

GENOTIPAGEM DAS MUTAÇÕES DO GENE HUMANO QUE CODIFICA A LECTINA LIGANTE DE MANOSE POR PCR-SSP

Mônica Caldeira Emerick Souza (PIC/Uem), Gabriela Travençolo (PIC/Uem), Cristiane Maria Colli (Docente/DBS/UEM), Jeane Eliete Laguilha Visentainer (Orientador), e-mail: jelvisentainer@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/
Departamento de Ciências Básicas e da Saúde/Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento conforme tabela do [CNPq/CAPES](#)
20000006 CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
21100004 IMUNOLOGIA

Palavras-chave: genotipagem, lectina manose ligante, pcr-ssp.

Resumo:

Este trabalho objetivou a padronização de uma metodologia molecular rápida, simples e confiável para a genotipagem das mutações conhecidas no éxon 1 do gene humano, localizado no cromossomo 10, que codifica a lectina ligante de manose (MBL). Polimorfismos no éxon 1 e na região promotora do gene *MBL-2* tem mostrado um importante efeito nos níveis de proteína circulante. A PCR-SSP foi padronizada utilizando DNAs controles com genótipos conhecidos fornecidos pela Universidade Federal do Paraná e DNAs controles internos do laboratório de Imunogenética da UEM. Ajustes na concentração de $MgCl_2$ e na temperatura de anelamento foram necessários para obtenção de reações sensíveis e específicas. Desta forma, foi possível a padronização da técnica de PCR-SSP para os códons 52, 54 e 57.

Introdução

A lectina ligante de manose (MBL) é uma lectina sérica, secretada pelo fígado e representa a proteína central da ativação da via das lectinas do sistema complemento, que compreende um conjunto de mais de 30 proteínas séricas e de membrana que interagem entre si de maneira altamente regulada, constituindo um importante mecanismo efetor da imunidade inata. A deficiência de qualquer componente proteico pode levar a padrões anormais de ativação do sistema (ABBAS, 2015).

O gene humano que codifica o produto proteico MBL é chamado de *MBL-2* e compreende 4 éxons e 3 íntrons, e está localizado no cromossomo 10 (q11.2-q21). Polimorfismos no éxon 1 e na região promotora deste gene têm um importante efeito nos níveis de proteína circulante, os quais foram identificados como uma das causas das imunodeficiências em humanos

(JENSENIUS et al. 2005). Estes polimorfismos resultam em defeitos na polimerização da molécula levando à deficiência funcional e de expressão da proteína (TURNER et al. 2003). As mutações estruturais do éxon 1 do gene compreendem trocas de bases nos códons 54, 57 e 52 e são denominadas de variantes *B* (GGC por GAC, substituindo glicina por ácido aspártico), *C* (GGA por GAA, substituindo glicina por ácido glutâmico) e *D* (CGT por TGT, substituindo cisteína por arginina), respectivamente. O alelo normal selvagem é chamado de *A* (CARVALHO et al. 2007). O objetivo deste trabalho foi padronizar e aperfeiçoar uma metodologia molecular rápida, simples e confiável, PCR-SSP (*Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer*), para genotipagem das mutações conhecidas no éxon 1 no gene *MBL-2*.

Materiais e métodos

Amostras

Foram utilizadas como padrões de reação amostras de DNA com genotipagem previamente conhecidas que foram cedidas pela Profa. Dra. Iara J. Messias-Reason, do Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Patologia Médica (Universidade Federal do Paraná) e DNAs controles do laboratório de imunogenética da UEM.

Padronização da PCR-SSP

As primeiras reações de PCR-SSP foram realizadas de acordo com o proposto por STEFFENSEN *et al.* (2000) em um volume final de 10 µL, contendo tampão 1X (200 mM Tris-HCL pH 8,4, 500 mM KCL), 0,2 mM de dNTP, 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, USA), 1,1 mM de MgCl₂, 2 ng/µL dos iniciadores específicos e dos iniciadores que amplificam o gene do crescimento (HGH), usado como controle interno da reação e 50-100 nmol de DNA. As condições de ciclagem iniciais foram: 10 min 95°C seguidos de 30 ciclos com 20 seg a 94°C, 20 seg a 62°C, e 30 seg a 72°C, e uma extensão final de 5 min a 72°C.

Foram realizadas reações de PCR-SSP para identificação das mutações nos códons 52 (mix 1 - variante D e mix 2, ABC), 54 (mix 3 - variante B e mix 4, ACD) e 57 (mix 5 - variante C e mix 6, ABD).

Resultados e Discussão

Após resultados inespecíficos e/ou ausência de sensibilidade, fez-se necessário realizar algumas adaptações como alterações na temperatura de anelamento e/ou na concentração de MgCl₂ e/ou da enzima *Taq* polimerase. Devido a adaptações no laboratório, a enzima *Taq* polimerase da marca Invitrogen foi substituída pela enzima da marca Promega, exceto para o mix 5 cuja reação de PCR-SSP só foi possível com a enzima *Taq* platinum (Invitrogen). Foram realizadas várias reações de PCR-SSP até serem encontradas as condições ideais para genotipagem. A concentração de

MgCl₂ foi de 0,8 mM para os mixes 1, 2 e 3, 1,5 mM para o mix 4, 0,5mM para o mix 5 e 1,0mM para o mix 6. A concentração de *Taq* polimerase manteve-se conforme proposto por STEFFENSEN *et al.* (2000), exceto para o mix 5, no qual também foi necessária adaptação em relação a concentração, sendo padronizado 0,8U. A temperatura de anelamento foi padronizada como 65°C para todos os mixes. A Figura 1 mostra o resultado da padronização das reações de PCR-SSP dos mixes de 1 a 6.

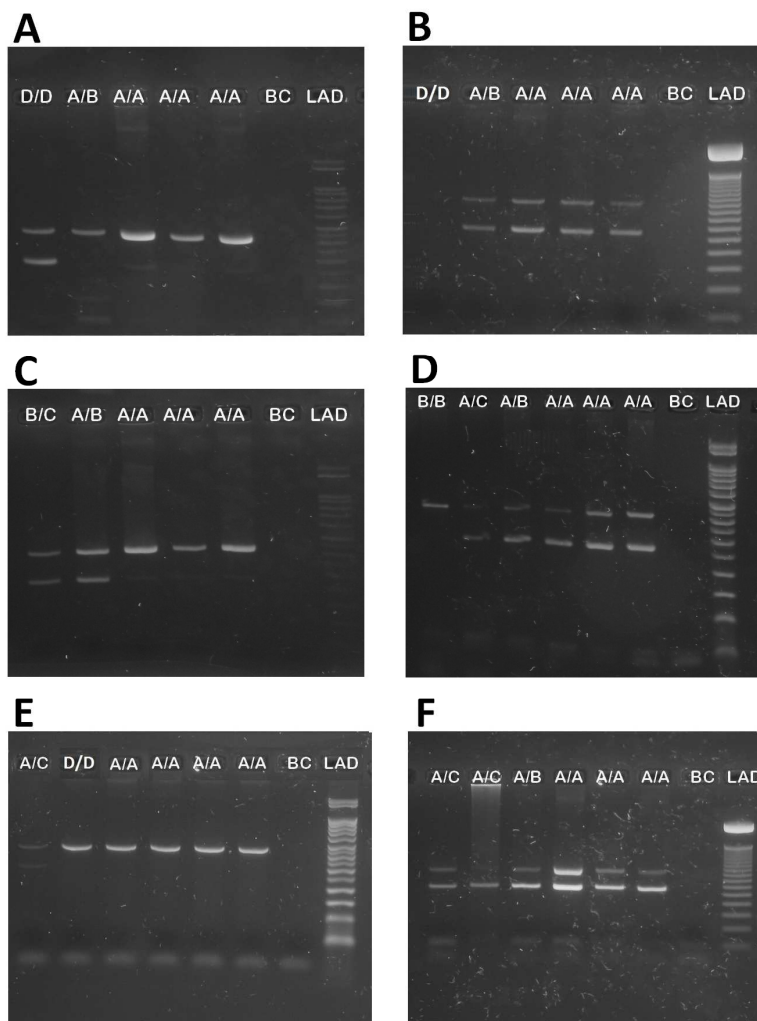


FIGURA 1: PCR-SSP para a genotipagem do éxon 1 do gene humano que codifica a proteína MBL, códons 52, 54 e 57

Gel de agarose 2%, corante SYBR Green, corrida de 15 minutos a 150V

A: MIX 1 (D); B: MIX 2 (ABC); C: MIX 3 (B); D: MIX 4 (ACD); E: MIX 5 (C); F: MIX 6 (ABD).

BC: amostra do branco (todos os reagentes, exceto DNA)

LAD (ladder): marcador de peso molecular de 50 pares de base (pb)

HGH: hormônio de crescimento humano = controle interno de reação 431 pb

Amplicons: 268-290pb

Conclusões

Foram realizadas as padronizações das reações de PCR-SSP para genotipagem dos polimorfismos encontrados no éxon 1 do gene *MBL-2*.

Agradecimentos

Agradecemos à Profa. Dra. Iara J. Messias-Reason, do Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Patologia Médica (Universidade Federal do Paraná) por nos ceder amostras controles de DNA.

Referências

STEFFENSEN R.; THIEL S.; VARMING K.; JERSILD C.; JENSENIUS J.C. **Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers.** J Immunol Methods. 2000; 241(1-2):33-42.

ABBAS A. K., LICHTMAN A.H. & PILLAI S. **Imunologia Celular e Molecular.** 8th ed. Rio de Janeiro:Elsevier, 2015.

JENSENIUS J.C. **The mannan-binding lectin (MBL) pathway of complement activation: biochemistry, biology and clinical implications.** Adv Exp Med Biol 2005; 564:21–2.

TURNER M.W. **The role of mannose-binding lectin in health and disease.** Mol Immunol 2003; 40:423-429.

CARVALHO E.G.; UTIYAMA S.R.R.; KOTZE L.M.S.; MESSIAS-REASON I.T. **Mannan-binding lectin (MBL): biological characteristics and diseases association.** Rev. Bras. Alerg. Immunopatol. 2007; 30: 187-193.