

Proposta de Projeto de Pesquisa para Utilização do servidor DockThor (LNCC)

Informações do Pesquisador

Nome: Marcus Senra

Posição: Pós-Doc

Instituto: Instituto de Recursos Naturais (IRN) – Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI)

Endereço: Av. BPS, 1303, Bairro Pinheirinho, Itajubá – MG CEP 47500-903

Email: msenra@unifei.edu.br

“Identificação e caracterização de novas enzimas para degradação de poluentes ambientais”

Palavras-chaves: Virtual screening, contaminantes ambientais, degradação enzimática, genômica e Biotecnologia ambiental

1. Introdução

A escassez e o risco de racionamento não são os únicos problemas que parte dos brasileiros enfrenta em relação à água. O crescimento das cidades e o consequente adensamento populacional, aliados ao saneamento precário e a novos hábitos de consumo, tem contribuído para lançar nos rios, lagos, depósitos subterrâneos e nos reservatórios destinados ao consumo, inúmeras substâncias, tais como fármacos, drogas ilícitas, cosméticos, inseticidas, herbicidas, antimicrobianos, produtos de higiene pessoal, nanomateriais e metais pesados (Montagner et al., 2017). Muitas destas substâncias, são conhecidas como contaminantes emergentes e ainda não estão incluídos nos programas de monitoramento de rotina (inter)nacionais e seu destino, comportamento e efeitos ecotoxicológicos não são bem compreendidos, podendo assim, representar um risco em potencial para o homem e para o ecossistema (Kuster et al., 2008). Desta forma, é urgente a realização de estudos multidisciplinares para entendimento sobre o comportamento destes compostos no meio ambiente e o desenvolvimento de novas metodologias visando sua remoção, de modo a permitir, antecipar e mitigar seus impactos sobre os ecossistemas (Geissen et al., 2015).

Os ciliados (Ciliophora) constituem um agrupamento monofilético de microeucariotos (Lynn, 2008), heterotróficos em sua maioria (bacterívoros e algívoros) e que compõem o microplâncton e microbentos (Fenchel, 2004), com importante papel no fluxo de carbono e

energia nos mais diversos ecossistemas (Sherr e Sherr, 1994). De fato, muitas espécies de ciliados são comumente encontradas em ambientes lóticos e lênticos oligotrofizados e eutrofizados (Foissner & Berger, 1992), e diversos estudos tem apontado que algumas espécies são, de alguma forma capazes de lidar bem com a presença de contaminantes ambientais, apresentando elevada resistência a esses xenobióticos, sugerindo sua utilização em projetos de biorremediação (Haq & Shakoori, 2000; Muneer et al., 2009; Chaudhry & Shakoori, 2011; Láng & Köhidai, 2012; Liu et al., 2017).

Nesta era pós-genômica, temos experienciado explosivo aumento no tamanho dos bancos de dados públicos de sequências. A exemplo, são mais de 109,414,500 sequências de proteínas depositadas no UniProt (Universal Protein Resource), devido ao desenvolvimento de novas técnicas de sequenciamento (NGS), que levou ao depósito de milhares de genomas e transcriptomas. Consequentemente, estes bancos de sequências têm se tornado uma valiosa fonte de informação biológica em diversas áreas do conhecimento, inclusive para biotecnologia ambiental, tendo sido utilizados para identificação e caracterização de novas enzimas e vias de degradação de xenobióticos (Arora & Bae, 2014). São centenas de enzimas atualmente conhecidas e relacionadas à degradação de contaminantes ambientais, como por exemplo as monooxigenases, dioxigenases, redutases, desaminases e dehalogenases (Arora & Bae, 2014). De fato, grande atenção tem sido dada a oxidases fenólicas (laccases e tirosinases) e peroxidases, pela sua falta de especificidade por substratos, falta de seletividade alostérica e fortes capacidades oxidativas (Ashger et al. 2014). Desta forma, utilizaremos informações contidas em bancos de dados gerais, como GenBank, Kegg, Uniprot, prosite e PFAM e em bancos de dados dedicados, como o UM-BBD, OxDBase, Bionemo, MetaCyc e o BioCyc, para realização de buscas, utilizando ferramentas de bioinformática para identificação de enzimas e vias já conhecidas, mas também, para identificação e caracterização de novas enzimas e vias de degradação de xenobióticos, nos 56 genomas/transcriptomas de ciliados disponíveis no GenBank.

2. OBJETIVOS

Realizar busca e caracterizar genes/proteínas/vias metabólicas de degradação de xenobióticos em genomas e transcriptomas de espécies de ciliados depositadas em banco de dados públicos, por meio de ferramentas de bioinformática (anotação, genômica comparativa, modelagem, dinâmica molecular) e avaliar a capacidade dos modelos teóricos gerados em interagir com inúmeras estruturas de contaminantes ambientais via virtual screening (utilizando o servidor DockThor - LNCC).

3. MÉTODOS

- Construção de banco de dados de sequências de proteínas a partir de genomas e transcriptomas de ciliados e Busca por genes e/ou vias metabólicas de degradação de xenobióticos

No NCBI estão disponíveis 22 genomas e 34 transcriptomas de protistas ciliados. Estes serão baixados, montados e anotados utilizando ferramentas básicas de bioinformática localmente. Os proteomas preditos serão anotados funcionalmente utilizando o KAAS (https://www.genome.jp/kaas-bin/kaas_main). Os genes e/ou vias relacionadas à degradação de xenobióticos serão identificados, baseando-se em informações disponíveis na literatura e principalmente disponíveis em KEGG pathways of xenobiotics biodegradation (www.genome.jp/kegg-bin/get_htext#B12) e em bancos de dados dedicados como: UM-BBD (<http://umbbd.ethz.ch/>), OxDBase (<http://www.imtech.res.in/raghava/oxdbas>), Bionemo (<http://bionemo.bioinfo.cnio.es>), MetaCyc (<http://metacyc.org/>) e o BioCyc (<http://biocyc.org/>), utilizando Blastp (Altschul et al., 1997) e psiblast (Altschul et al., 1997). Genes e vias candidatas serão selecionadas para realização de análises em maior detalhe utilizando CD-search (www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi), Interproscan (Jones et al., 2014) e Hmsearch (<http://hmmer.org/>) (usando banco de dados do PFAM [Finn et al., 2016]), visando profunda caracterização e avaliação do seu potencial uso em projetos de bioremediação.

- Bioinformática estrutural

Utilizaremos métodos estabelecidos para a modelagem das proteínas. Para modelagem comparativa utilizaremos o Modeller (Webb & Sali, 2014) e para threading, o I-Tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) e Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). Para a dinâmica molecular, utilizaremos o Gromacs (Abraham et al., 2015). Para predição de cofatores utilizaremos o Cofactor (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/COFACTOR/>). Já nas análises de “Docking” (virtual screening) entre os modelos das proteínas caracterizadas e contaminantes ambientais, utilizaremos o servidor online DockThor (LNCC).

6. Perspectivas

Tendo em vista a resistência natural a diversos contaminantes ambientais que muitas espécies de ciliados apresentam e as centenas de enzimas e vias metabólicas já descritas de degradação de xenobióticos e disponíveis nos bancos de dados de sequências, esperamos identificar

enzimas/vias já conhecidas e, caracterizar novas enzimas/vias de degradação de xenobiontes. Estas proteínas serão caracterizadas e terão suas estruturas terciárias preditas. Até o momento, já caracterizamos 6 novas tirosinases que serão utilizadas em ensaios de virtual screening contra uma lista de ~1000 estruturas de contaminantes ambientais, incluindo fármacos, drogas ilícitas, tinturas e agrotóxicos para avaliação de possíveis alvos preferências destas novas enzimas, assim como para caracterização de seus sítios ativos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Geissen V, Mol H, Klumpp E, Umlauf G, et al. Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. **International Soil and Water Conservation Research**. 3: (1), 57-65. 2015.
- Montagner CC, Vidal C, Acayaba RD. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: Cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**. 40: (9). 2017.
- Kuster M, de Alda MJ L, Hernando MD, et al. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). **Journal of Hydrology**. 358: (1–2), 112–123. 2008.
- Fenchel T, Finlay BJ. The ubiquity of small species: patterns of local and global diversity. **Bio Science**. 54, 777-784. 2004.
- Sherr EB, Sherr BF. Bacterivory and herbivory: key roles of phagotrophic protists in pelagic food webs. **Microbial Ecology**. 28, 223-235. 1994.
- Foissner W, Aagatha S, Berger H. Soil ciliates (Protozoa, Ciliophora) from Namibia (Southwest Africa), with emphasis on two contrasting environments, the Etosha Region and the Namib Desert. **Denisia**. 5, 1-1459. 2002.
- Haq RU, Shakoori AR (2000). Microorganisms resistant to heavy metals and toxic chemicals as indicators of environmental pollution and their use in bioremediation. **Folia Biologica**. 48, 143-147.
- Muneer B, Rehman A, Shakoori FR, et al. Evaluation of consortia of microorganisms for efficient removal of hexavalent chromium from industrial waste water. **Bulletin Environmental Contaminant Toxicology**. 82, 597-600. 2009.
- Chaudhry R & Shakoori AR. Characterization of copper resistant ciliates: Potential candidates for consortia of organisms used in bioremediation of wastewater. **African Journal of Biotechnology**. 2011.
- Láng J, Kóhidai L. Effects of the aquatic contaminant human pharmaceuticals and their mixtures on the proliferation and migratory responses of the bioindicator freshwater ciliate *Tetrahymena*. **Chemosphere**. 89: (5). 592-601. 2012.
- Liu CB, Qu GB, Cao MX, et al. Distinct toxicological characteristics and mechanisms of Hg⁺² and MeHg in *Tetrahymena* under low concentration exposure. **Aquatic Toxicology**. 193, 152-159. 2017.
- Lynn DH. **The Ciliated protozoa: characterization, classification and guide to the literature**, 3 ed. Springer Press, New York. 2008.
- Arora PK & Bae H. Integration of bioinformatics to biodegradation. **Biological Procedures Online**. 16: (8). 2014.
- Asgher M, Shahid M, Kamal S, et al. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 101, 56-66. 2014.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. 25, 3389–3402. 1997.
- Finn RD, Coghill P, Eberhardt RY, et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future Bateman **Nucleic Acids Research**. 44, D279-D285. 2016.
- Jones P, Binns D, Chang HY, et al. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. **Bioinformatics**, Jan 2014.
- Webb B & Sali A. Comparative protein structure modeling using Modeller. **Current Protocols in Bioinformatics**. 5.6.1-5.6.32. 2014.
- Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **Software X**. 1: (2), 19-25. 2015.

