

## Modelagem estrutural de uma nova quitinase (GH<sub>19</sub>) de melão, e análise de *docking* molecular com *N*-acetil- $\beta$ (1-4)-*D*-glicosamina

### *Structural modeling of a new melon chitinase (GH<sub>19</sub>), and molecular docking analysis with N-acetyl- $\beta$ (1-4)-D-glucosamine*

Cristiane de Oliveira<sup>1</sup>, Larissa Santos Sales<sup>2</sup>, José Ednézio da Cruz Freire<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Faculdade UniNassau, Fortaleza-CE Brasil. E-mail: cristiane.oliveira93@hotmail.com

<sup>2</sup>Faculdade UniNassau, Fortaleza-CE Brasil. E-mail: lara\_jully@hotmail.com

<sup>3</sup>Biólogo, Doutor em Bioquímica. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará E-mail: jednesio@gmail.com \*Autor para correspondência

#### Palavras-chave

Biologia computacional  
Análise de propriedades físico-químicas  
Análise bioquímica

As quitinases (EC 3.2.1.14) são proteínas enzimáticas capazes de degradar quitina, um biopolímero vastamente abundante na natureza. A quitina é um importante componente estrutural presente em insetos, nematódeos, fungos e outras pragas e patógenos de plantas e de animais. A *Cmchi*<sub>2</sub> (uma quitinase) foi previamente identificada na planta *Cucumis melo* (L.). Estudos adicionais realizados demonstraram que essa enzima apresentou atividade contra um análogo de quitina. No entanto, os autores não realizaram maiores estudos sobre o modo/velocidade de atividade desta molécula. A fim de melhorar a caracterização da *Cmchi*<sub>2</sub>, o presente estudo buscou explorar as diversas propriedades físico-químicas, bioquímicas e estruturais desta enzima e o modo como essa degrada polímeros de *N*-acetil- $\beta$ (1-4)-*D*-glicosamina a partir de previsões computacionais.

#### Keywords

Computational biology  
Physicochemical property analysis  
Biochemical analysis

*Chitinases* (EC 3.2.1.14) are enzymatic proteins capable of degrading chitin, a biopolymer vastly abundant in nature. Chitin is an important structural component present in insects, nematodes, fungi and other pests and pathogens of plants and animals. *Cmchi*<sub>2</sub> (a chitinase) was previously identified in the *Cucumis melo* (L.) plant. Additional studies have shown that this enzyme showed activity against a chitin analogue. However, the authors did not conduct further studies on the mode/speed of activity of this molecule. In order to improve the characterization of *Cmchi*<sub>2</sub>, the present study sought to explore the physicochemical, biochemical and structural properties of this enzyme and how it degrades *N*-acetyl- $\beta$ (1-4)-*D*-glucosamine polymers using computational simulations.

## INTRODUÇÃO

As plantas, desde suas origens, são suscetíveis a diferentes pressões bióticas e abióticas. Embora, não apresente um sistema de imunidade adquirida como ocorrem nos animais, as plantas detêm barreiras estruturais, físicas e químicas capazes de conferir resistência a diferentes pressões ambientais (MALINOVSKY; FANGEL; WILLATS, 2014; ZEILINGER et al., 2016).

Dentre os mecanismos químicos usados pelas plantas, destacam-se as PR-proteínas (proteínas relacionadas com a patogênese), cuja atividade enzimática destas podem ser maximizadas ou induzidas frente a situações de injúria, incluindo infecções causadas por fungos fitopatogênicos e bactérias, ataques de insetos fitófagos e vermes fitonematóides (SENTHILRAJA et al., 2013; GARCÍA-CRISTOBAL et al., 2015; JIANG, et al., 2015; CHINNASRI et al., 2016), além de fatores abióticos como, o calor, o frio, o déficit hídrico, entre outros. Quitinases (EC 3.2.1.14), um importante grupo de PR-proteínas, são glicosídeo hidrolases capazes de clivar ligações covalentes do tipo  $\beta$ -1,4 entre os resíduos de GlcNAc das cadeias que formam a quitina

(RATHORE; GUPTA, 2015). A quitina é um componente natural presentes em diversas espécies consideradas nocivas as plantas e, por essa razão, um alvo molecular de quitinases, resultando em um eficaz mecanismo de defesa químico contra seus predadores (SYTWALA; GÜNTHER; MELZIG, 2015).

Em muitas espécies de plantas de interesse econômico, incluindo a *Cucumis melo* (WITMER et al., 2003), foram isoladas e caracterizadas diferentes PR-proteínas, incluindo quitinases. Dois genes que codificam quitinases foram previamente isolados e caracterizados em sementes em desenvolvimento de *C. melo* (WITMER et al., 2003). Estas duas enzimas foram denominadas *Cmchi*<sub>1</sub> (Quitinase 1 do *Cucumis melo*) e *Cmchi*<sub>2</sub> (Quitinase 2 do *Cucumis melo*), agrupadas nas classes III e classe II das quitinases, respectivamente. Em relação à quitinase *Cmchi*<sub>2</sub>, foi demonstrada a presença de uma única cópia gênica no genoma da planta *C. melo*, empregando a técnica de *southern blotting*, sendo este gene expresso em radículas, sementes durante a germinação e, em raízes de plantas maduras (WITMER, et al., 2003), portanto, esta proteína deve fazer parte do conjunto de proteínas responsáveis pela atividade quitinolítica

durante o desenvolvimento das sementes do melão.

A Cmchi<sub>2</sub> foi expressa em bactérias e o produto recombinante foi purificado. Quando testada *in vitro* contra glicol-quitina (substrato) a enzima foi capaz de degradar (WITMER et al., 2003). Os autores mencionaram este fato como uma justificativa para investigar melhor o potencial defensivo da Cmchi<sub>2</sub> em ensaios de inibição de fungos. Neste trabalho foi realizada uma análise sistemática, utilizando uma abordagem computacional com o objetivo de melhor caracterizar a Cmchi<sub>2</sub> de acordo com suas propriedades bioquímicas, físicas e químicas. Por fim, uma compreensão mais detalhada sobre os aspectos estruturais e moleculares envolvendo a interação entre a quitinase Cmchi<sub>2</sub> e moléculas de N-acetil-β(1-4)-D-glicosamina (monômero de quitina) empregando estudos de docking molecular, foi obtida.

## MÉTODOS

### Obtenção e análise de seqüências da Cmchi<sub>2</sub>

A seqüência de aminoácidos da enzima Cmchi<sub>2</sub> (Acesso no GenBank N° AF241267) foi obtida em arquivo em extensão *.fasta* a partir da base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), localizado na página on line <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Para caracterizar a presença ou ausência de peptídeo sinal (PS) na seqüência de aminoácidos da Cmchi<sub>2</sub>, foi empregado o servidor SignalP 4.1 Server (PETERSEN et al., 2011). A seqüência da proteína madura obtida após avaliação pelo servidor SignalP foi utilizada nas análises adicionais.

### Caracterização física e química da Cmchi<sub>2</sub>

Dentre as caracterizações físicas e químicas da proteína madura (Cmchi<sub>2</sub>), procurou-se obter dados referentes ao peso molecular teórico (Mr), ponto isoelétrico (pI), índice de instabilidade (II) e o índice de hidropaticidade média (Grand Average of Hydropathicity - GRAVY) utilizando o servidor ExPASy ProtParam Tool (GASTEIGER et al., 2005).

Para prever a presença de pontes dissulfeto foi usado o servidor DIANNA 1.1 Web Server (FERRÉ; CLOTE, 2006).

### Análise de domínio

A fim de determinar o domínio proteico inerente à quitinase Cmchi<sub>2</sub>, a seqüência em extensão *.fasta* foi submetida ao servidor: CDD – *Conserved Domains Database and Resources* (MARCHLER-BAUER et al., 2015).

### Modelagem e análise da estrutura 3D da Cmchi<sub>2</sub>

#### Construção do modelo e refinamento

O servidor Phyre<sup>2</sup> - *Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0* (KELLEY, et al., 2015), foi utilizado para construir o modelo teórico da quitinase Cmchi<sub>2</sub>. A estrutura teórica obtida foi refinada utilizando o *software Coot 0.8.1* (EMSLEY et al., 2010), e a qualidade geral da estrutura obtida foi melhorada a partir da minimização de energia utilizando o servidor *Galaxy Refine* (KO et al., 2012; SHIN et al., 2014).

#### Avaliação do modelo

A qualidade global do modelo da Cmchi<sub>2</sub>, após refinamento e minimização energética, foi avaliada utilizando os servidores: ProSA-Web – *Protein Structure Analysis* (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007), MolProbity (CHEN et al., 2010), ERRAT (COLOVOS; YEATES, 1993) e Verify3D (LÜTHY; BOWIE; EISENBERG, 1992).

#### Estudo de Docking molecular

O modelo final da quitinase Cmchi<sub>2</sub> foi submetido à análise de interação com moléculas de quitina (oligômero de 4 unidades de N-acetil-β(1-4)-D-glicosamina). A estrutura da quitina foi obtida com auxílio do *software ChemSpider* (<http://www.chemspider.com>). As interações entre Cmchi<sub>2</sub> e a quitina foram simuladas pelo *software AutoDock Vina v. 1.1.2* (TROTT; OLSON, 2010).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análise da seqüência primária

A análise da estrutura primária da Cmchi<sub>2</sub>, utilizando o servidor *SignalP 4.1* (PETERSEN et al., 2011), mostrou que a proteína possui 272 aminoácidos de comprimento total, e um peptídeo sinal N-terminal de 23 aminoácidos que é clivado para formar o polipeptídeo maduro (249 resíduos de aminoácidos).

Os dados sugerem a presença de um sítio de clivagem entre os resíduos Ser<sup>23</sup> e Ser<sup>24</sup>, com um S-score de 0.966 e uma pontuação de discriminação de 0.727 (Figura 1).

### Propriedades físico-químicas

A análise de uma seqüência polipeptídica pode fornecer muitas informações importantes sobre a estrutura e as propriedades de uma proteína, resultando em uma melhor compreensão das suas funções bioquímicas e celulares. A família das quitinases se caracteriza por um grupo diverso de enzimas que diferem em atividades enzimáticas, seqüência primária, ponto isoelétrico (pI) e localização subcelular (MEINS et al., 1994), bem como outras características estruturais, tais como o domínio de ligação à quitina e uma seqüência na região C-terminal que ajuda a manter a topologia geral do principal domínio catalítico (HAMEL et al., 1997).

Após exaustiva revisão bibliográfica foi observado que

não existem informações significativas sobre as propriedades físico-químicas ou sobre o modo como a quitinase Cmchi<sub>2</sub> interage com a quitina. Por essa razão, as características físico-químicas incluindo, o peso molecular (*Mr*), o ponto isoelétrico teórico (pI), o índice de instabilidade e o índice de hidropaticidade média (*GRAVY*) da enzima Cmchi<sub>2</sub> foram analisados, empregando o servidor ProtParam *tool*.

A análise *in silico* revelou que a enzima Cmchi<sub>2</sub> possui massa molecular de 30,099 kDa (WITMER et al., 2003), enquanto que a proteína madura (sem peptídeo sinal) detém massa molecular prevista de 27,53 kDa, massa quase idêntica a outras quitinases da família GH<sub>19</sub> em plantas, tal como *Rhododendron irroratum* (27 kDa) (ZHA, et al., 2016). Além disso, Cmchi<sub>2</sub> é caracterizada como uma proteína básica, devido ao seu ponto isoelétrico (pI 9.32). Este valor de pI está de acordo com o pI obtido no trabalho de Witmer et al. (2003). As quitinases ácidas e básicas estão presentes em várias culturas de plantas, incluindo: *Arabidopsis thaliana* (SAMAC et al., 1990), *Capsicum annuum* (GARMENDIA; AGUIRREOLEA; GOICOECHEA, 2006) e *Sporisorium scitamineum* (SU et al., 2015). No melão a quitinase Cmchi<sub>1</sub> é uma proteína ácida, enquanto que a Cmchi<sub>2</sub> é básica (WITMER et al., 2003; JÚNIOR et al., 2017).

O índice de instabilidade fornece uma estimativa indireta da estabilidade metabólica de uma proteína (GURUPRASAD; REDDY; PANDIT, 1990). Este índice é baseado em uma escala de estabilidade em que valores inferiores a 40 podem ser considerados como uma proteína classificada como estável enquanto que os valores superiores a 40 preveem que a proteína pode ser instável (GURUPRASAD; REDDY; PANDIT, 1990).

Com base nessa análise Cmchi<sub>2</sub> pode ser considerada uma proteína estável, pois seu índice de instabilidade mostrou um valor de 29.47 (<40). O valor de *GRAVY* para um peptídeo ou proteína é calculado como a soma dos valores de hidropatia de todos os aminoácidos divididos pelo número total de resíduos na sequência. O valor de *GRAVY* (-0.403) obtido para a quitinase Cmchi<sub>2</sub>, sugere que essa possui alta possibilidade de interações com moléculas de água sendo, portanto, uma molécula hidrofílica.

Em relação à estabilidade térmica a Cmchi<sub>2</sub> pode ser considerada como uma proteína estável. É possível que a estabilidade térmica da quitinase Cmchi<sub>2</sub> seja em parte devido presença de ligações dissulfeto. A fim de identificar possíveis ligações dissulfeto na estrutura da Cmchi<sub>2</sub> foi utilizado o servidor DIANNA (FERRÉ; CLOTE, 2006), os resultados obtidos indicaram a existência de 4 interações envolvendo cisteínas (Cys-SCy), sendo os resíduos (Cys<sup>27</sup>-Cys<sup>91</sup>); (Cys<sup>102</sup>-Cys<sup>110</sup>); (Cys<sup>173</sup>-Cys<sup>227</sup>) e (Cys<sup>208</sup>-Cys<sup>240</sup>). De acordo com o servidor CDD (MARCHLER-BAUER et al., 2015), a Cmchi<sub>2</sub> pertence à família 19 das Glicosil Hidrolases (GH<sub>19</sub>), indicado pelo *E-value* de 1.53e<sup>-134</sup>.

#### Modelo de construção, refinamento e avaliação estereoquímica

A modelagem computacional de proteínas tem sido considerada mais confiável quando existe uma clara relação evolutiva (homologia) entre uma sequência alvo da proteína em análise e estruturas proteicas já armazenadas e disponíveis em bancos de dados de estrutura de proteínas. A fim de obter um modelo 3D da

**Figura 1.** Predição de peptídeo de sinal utilizando a ferramenta on line SignalP 4.1. Sequência do peptídeo sinal sublinhada. A presença do sítio de clivagem entre resíduos Ser<sup>23</sup> e Ser<sup>24</sup> identificado pelo triângulo invertido vermelho.

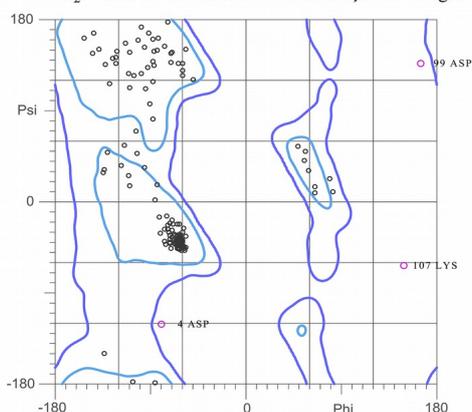
```

10      20      30      40      50      60
MKLYSLLSLL FLGVLWRSEG VASSNDDVGR LINVTTFNA MFKYQKDPQC PSQGFYSYQA
-----
70      80      90      100     110     120
FLTAARSFGK LGFATTGKLA TRKRELLAFL AQTSHQTTGG WLTAPDGPLF WGYCHIREST
130     140     150     160     170     180
EDSYCKADPK WPCAAGQKYY GRGPMQLKGN QNYGQAGKAL GLDLLKNPDL VAKDPVVSFK
190     200     210     220     230     240
TAIWFWMTAQ GIKPSCHDVM VGKWKPTBAD KAAKRVPGYG VVSNIIIGSE CGSGANTDVA
250     260     270
DRFGFYVRYC KMLGVNPGKH LDCFFQQPFT RM
    
```

**Figura 2.** Gráfico de Ramachandran (MolProbity) trando os ângulos diedros ( $\phi$  e  $\theta$ ) dos aminoácidos da *Cmchi*<sub>2</sub>, antes e após otimização e minimização de energia. Os resíduos localizados nas regiões favorecidas (97,98%) são trados em curvas azuis claras e os resíduos localizados nas regiões permitidas (99%) estão em curva azul escuro (Após refinamento e minimização de energia).

## MolProbity Ramachandran analysis

*Cmchi*<sub>2</sub>: Antes do refinamento e minimização de energia



### Summary statistics

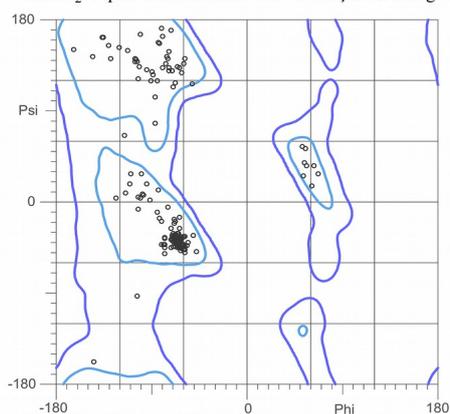
All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	63.99	1 <sup>st</sup> percentile* (N=1784, all resolutions)
	Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.		
Protein Geometry	Poor rotamers	4	1.99% Goal: <0.3%
	Favored rotamers	191	95.02% Goal: >98%
	Ramachandran outliers	3	1.21% Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	237	95.95% Goal: >98%
	MolProbity score <sup>^</sup>	2.78	32 <sup>nd</sup> percentile* (N=27675, 0Å - 99Å)
	Cβ deviations >0.25Å	2	0.90% Goal: 0
Peptide Omegas	Bad bonds:	0 / 1997	0.00% Goal: 0%
	Bad angles:	32 / 2702	1.18% Goal: <0.1%
	Cis Prolines:	0 / 14	0.00% Expected: ≤1 per chain, or ≤5%
	Cis nonProlines:	1 / 234	0.43% Goal: <0.05%

In the two column results, the left column gives the raw count, right column gives the percentage.

\* 100<sup>th</sup> percentile is the best among structures of comparable resolution; 0<sup>th</sup> percentile is the worst. For clashscore the comparative set of structures was selected in 2004, for MolProbity score in 2006.

<sup>^</sup> MolProbity score combines the clashscore, rotamer, and Ramachandran evaluations into a single score, normalized to be on the same scale as X-ray resolution.

*Cmchi*<sub>2</sub>: Após o refinamento e minimização de energia



### Summary statistics

All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	0	100 <sup>th</sup> percentile* (N=1784, all resolutions)
	Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.		
Protein Geometry	Poor rotamers	0	0.00% Goal: <0.3%
	Favored rotamers	199	99.00% Goal: >98%
	Ramachandran outliers	0	0.00% Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	242	97.98% Goal: >98%
	MolProbity score <sup>^</sup>	0.51	100 <sup>th</sup> percentile* (N=27675, 0Å - 99Å)
	Cβ deviations >0.25Å	10	4.50% Goal: 0
Peptide Omegas	Bad bonds:	1 / 1995	0.05% Goal: 0%
	Bad angles:	32 / 2698	1.19% Goal: <0.1%
	Cis Prolines:	0 / 14	0.00% Expected: ≤1 per chain, or ≤5%

In the two column results, the left column gives the raw count, right column gives the percentage.

\* 100<sup>th</sup> percentile is the best among structures of comparable resolution; 0<sup>th</sup> percentile is the worst. For clashscore the comparative set of structures was selected in 2004, for MolProbity score in 2006.

<sup>^</sup> MolProbity score combines the clashscore, rotamer, and Ramachandran evaluations into a single score, normalized to be on the same scale as X-ray resolution.

quitinase *Cmchi*<sub>2</sub>, foi usando o servidor Phyre<sup>2</sup> (KELLEY, et al., 2015), e a qualidade da estrutura prevista foi analisada pelo servidor *MolProbity* (CHEN, et al., 2010).

Após a análise da qualidade da estrutura foi observado que 95,02% dos aminoácidos encontravam-se distribuídos em regiões mais favorecidas ou regiões permitidas do gráfico de Ramachandran (Figura 2). Para melhorar o modelo 3D da *Cmchi*<sub>2</sub>, uma etapa de otimização foi feita usando o *software Coot* 0.8.1 (EMSLEY et al., 2010) para reorganizar os aminoácidos Asp<sup>4</sup>, Asp<sup>99</sup> e Lys<sup>107</sup> em regiões permitidas do gráfico de Ramachandran.

Em seguida, o modelo final de *Cmchi*<sub>2</sub> foi submetido à minimização de energia usando servidor *Galaxy Refine* (KO et al., 2012; SHIN et al., 2014). O *Galaxy Refine* executa o refinamento na estrutura geral (TERWISSCHA; HENNIG; DIJKSTRA, 1996). O método leva em consideração o padrão geral do modelo da proteína inicial e então executa o refinamento da estrutura com base em um teste de distância global de alta precisão (GDT-HA) (ZEMLA, 2003) seguido por um teste de distância global

de cadeia lateral (GDC-SC) (KEEDY et al., 2009) e, finalmente, para a correção física, o *software* faz uso da pontuação *MolProbity* (CHEN et al., 2010) (Figura 2). A qualidade geral do modelo (*Z-score*), o fator de qualidade geral e a pontuação média de 3D-1D do modelo *Cmchi*<sub>2</sub>, foram avaliadas usando os servidores ProSA-Web, ERRAT, Verify3D, respectivamente. Empregando o servidor *Protein Structure Assessment* (ProSA-Web) (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007), obteve-se um valor *Z-score* de - 7,78 (ponto preto - Figura 3A). A Figura 3B mostra a qualidade do modelo com base na energia global de estrutura. De acordo com esse resultado, o modelo *Cmchi*<sub>2</sub> pode ser classificado como um modelo de boa qualidade, sendo classificado com base em uma série de escores tipicamente de quitinases com conformações nativas e tamanhos semelhantes (200 a 300 resíduos de aminoácidos), nos quais as estruturas tridimensionais foram resolvidas por Ressonância magnética nuclear (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007).

As interações não ligadas entre diferentes átomos

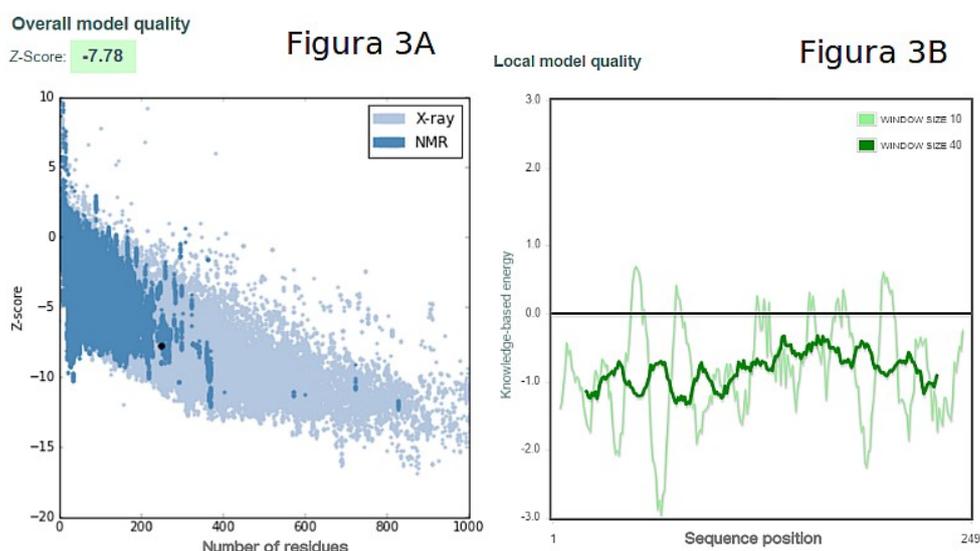
foram analisadas por ERRAT (COLOVOS; YEATES, 1993). O fator de qualidade global para o modelo  $Cmchi_2$  foi de 95.816% (Figura 4). Esse valor sugere que o modelo previsto pode ser considerado de qualidade aceitável, de acordo com a escala de limite de confiança ERRAT (<95%). Os resultados Verify3D (LÜTHY; BOWIE; EISENBERG, 1992) para o modelo  $Cmchi_2$  revelaram que 100% dos resíduos de aminoácidos tinham uma pontuação 3D-1D média superior a 0,2 o que indica um modelo bem construído com todos os resíduos posicionados na sua conformação dobrada (Figura 5). O

modelo final foi depositado no PMDB - Protein Model Database sob o número de acesso PM0080964 ([https://bioinformatics.cineca.it/PM\\_DB/](https://bioinformatics.cineca.it/PM_DB/)). O Modelo final refinado e com energia minimizada pode ser visto na figura 6.

### Estudo de Docking molecular

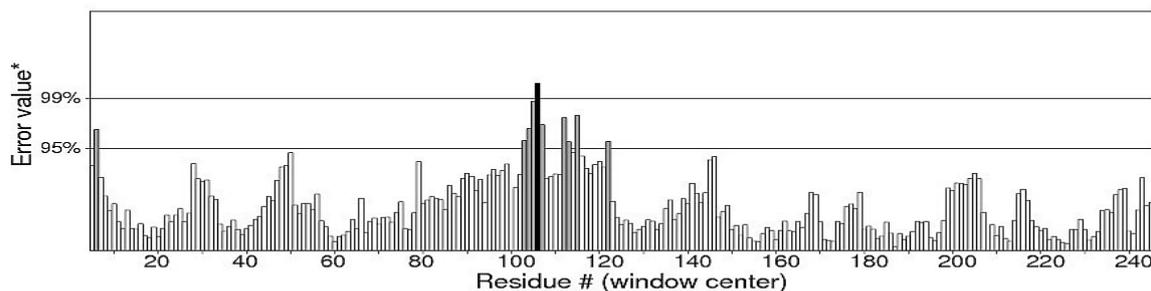
A quitinase do melão,  $Cmchi_2$ , foi inicialmente estudada pelo Witmer e colaboradores (2003). Uma versão recombinante da enzima foi expressa e purificada a partir

**Figura 3.** Análise do servidor *Protein Structure Assessment* (ProSA-web). O Z-score (-7,78) da  $Cmchi_2$  localizado na faixa de valores comumente encontrados para proteínas PDB, cujas estruturas foram determinadas por RMN (região azul escuro) e cristalografia de raios X (região azul claro). Observe o ponto preto no gráfico que representa o Z-score da  $Cmchi_2$  (A). A análise ProSA-Web tra que todos os resíduos de aminoácidos da  $Cmchi_2$  são distribuídas no interior da região negativa do gráfico (B). Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que o modelo  $Cmchi_2$  aqui proposto é de alta qualidade e confiança.



**Figura 4.** Análise geral da qualidade do modelo  $Cmchi_2$  de acordo com o servidor ERRAT. As regiões menos favorecidas são sombreadas em preto e as regiões mais favorecidas são em branco. O método de avaliação de ERRAT retornou um valor de 95.816% para a estrutura prevista da  $Cmchi_2$ . Estes dados sugerem um modelo de boa qualidade com base nos scores estabelecidos pelo servidor.

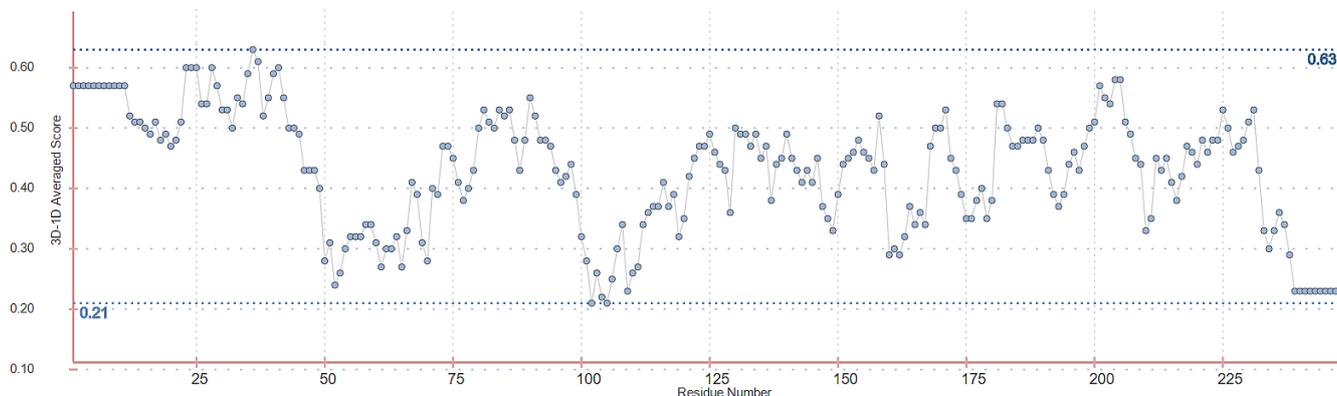
Program: ERRAT2  
File: /var/www/SAVES/Jobs/2931384//erratt.pdb  
Chain#: 1  
Overall quality factor\*\*: 95.816



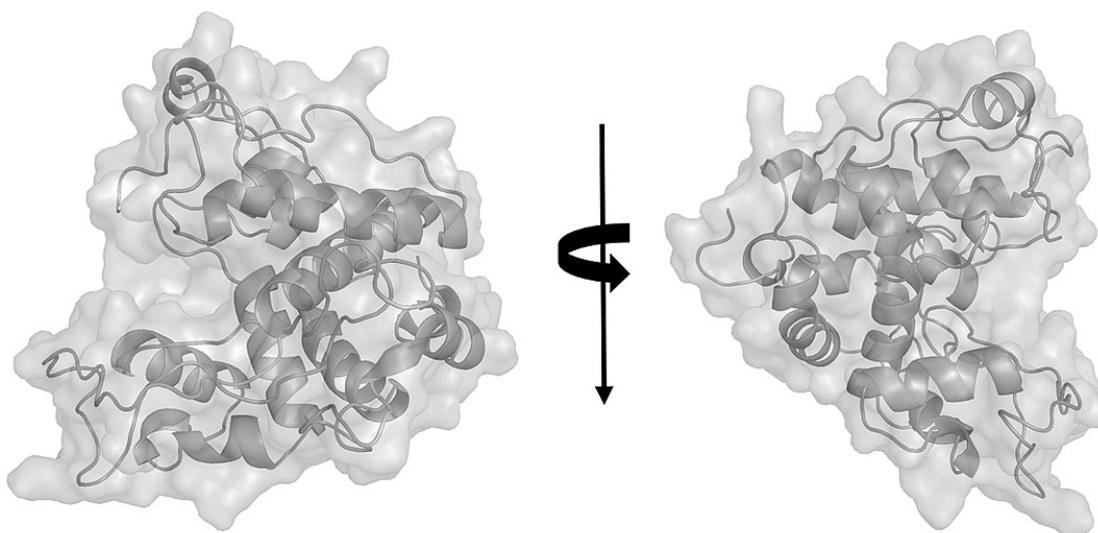
\*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.

\*\*Expressed as the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structures generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3Å) the average overall quality factor is around 91%.

**Figura 5.** Verificação do gráfico 3D do modelo *Cmchi*<sub>2</sub>. O eixo vertical representa a pontuação média do perfil 3D-1D para os resíduos numa janela deslizante de 25 resíduos. O eixo horizontal representa o número de resíduos na sequência primária da proteína. Os primeiros e os últimos 11 resíduos da sequência primária não são submetidos a análise. De acordo com o gráfico, a estrutura da *Cmchi*<sub>2</sub> não mostra erro na distribuição de resíduos de aminoácidos ao longo do espaço tridimensional.



**Figura 6.** Mapa de potencial eletrostático mostra diferenças na distribuição da carga superficial ao longo da estrutura *Cmchi*<sub>2</sub>. Imagem especular da *Cmchi*<sub>2</sub>; 180° rotação em torno do seu eixo longitudinal.

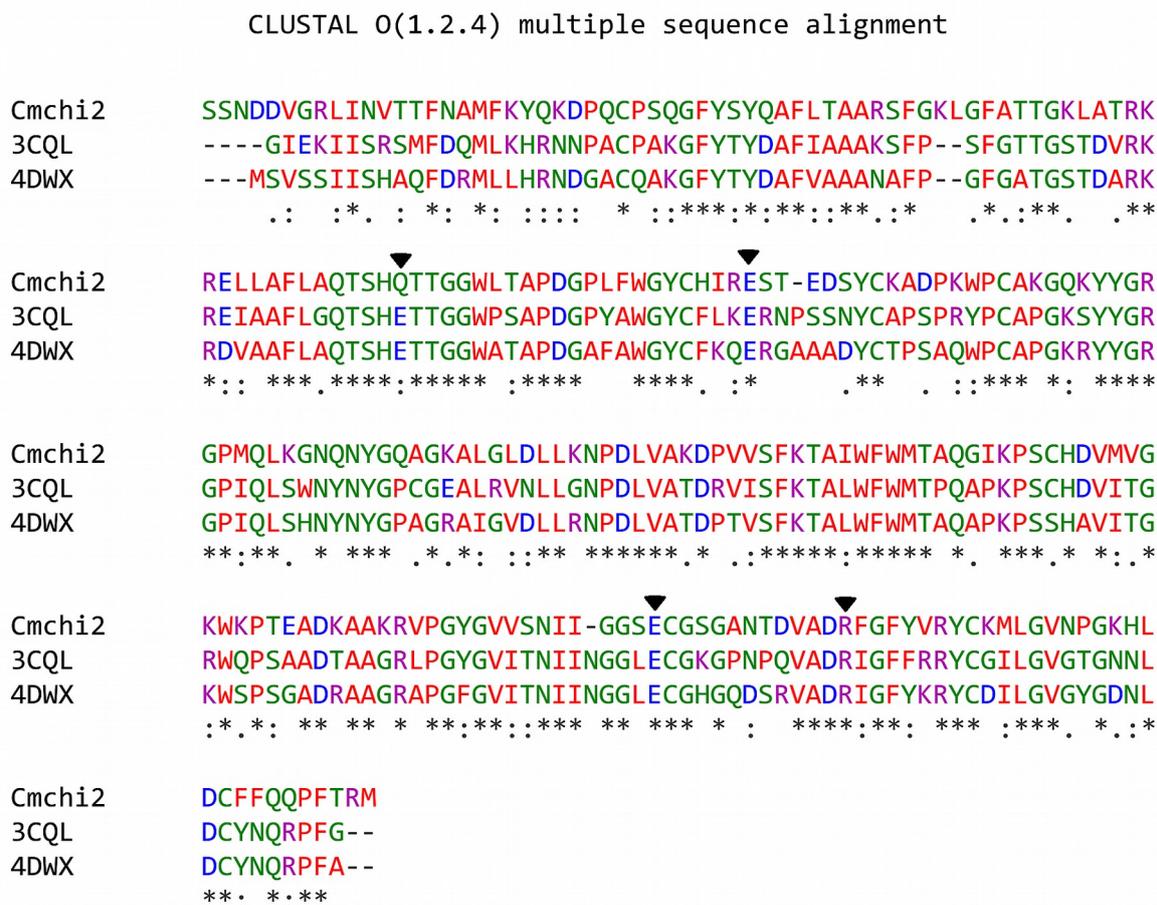


de bactérias. Além de ser uma autêntica quitinase, a proteína recombinante parece ser capaz de hidrolisar adequadamente a glicol-quitina, um substrato potencial para este tipo de enzima. Com base nessas informações, foi desenvolvido um estudo de *docking* molecular com o objetivo de elucidar as propriedades moleculares que justificam o mecanismo de interação da *Cmchi*<sub>2</sub> usando o modelo 3D predito e refinado com o ligante (GlcNac)<sub>4</sub>.

O primeiro passo no estudo de acoplamento consistiu na busca dos resíduos de aminoácidos responsáveis pela interação entre *Cmchi*<sub>2</sub> e a quitina. Além do fato de que a *Cmchi*<sub>2</sub> parece ser capaz de interagir corretamente com a quitina (WITMER et al., 2003), embora não exista uma sequência de resíduos de aminoácidos conservados localizados no sítio de quitinases GH<sub>19</sub>, é relatado apenas a existência de resíduos aromáticos nesta região, de

acordo com a base de dados CAZypedia ([https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside\\_Hydrolase\\_Family\\_19#Catalytic\\_Residues](https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_Hydrolase_Family_19#Catalytic_Residues)). Acredita-se que sejam apenas dois resíduos de glutamatos que atuam na catálise da quitina. Embora, as informações estruturais sejam ainda limitadas, existe considerável apoio à hipótese de que um Glu localizado na extremidade da terceira hélice alfa (Glu<sup>67</sup> na enzima da cevada), a partir da região *N*-terminal, atua como catalisador ácido geral. Um segundo Glu, em uma região de alça não conservada (Glu<sup>89</sup> na quitinase da cevada) atua como base da catálise geral (HART, et al., 1993; ANDERSEN, et al., 1997; HOELL, et al., 2006; HUET, et al., 2008). Ademais, pelo menos dois resíduos carregados (Glu<sup>203</sup> e Arg<sup>215</sup> na quitinase da cevada) são cruciais para a catálise, juntos formam uma tríade com o ácido glutâmico Glu<sup>67</sup> (OHNISH

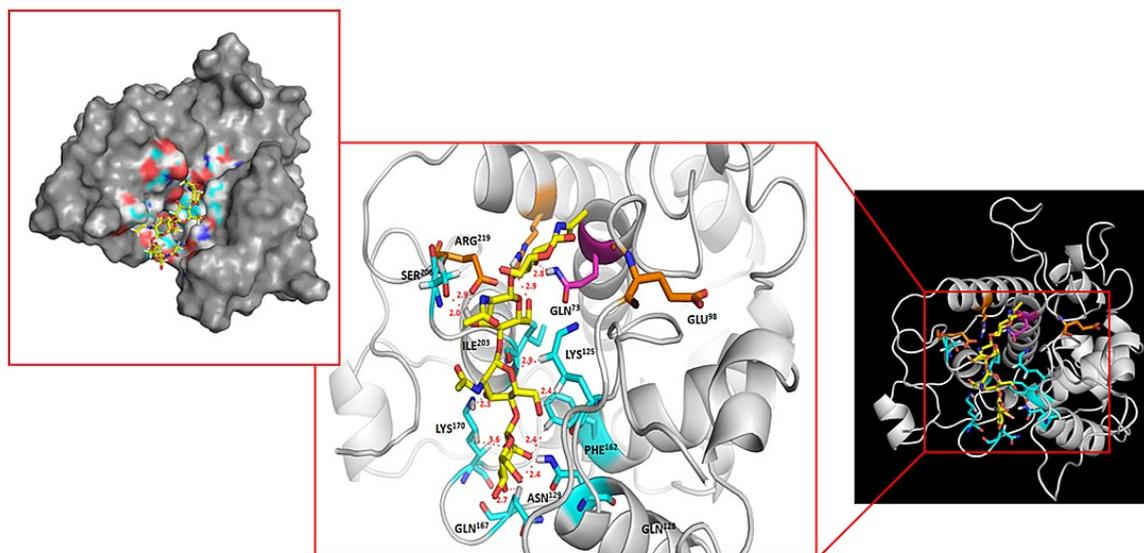
**Figura 7.** Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos de três quitinases da família 19 (GH<sub>19</sub>) da glicosil hidrolases de plantas: 3CQL, 4DWX e *Cmchi*<sub>2</sub> empregando o servidor Clustal-Ω. Os aminoácidos envolvidos com a catálise estão indicados pelos triângulos investidos (pretos).



et al., 2005). Surpreendentemente, *Cmchi*<sub>2</sub> apresenta uma mutação no aminoácido X<sup>73</sup> (X aqui representado por Asp), tal aminoácido deveria ser equivalente ao Glu<sup>67</sup> na quitinase da cevada. A presença na quitinase *Cmchi*<sub>2</sub> do

melão, de um Asp<sup>73</sup>, localizado onde deveria ser um Glu na maioria das quitinases ativas de plantas, indica que essa enzima possa expressar menor atividade quitinolítica, quando comparada com outras quitinases

**Figura 8.** Uma visão geral da interação molecular entre a *Cmchi*<sub>2</sub> e (GlcNac)<sub>4</sub>.



cuja presença deste Glu é conservada. Por outro lado, a *Cmchi<sub>2</sub>* possui um segundo Glu<sup>95</sup>, equivalente ao Glu<sup>89</sup> na quitinase da cevada, que funciona como base da catálise ácida. Ademais, outros dois aminoácidos muito importantes para a atividade quitinásica são conservados na *Cmchi<sub>2</sub>* (Glu<sup>207</sup> na e Arg<sup>219</sup>), correspondentes aos aminoácidos Glu<sup>203</sup> e Arg<sup>215</sup> quitinase da cevada. Além disso, quando a mesma região (sítio ativo) foi analisada nas sequências das quitinases utilizadas como moldes, ID PDB: 3CQL e 4DWX por meio de um alinhamento de sequências múltiplas utilizando o servidor Clustal-Ω (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), foi observado que a *Cmchi<sub>2</sub>* foi a única proteína que não conservou o primeiro Glu, como indicado na figura 7, indicado pelo primeiro triângulo invertido (preto). Além do fato de que *Cmchi<sub>2</sub>* tem uma mutação por substituição no primeiro resíduo de aminoácido do sítio conservado da quitinase, estudos de acoplamento revelaram que a enzima pode realizar uma interação ótima com o substrato. Um total de 10 simulações foram realizadas em que a ligação de (GlcNac)<sub>4</sub> ao local ativo da *Cmchi<sub>2</sub>* foi examinada. O melhor valor de interação foi *E-value* = - 8,3 kcal.mol<sup>-1</sup>. Este resultado demonstrou que os aminoácidos do local ativo da *Cmchi<sub>2</sub>* estavam propensos a interagir com moléculas de (GlcNac)<sub>4</sub> (Figura 8). Observou-se ainda distância (Å) compatível entre o ligante (GlcNac)<sub>4</sub> e a enzima. Dessa forma, este trabalho teve as seguintes conclusões: 1) A mutação do Glu<sup>73</sup> para Asp<sup>73</sup> e 2) A distância compatível com aminoácidos da enzima *Cmchi<sub>2</sub>* pode nos dar uma visão molecular que explica atividade parcial possível, razão pela qual essa enzima carece de maiores informações sobre sua atividade quitinolítica.

## CONCLUSÃO

Um modelo 3D da quitinase da planta *Cucumis melo* L., *Cmchi<sub>2</sub>*, foi construído neste trabalho usando o método de modelagem molecular baseado em duas estruturas de quitinases depositadas no banco de dados PDB. Diferentes ferramentas da bioinformática demonstraram que *Cmchi<sub>2</sub>* é uma típica quitinase de planta da família (GH<sub>19</sub>) que compartilha as mesmas propriedades físico-químicas que outras quitinases conhecidas de plantas. Entretanto, alterações particulares no motivo catalítico da *Cmchi<sub>2</sub>* foram investigadas em profundidade utilizando ferramentas de docking molecular. Este estudo revelou que a enzima *Cmchi<sub>2</sub>* pode possuir uma dificuldade para clivar quitina (GlcNac)<sub>4</sub>, devido a uma mutação por substituição (Glu<sup>73</sup> por um Asp<sup>73</sup>), embora as distâncias sejam possíveis para uma interação entre enzima e substrato. Dessa forma, estes resultados sugerem que *Cmchi<sub>2</sub>* é uma clássica quitinase de planta (GH<sub>19</sub>) que potencialmente pode não ser muito ativa contra o seu substrato mais comum, o polímero de quitina.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, M.D.; JESEN, A.; ROBERTUS, J.D.; LEAH, R.; SKRIVER, K. Heterologous expression and characterization of wild-type and mutant forms of a 26 kDa endochitinase from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Biochem. J.*, v. 322, p. 815-822, 1997.
- CHEN, V. B.; ARENDALL, W. B.; HEADD, J. J.; KEEDY, D. A.; IMMORMINO, R. M.; KAPRAL, G. J.; MURRAY, L. W.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, v. 66, n. 1, p. 12–21, 2010.
- CHINNASRI, B.; BORSICS, T.; CHRISTOPHER, D. A.; SIPES, D. B. Induction of pathogenesis-related gene 1 (PR-1) by acibenzolar-S-methyl application in pineapple and its effect on reniform nematodes (*Rotylenchulus reniformis*). *Agric. Nat. Resour.*, v. 1, n. Accepted Manuscript, 2016.
- COLOVOS, C.; YEATES, T. O. Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci.*, v. 2, n. 9, p. 1511–1519, 1993.
- EMSLEY, P.; LOHKAMP, B.; SCOTT, W. G.; COWTAN, K. Features and development of coot. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, v. 66, p. 486–501, 2010.
- FERRÈ, F.; CLOTE, P. DiANNA 1.1: an extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification. *Nucleic Acids Research*, v. 34, p. 182- 185, 2006.
- GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein identification and analysis tools on the ExpASY server. *The Proteomics Protocols Handbook*, p. 571–607, 2005.
- GARCÍA-CRISTOBAL, J.; GARCÍA-VILLARACO, A.; RA, B.; GUTIERREZMAÑERO, J.; LUCAS, J. A. Priming of pathogenesis related-proteins and enzymes related to oxidative stress by plant growth promoting rhizobacteria on rice plants upon abiotic and biotic stress challenge. *J. Plant Physiol.*, v. 188, p. 72–79, 2015.
- GARMENDIA, I.; AGUIRREOLEA, J.; GOICOECHEA, N. Defence-related enzymes in pepper roots during interactions with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Verticillium dahliae*. *BioControl*, v. 51, n. 3, p. 293–310, 2006.
- GURUPRASAD, K.; REDDY, B. V. B.; PANDIT, M. W. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting *in vivo* stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng. Des. Sel.*, v. 4, n. 2, p. 155–161, 1990.
- HAMEL, F.; BOIVIN, R.; TREMBLAY, C.; BELLEMARE, G. Structural and evolutionary relationships among chitinases of flowering plants. *J. Mol. Evol.*, v. 44, n. 6, p. 614–624, 1997.

- HART, P.J.; MONZINGO, A.F.; READY, M.P.; ERNST, S.R.; ROBERTUS, J.D. Crystal structure of an endochitinase from *Hordeum vulgare* L. seeds. *J. Mol. Bio.*, v.229, p. 189-193, 1993.
- HOELL, I.A.; DALHUS, B.; HEGGSET, E.B.; ASPMO, S.I.; EIJSINK, V.G.H. Crystal structure and enzymatic properties of a bacterial family 19 chitinase reveal differences from plant enzymes. *FEBS Journal*, V. 273, p. 4889–4900, 2006.
- HUET, J.; RUCKTOOA, P.; CLANTIN, B.; AZARKAN, M.; LOOZE, Y.; VILLERET, V.; WINTJENS, R. X-ray structure of papaya chitinase reveals the substrate binding mode of glycosyl hydrolase family 19 chitinases. *Biochemistry*, v. 47, n.32, p. 8283–8291, 2008.
- JIANG, L.; WU, J.; FAN, S.; LI, W.; DONG, L.; CHENG, Q.; XU, P.; ZHANG, S. Isolation and characterization of a novel pathogenesis-related protein gene (*GmPRP*) with induced expression in soybean (*Glycine max*) during infection with *Phytophthora sojae*. *PLoS One*, v. 10, n. 6, p. e0129932, 2015.
- JÚNIOR, J. E. M.; SOUSA, S. C. O.; SILVA, M. N.; MEDEIROS, S. C.; FREIRE, C. M. A. S.; FREIRE, J. E. C. New biochemical and physicochemical insights on a muskmelon [*Cucumis melo* (L.)] chitinase. *IOSR Journal of Pharmacy*. v.7, n.1 p. 46-57, 2017.
- KEEDY, D. A.; WILLIAMS, C. J.; HEADD, J. J.; III ARENDALL, I. W. B.; CHEN, V. B.; KAPRAL, G. J.; GILLESPIE, R. A.; BLOCK, J. N.; ZEMLA, A.; RICHARDSON, D. C.; RICHARDSON, J. S. The other 90% of the protein: Assessment beyond the Cas for CASP8 template-based and high-accuracy models. *Proteins*, v. 77, n. 9, p. 29–49, 2009.
- KELLEY, L.A.; MEZULIS, S.; YATES, C.M.; WASS, M.N.; STERNBERG, M.J.E. The Phyre<sup>2</sup> web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*, v.10, n.6, p. 845-858, 2015.
- KO, J.; PARK, H.; HEO, L.; SEOK, C. GalaxyWEB server for protein structure prediction and refinement. *Nucleic Acids Res.*, v. 40, n. W1, p. 294–297, 2012.
- LÜTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with threedimensional profiles. *Nature*, v. 356, n.6364, p. 83–85, 1992.
- MALINOVSKY, F. G.; FANGEL, J. U.; WILLATS, W. G. T. The role of the cell wall in plant immunity. *Front. Plant Sci.*, v. 5, n. 5, p. 178, 2014.
- MARCHLER-BAUER, A.; DERBYSHIRE, M. K.; GONZALES, N. R.; LU, S.; CHITSAZ, F.; GEER, L. Y.; GEER, R. C.; HE, J.; GWADZ, M.; HURWITZ, D. I.; LANCZYCKI, C. J.; LU, F.; MARCHLER, G. H.; SONG, J. S.; THANKI, N.; WANG, Z.; YAMASHITA, R. A.; ZHANG, D.; ZHENG, C.; BRYANT, S. H. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res.*, v. 43, n. D1, p. D222–D226, 2015.
- OHNISHI, T.; JUFFER, A.H.; TAMOI, M.; SKRIVER, K.; FUKAMIZO, T. 26 kDa endochitinase from barley seeds: An interaction of the ionizable side chains essential for catalysis. *J. Biochem.*, v. 138, n. 5, p. 553–562, 2005.
- PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods*, v. 8, n. 10, p. 785–6, 2011.
- RATHORE, A. S.; GUPTA, R.D. Chitinases from bacteria to human: Properties, applications, and future perspectives. *Enzyme Res.*, v. 2015, p. 1–8, 2015.
- SAMAC, D. A.; HIRONAKA, C. M.; YALLALY, P. E.; SHAH, D. M. Isolation and characterization of the genes encoding basic and acidic chitinase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, v. 93, n. 3, pp. 907–914, 1990.
- SENTHILRAJA, G.; ANAND, T.; KENNEDY, J. S.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and entomopathogenic fungus bioformulation enhance the expression of defense enzymes and pathogenesis-related proteins in groundnut plants against leafminer insect and collar rot pathogen. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, v. 82, p. 10–19, 2013.
- SHIN, W.-H.; LEE, G. R.; HEO, L.; LEE, H.; SEOK, C. Prediction of protein structure and interaction by GALAXY protein modeling programs. *Bio. Des.*, v. 2, p. 01–11, 2014.
- SU, Y.; XU, L.; WANG, S.; WANG, Z.; YANG, Y.; CHEN, Y.; QUE, Y. Identification, phylogeny, and transcript of chitinase family genes in sugarcane. *Sci. Rep.*, v. 5, p. 10708, 2015.
- SYTWALA, S.; GÜNTHER, F.; MELZIG, D. M. F. Lysozyme- and chitinase activity in latex bearing plants of genus *Euphorbia* - A contribution to plant defense mechanism. *Plant Physiol. Biochem.*, v. 95, p. 35–40, 2015.
- TERWISSCHA, V.S.A.; HENNIG, M.; DIJKSTRA, B. The 1.8 Å resolution structure of hevamine, a plant chitinase/lysozyme, and analysis of the conserved sequence and structure motifs of glycosyl hydrolase family 18. *J. Mol. Biol.*, v. 262, n. 2, p. 243–57, 1996.
- TROTT, O.; OLSON, A. J. Software news and update AutoDockVina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.*, v. 31, n. 16, p. 255–261, 2010.
- WATANABE, A.; HAI NONG, V.; ZHANG, D.; ARAHIRA, M.; ASARE YEBOAH, N.; UDAKA, K.; FUKAZAWA, C. Molecular cloning and ethylene-inducible expression of Chi b1 chitinase from soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 63, n. 2, p. 251–256, 1999.

- WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.*, v. 35, n. SUPPL.2, p. 407–410, 2007.
- WITMER, X.; NONOGAKI, H.; BEERS, E. P.; BRADFORD, K. J.; WELBAUM, G. E. Characterization of chitinase activity and gene expression in muskmelon seeds. *Seed Sci. Res.*, v. 13, n. 2, p. 167–178, 2003.
- ZEILINGER, S.; TSUI, C. K. M.; ZEILINGER, S.; GUPTA, V. K.; DAHMS, T. E. S.; SILVA, R. N.; SINGH, H. B.; UPADHYAY, R. S.; GOMES, E. V.; TSUI. Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 40, n. 2, p. 182–207, 2016.
- ZEMLA, A. LGA: A method for finding 3D similarities in protein structures. *Nucleic Acids Res.*, v. 31, n. 13, p. 3370–3374, 2003.
- ZHA, H-G.; MILNE, R.I.; ZHOU, H-X.; CHEN, X-Y.; SUN, H. Identification and cloning of class II and III chitinases from alkaline floral nectar of *Rhododendron irroratum*, Ericaceae. *Planta*. v. 244, p. 805–818, 2016.

---

**Submissão:** 20/02/2020

**Aprovado para publicação:** 04/03/2020