

## ESTUDO SOBRE A FORMAÇÃO DA ENZIMA MTHFR HUMANA POR HOMOLOGIA

Sérgio de Oliveira Gomes<sup>1</sup>, Thaísa Guedes de Freitas Almeida<sup>1</sup>, Cláudia Sampaio de Andrade Lima<sup>1</sup>, Ricardo Yara<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Biofísica Química - Departamento de Biofísica e Radiobiologia - UFPE; <sup>2</sup>Departamento de Engenharia Biomédica-UFPE  
\*sgomes1904@hotmail.com

### INTRODUÇÃO

Enzimas são substâncias de natureza normalmente proteica, com exceção das ribozimas, grupo de enzimas constituídas de RNA catalítico. Tem a função de catalisar as reações químicas nos sistemas biológicos, podendo ser classificadas em seis grupos - oxido-redutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases - de acordo com a reação que catalisam (ENZIMAS, 2017). As oxido-redutases, responsáveis pela catalise de reações de transferência de elétrons, tem como um dos representantes a Metileno-tetra-hidrofolato Redutase (MTHFR), enzima envolvida na remetilização de homocisteína em metionina (VANNUCCHI; MELO, 2009).

O nucleotídeo 677 no gene MTHFR tem duas possibilidades: C (citosina) ou T (timina). C na posição 677, que conduz a uma alanina no aminoácido 222, é o alelo normal. O alelo 677T, que conduz a uma substituição por uma valina no aminoácido 222, codifica uma enzima termo lábil com atividade reduzida (MARQUI, 2015).

O FAD (flavina-adenina dinucleotídeo), um derivado de riboflavina (vitamina B2) é uma coenzima capaz de sofrer ação redox, e age como cofator para a funcionalidade da enzima MTHFR. O alelo 677T causa um defeito no local de interação com o FAD, gerando uma menor afinidade com o cofator do que o alelo 677C, prejudicado assim a ativação da enzima (CABAÇA, 2014).

O objetivo deste trabalho foi mostrar como foi gerada a estrutura do MTHFR humano a partir do MTHFR do organismo *Thermus thermophilus*, uma vez que não há no PDB (Protein Data Bank - banco de dados de proteína, que se baseia nesses dados para criar ferramentas para a investigação e educação em biologia molecular, estrutural, computacional e além) o MTHFR humano.

### MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi feito *in silico*, através de programas e software computacionais, cada um deles com um objetivo específico. Foi usado o SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) (KIEFER et al., 2009; BIASINI et al., 2014; Arnold et al., 2006), um servidor de modelagem por homologia de estrutura de proteína totalmente automatizado, acessível através do servidor web ExPASy, ou do programa DeepView (Swiss Pdb-Viewer). A finalidade deste servidor é fazer Protein Modeling acessível.

A sequência de aminoácidos foi obtida no banco de dados do NCBI (centro Nacional de Informações de Biotecnologia) e a estrutura utilizada 3APY (IGARI et al., 2011), que é o MTHFR do organismo *Thermus thermophilus*, foi utilizada para fazer a modelagem por homologia porque são estruturas semelhantes e, além disto, foi identificada automaticamente pelo próprio SWISS-MODEL. A estrutura produzida foi feita utilizando uma parte da sequência de aminoácidos da MTHFR humana, encontrada no NCBI em formato FASTA (figura 1) e inserindo ela no SWISS-MODEL para formação da estrutura (figura 2).

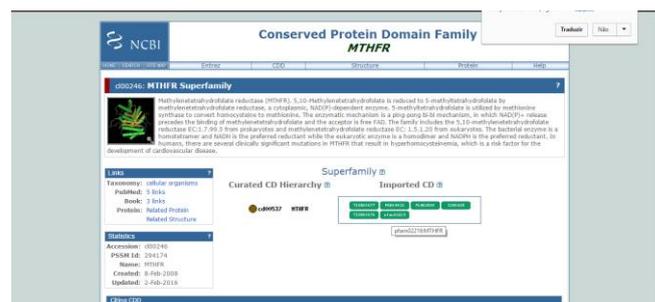


Figura 1. Página de acesso a sequência de aminoácidos que vai ser obtida no formato FASTA.

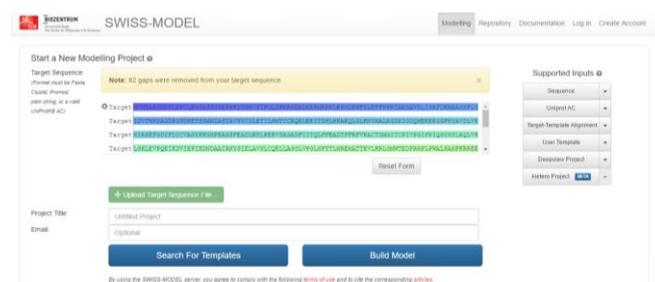


Figura 2. Sequência FASTA inserida no SWISS-MODEL.

Em seguida, com a estrutura molecular 3D da enzima humana pronta, foi testado a sua eficácia, através de informações do SWISS-MODEL da molécula produzida e do Rampage: Ramachandran Plot Analysis (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>).

Ao construir a enzima, não foi visto a molécula do FAD na estrutura, já que ela não é parte da estrutura do MTHFR, mas sim um cofator. Para adicionar o FAD ao modelo, o MTHFR da estrutura cristalográfica 3APY, o qual possui o FAD co-cristalizado em sua estrutura foi alinhado ao modelo e em seguida foi extraído, com o programa PyMol, apenas o modelo e o FAD (excluindo MTHFR do 3APY).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O modelo gerado com a ajuda do SWISS-MODEL se mostrou satisfatório, pois de acordo com resultados projetados pelo programa a identidade de sequência ficou acima dos 25% (38.68%), nível considerado bom para testes em nível teórico, e o local predito de similaridade ao 3APY, enzima comparada, ficou próximo ao nível da enzima original (Figura 3). A figura 4 mostra a interação entre a enzima MTHFR gerada por homologia e o FAD.

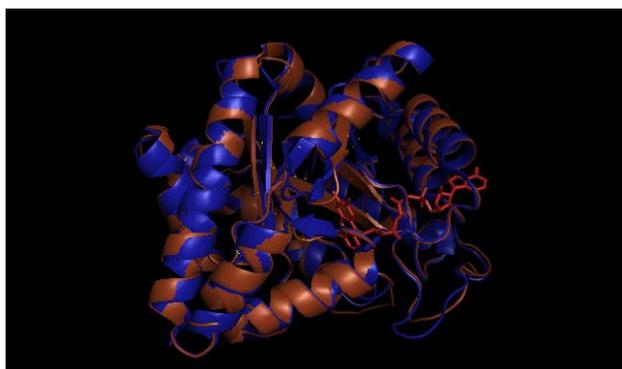


Figura 3. Alinhamento entre a 3APY (azul) e o MTHFR humano testado (marrom) para efetuar a ligação do FAD com a enzima teste.

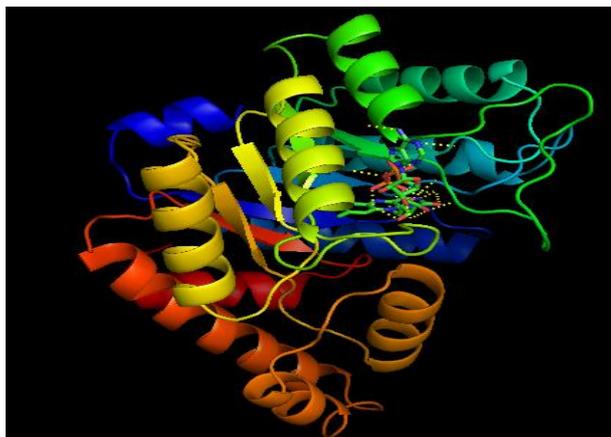


Figura 4. Interação entre a MTHFR gerada e o FAD.

Através de comparação com estruturas PDB, foi possível avaliar o nível de semelhança que a enzima humana gerada por homologia tem com as já conhecidas (figuras 5 e 6) obtidas pelo SWISS-MODEL.

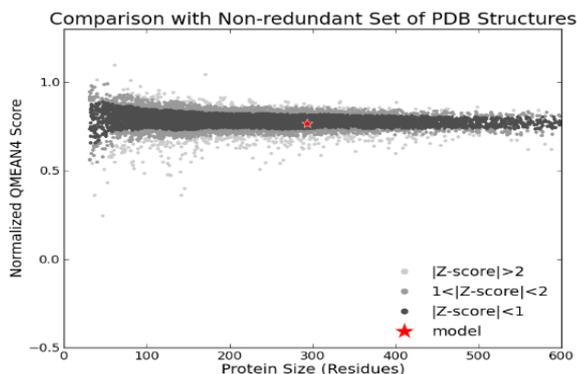


Figura 5. Comparação entre a molécula gerada por homologia (em vermelho) com estruturas pdb (em preto).

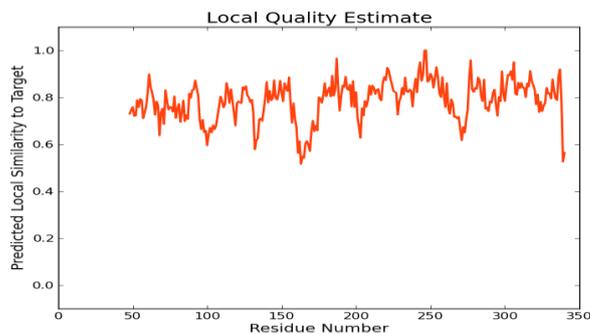


Figura 6. Nível de semelhança da enzima gerada por homologia com a original 3APY.

Além disso, de acordo com os dados apresentados pelo RAMPAGE, o gráfico encontrou 97,6% dos resíduos de aminoácidos em posições estáveis, 1% em regiões permitidas e 1,4% em regiões de isolamento, ou seja, sem contato com nenhum outro resíduo. As regiões onde se encontram os aminoácidos são demonstradas na figura 7. Regiões com cores mais escuras são as com mais estabilidade e de acordo com os dados adquiridos, onde se concentram a maioria dos aminoácidos.

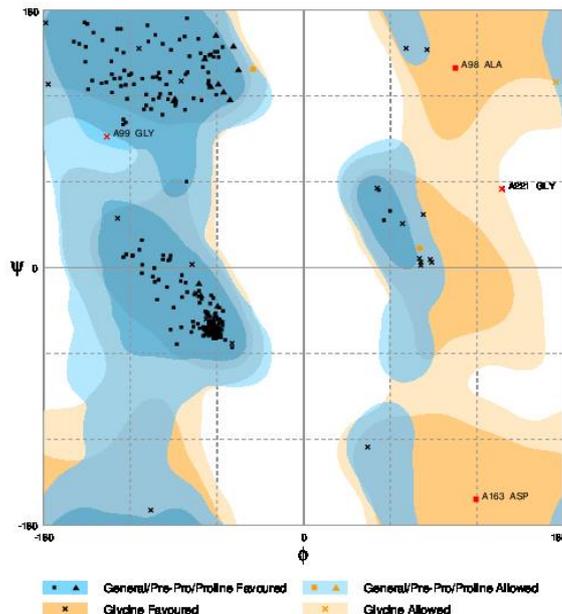


Figura 7. Gráfico Rampage, mostrando a área de concentração dos aminoácidos na enzima testada.

Ainda hoje, para testes que envolvem a manipulação da enzima, o que requer um nível maior de confiabilidade na estabilidade da molécula, são escolhidos outros modelos estruturais, devido ao fato da enzima ser de difícil produção e não ter estabilidade, ao contrário da enzima em outros organismos termofílicos, que são mais estáveis (IGARI et al., 2011).

## CONCLUSÕES

Este trabalho mostrou que, em base teórica, a enzima pode ser obtida em grau satisfatório para auxiliar em outros estudos que visem obter uma visão da interação da enzima MTHFR com moléculas que possam vir a fornecer uma melhor estabilidade a nível estrutural e funcional.

## REFERÊNCIAS

- ENZIMAS. Disponível em: [http://www2.dracena.unesp.br/graduacao/arquivos/bioquimica\\_animal/enzimas.pdf](http://www2.dracena.unesp.br/graduacao/arquivos/bioquimica_animal/enzimas.pdf) Acesso em: 04/02/2017.
- CABAÇA, RAFAELA COROA DIAS GARCIA; Polimorfismo da redutase do Metilenotetrahydrofolato e sua relação com a variação genética da

Fosfatase Ácida do Eritrócito como fatores de risco para Osteoporose (2014) **Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente)**;

IGARI, S. et al; Properties and Crystal Structure of Methylenetetrahydrofolate Reductase from *Thermus thermophilus* HB8 (2011) (**PLoS ONE**);

VANNUCCHI, HELIO; MELO, SANDRA SOARES. Hiper-homocisteinemia e risco cardiometabólico. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 53 n. 5. 2009.

MARQUI, ALESSANDRA BERNADETE TROVÓ de; Síndrome de Turner e polimorfismo genético: uma revisão sistemática. **Rev. paul. pediatr.** vol.33 no.3 São Paulo July/Sept. 2015

KIEFER, F.; ARNOLD, K.; KUNZLI, M.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. **Nucleic Acids Research**, v. 37,2009.

BIASINI, MARCO; BIENERT, STEFAN; WATERHOUSE, ANDREW; ARNOLD, KONSTANTIN; STUDER, GABRIEL; SCHMIDT, TOBIAS; KIEFER, FLORIAN; CASSARINO, TIZIANO GALLO; BERTONI, MARTINO; BORDOLI, LORENZA; SCHWEDE, TORSTEN. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic acids research**, v. 42, 2014.

ARNOLD, K.; BORDOLI, L.; KOPP, J.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v.22, n.2, p.195-201, 2006.