

De 23 a 26 de abril



## VIII Seminário de Iniciação Científica do IFNMG VI Prospectar I Seminário do ProfEPT

### A UTILIZAÇÃO DE FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA NO ESTUDO COMPARATIVO DE ENZIMAS DO METABOLISMO PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO EM *Helianthus annuus*

Luiz Antônio Teixeira Neto<sup>1</sup>; Darling de Andrade Lourenço<sup>2</sup>; Thalia Batista da Silva<sup>1</sup>; Wêudson Alves Mendes<sup>1</sup>; Altino Branco Choupina<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Acadêmicos da Licenciatura em Ciências Biológicas do IFNMG – Salinas; <sup>2</sup> Acadêmica do Bacharelado em Biotecnologia da UFPel; <sup>3</sup> Pesquisador do CIMO – *Mountain Research Center* e docente no *Department of Biology and Biotechnology, Agricultural College, Polytechnic Institute of Bragança* – Portugal.

#### Introdução

A bioinformática é um campo multidisciplinar que permite a obtenção, processamento, análise e apresentação de informações biológicas utilizando ferramentas de informática especializadas (ARAÚJO *et al.*, 2008). Algumas destas ferramentas nos permitem realizar a interpretação de sequências biológicas de modo a identificar elementos funcionais do genoma e seus respectivos produtos e implicações. Utilizando esses dados torna-se possível realizar ensaios de inibição enzimática, estudos preliminares para o desenvolvimento de fármacos, bem como fornecer respaldo para o diagnóstico de doenças (ESPINDOLA *et al.*, 2010).

*Helianthus annuus*, conhecida popularmente como girassol, é uma espécie reconhecida pela sua inflorescência característica, do tipo capítulo, e pelo crescimento orientado denominado heliotropismo. O girassol é uma oleaginosa cuja semente é rica em ácidos graxos poli-insaturados, que conferem à espécie uma considerável importância nutricional para a alimentação humana e consequente importância agrícola e econômica (SILVA *et al.*, 2007).

No presente trabalho, foram utilizadas algumas das ferramentas de bioinformática para a realização de um estudo comparativo do grau de homologia entre enzimas que catalisam reações do metabolismo primário (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase – RuBisCO) e secundário (Enoil-ACP redutase – ENR) em *H. annuus*. O objetivo do presente estudo foi demonstrar a aplicação e a importância das ferramentas de bioinformática na geração e interpretação de informações relevantes sobre as proteínas mencionadas.

#### Metodologia

Para a obtenção das sequências das enzimas, utilizou-se duas bases de dados biológicos: National Center for Biotechnology Information – NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e UniProt (<https://www.uniprot.org/>).

As sequências foram então utilizadas para a realização das etapas subsequentes listadas a seguir:

I – Análise das características físico-químicas das proteínas utilizando a aplicação ExpASY ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>).

II – Estudo de genômica comparativa, em que as proteínas de *H. annuus* foram comparadas com as de *Helianthus tuberosus*, *Glycine max*, *Magnolia grandiflora*, *Arabidopsis thaliana*, *Euglena gracilis* e *Zea mays*. Para tanto, foram realizados alinhamentos múltiplos utilizando a ferramenta Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

De 23 a 26 de abril



## VIII Seminário de Iniciação Científica do IFNMG VI Prospectar I Seminário do ProfEPT

III – Alinhamento utilizando a ferramenta BLAST, que compara e alinha as sequências inseridas com todas as sequências de proteínas depositadas nas bases de dados. Foram utilizadas as seguintes ferramentas: FASTA, da EMBL-EBI, e BLASTX, SmartBLAST e ProteinBLAST (blastp) da NCBI-NIH. Cabe destacar que essas ferramentas, apesar de realizarem o mesmo processo, executam algoritmos diferentes, o que diferencia a sua sensibilidade.

IV – Análise da estrutura tridimensional dessas enzimas, tendo como base os resultados de ensaios de modelagem por homologia gerados pela aplicação RaptorX Structure Prediction (<http://raptorx.uchicago.edu/StructurePrediction/predict/>). Foi também utilizado o *software* PyMOL (<https://pymol.org/2/>) para visualização e alinhamento das estruturas modeladas.

### Resultados e Discussão

A RuBisCO é uma enzima-chave para a eficiência fotossintética, uma vez que regula o balanço metabólico entre fotossíntese e fotorrespiração (SEVINDIK, 2017).

Nas características físico-químicas dessa enzima, foram observadas pequenas diferenças entre a RuBisCO de *H. annuus* e dos demais organismos, mesmo aqueles filogeneticamente mais distantes, como *E. gracilis*. Não foram observadas discrepâncias significativas no número total de resíduos, assim como no número de resíduos carregados (que afetam o pKa e o pI). A amplitude de variação no pI se encontra dentro de um intervalo de 0,46 graus na escala de pH. O valor do pI é importante porque determina, por exemplo, o intervalo de pH ótimo para a atividade catalítica da enzima.

Os resultados do alinhamento múltiplo demonstraram uma alta similaridade entre as sequências, apresentando apenas alguns *mismatches* e *gaps* no final da cadeia de proteínas maiores, como as de *Helianthus spp*, originados por inserções ao longo da história evolutiva da proteína.

A modelagem por homologia da RuBisCO revelou que a enzima apresenta estrutura tridimensional quase idêntica em todos os organismos, apresentando apenas algumas torções pontuais em cadeias laterais. Esse alto grau de homologia entre a enzima de diferentes organismos pode ser discutido como consequência de uma conservação estrutural ao longo do processo evolutivo. Esse tipo de mecanismo atua com a finalidade de impedir a perda da função de uma enzima, quando esta tem papel fundamental no metabolismo central de uma espécie ou grupo de organismos. Muitas proteínas, no entanto, sofrem modificações profundas em sua estrutura primária, sem, no entanto, perder ou modificar a sua função inicial. No caso da RuBisCO foram observadas mutações em pequeno número, observadas principalmente nos extremos da cadeia de resíduos, fator que não comprometeu a sua função.

De modo geral, os resultados da corrida do BLAST sobre essa proteína demonstraram que a enzima é altamente conservada, com um grau de homologia entre 98,80 e 100,00% dentro do mesmo gênero, e de 96,49 a 99,38% dentro da mesma família. As ferramentas da NCBI-NIH utilizadas apresentaram graus de sensibilidade distintos na análise comparativa dessa proteína.

Já a enzima ENR, embora tenha apresentado resultados bastante similares na análise físico-química, divergiu em relação ao alinhamento e à estrutura 3D. Essa enzima, que é dependente de NADH, catalisa a reação de conversão de acil-ACP  $\alpha$ - $\beta$ -insaturado em acil-ACP, através da redução da ligação dupla entre C2 e C3, e por esse motivo é amplamente estudada em bactérias, sendo um alvo potencial para testes farmacológicos contra a tuberculose (GONZALEZ-THUILLIER *et al.*, 2014). Apesar de também pertencer ao metabolismo primário, sua atuação também dá origem a ácidos graxos que são substrato para a produção de inúmeros metabólitos secundários na via do

De 23 a 26 de abril



## VIII Seminário de Iniciação Científica do IFNMG VI Prospectar I Seminário do ProfEPT

acetato. Desse modo, pode-se considerar que a enzima participa de uma via que pertence tanto ao metabolismo primário, quanto ao metabolismo secundário.

Os resultados da análise físico-química da enzima não revelaram grandes diferenças a nível de estrutura química, exceto no caso de *E. coli*, cujo tamanho da sequência e pI apresentaram diferenças significativas. O alinhamento múltiplo evidenciou um alto número de *mismatches* e *gaps* ao longo de toda a sequência, considerando todos os organismos analisados, demonstrando que a enzima é pouco conservada a nível de estrutura primária. E, por último, as estruturas modeladas e alinhadas de *H. annuus*, *H. sapiens* e *E. coli* também revelaram inúmeras diferenças na organização tridimensional dos resíduos de aminoácidos. Essas diferenças foram observadas até mesmo na região onde possivelmente se localiza o centro ativo dessa enzima, demonstrando que a catálise ocorre de maneira distinta nos organismos avaliados.

Com base nesses resultados, pode-se perceber uma diferença considerável no grau de conservação das duas enzimas, o que pode estar diretamente relacionado com as reações químicas catalisadas por essas biomoléculas. Enquanto a primeira, a RuBisCO, tem estrutura e função bastante conservadas, a segunda, a ENR, se apresenta com maior diversidade química e estrutural.

### Considerações Finais

A partir dos resultados apresentados, é possível inferir que as ferramentas de bioinformática disponíveis fornecem dados relevantes para a compreensão da evolução molecular de espécies vegetais, disponibilizando dados estruturais e funcionais, que servem de ponto de partida para a realização de estudos experimentais que efetivamente produzam o resultado esperado.

Atualmente, com o crescimento exponencial da bioinformática é possível verificar a existência de diversas ferramentas para a análise de dados, cuja sensibilidade e aplicação são diferenciadas, dando ao pesquisador a possibilidade de selecionar a aplicação que mais se aplica às suas necessidades. Há muitas ferramentas livres, que não têm custo e que podem ser executadas em qualquer plataforma ou até mesmo através do navegador, oferecendo recursos para a realização de pesquisa científica com facilidade e eficiência.

Em relação à espécie estudada, foi possível compreender melhor as relações filogenéticas com representantes de outros táxons, através do estudo comparativo de uma enzima altamente conservada, que executa um papel indispensável na sobrevivência da espécie e na fixação de carbono em todos os vegetais, e de outra pouco conservada, que atua de maneira distinta em diferentes grupos taxonômicos.

### Referências

- ARAÚJO, N. D. de *et al.* **A Era da Bioinformática: Seu Potencial e suas Aplicações para as Ciências da Saúde.** Estudos de Biologia, [S.l.], v. 30, n. 70/72, nov. 2008. ISSN 1980-590X. Disponível em: <<https://periodicos.pucpr.br/index.php/estudosdebiologia/article/view/22819/21922>>. Acesso em: 08 fev. 2019.
- ESPINDOLA, F. S. *et al.* **Recursos de Bioinformática Aplicados às Ciências Ômicas como Genômica, Transcriptômica, Proteômica, Interatômica e Metabolômica.** Uberlândia, v. 26, n. 3, p. 463-477, 2010.
- GONZALEZ-THUILLIER, I. *et al.* **Sunflower (*Helianthus annuus*) fatty acid synthase complex: enoyl-[acyl carrier protein]-reductase genes.** Planta. 241. 10.1007/s00425-014-2162-7 (2014).
- SEVINDIK, E. **Amino Acids Sequence Based in Silico Analysis of RuBisCO (Ribulose-1,5 Bisphosphate Carboxylase Oxygenase) Proteins in Some *Carthamus L. ssp.*** Notulae Scientia Biologicae. 9. 204. 10.15835/nsb9210053. 2017.
- SILVA, M. de L. O. e *et al.* **Crescimento e produtividade do girassol cultivado na entressafra com diferentes lâminas de água.** Rev. bras. eng. agríc. ambient., Campina Grande, v. 11, n. 5, p. 482-488, Oct. 2007.