

Identificação e análise filogenética dos genes codificantes da enzima fosfolípido diacilglicerol acyltransferase (PDAT) em algas e seu papel no metabolismo de lipídios.

Oliveira, Y¹; Bohn, B¹; Cagliari, A¹.

¹ Universidade Estadual do Rio Grande do Sul - UERGS - Santa Cruz do Sul-RS

Introdução

A demanda por energia no planeta só aumenta e junto a esse aumento a necessidade constante de uma alternativa a principal fonte de energia do planeta hoje; os combustíveis fósseis. Uma dessas alternativas são biocombustíveis que mais precisamente o biodiesel vêm se mostrando como alternativa eficaz aos derivados do petróleo; geralmente proveniente de óleos vegetais. Uma nova fonte para a produção de biodiesel que vem se mostrando eficaz são as microalgas isso por sua alta produção de óleo. Inúmeras algas vêm sendo analisadas buscando-se por variedades que apresentam uma maior capacidade de armazenamento lipídico. Porém o metabolismo lipídico, em especial a formação de TAGs (principal forma de armazenamento de lipídios em organismos vivos os triacilglicerídeos), é muito menos compreendido em algas do que em plantas superiores.

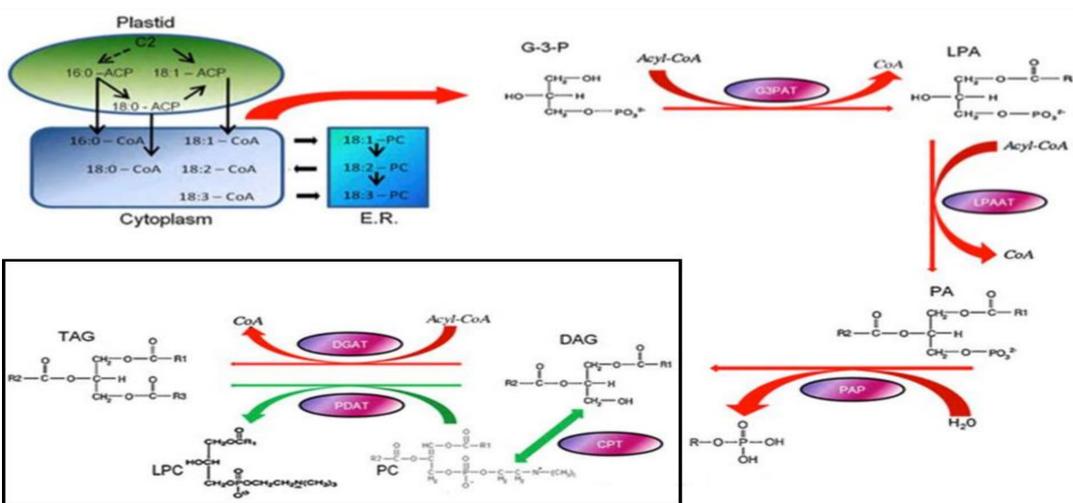


Figura 1. Biossíntese de triacilglicerol. Esquema geral da síntese de TAG em algas. A síntese de Ácidos graxos (AG) ocorre em plastídeos. No passo seguinte, o AG é incorporado num esqueleto de glicerol, levando à formação de TAG. As setas vermelhas indicam a via dependente de Acil-CoA (rota de Kennedy). Setas verdes indicam vias alternativas de biossíntese de TAG (Acil-CoA-independente). As enzimas envolvidas na biossíntese de TAG estão apresentadas como formas ovais: glicerol-3-fosfato aciltransferase (G3PAT), aciltransferase lisofosfatídico ácido (LPAAT), fosfatase fosfatidato (PAP), diacilglicerol aciltransferase (DGAT), fosfolípido:diacilglicerol aciltransferase diacilglicerol (PDAT) e colina fosfotransferase (CPT). ACP: proteína transportadora de acilo; G3P: glicerol-3-fosfato; LPA: ácido lisofosfatídico; PA: ácido fosfatídico; DAG: diacilglicerol; TAG: triglicerídeos; PC:fosfatidilcolina; PC:lisofosfatidilcolina.

Uma das principais enzimas envolvidas no acúmulo de lipídios na forma de TAGs é a enzima fosfolípido diacilglicerol aciltransferase (PDAT). Esta enzima tem atividade de transacilase, que consiste na remoção de um grupamento acila de um fosfolípido e sua posterior incorporação a uma molécula de 1,2diacilglicerol (DAG), resultando na formação de TAG.

Objetivo

Identificar, anotar e realizar uma análise filogenética dos genes PDAT e seus representantes de algas.

Metodologia

As sequências codificantes das proteínas PDAT melhor caracterizadas e presentes em *Arabidopsis thaliana* foram usadas como iscas para buscas usando a ferramenta BLAST (BLASTN) realizadas contra o banco de dados Phytozome (<http://www.phytozome.org/>). Após isso, os domínios proteicos presentes em todos os gene PDAT foram analisados utilizando o programa MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/>). A análise filogenética usando as sequências consenso completas das proteínas G3PAT identificadas foi realizada utilizando o software BEAST v.1.4.7 (20 milhões de gerações) a fim de verificar a relação filogenética entre os genes identificados.

Apoio

UERGS – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul
FAPERGS – Fundação de Amparo a pesquisa do Rio Grande do Sul
CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Resultados e Discussão

Identificamos ao todo 7 genes em algas referente a busca realizada pelo domínio/isca AT5G13640.1. Onde foi constatado que a localização subcelular predita em organelas celulares e também no citoplasma, não apresentando domínio transmembrana, nem peptídeo sinal. (Tabela 1)

Tabela 1. Análise de Domínio transmembrana, localização subcelular e peptídeo sinal no gene PDAT em algas

Espécie	Acrônimo	ISCA At5g13640		
		TRANSMEMBRANA TMHMM	LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR CELLO	Peptídeo sinal SignalP
<i>Volvox carteri</i>	VcPDAT*1	NÃO	Membrana Plasmática/ Cloroplasto/ Mitocondria	NÃO
	VcPDAT*2	NÃO	Membrana Plasmática	NÃO
<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>	CsPDAT*1	NÃO	Citoplasma	NÃO
	CsPDAT*2	NÃO	Citoplasma	NÃO
<i>Micromonas pusilla</i>	MpPDAT*1	SIM	Mitocondria /Cloroplasto	NÃO
<i>Micromonas sp</i>	MsPDAT*1	SIM	Cloroplasto	NÃO
<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	OIPDAT*2	NÃO	Mitocondria /Cloroplasto	NÃO

Utilizando a plataforma/ferramenta MEME, foi verificado que essas sequencias contém os domínios PDAT conservados. (Figura 2)



Figura 2. Análise da conservação da sequência dos domínios PDAT sendo eles Lid domain, R. E., S. P. A análise dos 7 genes PDAT foi realizada à frequência relativa correspondente sendo que altura total em cada pilha indica a sequência conservada em cada posição. A altura de cada letra é proporcional as repetições dos aminoácidos nos 7 genes. Os aminoácidos estão coloridos conforme sua propriedade química: Azul para a maioria dos resíduos hidrofóbicos (A, C, F, I, L, V e M); Verde para polares, sem carga, sem resíduo alifático (N, Q, S e T); Vermelho para resíduos positivamente carregados (K e R); Laranja para glicina (G); Rosa para histidina (H); amarelo para prolina (P) e turquesa para tirosina (Y).

Identificamos cópias de domínio PDAT em todos os organismos analisados, variando de uma a 20 cópias. Onde esses genes apresentaram uma grande conservação em seus domínios. O resultado da árvore filogenética, foi que as espécies se alinham de acordo com sua localização subcelular formando um grupo filogeneticamente mais próximo. (Figura 3)

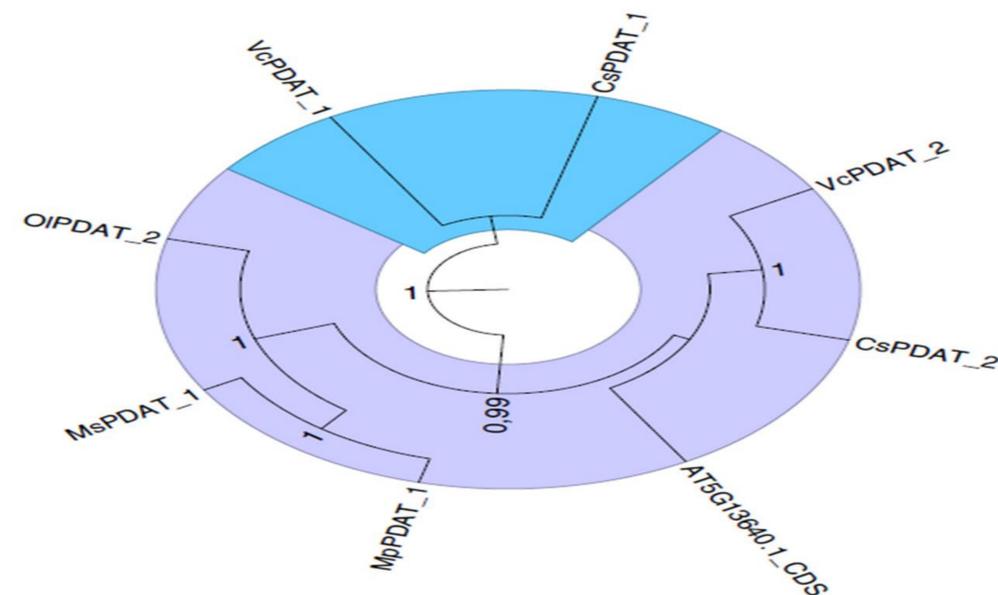


Figura 3. Análise Bayesiana que relaciona os genes da enzima PDAT, em azul e azul claro