



ANÁLISE PROTEÔMICA “*IN SILICO*” DA ALDEÍDO DESIDROGENASE DE CANA-DE-AÇÚCAR

*Dyoni Matias de Oliveira*¹, *Flavio Augusto Vicente Seixas*², *Aline Finger-Teixeira*³,
*Hugo Bruno Correa Molinari*⁴, *Wanderley Dantas dos Santos*²

RESUMO: Aldeídos são moléculas orgânicas altamente reativas produzidas em muitas vias metabólicas. Na via dos fenilpropenoides, responsável pela biossíntese da lignina em plantas, o coniferaldeído é oxidado a ácido ferúlico, um componente-chave na constituição da parede celular. Este passo metabólico é realizado por enzimas da família aldeído desidrogenase (ALDH). O objetivo deste trabalho foi determinar a estrutura da ALDH de cana-de-açúcar pelo método de modelagem por homologia, a fim de compreender sua estrutura química e obter embasamento teórico para a prospecção de inibidores químicos. Estes inibidores serão usados *in vivo* para reduzir o conteúdo de ácido ferúlico na parede celular a fim de se obter uma lignocelulose mais acessível às enzimas hidrolíticas, visando a produção de etanol celulósico. A seqüência do gene que codifica a proteína alvo foi obtida na base de dados do projeto SUCEST, traduzida para seqüência de aminoácidos e analisada por meio de ferramentas de bioinformática. A estrutura 3D da enzima ligada ao co-fator e ao inibidor foi obtida por meio de modelagem por homologia utilizando o software Modeller tendo a estrutura 3D da ALDH humana como molde. Os resultados mostraram que a seqüência da ALDH de cana-de-açúcar possui 61% de identidade com a ALDH humana e um peptídeo de trânsito para a mitocôndria, atuando assim nesta organela. Já a estrutura 3D da ALDH de cana-de-açúcar ligada ao inibidor, evidenciou as características estruturais e eletrostáticas do sítio ativo, permitindo a busca de inibidores específicos por meio de outras ferramentas de bioinformática como a varredura e “*docagen*” virtuais.

PALAVRAS-CHAVE: CALDH, fenilpropenoides, modelagem molecular.

INTRODUÇÃO

A lignina está associada à celulose na parede celular, e tem por função conferir rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais. A biomassa lignocelulósica, constitui uma fonte promissora para produção de etanol e outros biocombustíveis. A síntese de lignina e ácidos hidroxicinâmicos envolve três aldeídos, coniferaldeído, sinapil aldeído e o *p*-cumaril aldeído como intermediários.

¹ Acadêmico do Curso de Ciências Biológicas na Universidade Estadual de Maringá, Maringá – Paraná.
dyoni_matias@yahoo.com.br

² Docentes da Universidade Estadual de Maringá, Maringá - Paraná. Fundação Araucária

³ Pós-doutoranda na Universidade Estadual de Maringá, Maringá – Paraná. MCT/CNPq/FINEP

⁴ Pesquisador da Embrapa Agroenergia – Brasília – Distrito Federal.

A produção de aldeídos ocorre em diversos processos metabólicos podendo ser sintetizados a partir de fontes endógenas (metabolismo de aminoácidos, carboidratos, lipídios e vitaminas) ou gerados a partir de fontes exógenas (estresse abiótico). Uma forma de controlar os níveis de aldeídos intracelulares, que podem apresentar características tóxicas, é promover sua oxidação aos respectivos ácidos carboxílicos. Para isto, as células contam com a ação de um conjunto de isozimas denominadas aldeído desidrogenases (ALDHs). As aldeído desidrogenases (ALDH; aldeído:NAD(P)⁺ oxirredutase, EC 1.2.1.3) representam uma superfamília protéica com estruturas primárias similares e que exercem atividades catalíticas oxidando irreversivelmente moléculas de aldeídos e reduzindo NAD(P)⁺. Desta forma, estas enzimas auxiliam no processo de detoxificação celular (Yoshida *et al.*, 1998; Kirch *et al.*, 2001). A especificidade das ALDHs por seus substratos é baseada na variabilidade estrutural destas enzimas, as quais podem atuar na oxidação de uma ampla série de aldeídos alifáticos e aromáticos (Yoshida *et al.*, 1998).

A determinação da estrutura das ALDHs pode auxiliar no estudo de muitas outras enzimas importantes em diversas vias metabólicas, como por exemplo, a coniferaldeído desidrogenase que oxida o coniferaldeído a ácido ferúlico, um importante componente estrutural da parede celular vegetal. A estrutura de proteínas pode ser modelada em 3D através por homologia com outras enzimas de estrutura já identificada. Este é um método rápido de resolução de estruturas, e depende apenas de tempo de processamento em computador. Além disso, dispensa rotinas de laboratório como purificação, concentração, cristalização ou difração de raios-X, conseqüentemente reduzindo a utilização de produtos químicos, o que torna a metodologia econômica e ambientalmente amigável.

O objetivo deste trabalho foi determinar a estrutura da ALDH de cana-de-açúcar ligada a um inibidor e ao co-fator NAD(P)⁺, pelo método de modelagem por homologia, a fim de compreender sua estrutura química e obter embasamento teórico para a prospecção de possíveis inibidores químicos da atividade de enzimas desta família.

MATERIAL E MÉTODOS

Análise da sequência

A sequência do gene que codifica a proteína alvo foi obtida na base de dados do projeto SUCEST e traduzida na sequência de aminoácidos por meio da ferramenta de bioinformática Translate (Gasteiger *et al.*, 2003). Em seguida, a sequência foi confirmada por BLAST contra as sequências da base de dados Uniprot e também por meio da verificação de motivos estruturais por meio da ferramenta InterPro Scan (Hunter *et al.*, 2009).

Modelagem por homologia

A estrutura terciária da ALDH de cana-de-açúcar foi gerada pelo método de modelagem por homologia utilizando o software Modeller versão 9.9 (Eswar *et al.*, 2006). Para isso, a escolha do molde foi realizada por meio de um BLAST contra as sequências de estruturas 3D depositadas no Protein Data Bank (PDB). Ao todo foram gerados 1000 modelos e o melhor, escolhido com base no gráfico de Ramachandran.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado do BLAST da ALDH de cana-de-açúcar contra as proteínas contidas na base de dados Uniprot, mostrou que a sequência analisada tem alta identidade com a família 2 das aldeído desidrogenases de diversas espécies incluindo as ALDH2 mitocondriais bovina e humana, as quais já possuem estruturas cristalográficas determinadas e depositadas no Protein Data Bank. Isso possibilitou a utilização destas

enzimas como molde na determinação da estrutura tridimensional da ALDH por homologia. A análise do alinhamento entre as ALDHs humana, bovina e de cana-de-açúcar, mostrou que o sítio ativo e o de ligação de Na^+ são conservados. Além disso, as ALDH2 humana e bovina possuem sítio de ligação de NAD^+ , enquanto que a de cana possui sítio de ligação de NADP^+ .

Para confirmar estes resultados, foram consultados outros servidores de identificação de famílias como o **InterPro Scan** (Hunter *et al.*, 2009), um servidor que varre diferentes bases de dados sobre famílias de proteínas, incluindo o *Superfamily* (Figura 1).

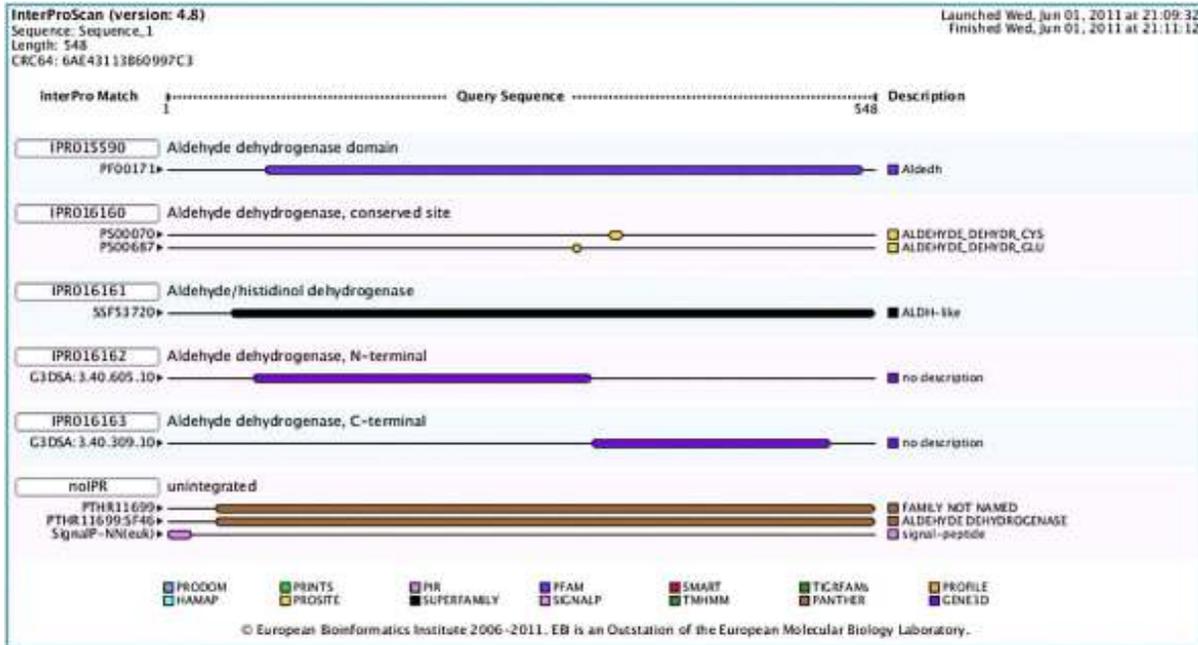


Figura 01 – Resultado do servidor *InterProScan*, na busca comparativa da seqüência da ALDH com os bancos de dados de motivos e famílias protéicas.

Os resultados confirmam que a proteína pertence à família 2 das aldeído desidrogenases e que a região inicial da sequência (resíduos 1 a 20) pertence a um peptídeo de sinalização para direcionamento a mitocôndria. Além disso, a ALDH de cana-de-açúcar possui um mecanismo catalítico envolvendo cisteína e glutamato de seu sítio ativo.

O refinamento da estrutura 3D da ALDH de cana-de-açúcar (Figura 2a) foi verificado com base no gráfico de Ramachandran (Figura 2b).

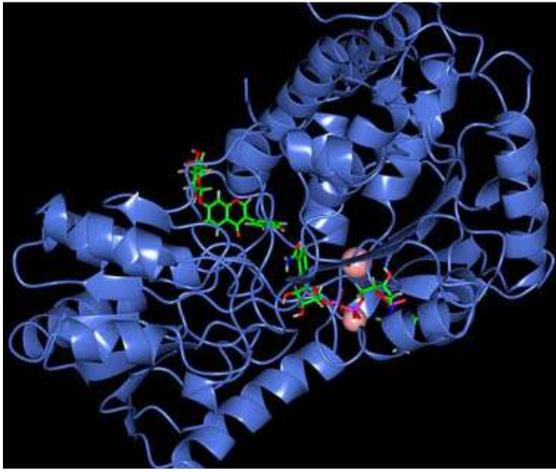


Figura 2a – Estrutura terciária modelada da ALDH de cana-de-açúcar (*ribbons*) mostrando todos os seus ligantes em verde.

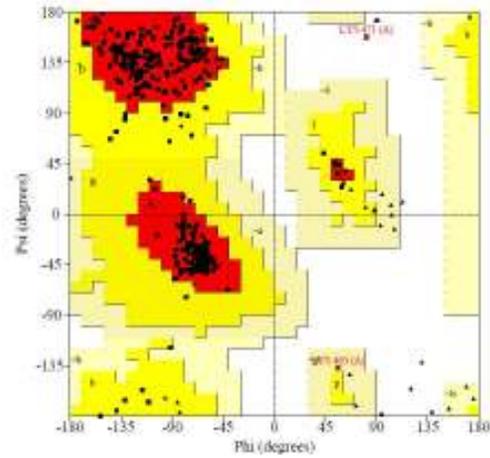


Figura 2b – Gráfico de Ramachandran mostrando que o modelo final tem mais de 99% dos resíduos em regiões permitidas.

A figura 3 mostra um típico inibidor de ALDH (daidzin) preso ao sítio ativo da enzima. Este procedimento serviu para destacar o sítio no processo de modelagem e evidenciar seu volume, conformação espacial e potencial eletrostático.

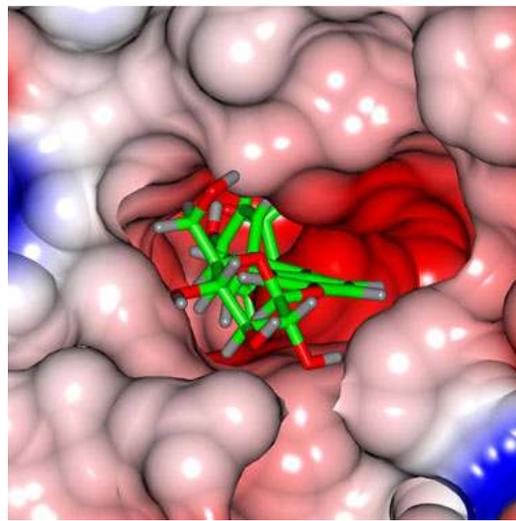
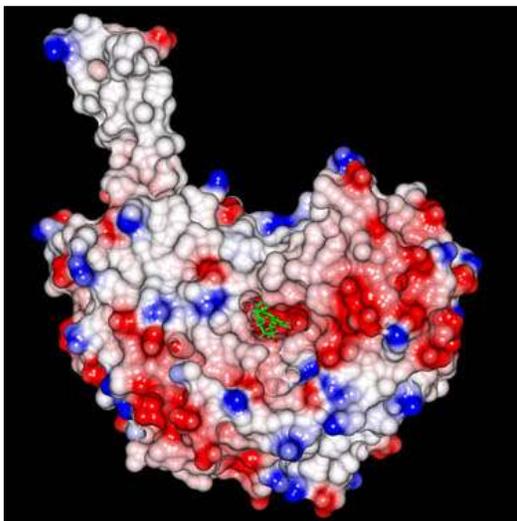


Figura 3 – Sítio ativo da CALDH colorido por potencial eletrostático, mostrando o inibidor Daidzin ligado.

A análise do sítio ativo da enzima por meio da superfície colorida por potencial eletrostático evidenciou que este é altamente polar devido a presença de grupos como OH e O⁻. Este resultado sugere que potenciais inibidores de ALDHs devem ser polares (solúveis) e conter elementos que possam interagir por meio de ligação de H ou pontes salinas com os grupos do sítio ativo.

CONCLUSÃO

As análises de bioinformática indicaram que a ALDH de cana-de-açúcar possui alta identidade com as ALDHs de outros organismos e um sítio catalítico bastante definido e conservado, além da presença de um peptídeo de sinalização que sugere sua atuação na mitocôndria. A estrutura terciária da enzima forneceu informações sobre o seu mecanismo

catalítico e sobre como devem ser os possíveis inibidores destas enzimas que poderão ser utilizados em testes *in vitro* e *in vivo* para a geração de biomassa vegetal mais facilmente degradável e fermentável.

REFERÊNCIAS

ESWAR, N., WEBB, B., MARTI-RENOM, M. A., MADHUSUDHAN, M. S., ERAMIAN, D., SHEN, M., PIEPER, U., SALI, A. (2006) Comparative protein structure modeling using Modeller, **Curr Protoc Bioinformatics**, Chapter 5, Unit 5 6.

GASTEIGER, E., GATTIKER, A., HOOGLAND, C., IVANYI, I., APPEL, R. D., BAIROCH, A. (2003) ExpASY: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, **Nucleic Acids Res**, 31, 3784-3788.

HUNTER, S., APWEILER, R., ATTWOOD, T. K., BAIROCH, A., BATEMAN, A., BINNS, D., BORK, P., DAS, U., DAUGHERTY, L., DUQUENNE, L., FINN, R. D., GOUGH, J., HAFT, D., HULO, N., KAHN, D., KELLY, E., LAUGRAUD, A., LETUNIC, I., LONSDALE, D., LOPEZ, R., MADERA, M., MASLEN, J., MCANULLA, C., MCDOWALL, J., MISTRY, J., MITCHELL, A., MULDER, N., NATALE, D., ORENGO, C., QUINN, A. F., SELENGUT, J.D., SIGRIST, C. J., THIMMA, M., THOMAS, P. D., VALENTIN, F., WILSON, D., WU, C. H., YEATS, C. (2009) InterPro: the integrative protein signature database, **Nucleic Acids Res**, 37, D211-215.

KIRCH, H. H., NAIR, A., BARTELS, D. (2001). Novel ABA-dehydration-inducible aldehyde dehydrogenase genes isolated from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* and *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal** 28: 555-567.

YOSHIDA, A., RZHETSKY, A., HSU, L.C., CHANG, C (1998). Human aldehyde dehydrogenase gene family. **European Journal of Biochemistry**, 251:549-557.