

Modelagem molecular da enzima pectina liase B do fungo *Aspergillus fumigatus* por homologia estrutural

Marcelo SANTOS (1); Letícia BARBOSA (2); Iven VALE (3)

(1) IFMA, Avenida Getúlio Vargas, Monte Castelo, São Luís-MA, e-mail:

marcelokasssyo@gmail.com

(2) IFMA, Avenida Getúlio Vargas, Monte Castelo, São Luís-MA, e-mail:

xletxax@hotmail.com

(3) IFMA, Avenida Getúlio Vargas, Monte Castelo, São Luís-MA, e-mail:

iven.neylla@gmail.com

RESUMO

Entender o funcionamento de todas as enzimas do complexo pectinolítico do fungo *Aspergillus fumigatus* é compreender como funciona os processos de biodegradação e patogenicidade do mesmo. Em virtude disso, o presente estudo tem como objetivo construir a estrutura tridimensional da enzima pectina liase B do *A. fumigatus* utilizando ferramentas computacionais disponíveis na rede mundial de computadores. Assim, a pesquisa experimental desenvolveu-se em quatro etapas fundamentais. Na primeira obteve-se o molde 1QCX (*Aspergillus niger*) pela busca em bancos de dados. Na segunda etapa promoveu-se o alinhamento através do BLAST entre a proteína-alvo e a proteína-molde respeitando parâmetros como similaridade e homologia. Na terceira construiu-se a enzima utilizando o software de modelagem MODELLER e, por último, na quarta etapa, avaliou-se o modelo construído pelos programas de validação PROCHECK E VERIFY3D. Após esse *pipeline* computacional obteve-se um modelo em 3D confiável da enzima atestado pelos resultados de validação fortemente positivos. Portanto, as predições *in silico* se tornaram eficientes ferramentas para o entendimento da funcionalidade da enzima pectina liase B do fungo *A. fumigatus*.

Palavras-chave: *Aspergillus*, pectina liase B, bioinformática, modelagem molecular, homologia.

1 INTRODUÇÃO

Pectinases, ou enzimas pectinolíticas, são produzidas por um grande número de bactérias, leveduras e fungos, insetos, nematódeos e plantas, a fim de degradar (para obter fonte de carbono) ou para modificar (fruto em amadurecimento) o heteropolissacarídeo pectina (WHITAKER, 1991).

Fungos do gênero *Aspergillus* apresentam um variado complexo de enzimas pectinolíticas essenciais para manter a sua estabilidade no ambiente (VRIES et al., 2002).

Os fungos *Aspergillus fumigatus* são sapróbios de distribuição universal, filamentosos e produzem esporos encontrados na atmosfera durante todas as estações do ano (VRIES et al., 2002).

Com isso, torna-se relevante conhecer a estrutura tridimensional (3D) da enzima pectina liase B do complexo pectinolítico do fungo *A. fumigatus* para elucidar com mais acurácia suas prováveis funções biológicas não esclarecidas ainda.

A estrutura de uma proteína pode, em teoria, ser obtida por três métodos, através da utilização de modelos experimentais de informação, normalmente a partir de cristalografia de raios X ou RMN, por métodos puramente teóricos, ou pela utilização de modelagem por homologia estrutural.

A modelagem por homologia estrutural parte do princípio de que as proteínas são relacionadas evolutivamente e, portanto, compartilham uma estrutura similar. Com isso, o modelo de uma proteína com estrutura desconhecida (alvo) pode ser construído com base em um alinhamento de uma proteína com estrutura conhecida (modelo). Isso geralmente envolve quatro etapas (SÁNCHEZ & SALI, 1997; MARTI-RENOM *et al.*, 2000): (1) identificação dos homólogos que pode ser utilizada como modelo (s) para modelagem; (2) o alinhamento da sequência alvo para o modelo (s); (3) construção de um modelo para o alvo com base nas informações a partir do alinhamento (s) e (4) avaliação do modelo.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi obter um modelo estrutural (construção da estrutura tridimensional) da enzima pectina liase B do fungo *Aspergillus fumigatus* para aumentar o conhecimento sobre o papel biológico da mesma com o uso de softwares e banco de dados disponíveis na rede mundial de computadores.

2 METODOLOGIA

2.1 Ferramentas De Bioinformática Para Modelagem Por Homologia

O presente trabalho utilizou ferramentas de bioinformática disponíveis publicamente na internet para realizar a modelagem por homologia. Sendo assim, temos adiante uma descrição sumarizada do *pipeline* computacional utilizado na pesquisa experimental, bem como, uma tabela no final das descrições das ferramentas informando o endereço virtual das ferramentas utilizadas.

2.1.1 Banco De Dados De Bioinformática

Os números crescentes a respeito dos genes e das proteínas de muitos organismos proporcionaram o surgimento de inúmeros bancos de dados, com a tentativa de organizar e distribuir esses dados.

Dentre os vários bancos de dados existentes, o presente trabalho utilizou o GenBank, UniProt, PDB e o MODBASE para a identificação e seleção de proteínas alvo e molde.

2.1.4 Alinhamentos De Sequência

O alinhamento de sequências é um método de comparação que procura determinar o grau de similaridade entre duas ou mais sequências, ou a similaridade entre fragmentos destas sequências (MUNIZ, 2003).

O valor aceitável de similaridade na modelagem por homologia é acima de 30% da sequência entre proteína-molde e proteína-alvo. (SALI, 1998; D'ALFONSO *et al.*, 2001; VITUKUP *et al.*, 2001).

O “e-value”, parâmetro estimado pelo BLAST, expressa a dificuldade para encontrar uma sequência perfeitamente idêntica, ou seja, quanto menor o valor, menor a chance de tal comparação ter sido encontrada por pura coincidência (GIBAS & JAMBECK, 2001).

Outros dois parâmetros que devemos levar em consideração para a análise do molde são os valores de “score” e de resolução em Ångstron da difração por raio-X.

Na modelagem por homologia os valores significativos de “score” devem estar maiores de 200 para esse programa (SALES, 2006).

2.1.5 Construção Do Modelo

A construção de um modelo tridimensional (alvo) é feito através da utilização de uma estrutura molde gerado depois de um alinhamento consistente. No presente trabalho utilizou-se o software MODELLER para a construção do modelo.

O MODELLER é o programa mais usado na modelagem molecular por homologia de uma estrutura tridimensional de proteínas (MARTI-RENOM *et al.*, 2000). Ele utiliza estruturas-molde, para construir modelos tridimensionais da sequência-alvo, através de um alinhamento (GIBAS & JAMBECK, 2001).

2.1.6 Validação Do Modelo

A validação é uma etapa essencial, a qual pode ser executada em diferentes níveis de organização estrutural.

Os softwares usados no trabalho para avaliação do modelo foram: PROCHECK (LASKOWSKI *et al.*, 1998) e o VERIFY3D (LUTHY *et al.*, 1992).

O PROCHECK é o programa mais utilizado na avaliação dos parâmetros estereoquímicos (LASKOWSKI *et al.*, 1998) e para analisar erros estruturais com o intuito de promover a confiabilidade do modelo atômico (3D) utilizou-se o VERIFY3D (LUTHY *et al.*, 1992).

2.1.7 Endereço Na Internet Das Ferramentas Computacionais Utilizadas

Tabela 1: Endereço na internet das ferramentas computacionais

Nome	Endereço na internet
Banco de dados	
GenBank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank

UniProt	http://www.uniprot.org
PDB	http://www.rcsb.org/pdb
MODBASE	http://modbase.compbio.ucsf.edu/modbase-cgi
Alinhamento de seqüências	
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi
Construção do modelo	
MODELLER	http://salib.org/modeller
Visualização das estruturas	
Pymol	http://pymol.sourceforge.net
Swiss-Pdb Viewer	http://spdbv.vital-it.ch
Validação do Modelo	
PROCHECK	http://www.biochem.ucl.ac.uk/~roman/procheck
VERIFY3D	http://nihserver.mbi.ucla.edu/verify_3D

2.2 Modelagem Estrutural

A primeira etapa da modelagem comparativa foi a identificação de uma proteína de estrutura tridimensional conhecida, relacionada com a pectina liase do fungo *A. fumigatus*. Nessa busca utilizou-se os bancos de dados: Genbank, UniProt, PDB e MODBASE.

A etapa seguinte foi o alinhamento das seqüências utilizando o BLAST para encontrar o molde mais apropriado para a construção do modelo.

A construção do modelo foi realizada com o software MODELLER. Após a construção do mesmo gerado pelo MODELLER foi feita uma avaliação utilizando os programas computacionais: PROCHECK e VERIFY3D. Em seguida, visualizou-se as estruturas por meio dos programas computacionais Pymol e Swiss-PdbViewer.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Banco De Dados

A busca pela proteína molde para a seqüência Q4WGH2 (GenBank) nos banco de dados Genbank, UniProt, PDB e MODBASE revelou como resultado a seqüência 1QCX (GenBank); uma pectina liase B do fungo *Aspergillus niger*. Após encontrado a seqüência 1QCX realizou-se uma modelagem básica, na qual emprega um único molde para a construção da proteína-alvo.

3.2 Alinhamento Das Seqüências

Os dados referentes ao alinhamento indicam que a similaridade (identidade e positividade) entre a proteína-alvo e a proteína-molde ultrapassa 60% revelando uma boa equivalência estrutural entre os resíduos de aminoácidos do molde e modelo como mostra a **figura 1**.

```

>lcl|38413 1QCX:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
Length=359

Score = 474 bits (1220), Expect = 2e-138, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 242/358 (67%), Positives = 285/358 (79%), Gaps = 6/358 (1%)

Query 21  GVQGTAEGFASVTGGGSATLVYPSTTDELVSYLGDSEARVIVLTKTFDFTGTGEGTTTAT 80
Sbjct 2  GV G AEGFA VTGGGSA+ VYP+TTDELVSYLGD+E RVI+L +TFDFTGTGEGT T T 61
      GVVGAAEGFAHGVTTGGGSASPVYPTTDELVSYLGDNEPRVIILDQTFDFTGTGEGTETTT

Query 81  GCAPWGTASGCQVAINKDNWCINYSAPSVSVTYDNAGSLGITVNSNKSLLIGESTSGVI 140
Sbjct 62  GCAPWGTAS CQVAIN +WC NYQ+SAP VSVTYD AG L ITVNSNKS++G+GT GVI 121
      GCAPWGTASQCQVAINLHSWCDNYQASAPKVSVTYDKAGILPITVNSNKSIVGQGTGKVI

Query 141  KGKGLRIVSGAKNIIIQNIAITDINPKYVWGGDAITINQADLVWVDHVTTARIGRQHYVL 200
Sbjct 122  KGKGLR+VSGAKN+IIQNIA+TDINPKYVWGGDAIT++ +DLVW+DHVTTARIGRQH VL 181
      KGKGLRVVSGAKNVIIQNIAVTDINPKYVWGGDAITVDDSDLVWIDHVTTARIGRQHIVL

Query 201  GTEASNRITLSNNYIDGESDYSATCDNHHYWNIVLDGSSDRVTLKGNLYKTSGRAPKVQ 260
Sbjct 182  GT A NR+T+S + IDG SDYSATC+ HHYW +YLDGS+D VTLKGN Y SGR PKVQ 241
      GTSADNRVTISYSLIDGRSDYSATCNGHHYWGVLVLDGSNDMVTLKGNYPNLSGRMPKVQ


Query 261  GNTYLHAVNNYWNDSNHNHAFEIGDGAYVLAEGNLFSDVTAAVESSFTGELFGSASAST 320
Sbjct 242  GNTLLHAVNNLFHNFDFGHAPEIGTGGYVLAEGNVFQDVNVVVE-TPISGQLFSSPDANTN 300

Query 321  --CQSYIGRDCVANSFSSSGTSLSGSNVDVLSKFRGETVASASAAAGTSP---ASSAGQG 373
Sbjct 301  QQCASVFGRSCQLNAFNGSGMSGSDTISIISKFAGRTIAAHPGAIAQWMTKNAGQG 358

```

Figura 1: Alinhamento entre as seqüências

Além dos dados sobre similaridade, os valores de “e-value”, “score” mostraram-se significativos para a utilização do mesmo como molde levando em consideração os parâmetros elencados no item 2.1.4.




PECTIN LYASE B

Chain(s): A

Authors: Vitali, J., Journak, F.

Release Date: 1999-05-19 **Classification:** Lyase

Experiment: X-RAY DIFFRACTION with resolution of 1.70 Å

Compound: 1 Polymer [[Display Full Polymer Details](#) | [Display for All Results](#)]

Alignment: E-Value: 2.37043E-106 Score: 981
[[Display Full Alignment](#) | [Display for All Results](#)]

Citation: The tree-dimensional structure of aspergillus niger pectin lyase B at 1.7-A resolution. (1998) Plant Physiol. 116: 69-80 [[Display Full Abstract](#) | [Display for All Results](#)]

Figura 2: "E-value" e "score" do molde.

3.3 Construção Do Modelo

A utilização do molde 1QCX pelo software MODELLER gerou a estrutura desejada (alvo). O alvo apresentou uma organização estrutural contendo alfa-hélice (cor vermelha), folha beta (cor amarela) e os loops ou alças (cor verde) como demonstrado na figura 4.



figura 3: Alvo gerado pelo MODELLER.

A enzima (alvo) pectina liase B do fungo *Aspergillus fumigatus* foi classificada como $\alpha + \beta$ revelando hélices α e folhas β separadas em partes diferentes da molécula e com ausência da estrutura supersecundária β - α - β (LESK, 2008).

O alvo também apresenta 7 alfa-hélice e 24 folhas-beta como determinantes na sua estrutura.

3.4 Validação Do Modelo

3.4.1 Procheck

Com esse software de avaliação do modelo geramos o gráfico de Ramachandran e o gráfico de propriedades estereoquímicas.

Para ser considerado um bom modelo, o resultado do gráfico de Ramachandran deve apresentar, na região mais favorável (A, B e L), mais de 90% dos resíduos, desconsiderando os resíduos de glicina, prolina e os resíduos das extremidades que apresentam padrões estereoquímicos diferentes dos outros resíduos (LASKOWSKI, et al., 1993).

A **figura 5** demonstra o gráfico de Ramachandran obtido do modelo em que se observa que 85,5% dos resíduos dos aminoácidos estão em regiões mais favoráveis (A, B e L), nas regiões adicionalmente permitidas (a, b, l e p, isto é, região em amarelo escura) foi de 13,9%, nas regiões generosamente permitidas (\sim a, \sim b, \sim l, e \sim p, isto é em amarelo claro) foi de 0,3% e nas regiões desfavoráveis (região em branco) foi de 0,3%. Esses parâmetros indicam que o modelo é confiável, pois os parâmetros obtidos estão próximos do ideal.

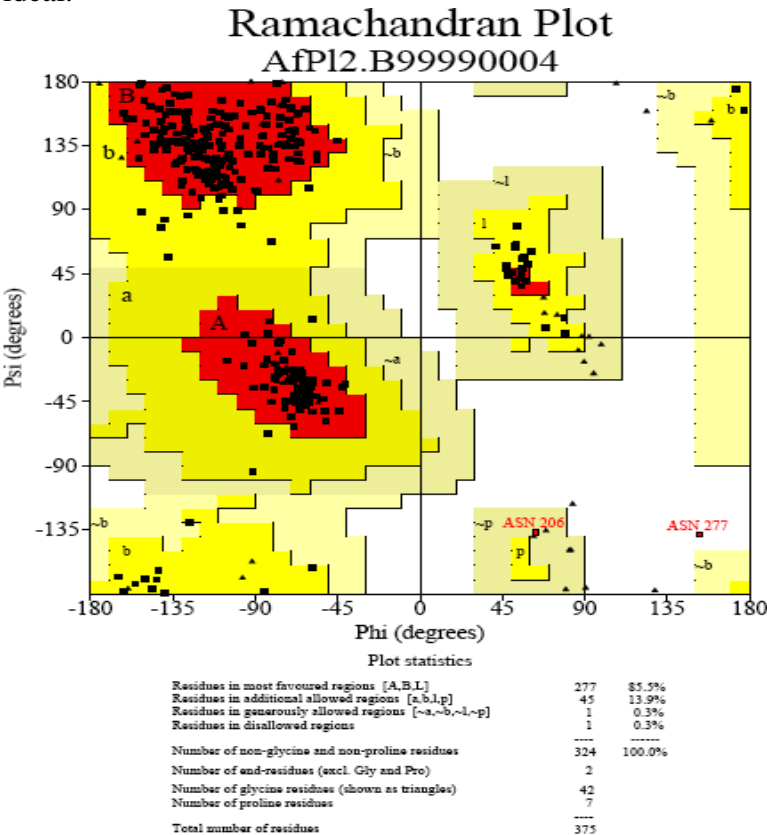


figura 4: Gráfico de Ramachandran do alvo.

Nas propriedades estereoquímicas da cadeia principal, que são verificadas pelo PROCHECK são cinco: (a) Avaliação do gráfico de Ramachandran, (b) Planaridade de ligação peptídica, (c) Maus contatos atômicos, (d) distorção do carbono e (e) Energia das ligações de hidrogênio (LASKOWSKI, et al., 1993).

Observa-se na **figura 6** que a maioria dos parâmetros analisados do alvo para a cadeia principal está dentro da média.

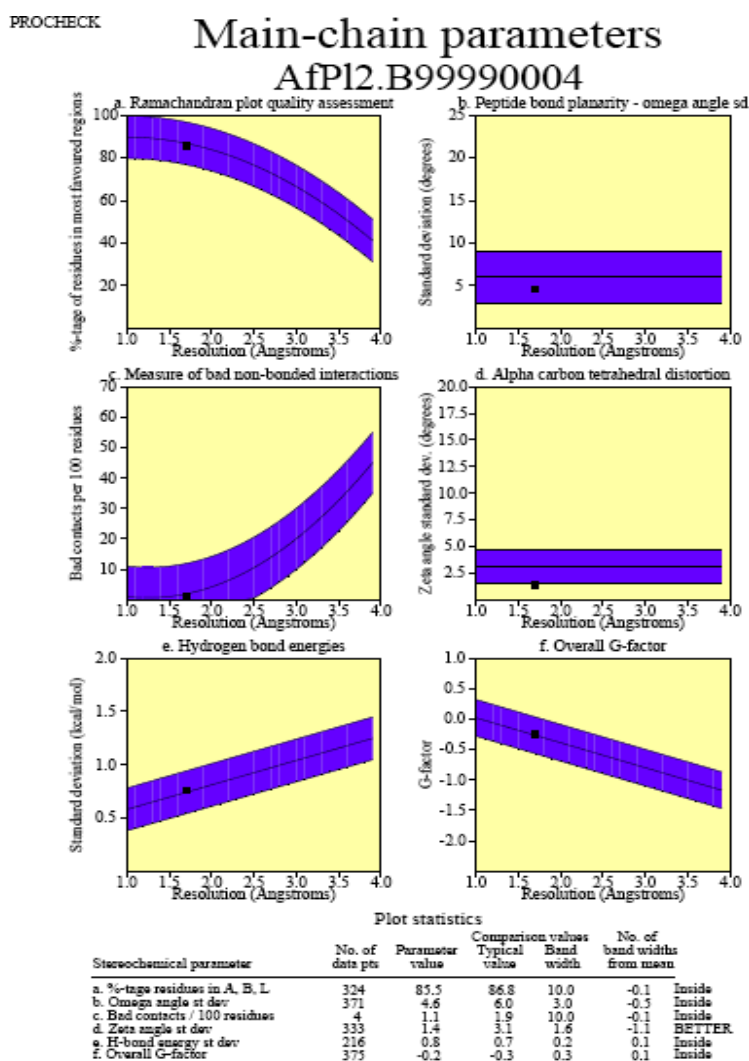


figura 5: Propriedades estereoquímicas do alvo gerados pelo PROCHECK.

3.4.2 Verify3d

Para analisar a confiabilidade do enovelamento do modelo, utilizou-se o VERIFY3D que determina os ambientes químicos de cada resíduo do modelo e atribui “scores” com referência a uma matriz construída a partir de uma análise estatística envolvendo as estruturas protéicas do PDB (BOWIE *et al.*, 1991).

A **figura 7** contém somente o começo do gráfico da proteína, já que o mesmo é muito extenso e somente nessa parte houve problema com o enovelamento. Na figura observa-se também que os valores obtidos estão dentro da faixa aceitável (-0,05 e 0,75) segundo BOWIE *et al.*, 1991.

Number of Residues = 375

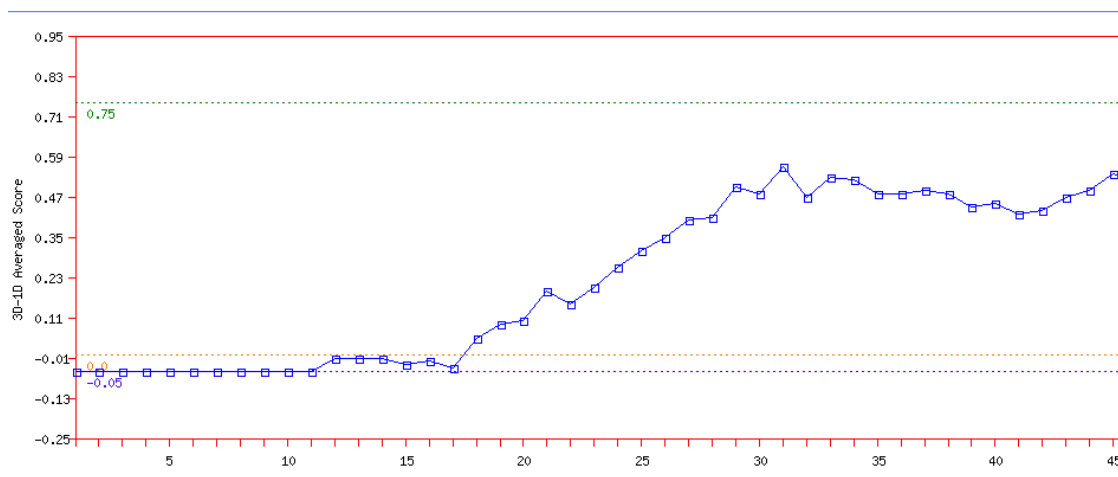


figura 6: Gráfico gerado pelo VERIFY3D.

4 CONCLUSÃO

A modelagem por homologia da enzima pectina liase B do fungo *Aspergillus fumigatus* foi bastante eficiente por meio da modelagem básica empregando como molde a estrutura 1QCX e obtendo como resultado uma estrutura com 85,5% de resíduos em ângulos possíveis, segundo o gráfico de Ramachandran. Pela análise do enovelamento protéico por meio do VERIFY3D, o modelo gerado foi considerado um bom modelo já que os resíduos se encontraram na região considerada como aceitável.

A enzima elucidada por modelagem por homologia representa uma importante contribuição para “desvendar” os pormenores nos processos de biodegradação realizados pelo fungo *Aspergillus fumigatus*.

Nesse contexto, as predições *in silico* são essenciais para o entendimento do funcionamento da enzima, já que a estrutura tridimensional revela como a enzima pode funcionar na presença do substrato.

REFERÊNCIAS

WHITAKER, J. R. **Microbial pectolytic enzymes**. In: Microbial Enzymes and Biotechnology (eds. Fogarty, W. M. and Kelly, C. T.) Appl. Science, London e New York. p. 133-175, 1991.

LESK, A.B. **Introdução à Bioinformática**. (2ª Ed). Porto Alegre: Artmed, 2008.

GIBAS, C.; JAMBECK, P. **Desenvolvendo Bioinformática: ferramentas de software para aplicações em biologia**. Tradução Milarepa Ltda. Rio de Janeiro: Campus, 2001.

FIGUEREDO, Ricardo Tajra De. **Modelagem molecular da endopoligalacturonase 2 do fungo *Botrytis cinérea***. 2009 (Monografia)- Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão, São Luis, 2009