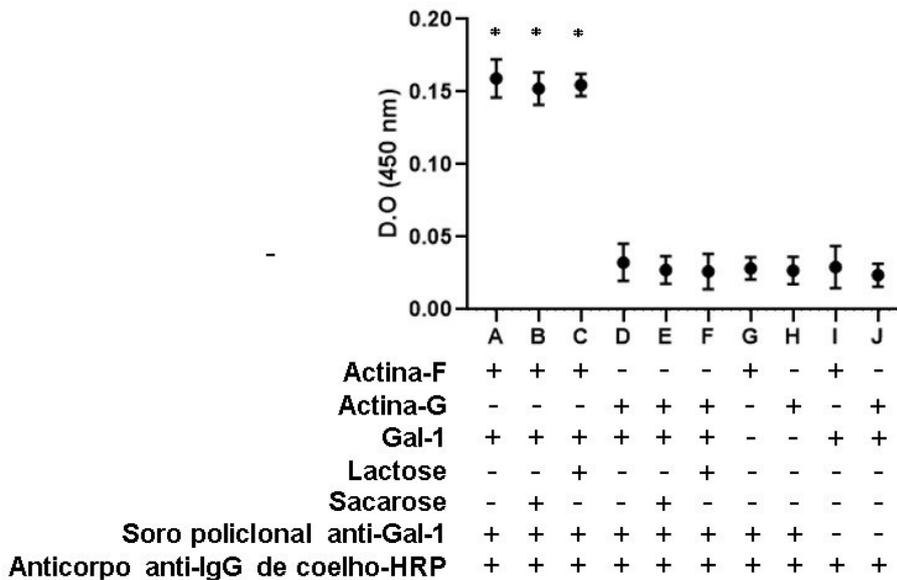


Figura 13. Análise de interação entre Gal-1 e Actina-F, por ensaio imunoenzimático (ELISA).

Poços de microplacas foram sensibilizados com soluções de Actina-G (5 µg/poço/50 µL) ou Actina-F (5 µg/poço/50µL). Solução de gelatina (3%) foi utilizada na etapa de bloqueio e a concentração de Gal-1 foi de 10 µM (50 µL/poço). Lactose (10mM) foi usada com açúcar inibidor da atividade lectínica de Gal-1 e a sacarose (10 mM) foi usada com açúcar controle. Soro policlonal de coelho anti-Gal-1 foi usado como anticorpo primário (1:5000) e IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase como secundário (1:15000). A leitura da densidade óptica das imunorreações foi medida a 450 nm com auxílio de um espectrofotômetro de microplacas (SpectraMax-350, Molecular Device). Os resultados foram estatisticamente significantes pelo método ANOVA one-way, ($p < 0,05$) para os resultados em relação ao controle sem Gal-1 e sem o Soro policlonal anti-Gal-1, e são representativos de 2 experimentos independentes.

4.6 Análise funcional da interação Gal-1 e Actina-F com o uso do ensaio de viscosimetria

Após a detecção da interação direta entre Gal-1 dimérica e Actina-F por ELISA (Figura 13) foram realizados ensaios de viscosimetria como o objetivo de analisar a habilidade de Gal-1 em promover a polimerização e/ou formação de retículos de actina sarcomérica. Como esperado, a Gal-1 não alterou a viscosidade de soluções de actina-G na presença de tampão G (Figura 14 A), uma vez o tempo de queda da esfera de aço foi similar em todas as condições testadas ($0,56 \pm 0,09$ segundos). Na presença do tampão KMET, a solução de actina sarcomérica apresentou um aumento de sua viscosidade (tempo de queda de $1,48 \pm 0,05$ segundos) e este efeito foi incrementado em 2,9 vezes na presença de Gal-1

dimérica na concentração de 0,625 μM (tempo de queda de $4,25 \pm 0,07$ segundos). Interessantemente, este feito potencializador da Gal-1 foi modo insensível a presença de carboidratos (lactose ou sacarose). Além disso, em concentrações superiores a 0,625 μM , a Gal-1 promoveu aumentos menos robustos na viscosidade da solução de Actina-F, mas 5 μM desta galectina causou um ganho de aproximadamente 30% na taxa viscosidade. Salienta-se que em nenhuma concentração testada da Gal-1, a taxa de viscosidade da actina-F não foi reduzida.

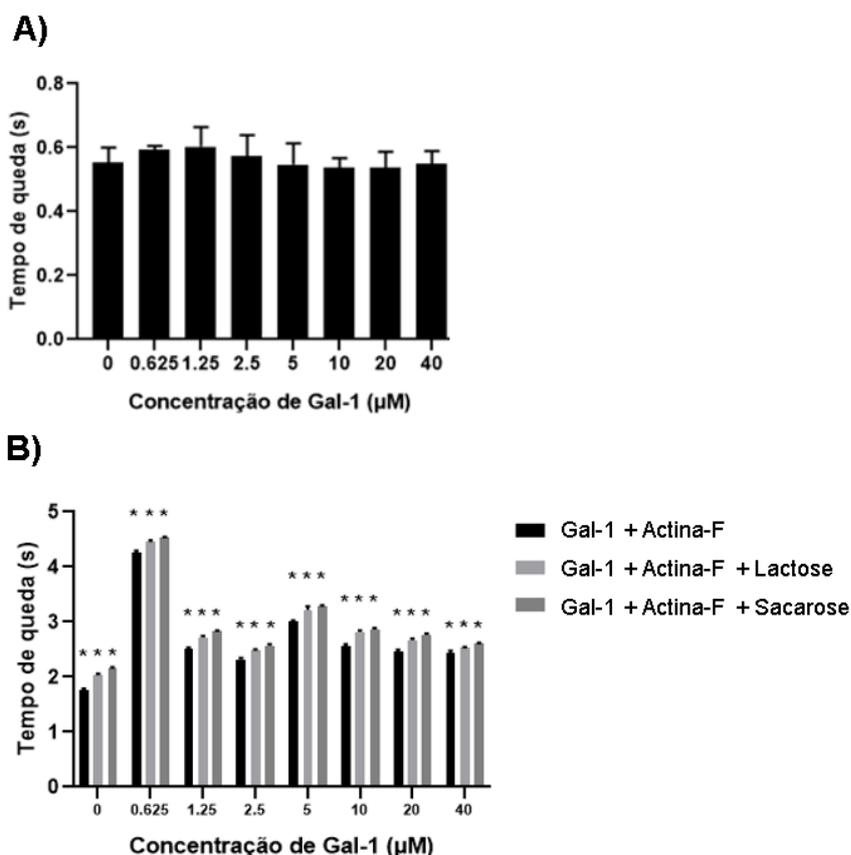


Figura 14. Análise viscosimétrica de soluções contendo Actina-F ou Actina-G adicionadas de Gal-1 e na presença ou ausência de carboidratos. A) Tempo de queda da esfera de aço em soluções de actina sarcomérica (20 μM) na presença de tampão G e de diferentes concentrações de Gal-1 (0,625 a 40 μM). **B)** Tempo de queda da esfera de aço em soluções de actina sarcomérica (20 μM) na presença de tampão KMET adicionadas de diferentes concentrações de Gal-1 (0,625 a 40 μM) e na presença ou ausência de Lactose ou Sacarose (10mM). Os resultados foram expressos em tempo de queda (segundos). Os resultados foram estatisticamente significantes pelo método ANOVA one-way, ($p < 0,05$) para os resultados em relação ao controle sem Gal-1, e são representativos de 3 experimentos independentes.

4.7 Construção do modelo do complexo molecular entre Gal-1 e Actina-F

Após a demonstração da interação direta entre Gal-1 dimérica e Actina-F e seu impacto em propriedades físicas da solução de actina-F, foram realizados estudos *in silico* para investigar o mecanismo molecular da formação de complexo.

As estruturas dimérica de Gal-1 humana e hexamérica de Actina-F de coelho obtidas a partir do *PDB* encontram-se ilustradas na Figura 15a e 15b, respectivamente.

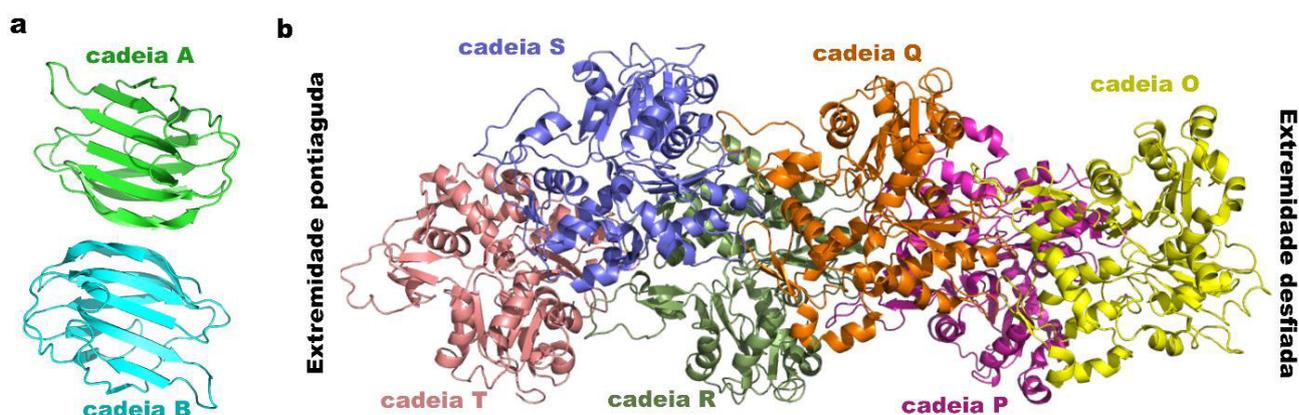


Figura 15. Estruturas de Gal-1 e Actina-F utilizadas nos estudos *in silico*. (a) Estrutura do dímero de Gal-1 obtida a partir do *PDB* com código 2KM2 (NESMELOVA et al., 2010). A cadeia A (verde) é mostrada na parte superior, a cadeia B (ciano) na parte inferior e a região do CRD encontra-se na face exposta no plano da imagem. (b) Estrutura do hexâmero de Actina-F obtida do *PDB* com código 2Y83 (NARITA; ODA; MAÉDA, 2011) onde podemos observar as cadeias O (amarelo), P (rosa), Q (laranja), R (verde oliva), S (azul) e T (salmão) orientadas da direita para esquerda, apresentação que corresponde às extremidades desfiada e pontiaguda (do inglês ‘*barbed end*’ e ‘*pointed end*’) (NARITA; ODA; MAÉDA, 2011).

As comparações das respectivas sequências das estruturas experimentais com as sequências nativas obtidas no *Uniprot* para estas duas proteínas resultaram em alinhamentos com 100% de identidade (dados não mostrados). Salienta-se que não foi inserido no modelo de Gal-1 dimérica o resíduo de metionina na posição N-terminal. Os monômeros presentes na estrutura da Actina-F não apresentaram a cobertura de dois resíduos N-terminais (metionina e cisteína) presentes na sequência nativa. Como os experimentos foram realizados com Actina-F extraída de coelhos, então os resíduos ausentes foram inseridos no modelo desta proteína motora. A

estrutura do dímero de Gal-1 e do hexâmero de Actina-F modelados e reparados com o programa Modeller resultaram em modelos com distribuição majoritária dos resíduos em regiões favoráveis e permitidas do gráfico de Ramachandran, de forma que as estruturas foram otimizadas em relação aos dados cristalográficos e se mostraram adequadas para os estudos subsequentes estudos de ancoragem molecular proteína-proteína (Tabela 2).

Região do gráfico de Ramachandran (%)	Gal-1		Actina-F	
	Experimental	Modeller	Experimental	Modeller
Permitida	79,8	86,4	77,6	86,8
Adicionalmente permitida	17,5	11,4	19,1	1,5
Generosamente permitida	2,6	2,2	2,3	1,0
Não permitida	0,0	0,0	1,1	0,8

Tabela 2. Avaliação da viabilidade estrutural dos modelos moleculares de Gal-1 e Actina-F cujas estruturas foram reparadas utilizando modelagem molecular. Distribuição dos resíduos das estruturas de referência e modeladas com o programa Modeller sobre as regiões do gráfico de Ramachandran calculados para o dímero de Gal-1 e hexâmero de Actina-F.

4.7.1 Construção do modelo do complexo molecular Gal-1 dimérica e Actina-F, por ancoragem molecular

A predição das interações e formação de complexos entre o hexâmetro de Actina-F (receptor) e o dímero da Gal-1 (ligante) foi feita por ancoragem molecular. Os complexos foram então agrupados em conjuntos de estruturas semelhantes com conformações de baixa energia, conforme descrito nos Modelos e Métodos e literatura (KOZAKOV et al., 2017) (*Balanced*, *Electrostatic-favored*, *Hydrophobic-favored* e *VdW+Elec*). As análises indicaram um número elevado de conjuntos para todas as funções de energia, variando de 23 (*Hydrophobic-favored* e *VdW+Elec*) até 30 (*Balanced* e *Electrostatic-favored*) (Figura 16). Estes achados sugerem que há favorecimento de múltiplas formas de interação dentro dos limites dos modelos empregados. Cada conjunto, por sua vez, contém um número variável de estruturas

semelhantes que foram usadas para elencar os modelos gerados para cada categoria de energia. Outra medida importante foi a energia da estrutura que corresponde ao centro de cada conjunto de configurações estruturais porque fornece parâmetro de caracterização da ligação proteína-proteína. A energia de cada centróide e o número de estruturas dos conjuntos para as quatro categorias de energias encontram-se nas Figuras 16 A-D. Com base nesta coleção de dados foi possível distinguir e selecionar os modelos moleculares mais adequados e robustos para a melhor compreensão dos resultados experimentais. Em linha gerais, foram identificadas energias de interação atrativas para todos os conjuntos de modelos do complexo molecular entre Gal-1 e Actina-F gerados. As energias de interação destes modelos estão dentro de limites observados em outros estudos baseados na ferramenta Cluspro (PANDEY; BHATT; PRAJAPATI, 2018), onde sabidamente ocorria a formação do complexo. Estes resultados sugerem que os modelos dos complexos entre a Gal-1 e Actina-F obtidos devem condizer com interações funcionais observadas a partir dos resultados experimentais.

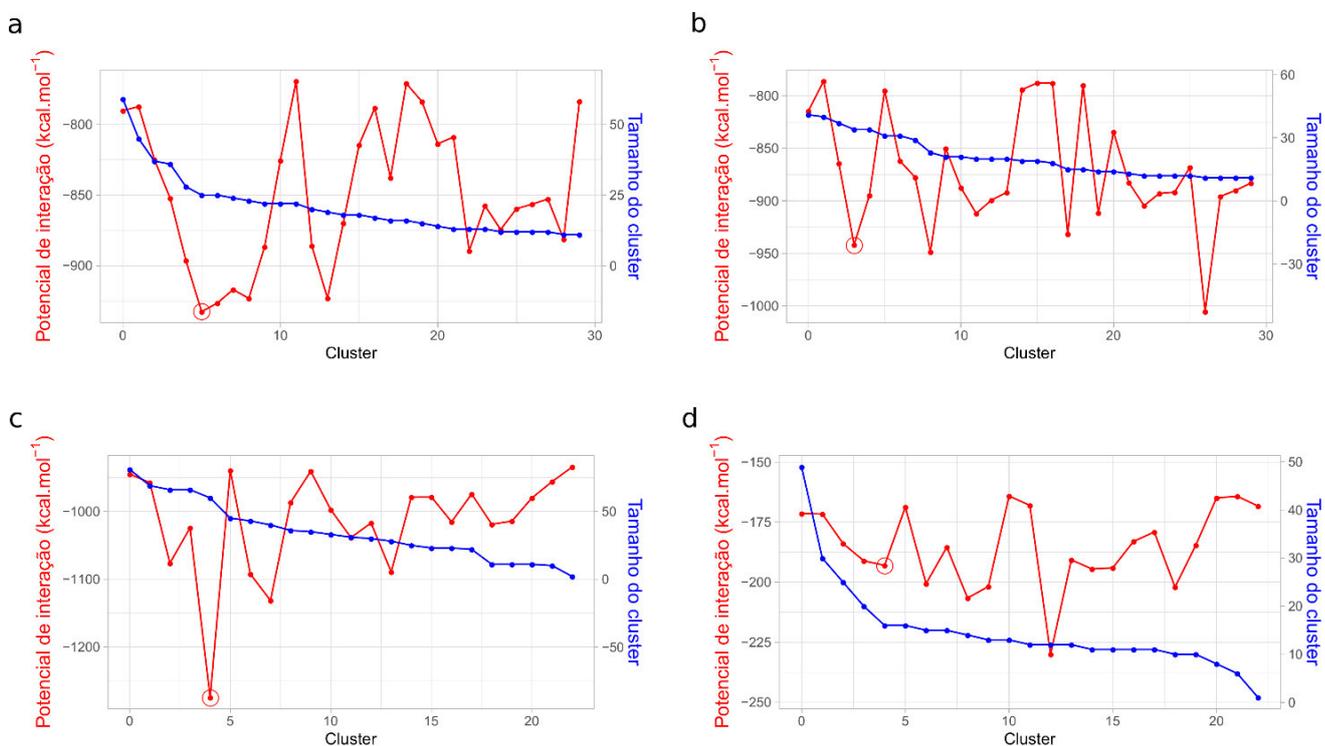


Figura 16. Agrupamento das estruturas dos complexos obtidos das análises de ancoragem molecular entre a Gal-1 dimérica e Actina-F. Energia de interação dos conjuntos de estruturas obtidos a partir das simulações de ancoragem molecular para cada uma das funções de energia (a) *Balanced*, (b) *Electrostatic-favored*, (c) *Hydrophobic-favored* e (d) *VdW+Elec*. Estão representados os

números de estruturas que compõe cada conjunto (pontos e linhas em azul) e as intensidades das energias de interação proteína-proteína do centróide de cada conjunto de estruturas (pontos e linhas em vermelho) organizados em ordem decrescente. Os círculos vermelhos abertos indicam os modelos dos complexos moleculares selecionados.

Os modelos moleculares de interação Gal-1/Actina-F foram selecionados para cada categoria de energia obedecendo os critérios de maior número de estruturas em um conjunto com menor energia. Os modelos dos complexos selecionados encontram-se nas Figuras 17 A-D. Em dois complexos a Gal-1 encontra-se na região de interface entre monômeros da Actina-F (Figuras 17A e 17A) enquanto nos outros dois modelos ela está situada na extremidade desfiada (*barbed end*) da Actina-F, interagindo com apenas um monômero da Actina-F (Figuras 17B e 17C). Em todos estes modelos, o CRD da Gal-1 não participa diretamente na formação dos complexos, ou seja, não são observados contatos proteína-proteína do CRD com a Actina-F. Curiosamente, os dois modelos onde a Gal-1 interage com a extremidade desfiada do hexâmetro de Actina-F apresentam as energias de interação mais atrativas (-941,8 e -1274,5 kcal.mol⁻¹), enquanto que a interação da Gal-1 com as interfaces de monômeros de Actina-F apresentaram energias menos atrativas (-932,5 e -200,6 kcal.mol⁻¹) (Figuras 17 A-D). Ressalta-se porém que estas variações de energia podem ser tanto decorrentes das diferentes formas de ligação como também devido às diferenças das categorias de energia (DESTA et al., 2020).

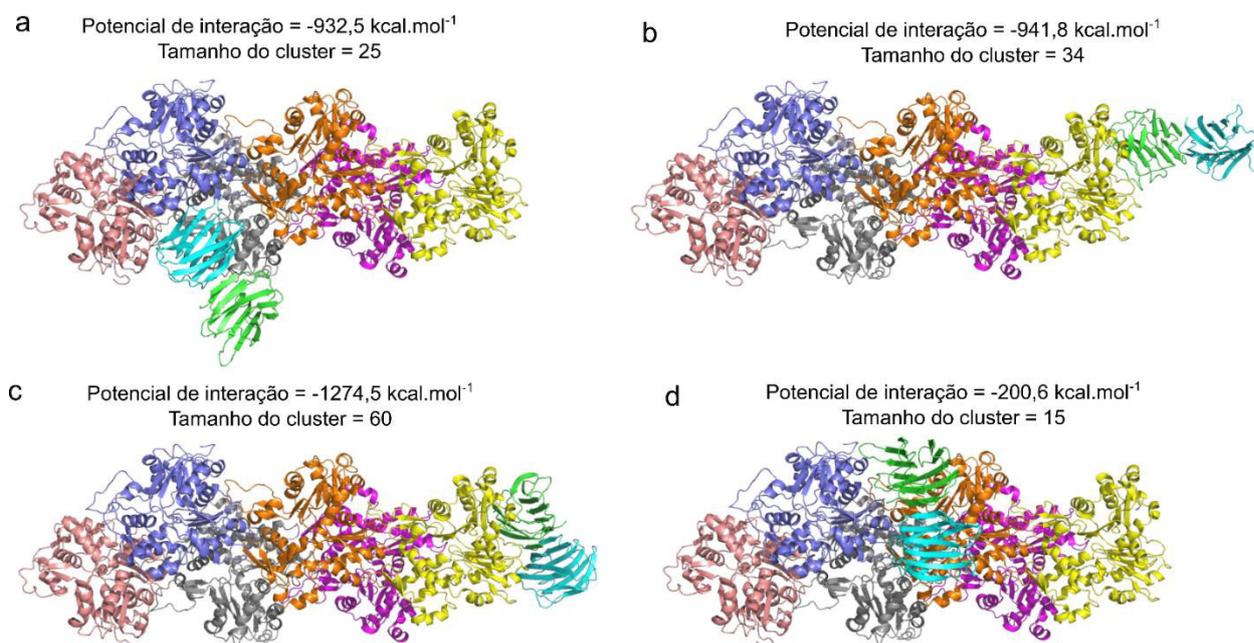


Figura 17. Modelos dos complexos entre Gal-1 e Actina-F obtidos no estudo de ancoragem molecular. As estruturas correspondem às categorias de energia (a) *Balanced*, (b) *Electrostatic-favored*, (c) *Hydrophobic-favored* e (d) *VdW+Elec*. As cadeias A e B da Gal-1 são representadas pela cor verde e ciano, respectivamente. As cadeias do hexâmero de Actina-F esta indicadas pelas cores amarela (O), rosa (P), laranja (Q), verde oliva (R), azul (S) e salmão (T).

As previsões das energias livres de ligação (ΔG) para cada um dos modelos moleculares selecionados encontram-se na Tabela 3 juntamente com a previsão de ΔG de estruturas depositadas no PDB. Observa-se que os modelos nos quais a Gal-1 encontra-se nas regiões de interface de monômeros da Actina-F (Figuras 17A e 17D) apresentam as maiores afinidades quando comparados com os modelos cuja Gal-1 encontra-se na extremidade desfiada interagindo com um monômero (Figuras 19B e 19C). Alguns complexos moleculares contendo Actina-F e depositados no PDB apresentam valores de ΔG de mesma ordem ou inferiores aos modelos nos quais a Gal-1 está complexada à extremidade desfiada (Tabela 3). Este conjunto de resultados *in silico* suportam os achados experimentais sobre a ocorrência de uma interação direta e a consequente formação de complexos macromoleculares entre Gal-1 dimérica e Actina-F.

Modelo/complexo	ΔG (kcal.mol ⁻¹)	K_d (M) à 25°C	Descrição (cadeias actina / cadeia ligante)
<i>Balanced</i>	-16,2	1,3E-12	Figura 17 A
<i>Electrostatic-favored</i>	-10,4	2,2E-08	Figura 17 B
<i>Hydrophobic-favored</i>	-12,7	5,0E-10	Figura 17 C
<i>VdW+Elec</i>	-16,4	8,9E-13	Figura 17 D
3BYH	-11,5	3,8E-09	Modelo de interação Actina-G com fimbrina ABD2 (monômero de actina) (A / B)
3JOS	-14,8	1,4E-11	Modelo de interação entre Actina-F e cofilina (A,B,C / N)
3LUE	-15,1	8,2E-12	Modelo de interação Alfa-actinina com Actina-F (A,B,C / K)
6VAO	-14,1	4,7E-11	Modelo de interação entre cofilina-1 com Actina-F (A,D,E / I)
6WVT	-15,1	8,4E-12	Modelo de interação entre alphaE-catenina com Actina-F (actina-F) (B,D,I / N)

Tabela 3. Análise preditiva das energias de afinidade (ΔG) e as constantes de dissociação (K_D) dos modelos moleculares. Foram estimadas as energias livres, com o uso do programa PRODIGY dos modelos selecionados para os possíveis complexos entre Gal-1 dimérica e Actina-F construídos por ancoragem molecular e de complexos entre outras proteínas e Actina-F a partir de estruturas depositadas no *PDB*.

Discussão

5 DISCUSSÃO

A Gal-1 é uma molécula multifuncional que participa de vários aspectos da fisiologia muscular, incluindo a regeneração, reparo, diferenciação celular e modulação de processos inflamatórios associados ao músculo (AHMED; DU; VASTA, 2009; BENATAR et al., 2015; CERRI et al., 2008b; DIAS-BARUFFI et al., 2010b; WATT; JONES; GOLDRING, 2002)

Dados da literatura sugerem que a Gal-1 pode exercer um novo papel na biologia do músculo, associado ao processo de contração da musculatura esquelética ou cardíaca (SEROPIAN et al., 2013). Entretanto, ainda não se conhece os aspectos biológicos, biofísicos e moleculares desta nova proposta funcional para Gal-1. O presente trabalho demonstrou que esta glectina endógena, interage diretamente com Actina-F, promovendo o favorecimento da polimerização e/ou formação de retículos desta proteína muscular.

Actina sarcomérica e Gal-1 são duas das proteínas mais abundantes das células eucarióticas, e participam de vários processos celulares dependentes de interações proteína-proteína e proteína-carboidrato, respectivamente (DIAS-BARUFFI et al., 2010b; DOMINGUEZ; HOLMES, 2011; STOWELL et al., 2010).

Nosso grupo de pesquisa tem investigado a participação da Gal-1 em vários processos fisiológicos e patológicos, incluindo os relacionados ao tecido muscular (CERRI et al., 2020, 2008b; DIAS-BARUFFI et al., 2010b). Curiosamente, um desses estudos descreveu a possibilidade de um contato direto entre Gal-1 e actina sarcomérica, demonstrado por ensaios de co-localização de Gal-1 com actina sarcomérica nas bandas I e linha Z do sarcômero, não interagindo com a proteína motora miosina. Estes achados sugerem que esta lectina endógena pode desempenhar funções importantes na contratilidade de miócitos (DIAS-BARUFFI et al., 2010).

A estratégia de investigação da potencial interação entre a Gal-1 e actina sarcomérica foi multifacetada e composta pelas seguintes abordagens: (i) Estudo experimental envolvendo a detecção da ligação entre Gal-1 e actina sarcomérica (formas F e G) por análise eletroforética, ELISA, teste de viscosidade (ii) ensaios *in silico* de ancoragem e modelagem moleculares, para se determinar as regiões de interação entre estas proteínas e o modelo molecular do complexo. Salienta-se que as preparações de Gal-1, Gal-3 e actina sarcomérica purificadas apresentaram

elevado grau de homogeneidade e se apresentaram funcionais, como descrito por (BARONI et al., 2018; DIAS-BARUFFI et al., 2003; STOWELL et al., 2010). Estes resultados nos permitiram prosseguir nas análises subsequentes. Neste sentido, por meio de análises eletroforéticas em condições nativas; dissociantes e redutoras na presença ou ausência do agente de reação cruzada (EDC), foi demonstrado que Gal-1 não interage com a Actina-G. Diferentemente da Gal-1 recombinante humana, lectinas de tecido cerebral foram capazes de se ligar à Actina-G, proveniente de músculo. Além disso, preparações de Gal-1 de plaquetas foram co-purificadas com Actina-G do citoesqueleto plaquetário, indicando a ligação entre estas duas entidades moleculares (JOUBERT; AVELLANA-ADALID; MORNET, 1992; WOLFENSTEIN-TODEL, 2012). Estes dados, aparentemente contraditórios, podem ser explicados pelas diferentes fontes de Gal-1 e Actina-G, apesar de existir uma alta identidade estrutural entre as actinas citoplasmáticas de diferentes tipos celulares.

Um estudo recente mostrou o papel terapêutico de Gal-1 recombinante humana, relacionado ao reestabelecimento da força muscular e da estabilidade do sarcolema e aumento da micro-vascularização em músculos distróficos de camundongos da linha *mdx*. (WUEBBLES et al., 2019).

Por outro lado, por meio de ensaio imunoenzimático, foi possível demonstrar que Gal-1 interage com Actina-F imobilizada e em condições nativas. Além disso, a presença de lactose ou sacarose não interferiu na interação entre esta galectina endógena e a Actina-F. Este resultado sugere que possivelmente a ligação entre estas moléculas ocorra por meio de uma interação do tipo proteína-proteína, independente da capacidade da Gal-1 de reconhecer carboidratos. Uma possível explicação para o reconhecimento seletivo da Gal-1 recombinante para Actina-F, é que embora intimamente relacionadas, as estruturas da G-actina e da subunidade da actina na F-actina são de fato diferentes (DOMINGUEZ; HOLMES, 2011).

Com o objetivo de fazer uma análise funcional da interação entre Gal-1 e Actina-F, foi realizado o teste de viscosimetria. Neste teste, foi observado que a Gal-1 na concentração de 0.625 μM é capaz de aumentar a viscosidade aparente da solução de Gal-1 + Actina-F. Este resultado pode indicar que ou a Gal-1 aumenta a polimerização da Actina-F, ou então, a Gal-1 pode estar se ligando em diversos filamentos de Actina-F de forma bivalente, formando retículos (BARONI et al., 2018).

Estes achados relacionados à interação da Gal-1 com Actina-F são

coerentes com descrições da literatura (STOWELL et al., 2010; WUEBBLES et al., 2019).

Conforme observado nos resultados dos nossos experimentos, a Gal-1 promove o aumento de polimerização e/ou formação de retículos de Actina-F indicando um potencial papel acessório como observado para íons, pequenas moléculas e um grande grupo de proteínas denominadas como proteínas ligadoras de actina (ABP do inglês 'actin-binding proteins') cujos papéis e efeitos tem sido relacionados à modulação das conformações funcionais seja pelos efeitos regulatórios originados por estas proteínas como também como por efeitos alostéricos relacionados à ligação à actina (DOMINGUEZ; HOLMES, 2011; HARRIS et al., 2020). Estes efeitos alostéricos das APBs se dão pelas ligações em diversas porções da actina como também em porções comuns por diferentes proteínas (tem figuras no holmes e diversos trabalhos que mostram as estruturas). Interessantemente, tem sido proposto que mudanças conformacionais nos filamentos de actina induzidos por exatão mecânica podem modificar a ligação e a ação regulatória de APBs (JÉGOU; ROMET-LEMONNE, 2021).

Em conformidade com os resultados experimentais descritos neste trabalho buscamos por modelos de interação da Gal-1 com a Actina-F de forma a aumentar a resolução sobre o conhecimento e modelo previamente proposto no trabalho do grupo (STOWELL et al., 2010) e também como forma a refinar os modelos previamente propostos (DIAS-BARUFFI et al., 2010).

Os modelos dos complexos entre a Gal-1 e Actina-F construídos *in silico* empregando a abordagem de ancoragem molecular dão suporte às nossas premissas e achados experimentais presentes. Neles observamos potenciais ligações estáveis de Gal-1 em regiões de interface entre monômeros da Actina-F em porções que se ligam diversas APBs, com afinidade da ordem de outras proteínas que interagem nestas porções, (vide Tabela 3). Como exemplo mais recente foi mostrado a partir da determinação estrutural que a pequena proteína *Lifect* interage com a Actina-F em um sítio hidrofóbico que estende por duas subunidades de actina adjacentes, estabilizando o *D-loop* (do inglês '*DNase I-binding loop*') da actina em uma conformação fechada (BELYY et al., 2020). Observamos também interações na porção monomérica da extremidade desfiada da Actina-F com uma menor afinidade, mas que também é uma região de ligação de outras APBs. Estes resultados sugerem

a ligação da Gal-1 num potencial complexo com Actina-F na região adjacente entre subunidades, o que corrobora nossos achados experimentais.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

A Gal-1 liga-se, de modo independente de sua atividade lectínica, a extremidades e interfaces das subunidades de Actina-F purificada de músculos de coelhos, favorecendo a formação de retículos e/ou a polimerização da actina sarcomérica.

A Gal-1 pode participar do mecanismo de contração muscular por meio de uma interação direta com a Actina-F.

Referências

7 REFERÊNCIAS

- AHMED, H.; DU, S.; VASTA, G. R. Knockdown of a galectin-1-like protein in zebrafish (*Danio rerio*) causes defects in skeletal muscle development. p. 277–283, 2009.
- ALBERTS, B. **Biologia Molecular da Célula 6^a**. [s.l: s.n.].
- ANDREWS, A. R. et al. Blocking extracellular Galectin-3 in patients with osteoarthritis. **Contemporary clinical trials communications**, v. 17, p. 100500, mar. 2020.
- ARTHUR, C. M. et al. Galectins. In: STOWELL, S. R.; CUMMINGS, R. D. (Eds.). . **Galectins Methods and Protocols**. [s.l.] Humana Press, 2015. v. 1207p. 1–35.
- BACIGALUPO, M. L.; CARABIAS, P.; TRONCOSO, M. F. Contribution of galectin-1, a glycan-binding protein, to gastrointestinal tumor progression. **World journal of gastroenterology**, v. 23, n. 29, p. 5266–5281, ago. 2017.
- BARONDES, S. H. et al. Galectins: A family of animal ??-galactoside-binding lectins. **Cell**, v. 76, n. 4, p. 597–598, 1994.
- BARONI, L. et al. Functional characterisation of the actin-depolymerising factor from the apicomplexan *Neospora caninum* (NcADF). **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 224, n. May, p. 26–36, 2018.
- BELYY, A. et al. Structure of the Lifeact–F-actin complex. **PLOS Biology**, v. 18, n. 11, p. e3000925, nov. 2020.
- BENATAR, A. F. et al. Galectin-1 Prevents Infection and Damage Induced by *Trypanosoma cruzi* on Cardiac Cells. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. 1–23, 2015.
- BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, jan. 2000.
- BLAKE, D. J. et al. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. **Physiological reviews**, v. 82, n. 2, p. 291–329, abr. 2002.
- BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). **Science (New York, N.Y.)**, v. 119, n. 3091, p. 419, mar. 1954.
- BRINCHMANN, M. F.; PATEL, D. M.; IVERSEN, M. H. The Role of Galectins as Modulators of Metabolism and Inflammation. **Mediators of inflammation**, v. 2018, p. 9186940, 2018.
- BUSHBY, K. et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. **The Lancet. Neurology**, v. 9, n. 1, p. 77–93, jan. 2010.
- CAMBY, I. et al. **Galectin-1: A small protein with major functions** *Glycobiology*, 2006.
- CERRI, D. et al. **Endogenous Galectin-3 is Required for Skeletal Muscle Repair**. [s.l: s.n.].

- CERRI, D. G. et al. Degeneration of dystrophic or injured skeletal muscles induces high expression of Galectin-1. v. 18, n. 11, p. 842–850, 2008a.
- CERRI, D. G. et al. Degeneration of dystrophic or injured skeletal muscles induces high expression of Galectin-1. **Glycobiology**, v. 18, n. 11, p. 842–850, 2008b.
- CHAN, J. et al. Galectin-1 induces skeletal muscle differentiation in human fetal mesenchymal stem cells and increases muscle regeneration. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 24, n. 8, p. 1879—1891, 2006.
- CHEN, J.; THOMPSON, L. D. .; SNOW, L. . Muscle Structure and Function. In: **Orthopaedic Physical Therapy Secrets**. 3. ed. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 1–9.
- CHIARIOTTI, L. et al. Galectin genes: Regulation of expression. **Glycoconjugate Journal**, v. 19, n. 7–9, p. 441–449, 2002.
- CHO, M.; CUMMINGS, R. D. **Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. II. Localization and biosynthesis.** **The Journal of biological chemistry**, 1995.
- CHO, M.; CUMMINGS, R. D. Characterization of monomeric forms of galectin-1 generated by site- directed mutagenesis. **Biochemistry**, v. 35, n. 40, p. 13081–13088, 1996.
- COOPER, D. N. W. Galectinomics: Finding themes in complexity. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1572, n. 2–3, p. 209–231, 2002.
- CUMMINGS, R. D.; LIU, F.-T. Galectins. In: **Essentials of Glycobiology**. 2. ed. [s.l.] Cold Spring Harbor, 2008.
- DESTA, I. T. et al. Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking. **Structure**, v. 28, n. 9, p. 1071- 1081.e3, 2020.
- DIAS-BARUFFI, M. et al. Dimeric Galectin-1 Induces Surface Exposure of Phosphatidylserine and Phagocytic Recognition of Leukocytes without Inducing Apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 42, p. 41282–41293, 2003.
- DIAS-BARUFFI, M. et al. Differential expression of immunomodulatory galectin-1 in peripheral leukocytes and adult tissues and its cytosolic organization in striated muscle. **Glycobiology**, 2010a.
- DIAS-BARUFFI, M. et al. Differential expression of immunomodulatory galectin-1 in peripheral leukocytes and adult tissues and its cytosolic organization in striated muscle. v. 20, n. 5, p. 507–520, 2010b.
- DOMINGUEZ, R.; HOLMES, K. C. Actin Structure and Function. **Annual Review of Biophysics**, v. 40, n. 1, p. 169–186, maio 2011.
- DUMIC, J.; DABELIC, S.; FLÖGEL, M. Galectin-3: an open-ended story. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1760, n. 4, p. 616–635, abr. 2006.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.
- EMERY, A. E. H. The muscular dystrophies. **Lancet (London, England)**, v. 359, n. 9307, p. 687–695, fev. 2002.

- GEORGIADIS, V. et al. Lack of galectin-1 results in defects in myoblast fusion and muscle regeneration. **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 236, n. 4, p. 1014–1024, abr. 2007.
- GU, M. et al. Selective modulation of the interaction of alpha 7 beta 1 integrin with fibronectin and laminin by L-14 lectin during skeletal muscle differentiation. **Journal of cell science**, v. 107 (Pt 1), p. 175–181, jan. 1994.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Contraction of Skeletal Muscle. In: GUYTON, A. C.; HALL, J. E. (Eds.). . **Medical Physiology**. 11. ed. Philadelphia: Elsevier Inc., 2006. p. 72–84.
- HARRIS, A. R. et al. Biased localization of actin binding proteins by actin filament conformation. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 5973, 2020.
- HARTMAN, M. A.; JAMES, A. The myosin superfamily at a glance. 2011.
- HIRABAYASHI, J.; KASAI, K. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. **Glycobiology**, v. 3, n. 4, p. 297–304, 1993.
- HONG, M.-H. et al. Intracellular galectins control cellular responses commensurate with cell surface carbohydrate composition. **Glycobiology**, v. 30, n. 1, p. 49–57, dez. 2019.
- JÉGOU, A.; ROMET-LEMONNE, G. Mechanically tuning actin filaments to modulate the action of actin-binding proteins. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 68, p. 72–80, 2021.
- JIANG, Z. et al. Galectin-1 gene silencing inhibits the activation and proliferation but induces the apoptosis of hepatic stellate cells from mice with liver fibrosis. **Int J Mol Med**, v. 43, n. 1, p. 103–116, 2019.
- JIN, Y. et al. Complete Characterization of Cardiac Myosin Heavy Chain (223 kDa) Enabled by Size-Exclusion Chromatography and Middledown Mass Spectrometry. v. 89, n. 9, p. 4922–4930, 2018.
- JOUBERT, R.; AVELLANA-ADALID, V.; MORNET, S. Human Brain Lectin : A Soluble Lectin That Binds Actin. p. 200–203, 1992.
- KAMI, K.; SENBA, E. Galectin-1 is a novel factor that regulates myotube growth in regenerating skeletal muscles. **Current drug targets**, v. 6, n. 4, p. 395–405, jun. 2005.
- KANG, H. et al. Regulation of Actin by Ion-Linked Equilibria. **Biophysical Journal**, v. 105, n. 12, p. 2621–2628, 2013.
- KIM, H. et al. Expression and immunohistochemical localization of galectin-3 in various mouse tissues. **Cell Biology International**, v. 31, n. 7, p. 655–662, 2007.
- KOZAKOV, D. et al. The ClusPro web server for protein-protein docking. **Nature Protocols**, v. 12, n. 2, p. 255–278, 2017.
- KRAEMER, W. .; SPIERING, B. A. Skeletal Muscle Physiology: Plasticity and Responses to Exercise. In: M.B. RANKE, T.; V. POPOVIĆ-BRKIĆ, B. (Eds.). . **Skeletal Muscle as a Response Target: The Link between Growth and**

Metabolism. 9. ed. Basel: Karger, 2006. p. 2–16.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993.

LEWIS, S. F.; HALLER, R. G. Skeletal Muscle Disorders and Associated Factors That Limit Exercise Performance. **Exercise and Sports Sciences Reviews**, v. 17, n. 1, p. 67–114, 1989.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. **Chemical reviews**, v. 98, n. 2, p. 637–674, abr. 1998.

MARTONOSI, A.; GOUVEA, M. A.; GERGELY, J. Studies on Actin: III. G-F TRANSFORMATION OF ACTIN AND MUSCULAR CONTRACTION (EXPERIMENTS IN VIVO). **Journal of Biological Chemistry**, v. 235, n. 6, p. 1707–1710, 1960.

MENDEZ-HUERGO, S. P. et al. Clinical Relevance of Galectin-1 and Galectin-3 in Rheumatoid Arthritis Patients: Differential Regulation and Correlation With Disease Activity. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 3057, 2019.

MENSE, S. Functional Anatomy of Muscle: Muscle, Nociceptors and Afferent Fibers. In: MENSE, S.; GERWIN, R. D. (Eds.). . **Muscle Pain: Understanding the Mechanisms**. Berlin: Springer, 2010. p. 19–21.

NARITA, A.; ODA, T.; MAÉDA, Y. Structural basis for the slow dynamics of the actin filament pointed end. **EMBO Journal**, v. 30, n. 7, p. 1230–1237, 2011.

NESMELOVA, I. V et al. Lactose binding to galectin-1 modulates structural dynamics, increases conformational entropy, and occurs with apparent negative cooperativity. **Journal of molecular biology**, v. 397, n. 5, p. 1209–1230, abr. 2010.

ODA, Y. et al. Human breast carcinoma cDNA encoding a galactoside-binding lectin homologous to mouse Mac-2 antigen. **Gene**, v. 99, n. 2, p. 279–283, mar. 1991.

PANDEY, R. K.; BHATT, T. K.; PRAJAPATI, V. K. Novel Immunoinformatics Approaches to Design Multi-epitope Subunit Vaccine for Malaria by Investigating Anopheles Salivary Protein. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1125, 2018.

PARDEE, J. D.; ASPUDICH, J. Purification of muscle actin. **Methods in Enzimology**, v. 85, p. 164–181, 1982.

PERRIN, B. J.; ERVASTI, J. M. The Actin Gene Family : Function Follows Isoform. v. 634, n. August, p. 630–634, 2010.

PORTO, C. . **Semiologia Médica**. [s.l.] Guanabara Koogan, 2005.

QUEROL CANO, L. et al. Intracellular Galectin-9 Controls Dendritic Cell Function by Maintaining Plasma Membrane Rigidity. **iScience**, v. 22, p. 240–255, dez. 2019.

RANCOURT, A. et al. Galectin-3 and N -acetylglucosamine promote myogenesis and improve skeletal muscle function in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. **The FASEB Journal**, v. 32, p. fj.201701151RRR, 12 jun. 2018.

RAZ, A. et al. Molecular cloning and chromosomal mapping of a human galactoside-binding protein. **Cancer research**, v. 51, n. 8, p. 2173–2178, abr. 1991.

- RODRIGUES, L. C. et al. Galectin-1 modulation of neutrophil reactive oxygen species production depends on the cell activation state. **Molecular Immunology**, v. 116, p. 80–89, 2019.
- SEROPIAN, I. M. et al. Galectin-1 controls cardiac inflammation and ventricular remodeling during acute myocardial infarction. **The American journal of pathology**, v. 182, n. 1, p. 29–40, jan. 2013.
- SHIH, T.-C. et al. Galectin-1 inhibition induces cell apoptosis through dual suppression of CXCR4 and Ras pathways in human malignant peripheral nerve sheath tumors. **Neuro-oncology**, v. 21, n. 11, p. 1389–1400, nov. 2019.
- SNOW, L. A. **MUSCLE STRUCTURE AND FUNCTION**. 3. ed. [s.l.] Elsevier Inc., [s.d.].
- STOWELL, S. R. et al. Human galectin-1 recognition of poly-N-acetyllactosamine and chimeric polysaccharides. **Glycobiology**, v. 14, n. 2, p. 157–167, 2004.
- STOWELL, S. R. et al. Innate immune lectins kill bacteria expressing blood group antigen. **Nature Medicine**, v. 16, n. 3, p. 295–301, 2010.
- STOWELL, S. R. et al. Differential Roles of Galectin-1 and Galectin-3 in Regulating Leukocyte Viability and Cytokine Secretion. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 5, p. 3091–3102, 2014.
- SWEENEY, H. L.; HAMMERS, D. W. Muscle Contraction. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 10, n. 2, 2018.
- TSAI, M.-S. et al. Galectin-1 Restricts Vascular Smooth Muscle Cell Motility Via Modulating Adhesion Force and Focal Adhesion Dynamics. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 11497, 2018.
- VALACH, J. et al. Smooth muscle actin-expressing stromal fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma: Increased expression of galectin-1 and induction of poor prognosis factors. **International Journal of Cancer**, v. 131, n. 11, p. 2499–2508, 2012.
- VAN RY, P. M. et al. Galectin-1 Protein Therapy Prevents Pathology and Improves Muscle Function in the mdx Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. **Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 23, n. 8, p. 1285–1297, ago. 2015.
- VERGETAKI, A. et al. Galectin-1 Overexpression in Endometriosis and Its Regulation by Neuropeptides (CRH, UCN) Indicating Its Important Role in Reproduction and Inflammation. **PLOS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–17, 2014.
- WANG, W.-H. et al. The role of galectins in virus infection - A systemic literature review. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 53, n. 6, p. 925–935, 2020.
- WATT, D. J.; JONES, G. E.; GOLDRING, K. The involvement of galectin-1 in skeletal muscle determination, differentiation and regeneration. **Glycoconjugate Journal**, v. 19, n. 7–9, p. 615–619, 2002.
- WOLFENSTEIN-TODEL, L. Y. C. Isolation of Galectin-1 from Human Platelets : Its Interaction with Actin. p. 8–14, 2012.

WUEBBLES, R. D. et al. Human Galectin-1 Improves Sarcolemma Stability and Muscle Vascularization in the mdx Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. **Molecular Therapy: Methods & Clinical Development**, v. 13, n. June, p. 145–153, 2019.

XUE, L. C. et al. PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein–protein complexes. **Bioinformatics**, v. 32, n. 23, p. 3676–3678, 2016.

YANG, L.-T. et al. Long-term effects: Galectin-1 and specific immunotherapy for allergic responses in the intestine. **Allergy**, v. 73, n. 1, p. 106–114, jan. 2018.

ZAK, R. et al. Comparison of turnover of several myofibrillar proteins and critical evaluation of double isotope method. **The Journal of biological chemistry**, v. 252, n. 10, p. 3430–3435, maio 1977.