

# Biologia Estrutural de Prolil-4-Hidroxilases

John, E. O.<sup>1</sup>; Verli, H.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biotecnologia - UFRGS, Porto Alegre, Brasil;  
<http://www.ufrgs.br/bioinfo/>

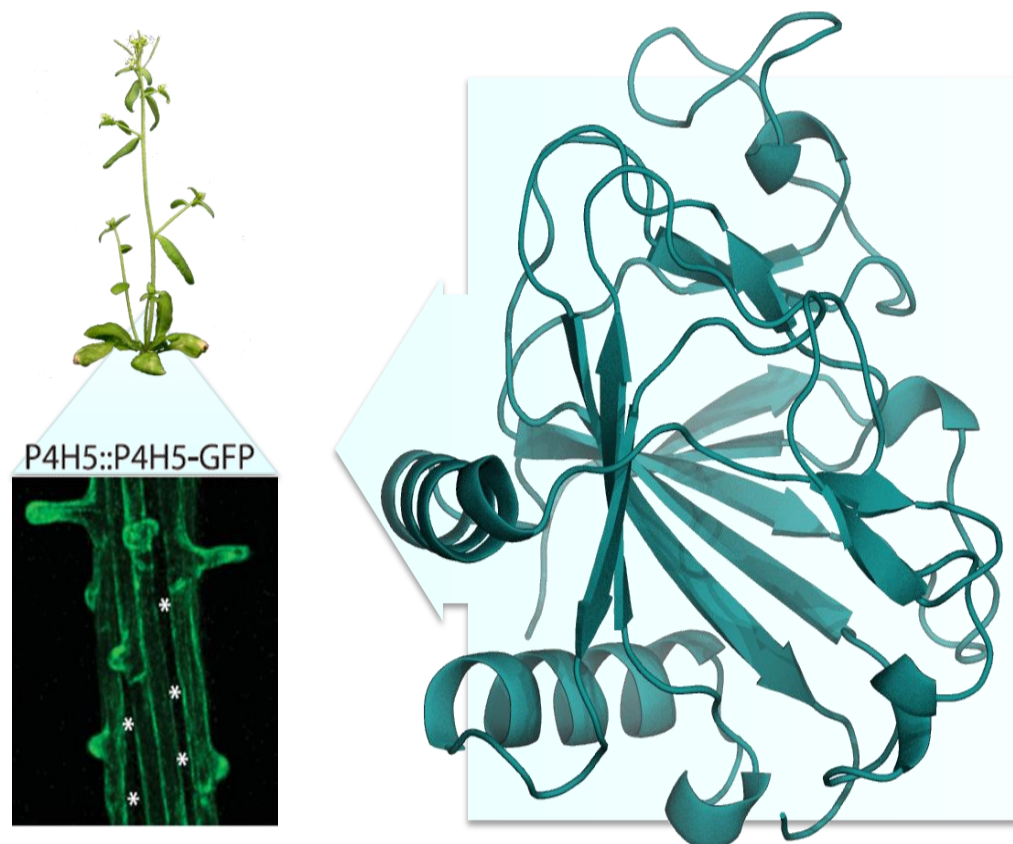
Grupo de  
Bioinformática  
Estrutural  
Centro de Biotecnologia / UFRGS

PPGBCM  
CBiot/UFRGS

UFRGS  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

## 1. Introdução

Paredes celulares de plantas são estruturas complexas e dinâmicas, compostas principalmente por polissacarídeos e glicoproteínas. Glicoproteínas ricas em hidroxiprolina são encontradas nas paredes celulares de plantas e algas verdes, e estão relacionadas ao crescimento e desenvolvimento. Prolil-4-hidroxilases (P4H) catalisam a formação pós-traducional de hidroxiprolina, sendo assim enzimas essenciais para o crescimento das plantas, uma vez que a hidroxilação de prolina define os sítios que sofrerão O-glicosilação em extensinas (EXT), um grupo de glicoproteínas da parede celular [1].



**Figura 1:** Prolil-4-hidroxilase 5 (P4H5) é altamente expressa em pelos radiculares de *Arabidopsis thaliana*, como mostrado na microscopia de fluorescência usando P4H5 marcada com GFP [2]. O modelo foi obtido a partir do PDB 3GZE [3].

Em *Arabidopsis thaliana*, enquanto existem pelo menos 13 P4Hs com padrões de expressão distintos, P4H5 e P4H2 são os tipos mais expressados nos pelos radiculares, estruturas que tem um papel relevante na absorção de nutrientes [2]. Apesar da sua importância para o crescimento e desenvolvimento das plantas, o reconhecimento entre essas enzimas e o substrato rico em prolina não é bem compreendido.

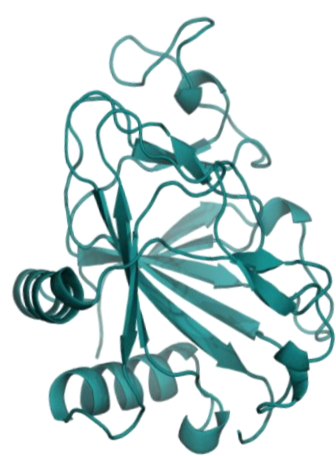
## 2. Objetivos

A fim de contribuir com o entendimento da biologia estrutural da interação de P4Hs com EXTs, o presente trabalho visa caracterizar o reconhecimento molecular entre a enzima P4H5 de *A. thaliana* e um peptídeo com repetições de prolina.

## 3. Metodologia

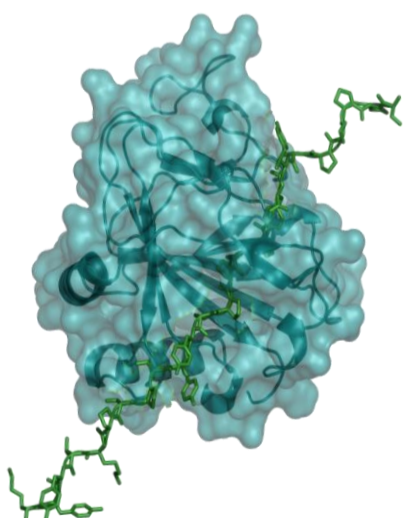
### Modelagem por Homologia

MODELLER 9.0 [4]  
Um modelo da enzima P4H5 foi obtido a partir do PDB 3GZE



### Acoplamento do peptídeo EXT

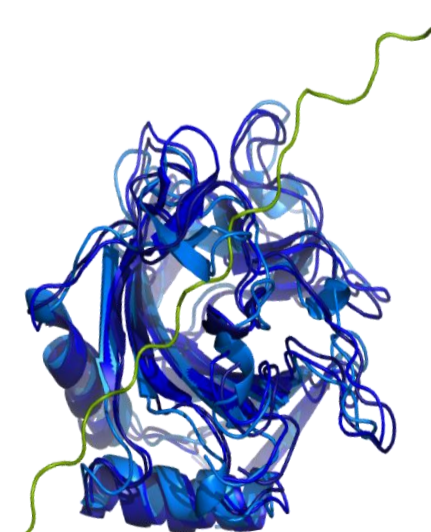
SPDBV [5]  
Um peptídeo Ser-Pro obtido de trabalhos prévios [2], foi acoplado em posições sequenciais nos modelos de P4H5



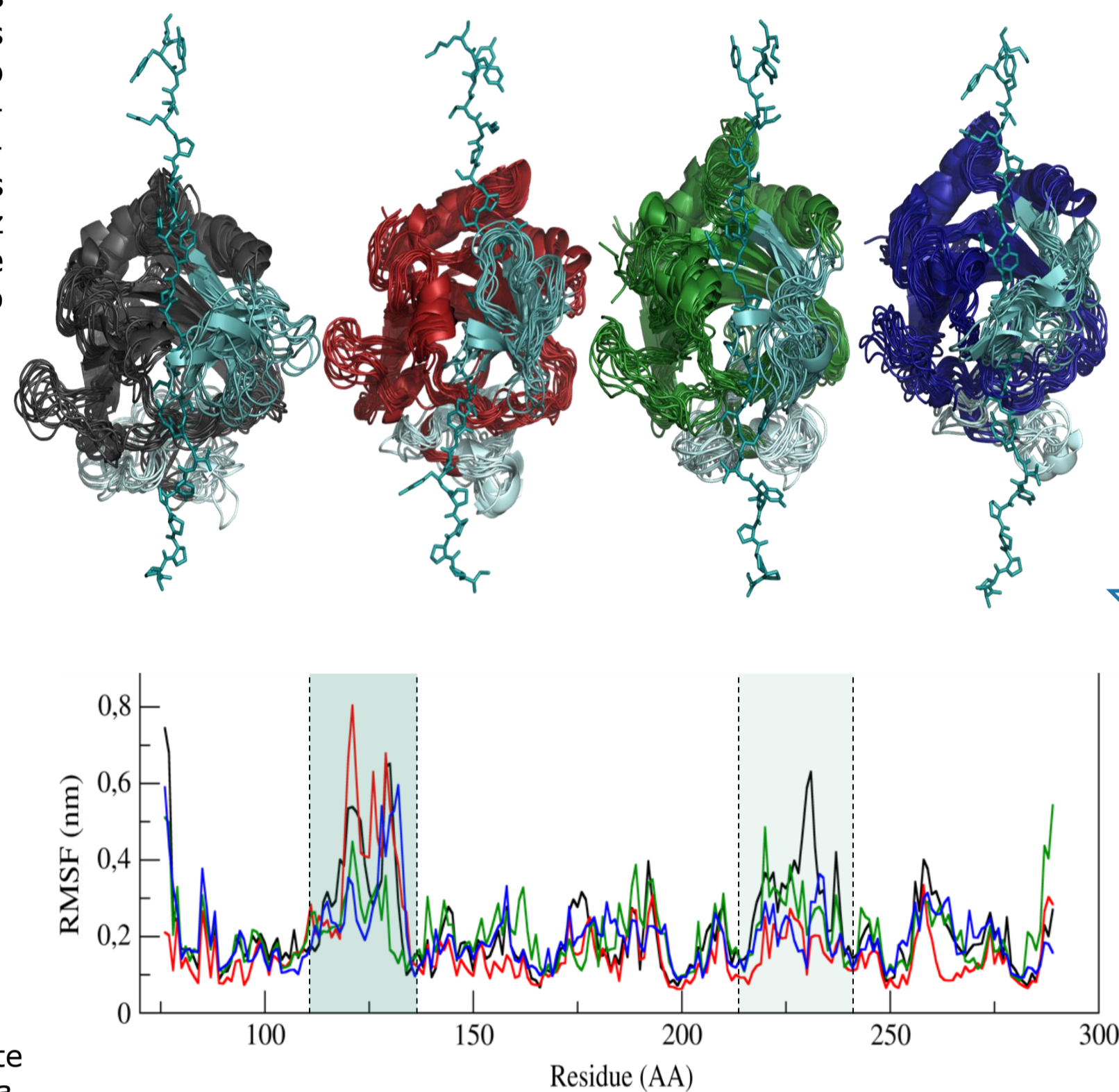
### Simulações de dinâmica molecular

GROMACS [6]

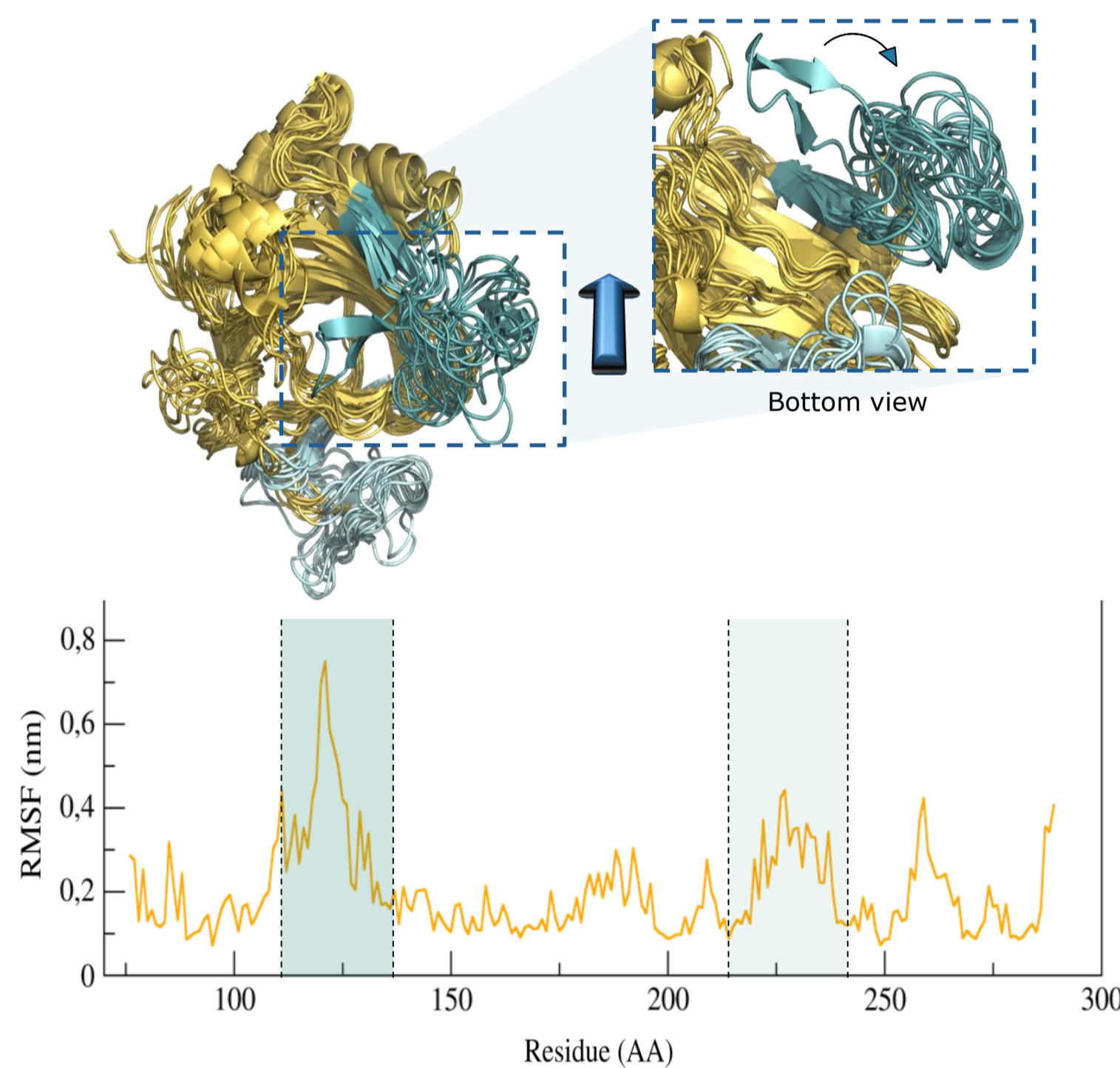
- O peptídeo EXT foi considerado periódico durante as simulações, nas quais Ser1 foi ligada com Lys25 através de imagens especulares. Interações eletrostáticas de longo alcance foram calculadas usando o método de *reaction field*. Pressão semi-isotrópica foi aplicada somente nos eixos XY;  
- Todas as simulações foram feitas dentro do pacote de simulação GROMACS [6] durante 100 ns, usando o campo de força GROMOS 96 [7], moléculas de água e íons para neutralizar os sistemas.



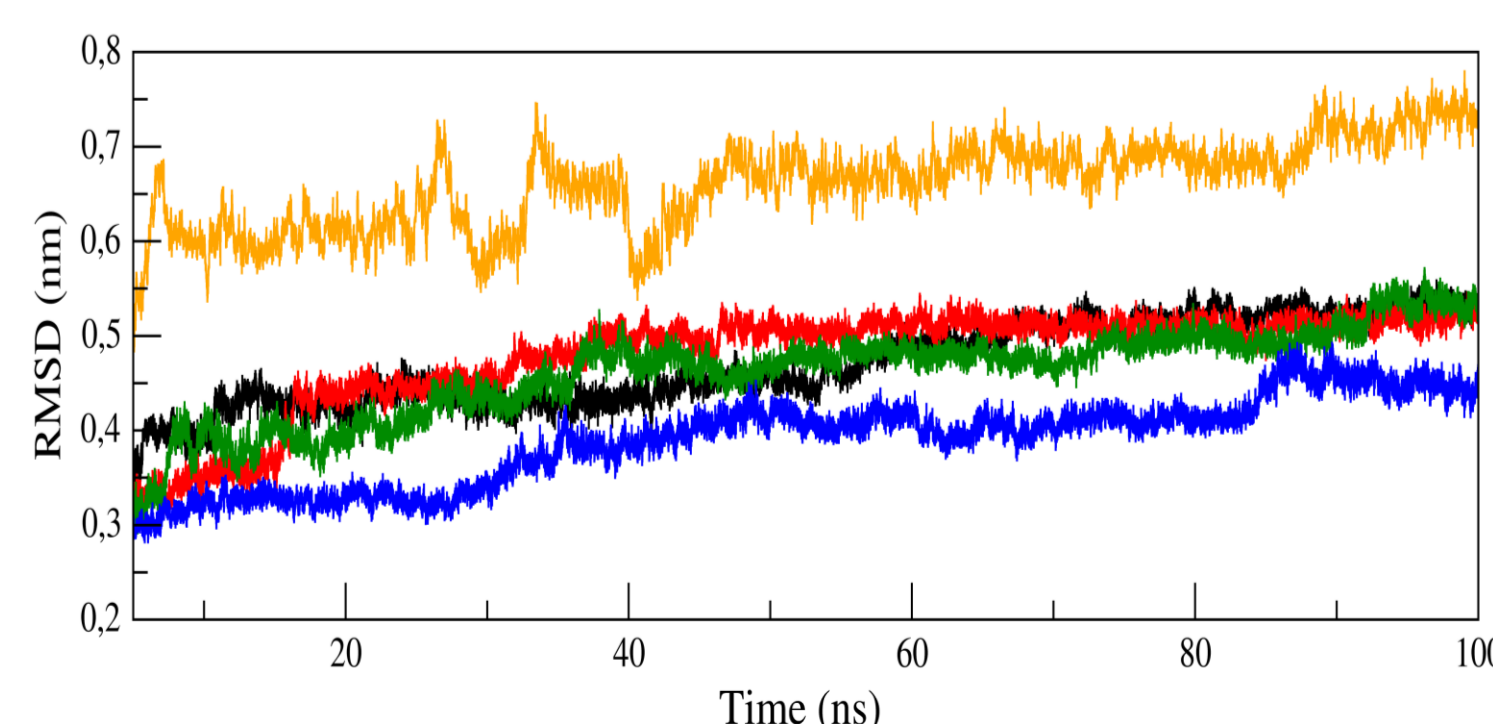
## 4. Resultados



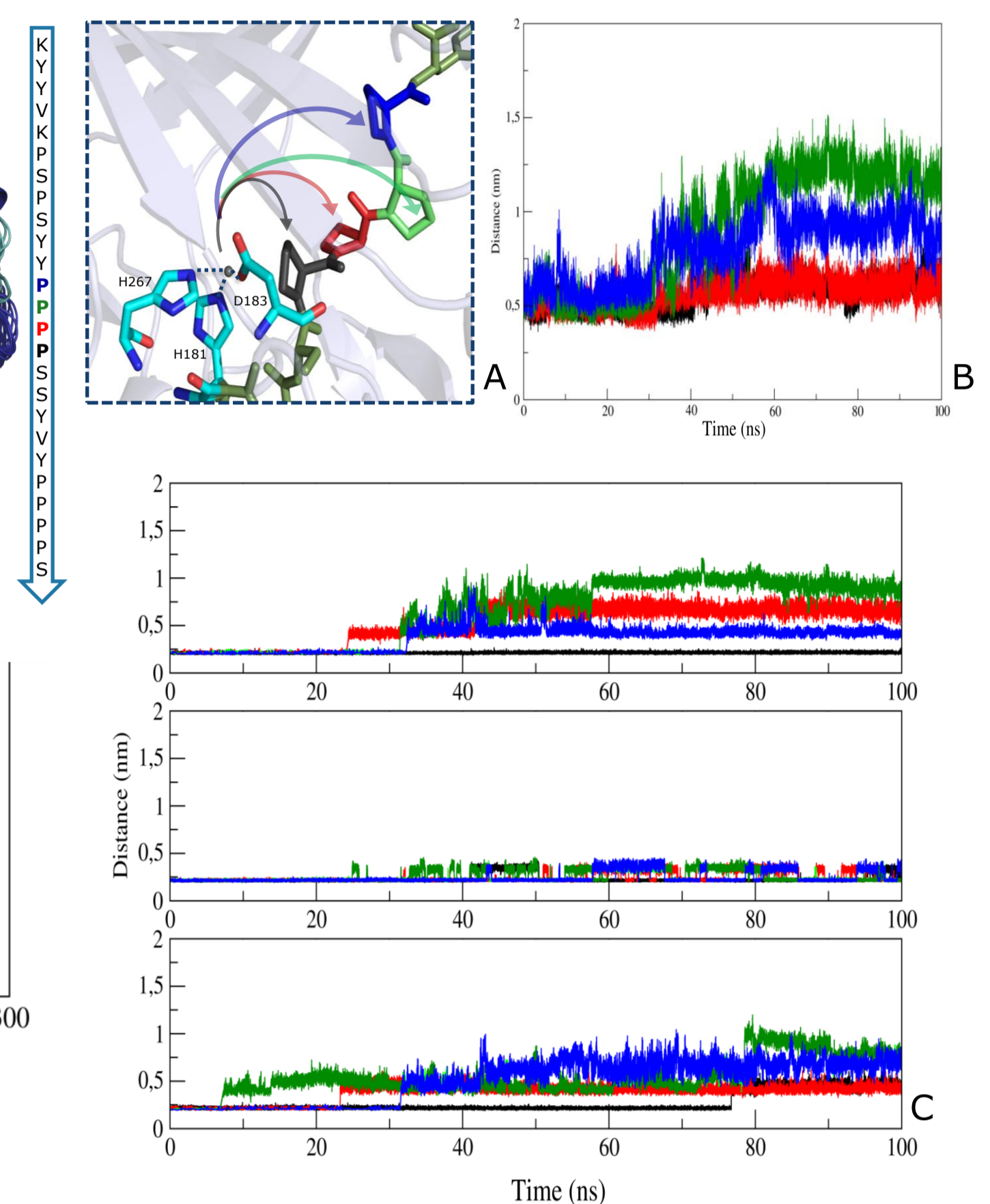
**Figura 2:** Nas estruturas, *frames* das simulações de DM estão sobrepostos. Resíduos diferentes de prolina estão alinhados para serem hidroxilados (Pro11, preto; Pro12, vermelho; Pro13, verde; Pro14, azul). Dois grupos de resíduos com alta flexibilidade estão marcados nas estruturas e no gráfico da análise de RMSF (*root mean square fluctuation*).



**Figura 3:** *Frames* das simulações de DM de P4H5 sem peptídeo EXT complexado. O excerto na direita mostra a visão inferior da estrutura, onde há um *loop* com alta flexibilidade que não cobre a cavidade da enzima durante a simulação. O mesmo *loop* apresenta alta flexibilidade nos modelos com o peptídeo acoplado, mas nestas simulações tende a ficar mais perto da cavidade com substrato.



**Figura 4:** Análise de RMSD (*root mean square deviation*). A enzima livre (em laranja) tem os valores mais altos de RMSD durante as simulações, indicando que o acoplamento do peptídeo EXT à P4H5 estabiliza a estrutura. Apesar do valor alto de RMSD, a P4H5 livre não está desnaturando. A modificação conformacional está localizada nas regiões destacadas na Figura 3, e o RMSD médio sem estas regiões é 0.437.



**Figura 5:** **A.** Representação esquemática das distâncias medidas em (B) e (C). **B.** Medida da distância entre o íon co-fator da enzima e o carbono  $\gamma$  dos resíduos de prolina de cada modelo. **C.** Medida da distância entre o íon co-fator da enzima e os resíduos do sítio catalítico (primeiro gráfico para His181, segundo para Asp183 e terceiro para His267).

## 5. Conclusões

- Os resultados indicam que o acoplamento do peptídeo EXT à P4H5 estabiliza a estrutura da enzima, como observado pelos valores de RMSD;
- Há um *loop* na enzima que pode agir como um *flap*, controlado o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima;
- P4H5 parece ter um comportamento diferencial com as prolinas sequenciais nas extensinas;
- A conformação do motivo de Pro11 – Pro14 é alterada nas simulações em que as pontes de hidrogênio foram mantidas. Isso sugere que as mudanças conformacionais são importantes para catálise;
- Espera-se que estes resultados contribuam com os conhecimentos da formação de hidroxiprolina pelas P4Hs em EXT.

## 6. Perspectivas

- Realizar os mesmos experimentos usando P4H2.
- Realizar os mesmos experimentos usando hidroxiprolina em posições específicas.
- Realizar experimentos similares com oligômeros de P4Hs.

## 7. Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), MCT, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), MEC, Brasília-DF, Brazil.

## 8. Referências

- [1] Velasquez, S. M. et al.: *Plant Sign. & Behavior*. **2011**, 6, 1600.
- [2] Velasquez, S. M. et al.: *Science*. **2011**, 332, 1401.
- [3] Koski, K. M. et al.: *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 25290.
- [4] Sanchez, R. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **2000**, 28, 250.
- [5] Guex, N. and Peitsch, M.C.: *Electrophoresis*. **1997**, 18, 2714
- [6] van der Spoel, D. et al.: *J. Comput. Chem.* **2005**, 26, 1701.
- [7] Scott, W. R. P. et al.: *J. Phys. Chem. A*. **1999**, 103, 3596.