# FÁBIO NEVES DO AMARAL

Desenvolvimento de ensaios para a determinação da atividade enzimática das aldeído desidrogenases de cordados invertebrados

> Tese apresentada ao Programa de Pósgraduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo 2018

# FÁBIO NEVES DO AMARAL

# Desenvolvimento de ensaios para a determinação da atividade enzimática das aldeído desidrogenases de cordados invertebrados

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. José Xavier Neto

São Paulo 2018

#### CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Neves do Amaral, Fábio Desenvolvimento de ensaios para a determinação da atividade enzimática das aldeído desidrogenases de cordados invertebrados / Fábio Neves do Amaral; orientador José Xavier Neto. -- São Paulo, 2018. 68 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Aldeído desidrogenases. 2. Evolução. 3. Cordados. 4. Vertebrados. 5. Estrutura Molecular . I. Xavier Neto, José, orientador. II. Título.



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000 Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

# CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **780/2015** referente ao projeto intitulado: *"Estudos de estrutura e função de aldeído desidrogenases envolvidas em vias de detoxificação e sinalização celular"* sob a responsabilidade de Fábio Neves do Amaral e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **José Xavier Neto**, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela **CEPSH** - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 25 de novembro de 2015

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. Paolo M. A. Zanotto Coordenador CEPSH ICB/USP

E	XPEDIÇÃO
DA	TA 03, 12, 2015
RE	EL. N.º

Dedico este trabalho a minha família por todo incentivo e apoio.

# Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Dr. José Xavier Neto, pela oportunidade, confiança e paciência.

Ao Dr. Alexander R. Moise, pela colaboração intelectual e pelas valiosas dicas na execução dos experimentos.

À Dra. Ana Carolina M. Figueira e Dra. Juliana Fattori por auxiliarem nos experimentos e abrirem as portas do Laboratório de Espectrometria e Calorimetria do LNBio.

À minha companheira, Lilo, pelo apoio e amor incondicional em todos os momentos.

Ao meu filho, Daniel, por trazer luz e alegria para os meus dias.

Aos meus pais e meus irmãos, muito obrigado. Sem vocês, eu não conseguiria chegar até aqui.

À Luana, pelos momentos compartilhados na bancada e por me ajudar com as correções da tese.

À Hoza, que mesmo estando em outro país, me apoiou em um dos momentos mais difíceis dessa trajetória. Agradeço também ao Wilker, por ser uma extensão dos cuidados dela no Brasil.

Aos amigos Fábio 4F, Tailise e Lara, por levarem a relação de amizade para além da bancada.

Aos amigos do laboratório, por todas as conversas e risadas que tornaram esse período mais leve. Em especial, gostaria de agradecer aos amigos do Laboratório de Modificação do Genoma, Murilo, Angela Costa, Ângela Saito, Giulia e Bárbara.

Ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, pela estrutura e equipamentos disponibilizados, sem os quais esse trabalho não seria possível.

Aos alunos, técnicos e pesquisadores do LNBio, que de alguma forma contribuíram para a execução desse projeto.

À FAPESP, pelo financiamento concedido para a realização desse trabalho.

"A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro." Albert Einstein

#### Resumo

Neve FA. Desenvolvimento de ensaios para a determinação da atividade enzimática das aldeído desidrogenases de cordados invertebrados. [tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2018.

O presente projeto representa uma extensão dos paradigmas que criamos com estudos de simulação molecular para compreender as frequentes mudanças de estrutura e função das Aldeído Desidrogenases (ALDHs) durante a evolução. As ALDHs formam uma superfamília de proteínas que catalisam a oxidação de vários aldeídos, mas as origens evolutivas das preferências pelos seus substratos são pouco conhecidas. Apesar de possuírem uma elevada identidade sequencial, duas destas ALDHs, a ALDH1 e a ALDH2, exibem distintos papéis funcionais de sinalização celular e detoxificação, respectivamente. Através de prévia análise computacional e filogenética, identificamos que, curiosamente, as ALDH1s de organismos invertebrados, Branchiostoma floridae e Ciona intestinalis apresentam características estruturais mais semelhantes às de suas ALDH2s do que das ALDH1 típicas. Isto sugere que essas ALDH1s divergentes podem ter evoluído na direção da atividade de degradação de aldeídos pequenos e tóxicos, que parecem representar a função ancestral das ALDH2s eucarióticas. Nossa análise identificou três assinaturas de aminoácidos localizadas na área interna do canal de entrada do substrato (CES) que distinguem as ALDH1 das ALDH2. Desta forma, constatamos que as ALDH1s possuem um CES amplo e desobstruído, consistente com o fato destas enzimas catalisarem aldeídos de cadeia longa como o retinaldeído, que é um precursor de vias de sinalização por retinóides. Em contraste, as ALDH2s possuem o CES pouco volumoso e constrito, consistente com sua função na degradação de pequenos aldeídos tóxicos e reativos, como o acetaldeído. Neste projeto o nosso objetivo é analisar a correlação funcional e estrutural entre as ALDH1 e ALDH2 presentes em B. floridae e C. intestinalis para desvendar e compreender seus papéis funcionais e evolutivos em cordados. Especificamente, testaremos a hipótese de que as três assinaturas descritas constituem o núcleo fundamental da preferência por substratos, e que sua inversão por mutações sitio-dirigidas entre ALDH1 e ALDH2 modificará a preferência de substrato de acordo com a origem da assinatura. Se confirmado experimentalmente, este será um exemplo pioneiro de reversão evolutiva molecular, que terá impacto direto sobre as interpretações atuais sobre controversa lei de Dollo da irreversibilidade evolutiva.

Palavras-chave: Aldeído desidrogenases, evolução, cordados, vertebrados, estrutura molecular.

## Abstract

Neve FA. Assays' developments for the determination of the enzymatic activity of aldehydes dehydrogenases of invertebrate chordates. Doctoral thesis (Cell and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2018.

This project represents an extension of the paradigms that we created from our molecular simulation studies to understand the frequent structure and function changes of aldehyde dehydrogenases (ALDH) during evolution. The ALDHs form a superfamily of proteins that catalyze the oxidation of several aldehydes, but the evolutionary origins of their substrate preference are unknown. Despite having a high sequence identity, two of these ALDHs, the ADLH1, and ALDH2, exhibit distinct functional roles of cellular signaling and detoxification, respectively. Through previous computational and phylogenetic analysis, we found that, interestingly, the ALDH1s of invertebrate organisms (Branchiostoma floridaeand Ciona intestinalis) show structural features more similar to their ALDH2s than the typical ALDH1. It suggests that these divergent ALDH1sevolved to provide small aldehydes detoxification pattern, what seems to represent the ancestral eukaryotic ALDH2s function. Our analysis also identified three aminoacid signatures, located internally in the substrate entry channel (SEC), that distinguishes the ALDH1 from ALDH2. Thus, we find that ALDH1s have a wide, open and unobstructed SEC, consistent with the fact that these enzymes catalyze bulky long-chainaldehydes, like retinaldehyde, a precursor of important signaling pathways. In contrast, the ALDH2s have a small and constricted SEC, consistent with the degradation function of small aldehydes, like the toxic metabolite acetaldehyde. In this project, our objective is to understand the functional and structural correlation between ALDH1 and ALDH2 found in B. floridae and C. intestinalisto discover and comprehend their functional and evolutionary roles in chordates. Specifically, we will test the hypothesis that the three signatures described above are the fundamental core of the substrate preference, based on the signature origin. If confirmed experimentally, this will be a pioneeringexample of evolutionary molecular reversion, impacting directly on the current interpretations of the controversial Dollo's Law of Irreversibility.

**Keywords:** Aldehyde dehydrogenases, evolution, chordates, vertebrates, molecular structure.

# Lista de ilustrações

Figura 1 –	Pictogramas representando os três principais resíduos que distin- guem as ALDH1 (linha superior) das ALDH2 (linha inferior) em verte- brados. A frequência dos resíduos é demonstrada pela altura da letra	
	que representa o aminoácido.	20
Figura 2 –	Simulação da estrutura do canal de entrada de substratos (CES) em ALDH1 e ALDH2, comparados a dois aldeídos de diferentes tamanhos, possibilitando visualizar a restrição de entrada de aldeídos grandes na ALDH2 devido à presença de residuos de aminoácidos mais volumosos: metionina (Met124~124 3, em volume de van der Walls) na entrada, fenilalanina (Phe459~135 3) no terço proximal e císteina (Cys303~863) no fundo da CES. Em ALDH1, esses resíduos são normalmente menos volumosos, como a glicina (Gly124~483),	
	a valina (Val459 $\sim$ 93Å3 ) e a isoleucina (Ile303 $\sim$ 124 3 )	21
Figura 3 –	Mecanismo de trava molecular representado pelos resíduos Phe459	
	e Cys303	22
Figura 4 –	Mecanismo do processo de catálise realizado pela ALDH (1, 2 e 3).	
	Adaptado de Muños-Clarez, R.A., 2011	23
Figura 5 –	Esquema da reação de conversão da resazurina em resorutina, com	05
Figura 6 –	ALDHs de <i>Ciona intestinalis</i> e <i>Branchiostoma floridae</i> após purifica- ção por batch e FPLC ( <i>B. floridae ALDH2</i> , <i>B. floridae ALDH1A</i> , <i>B</i> <i>floridae ALDH1B</i> , <i>C. intestinalis ALDH2</i> , <i>C. intestinalis ALDH1C</i> , <i>C.</i> <i>intestinalis ALDH1A</i> ). Note que a proporção de ALDH1A de <i>C. intes-</i> <i>tinalis</i> pura é consideravelmente maior do que a obtida para outras <i>ALDHs</i> , o que justifica sua escolha para o início das caracterizações	35
	posteriores	38
Figura 7 –	Dynamic light scattering (DLS) realizado com as proteínas ALDH1A2 de <i>H. sapiens</i> (R2m1GF) e ALDH1A de <i>C. intestinalis</i> (Cialdh1A_GF) obtidas após filtração em gel (GF). R = Raio de giro. %Pd = Índice de polidispersão. %Int = Intensidade da população. A %Int indica a proporção de cada espécie molecular, enquanto a %Pd indica a	
Figura 8 –	variação da dispersão da espécie molecular em solução Gel Nativo de proteínas. As bandas dentro do retângulo mostram que há presença de uma única espécie molecular de ALDH1A de <i>Ciona</i>	39
	<i>intestinalis</i> (duplicata)	41

Figura 9 –	Gel de eletroforese em SDS-Page de ALDH1C (A) e ALDH2 (B) de	
	Ciona intestinalis, mostrando que as adaptações introduzidas nos	
	protocolos de purificação resultaram em frações mais limpas após a	
	gel filtração. As bandas correspondem as ALDHs com ${\sim}58$ kDa. $$ .	43
Figura 10 -	Gráfico da leitura de ultravioleta (UV) da cromatografia em gel fil-	
	tração, mostrando os picos eluídos em aproximadamente 80mL e	
	coletados em frações de 1mL, contendo as proteínas ALDH1C (A) e	
	ALDH2 (B) purificadas (picos >100mAU).	44
Figura 11 -	Experimentos de Dynamic light scattering (DLS) com enzimas ALDH	
	sequencialmente purificadas e imediatamente após etapa de croma-	
	tografia por gel filtração. A- ALDH1C de Ciona intestinalis. B- ALDH2	
	de <i>C. intestinalis</i> . É possível observar uma amostra pura e monodis-	
	persa de ALDH1C, enquanto a ALDH2 apresenta alguns agregados,	
	representados pelos picos maiores que 10nm. C- A mesma amostra	
	de ALDH1C foi utilizada para ultracentrifugação apresentando perfil	
	semelhante ao observado através do DLS.	46
Figura 12 –	Km e Vmax da ALDH2 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtidos para	
	acetaldeído e NAD	48
Figura 13 –	Curvas de progresso da atividade enzimática de ALDH1A2 humana	
	expressa em bactérias e purificada em laboratório (A) e curva de	
	saturação (B). Note que apesar de boa atividade apresentada com	
	altas concentrações de substrato (superiores a 800 uM de octanal), a	
	reação não produziu sinal suficiente para registro em baixas concen-	
	trações de substrato, ( $\sim$ 5 uM), impedindo assim um cálculo realista	
	de Vmax e Km	50
Figura 14 –	Gráficos de velocidade vs concentração inicial de diferentes aldeí-	
	dos, realizados em triplicata, frente à ALDH1A de C. intestinalis (Ci-	
	ALDH1A). O Km e Vmax foram calculados usando o GraphPad Prism	
	6.00 (GraphPad Software, La Jolla California USA) e são mostrados	
	na tabela abaixo de cada gráfico.	53

- Figura 15 km para acetaldeído e retinaldeído determinados para representantes humanos do grupo das enzimas ALDH1 (ALDH1A1, a.k.a. RALDH1) e ALDH2 (HsALDH2). Note que as maiores diferenças entre Km se observam em relação ao substrato mais volumoso, ou seja, ao retinaldeído, enquanto que diferenças bem menos substanciais são encontradas para o acetaldeído, que apresenta uma molécula comparativamente muito menor. Os dados também nos permitem especular em favor de uma maior especialização da enzima RALDH1 (ALDH1A1). Os valores correspondentes às enzimas humanas ALDH1A1/RALDH1 e HsALDH2 foram extraídos de Klyosov, 1996.
- Figura 16 Relação entre Km (Log) e número de carbonos dos substratos aldeídicos para as ALDHs (aldeído desidrogenases) dos cordados invertebrados C. intestinalis e B. floridae representada em escala semi-logarítmica. Note que as ALDH1 de C. intestinalis (CiALDH1A) e de B. floridae (BfALDH1B) testadas, exibiram o padrão típico do grupo ALDH1, com aumento de afinidade (proporcional à recíproca do Km) paralelo ao incremento no volume do substrato (número de carbonos dos aldeídos), típico das ALDH1 humanas, como a HsALDHA1. Curiosamente, em contraste com a ALDH2 humana, que essencialmente não variou o Km em resposta ao incremento no volume do substrato, a ALDH2 de C. intestinalis mostrou comportamento semelhante às das enzimas do tipo ALDH1, crescendo o Km em paralelo ao volume do substrato. Os dados relativos às ALDHs de cordados invertebrados foram obtidos diretamente de nossos ensaios enzimáticos, enquanto que os valores correspondentes às enzimas
- Figura 17 Eficiências catalíticas (kcat/Km)de ALDH1A1/RALDH1 e ALDH2 de *Homo sapiens* frente aos substratos acetaldeído e retinaldeído. . .
- Figura 18 Painel da esquerda. Comparação entre as eficiências catalíticas (kcat/Km) da ALDH1 (CiALDH1A, verde) e da ALDH2 (CiALDH2, marron) de *C. intestinalis* representadas em escala semi-logaritmica. Painel da direita. Os dados de eficiência catalítica são apoiados pela representação em paralelo da evolução dos Km das enzimas frente aos diferentes substratos quando representados em escala linear. 59

55

57

59

# Lista de tabelas

Tabela 1 – Genes de C. intest	inalis e B. floridae e suas respectivas entradas ao	
banco de dados.		32

# Lista de abreviaturas e siglas

ALDH	Aldeído Desidrogenase
ANOVA	Análise de Variância
AR	Ácido Retinóico
CES	Canal de Entrada de Substratos
Cys	Cisteína
DLS	Dynamic light scattering
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GE	General Eletric
GF	Gel Filtração
Gly	Glicina
H2O	Agua
II	Dois
lle	Isoleucina
LB	Luria-Bertani (meio de cultura)
Met	Metionina
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (forma reduzida)
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
Phe	Fenilalanina
USA	United States of America
UV	Ultra Violeta
Val	Valina
VE	Ventrículo Esquerdo
Vmáx	Velocidade Máxima

# Lista de símbolos

Кm	Constante de	Michaelis

mM mili Molar

- nm Nanometro
- nM nano Molar

# Sumário

1	Introdução	18
1.1	ALDHs: papéis funcionais	18
1.2	ALDHs: relação estrutural e funcional	19
1.2.1	Regulação da função da ALDH pelas dimensões do canal de entrada	
	de substratos (CES)	22
1.2.2	Regulação da função ALDH por mecanismos de trava molecular	23
1.3	ALDHS e evolução	24
1.3.1	Papel fisiológico das ALDHs em invertebrados cordados que são	
	modelos de estudo para evolução de vertebrados	24
1.3.2	Evolução de novas preferências por substrato entre as ALDHs: papel	
	das duplicações genéticas	25
1.4	ALDHS: evolução molecular, direcionalidade, reversões e a lei	
	de Dollo	26
1.4.1	Direcionalidade do processo evolutivo enzimático	26
1.4.2	A lei de Dollo	27
1.4.3	Explorando a lei de Dollo	28
1.4.4	Reversão evolutiva enzimática e a interpretação de Gould da lei de Dollo	29
1.4.5	Reversão evolutiva de ALDHs em oposição à interpretação de retorno	
	pela mesma via	30
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivos Gerais	33
2.2	Objetivos específicos	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1	Subclonagem	34
3.2	Expressão e purificação	34
3.3	Análises funcionais	35
3.4	Análise estatística	35
4	RESULTADOS e DISCUSSÃO	37
4.1	Sub-clonagem	37
4.2	Expressão e purificação	37
4.3	Ensaios biofísicos	38
4.4	Ensaios de "Thermal Shift"	40
4.5	O desafio de purificação da ALDH1C de <i>Ciona intestinalis</i> e aper-	
	feiçoamentos à técnica	44

4.6	Em busca de um protocolo de purificação de ALDHs otimizado	
	pela experiência	47
4.7	Ensaios cinéticos	48
4.7.1	Experiência inicial com reações catalisadas por ALDHs	48
4.7.2	Ensaios de atividade ALDH através da monitoração de NADH em 340	
	nm	48
4.7.3	Ensaios de atividade ALDH através da fluorescência de NADH	50
4.7.4	Padronização de um ensaio sensível para atividade de ALDH	51
4.7.5	Constantes cinéticas enzimáticas para a ALDH1A de Ciona intestinalis:	
	modelo de estudo	52
4.7.6	Parâmetros cinéticos para ALDH1 (ALDH1A2, a.k.aRALDH2) e ALDH2	
	de Homo sapiens	54
4.7.7	Parâmetros cinéticos para ALDH1 e ALDH2 de Ciona intestinalis e	
	Branchiostoma floridae	55
4.7.8	A eficiência catalítica das ALDHs de Ciona intestinalis e Branchios-	
	toma floridae	58
4.7.9	O curioso comportamento da ALDH1C de Ciona intestinalis	59
5	CONCLUSÃO	61
	Referências	64

#### 1 Introdução

#### 1.1 ALDHs: papéis funcionais

As ALDHs constituem uma superfamília de proteínas muito versáteis, que catalisam a oxidação irreversível de uma grande diversidade de aldeídos (MARCHITTI et al., 2008). Todas as ALDHs partilham de uma estrutura tridimensional básica, mas possuem substratos aldeídicos de estrutura muito variada. Algumas destas enzimas estão relacionadas a funções cruciais como processos de detoxificação (CHEN et al., 2008a; CHEN; SUN; MOCHLY-ROSEN, 2010; HUA; WEISS, 2004; MA et al., 2010; MA et al., 2011a) e sinalização celular em uma grande variedade de organismos de diferentes níveis de complexidade (SIMÕES-COSTA; AZAMBUJA; XAVIER-NETO, 2006; YOSHIDA et al., 1998). Por estas razões, as ALDHs são úteis como modelos de estudo de mecanismos de evolução proteica e de suas implicações funcionais (EMSLEY; COWTAN, 2004; STRELOW et al., 2012). Além disto, do ponto de vista de patologias humanas e de inovação farmacológica, as ALDHs são alvosterapêuticos para pesquisa de novos fármacos como, por exemplo, agentes de proteção contra dano de isquemia e reperfusão (CHEN et al., 2008b; CHEN; SUN; MOCHLY-ROSEN, 2010; HUA; WEISS, 2004; MA et al., 2010; MA et al., 2011b; SALASPURO, 2011; ZHANG; REN, 2011) (EMSLEY; COWTAN, 2004; STRELOW et al., 2012). Os diversos aldeídos catalisados pelas ALDHs específicas caracterizam os seus distintos papéis funcionais. O ácido retinóico (AR), por exemplo, é resultante da oxidação do retinaldeído pelas ALDH1 (e.g. ALDH1A1, ALDH1A2 e ALDH1A3), que é a etapa final e irreversível da rota de síntese de retinóide (CAMPO-PAYSAA et al., 2008). O AR modifica a transcrição de genes que, por sua vez, regulam funções como diferenciação e crescimento de vários tecidos durante o desenvolvimento embrionário (DUESTER, 2008). Alterações nos níveis de AR culminam em malformações de vários tecidos embrionários, e seus efeitos dependem do tecido e do estágio da organogênese no gual houve alterações (MAR-CHITTI et al., 2008; CAMPO-PAYSAA et al., 2008; DUESTER, 2008; HOCHGREB et al., 2003; NIEDERREITHER et al., 2002). As ALDH1 estão diretamente relacionadas com a regulação dos níveis de AR em múltiplos tecidos, o que indica um importante papel de controle do grupo de enzimas sobre esta via de sinalização (CAMPO-PAYSAA et al., 2008). Outro exemplo é configurado por pequenos aldeídos como o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) (CHEN et al., 2008b; CHEN; SUN; MOCHLY-ROSEN, 2010) e o acetaldeído (SHI-YAN LI; MARK GOMELSKY; JINHONG DUAN; ZHAOJIE ZHANG; LARISSA GOMELSKY; XIAOCHUN ZHANG; PAUL N. EPSTEIN; JUN REN, 2004; BOYD; O'BUCKLEY; MORROW, 2008), que são compostos tóxicos altamente reativos, e que, portanto, demandam mecanismos eficientes de inativação. Esta função é desempenhada por enzimas como a ALDH2, que oxidam estes pequenos aldeídos até seus correspondentes ácidos carboxílicos menos tóxicos que, por sua vez, são excretados ou reutilizados pelo organismo, o que representa uma ação protetora exercida por este grupo de enzimas (CHEN et al., 2008b; MA et al., 2010; MA et al., 2011b; BOYD; O'BUCKLEY; MORROW, 2008).

#### 1.2 ALDHs: relação estrutural e funcional

Um exemplo muito claro da versatilidade funcional que é alcançada pelas ALDHs a despeito de possuírem, essencialmente, a mesma estrutura tridimensional básica, é fornecido pelas enzimas do tipo ALDH1 e ALDH2. Apesar das claras distinções funcionais aludidas acima, ALDH1 e ALDH2 possuem identidade geral de 68%. Consistente com esta semelhança, nós mostramos através de ferramentas bioinformáticas que, inclusive, ALDH1 e ALDH2 fazem parte de um mesmo grupo natural (i.e. grupo formado por um ancestral e todos os seus descendentes), o qual nós denominamos clade ALDH1/2, contrariamente à noção clássica de que estas enzimas representariam famílias distintas (SOBREIRA et al., 2011). Tanto para ALDH1, quanto para ALDH2, a preferência pelos seus substratos está relacionada à estrutura do canal de entrada do substrato (CES). Esta estrutura está localizada nas porções globulares dos monômeros que se unem através da região de oligomerização para formar um tetrâmero, originando assim quatro sítios catalíticos livres em sua forma de enzima funcional (SOBREIRA et al., 2011; B. et al., 2011; PEREZ-MILLER et al., 2010). Nas ALDH1, que catalisam aldeídos de cadeia lateral longa como o AR, estes canais tem um volume interior maior, quando comparadas às ALDH2, que catalisam pequenos aldeídos (SOBREIRA et al., 2011). Estudando os aminoácidos que formam as várias regiões deste canal, nós encontramos cerca de 34 resíduos especialmente conservados nas sequências de ALDH1 e de ALDH2. Estes aminoácidos são suficientes para distinguir ALDH1 e ALDH2 de vertebrados, ou seja, são assinaturas específicas para ALDH1 ou para ALDH2. Três desses resíduos (Figura 1) estão localizados em posições cruciais para a conformação interna do CES (SOBREIRA et al., 2011) : a entrada (resíduo 124), o terço proximal (resíduo 459), e o fundo do canal (resíduo 303).

Figura 1 – Pictogramas representando os três principais resíduos que distinguem as ALDH1 (linha superior) das ALDH2 (linha inferior) em vertebrados. A frequência dos resíduos é demonstrada pela altura da letra que representa o aminoácido.



Sobreira et. al., 2011

Dependendo do tamanho do aminoácido localizado nestas posições, o CES sofre modificações que impedem, ou que permitem a entrada de aldeídos grandes (SO-BREIRA et al., 2011) (Figura 2). Além disto, a interação entre dois desses resíduos (303 e 459) ora torna possível a permanência de aldeídos pequenos próximos ao sítio catalítico por tempo suficiente para a catálise no caso da ALDH2, ora a inviabiliza, como no caso da ALDH1 (SOBREIRA et al., 2011) (Figura 2).

Figura 2 – Simulação da estrutura do canal de entrada de substratos (CES) em ALDH1 e ALDH2, comparados a dois aldeídos de diferentes tamanhos, possibilitando visualizar a restrição de entrada de aldeídos grandes na ALDH2 devido à presença de residuos de aminoácidos mais volumosos: metionina (Met124~124 3, em volume de van der Walls) na entrada, fenilalanina (Phe459~135 3) no terço proximal e císteina (Cys303~863) no fundo da CES. Em ALDH1, esses resíduos são normalmente menos volumosos, como a glicina (Gly124~483), a valina (Val459~93Å3) e a isoleucina (Ile303~124 3).



Sobreira, T. J. et. al., 2010



Figura 3 – Mecanismo de trava molecular representado pelos resíduos Phe459 e Cys303.

1.2.1 Regulação da função da ALDH pelas dimensões do canal de entrada de substratos (CES)

Na entrada do CES, na posição 124, a ALDH2 apresenta um aminoácido com um radical volumoso voltado para a porção interna, diminuindo sua entrada, como por exemplo, a Metionina (Met124), que contrasta com a pequena molécula de Glicina (Gly124) presente na mesma posição nas ALDH1. Esta configuração seleciona o tamanho dos aldeídos que podem acessar a região onde está a Cisteína catalítica (Cys302), e é um dos mecanismos principais na seleção de substrato das ALDH1 e ALDH2. Uma vez que haja esta substituição para um aminoácido maior na posição 124, como nas ALDH2s, dificilmente um aldeído grande como o retinaldeído conseguirá acessar o canal.

#### 1.2.2 Regulação da função ALDH por mecanismos de trava molecular

Na posição 459, que corresponde ao terço proximal do CES, a ALDH2 apresenta uma Fenilalanina, enquanto as ALDH1 apresentam aminoácidos menores, como a Valina ou Leucina. Por último, na posição 303, no fundo do canal, próximo à Cys302 catalítica, as ALDH2 apresentam uma Cisteína, enquanto as ALDH1 apresentam Treonina, Isoleucina ou Valina . Nós sugerimos que estas assinaturas de aminoácidos possuem impacto direto na eficiência do acoplamento de pequenos substratos aldeídicos ao sítio catalítico. Por exemplo, na ALDH2, tanto Cys303 quanto Phe459 mantém o aldeído próximo à porção catalítica da Cys302. Esta Phe459, que é estabilizada pela Cys303, mantém "fixa" a Phe465 (conservada em todas as ALDH1 e ALDH2), que junto com a Cys302, mantém o aldeído próximo ao  $\gamma$ -sulfur catalítico (Figura 3), o que é fundamental para que a reação ocorra 22 (Figura 4).

Figura 4 – Mecanismo do processo de catálise realizado pela ALDH (1, 2 e 3). Adaptado de Muños-Clarez, R.A., 2011.

![](_page_23_Figure_4.jpeg)

Significativamente, este complexo mecanismo que mantém os aldeídos de cadeia curta próximos à Cys302 durante a reação em enzimas do tipo ALDH2 não existe nas ALDH1, na qual as interações entre Cys303 e Phe459 não são possíveis devido às suas respectivas substituições nestas posições, o que, virtualmente, anula a eficiência catalítica destas sobre aldeídos menores como o acetaldeído ou o formal-

deído (SOBREIRA et al., 2011). Em resumo, a ausência deste mecanismo de trava é importante na especificidade das ALDH1, uma vez que os aldeídos(SOBREIRA et al., 2011)menores tendem a não se manterem próximos ao resíduo catalítico por tempo suficiente, diminuindo o espectro de substratos utilizados. Estes mecanismos podem ser observados nos vídeos que criamos a partir de nossas simulações computacionais que demostram, respectivamente, como se comporta o acetaldeído no CES da ALDH2 e ALDH1 e o formaldeído no CES ALDH123 (SOBREIRA et al., 2011).

#### 1.3 ALDHS e evolução

Analisando filogeneticamente a ALDH1 e a ALDH2 em nossos trabalhos anteriores, foi possível concluir que, em eucariotos, elas divergiram de um ancestral ALDH1/2 comum (SOBREIRA et al., 2011). Utilizando técnicas computacionais de reconstrução das sequências de aminoácidos ancestrais (Análise de máxima verossimilhança (SO-BREIRA et al., 2011)) nós mostramos que o ancestral comum ALDH1/2 possuía um perfil estrutural (e provavelmente uma função) compatível com o perfil de detoxificação, semelhante à função desempenhada pelas ALDH2s atualmente encontradas em vertebrados (SOBREIRA et al., 2011). Isto sugere que o perfil de sinalização das ALDH1s só foi adquirido, posteriormente, com as mudanças evolutivas na estrutura do canal que tornaram possível a acomodação de aldeídos maiores, mas tendo como consequência importante a perda do mecanismo de trava de pequenos substratos pré-existente, que era crucial para a função de detoxificação.

1.3.1 Papel fisiológico das ALDHs em invertebrados cordados que são modelos de estudo para evolução de vertebrados

Durante nossos estudos sobre a evolução das ALDHs, alguns animais cordados (animais que em algum estágio de seu desenvolvimento apresentam a notocorda, uma estrutura axial localizada ventralmente ao tubo neural, o que inclui cefalocordados, tunicados e vertebrados) que vêm sendo estudados como modelos para compreender a origem dos vertebrados (e.g. o representante dos cefalocordados, *Branchiostoma floridae* e o membro dos tunicados, *Ciona intestinalis*) nos chamaram a atenção por representarem os grupos externos mais próximos dos vertebrados na filogenia (ALBALAT et al., 2011; HOLLAND; LAUDET; SCHUBERT, 2004; HOLLAND et al., 2008; LEMAIRE; SMITH; NISHIDA, 2008; SCHUBERT et al., 2006; SWALLA; XAVIER-NETO, 2008) e por apresentarem oportunidades únicas para esclarecer a evolução de mecanismos

de sinalização como, por exemplo, o do AR (CAMPO-PAYSAA et al., 2008; MARLÉ-TAZ et al., 2006). Nestes animais, além dos esperados representantes de ALDH1 e ALDH2, tanto *B. floridae* quanto *C. intestinalis* apresentam parálogos da ALDH1 que, curiosamente, possuem características moleculares semelhantes à ALDH2. Observamse estas semelhanças também em relação ao padrão de expressão. Nestas ALDH1 divergentes, o padrão de expressão tecidual durante a embriogenia tardia é tipicamente o de dispersão por virtualmente toda a extensão do embrião, o que se assemelha ao padrão de expressão observado para os genes ALDH2 de *B. floridae* e de *C. intestinalis* (SOBREIRA et al., 2011). Considerando este padrão de expressão disperso, é possível que as ALDH1s divergentes possam exercer algum tipo de papel de proteção tecidual contra pequenos aldeídos tóxicos, em uma função semelhante à da ALDH2. Por isso, para testar essa hipótese, um dos nossos objetivos é determinar o espectro de substratos utilizados por estas enzimas ALDH1 divergentes nestes organismos-modelo.

# 1.3.2 Evolução de novas preferências por substrato entre as ALDHs: papel das duplicações genéticas

É bastante provável que as transições estruturais e/ou funcionais entre ALDHs tenham se processado na vigência de um equilíbrio entre a funcionalidade e a estabilidade da proteína que garantisse a manutenção da atuação original das ALDH ancestrais, mesmo após mutações. Por isto, é plausível que a aquisição de novas preferências por substrato nas ALDHs ancestrais tenha demandado condições adicionais às mutações. Uma possibilidade é que novas preferências por aldeído tenham sido facilitadas pelo processo de duplicação que alguns desses genes sofreram. A duplicação cria a possibilidade de aumentar o controle da expressão gênica, modificar ou redistribuir os papéis funcionais do gene (HOLLAND; LAUDET; SCHUBERT, 2004; AHARONI et al., 2005; BRIDGHAM; ORTLUND; THORNTON, 2009; LYNCH; KATJU, 2004). No modelo clássico (LYNCH; KATJU, 2004), a duplicação precisa adquirir uma nova função para permanecer no organismo, enquanto no modelo DDC (CAÑESTRO; YOKOI; POSTLETHWAIT, 2007) (Duplicação-Degeneração-Complementação) é considerada asubfuncionalização. Na subfuncionalização ocorre a degeneração de parte da função total ancestral em ambas as cópias, de forma que uma cópia complementa a outra após a duplicação, preservando a função original (HOLLAND; LAUDET; SCHUBERT, 2004; AHARONI et al., 2005; BRIDGHAM; ORTLUND; THORNTON, 2009; LYNCH; KATJU, 2004; CAÑESTRO; YOKOI; POSTLETHWAIT, 2007) Em ambos os modelos, clássico e DCC, a efetividade da função final é equivalente à atividade original (o que leva à conservação das cópias). A partir daí, pode surgir a neofuncionalização de

uma ou mais cópias, o que possibilita a exploração de novas funções (LYNCH; KATJU, 2004). Em resumo, acreditamos que um estudo aprofundado da evolução molecular de proteínas extensamente caracterizadas como as ALDH1/2s pode iluminar muitos aspectos importantes e, provavelmente, comuns à evolução de muitos outros tipos de enzimas.

#### 1.4 ALDHS: evolução molecular, direcionalidade, reversões e a lei de Dollo

Como já abordado, durante sua evolução nos vertebrados, as ALDHs apresentaram reiteradas mudanças funcionais, inicialmente a partir de um perfil de detoxificação para um perfil de sinalização, mas também no sentido contrário, ou seja, de sinalização para detoxificação (SOBREIRA et al., 2011) . De forma resumida, vimos que em organismos invertebrados, as ALDHs sofreram modificações em sua estrutura e readquiriram um perfil enzimático ancestral, semelhante às ALDH2, a partir de cópias de suas ALDH1 (SOBREIRA et al., 2011). Embora não restem dúvidas de que transições evolutivas para novas funções sejam comumente observadas, a existência de regressão para funções originais, ou ancestrais, sempre foram controversas (COLLIN; MIGLIETTA, 2008; SJ., 1970). Contudo, durante os últimos anos, surgiram múltiplas evidências de que realmente existem reversões funcionais, e que estas são encontradas em muitos organismos (COLLIN; MIGLIETTA, 2008; SJ., 1970) . A possibilidade de reversão, evidenciada nestes dados recentes (COLLIN; MIGLIETTA, 2008; SJ., 1970), é consistente com os padrões que observamos computacionalmente acerca da evolução das ALDHs no que diz respeito à recuperação das formas ancestrais (no caso, atividade enzimática). Apesar da clara tendência atual de aceitação da existência de tais reversões, ainda há muito que esclarecer sobre como ocorrem essas transições entre duas funções.

#### 1.4.1 Direcionalidade do processo evolutivo enzimático

Intuitivamente, é fácil compreender que, quanto maior e mais complexa é a sequência de mutações que leva à evolução de uma nova função, menor é a probabilidade de uma função anterior ser completamente restaurada, o que tornaria, em última análise, o processo virtualmente irreversível (unidirecional). Desta forma, também é importante considerar a sequência das mutações. Por exemplo, existem mutações que, caso aconteçam, tornarão a proteína não funcional. Grande parte (30-50%) das regiões de um gene é sujeita a mutações que são fortemente deletérias, dificilmente fixadas durante a evolução sem a existência de mutações compensatórias em outras regiões (ROMERO; ARNOLD, 2009; BLOOM; ARNOLD, 2009). Além disto, as mutações que são responsáveis pela troca de função podem ser deletérias para cada conjunto específico de seguência, enovelamento e condição ambiental de cada proteína. Desta forma, ao analisar a evolução funcional de uma enzima, é possível que as mutações que condicionaram e que criaram a sua função atual não fossem "possíveis" nas suas ancestrais mais distantes (que possuíam uma estrutura "não permissiva" ou "restritiva"). Sendo assim, várias modificações ("permissivas") devem ter ocorrido até que a estrutura proteica pudesse suportar uma nova mutação que finalmente trouxesse a mudança efetiva de sua função. É bastante possível, e de fato já demonstrado experimentalmente (BRIDGHAM; ORTLUND; THORNTON, 2009), que o conjunto de mutações discutidas acima dificulte a possibilidade de reaguisição do estado anterior da proteína. Isto pode ocorrer quando é criada uma relação oposta entre as mutações permissivas e não permissivas na transição entre duas funções, aumentando a quantidade de mutações necessárias para efetivamente alterar a função (BRIDGHAM; ORTLUND; THORNTON, 2009). Assim, fica clara a ideia de que a ordem e a complexidade dos eventos evolutivos podem implicar na irreversibilidade da mudança, o que remete ao problema da direcionalidade do processo evolutivo.

#### 1.4.2 A lei de Dollo

A afirmação de que a transição entre dois estágios evolutivos acontece de forma unidirecional, e, portanto, de forma irreversível, faz parte da chamada de lei de Dollo da irreversibilidade (SJ., 1970), que estabelece que processos complexos perdidos ou ganhos dentro de uma filogenia não podem retornar ao seu estado anterior, o que, em teoria, também acontece em outros processos evolutivos que abrangem morfogenia e processos fisiológicos (SJ., 1970). Contudo, em uma interpretação mais atual da lei de Dollo (GOULD, S.J. 1970), é afirmado que a impossibilidade de retorno a um estado evolutivo anterior reside especificamente <u>apenas</u> na regressão através das mesmas etapas de modificação, ou seja, pela mesma via. A interpretação de Gould difere da interpretação da maioria dos autores, que consideram a impossibilidade de retorno prevista por Dollo (DOLLO, 1893) extensiva também a outras vias que não a via original de mudança, contanto que tenham o mesmo atributo fenotípico do estado anterior (SJ., 1970).

#### 1.4.3 Explorando a lei de Dollo

A interpretação da Lei de Dollo segundo Gould pode ser abordada como uma descrição probabilística, inferindo que se a quantidade de fatores a serem modificados é muito alta, a probabilidade de se recuperar uma característica seguindo exatamente a mesma seguência de mudanças na ordem inversa se torna muito baixa. Sob este ângulo, a Lei de Dollo assume uma forma bastante trivial e, talvez, indigna da repercussão que recebeu. No entanto, se ampliamos o espectro da lei de Dollo para incluir reversões atingidas também através de caminhos de mudança diversos dos originais, chegamos a opiniões que demandam uma discussão muito clara, pois, no limite, esta lei pode sugerir a negação de inúmeros eventos de reversão que sabidamente aconteceram durante o processo evolutivo (e.g. como se "funções complexas não pudessem reaparecer") (COLLIN; MIGLIETTA, 2008; SJ., 1970). Como discutido anteriormente, existem múltiplas evidências na natureza da possibilidade de reaparecimento de funções ancestrais perdidas há milhões de anos, como os dentes de galináceos (e.g. reversões, atavismos) (COLLIN; MIGLIETTA, 2008; SJ., 1970). Foi, inclusive, sugerida a existência de um intervalo de tempo genético, algo em torno de dez milhões de anos marsa(MARSHALL; RAFF; RAFF, 1994) que permitiria que regressões evolutivas ocorressem. Este intervalo está relacionado à possibilidade de um gene que contenha uma determinada função não seja utilizado e, com o decorrer do tempo, acumule mutações consideráveis que o tornem praticamente incapaz de retomar esta função. Desta forma, este intervalo mostraria a mesma relação probabilística e relacionada à quantidade de alterações discutida anteriormente. Entretanto, outros trabalhos mais recentes sugerem que este intervalo de tempo poderia ser um pouco maior (COLLIN; MIGLIETTA, 2008), mas ainda existem casos que ultrapassam muito este intervalo, como o surgimento de dentes em sapos (WIENS, 2011). Estes dados demonstram que as reversões evolutivas acontecem com frequência, mas, se expressam por vias diferentes das originais, o que reforça a ideia de que as conjecturas propostas originalmente por Dollo (DOLLO, 1893) são apenas inferências estatísticas. Em resumo, as diferentes interpretações sobre a lei de Dollo são atribuídas à falta de clareza nos seus textos quanto aos termos de irreversibilidade e complexidade (COLLIN; MIGLIETTA, 2008; SJ., 1970). Assim, é necessário um melhor conhecimento dos diversos paradigmas evolutivos e a observação da correlação entre esses exemplos morfológicos com o comportamento evolutivo enzimático. Considerando isto, é provável que o paradigma da lei de Dollo sobre a recuperação de uma função não seja canônico, e aconteça em alguns casos morfológicos específicos observados originalmente por ele. Mesmo se for considerada a reversão por uma mesma sequência inversa de alterações, esta lei deve ser vista com cautela e ser questionada inclusive sobre a importância destas afirmações como

termos de "lei" (COLLIN; MIGLIETTA, 2008; SJ., 1970), principalmente do ponto de vista molecular, contexto no qual se insere este projeto.

#### 1.4.4 Reversão evolutiva enzimática e a interpretação de Gould da lei de Dollo

Passando para um ponto de vista mais molecular, algumas evidências favorecerem essa teoria inicial de transição unidirecional sugerida por Dollo. Este é o caso do receptor de glicocorticoide (BRIDGHAM; ORTLUND; THORNTON, 2009), um membro da família dos receptores nucleares que, durante sua evolução natural, convergiu para uma função específica a partir de uma função mais promiscua. Nesse trabalho, foi descrita uma aparente dificuldade experimental em recuperar a função ancestral, no qual as modificações essenciais e supostamente suficientes para tal não conseguiram reverter a função enzimática. Assim, os receptores de glicocorticóide atuais (apresentando função específica) possuiriam uma estrutura restritiva para as mutações dirigidas à recuperação da função original (mais promíscua). Desta forma, foram necessárias mutações acessórias (permissivas), que modificavam o arcabouço proteico para suportar a "nova" configuração ancestral a ser inserida (BRIDGHAM; ORTLUND; THORNTON, 2009). Considerando este fato, a chance de ocorrerem estas alterações na proteína naturalmente ao longo do tempo é bem reduzida, tendo em vista que seria necessária uma "sequência correta" de modificações que conseguisse ser suportada pelo organismo em sua transição. Dependendo da existência ou não de outras mutações diferentes das utilizadas no experimento que recuperassem a função ancestral, a reversão evolutiva se torna um cenário virtualmente mais complexo do que o caminho natural seguido durante a evolução (BRIDGHAM; ORTLUND; THORNTON, 2009). O caso do receptor de glicocorticóide remonta ao cenário probabilístico como um exemplo de evolução potencialmente unidirecional. Neste caso, a reversão experimental foi executada pela mesma via, uma vez que apenas foi "resgatada" diretamente a posição inicial de alguns aminoácidos pré-existentes, de uma forma que provavelmente não seria possível na natureza, se considerarmos a inferência probabilística citada acima. Desta forma, as características necessárias para que as modificações no receptor de glicocorticóide ocorressem novamente e recuperassem seu estado anterior estão perdidas no passado, e as novas estruturas do receptor não contêm essas características que um dia foram úteis na evolução da proteína (BRIDGHAM; ORTLUND; THORNTON, 2009).

O caso das ALDHs parece diferente daquele discutido para o receptor de glicocorticóide. Aparentemente, suas funções ancestrais (i.e. semelhante ao papel detoxificador das ALDH2 de vertebrado) foram readquiridas várias vezes durante a evolução, contrastando diretamente com o perfil associado ao receptor de glicocorticóides, desafiando assim a ideia de que a irreversibilidade possa ser um modelo absolutamente aplicável a outras proteínas (BRIDGHAM; ORTLUND; THORNTON, 2009; SOBREIRA et al., 2011). As interpretações muito deterministas baseadas no modelo do receptor de glicocorticóide pode representar algum artefato probabilístico que se aplique apenas a certos modelos biológicos, ou, mais provavelmente, ao desconhecimento das relações entre certas redundâncias estruturais na aquisição (ou no caso, reaquisição) de uma nova função, principalmente pelos poucos dados experimentais existentes. Assim, a exploração dos dados estruturais e funcionais das ALDHs nos ajudará a entender melhor outros mecanismos selecionados no processo evolutivo de proteínas.

1.4.5 Reversão evolutiva de ALDHs em oposição à interpretação de retorno pela mesma via

O ancestral comum da clade ALDH1/2 em eucariotos possuia uma relação estrutura/função semelhante às ALDH2 encontradas atualmente em vertebrados, sugerindo uma função ancestral de detoxificação (SOBREIRA et al., 2011). Já em invertebrados, o ancestral comum ALDH1 apresentava um perfil semelhante às ALDH1 atuais de vertebrados, convergindo posteriormente a um provável perfil ALDH2 como uma possível reaquisição de um fenótipo ancestral. Assim, a enzima ancestral ALDH1 existente em invertebrados parece ter evoluído no sentido ALDH1-ALDH2, quando consideramos vários diferentes organismos. Além disso, as ALDHs parecem apresentar uma relação direta entre o tamanho do CES, que distinguem as enzimas ALDH1 e ALDH2 em vertebrados, e as trocas de função ao longo da evolução. Essa característica de reversão evolutiva parece se contrapor à improbabilidade de reversão pela mesma via evolutiva como sugerido por Dollo, de uma perspectiva molecular (contrastando, assim, com o caso do receptor de glicocorticóide), que confere a essas proteínas uma boa ferramenta de estudo do efeito estrutural sobre o funcional e suas aplicações às teorias evolutivas (SOBREIRA et al., 2011). Desta forma, analisando funcionalmente as ALDHs presentes em B. floridae e C. intestinalis, poderemos observar se realmente houve reversão evolutiva natural (de função ALDH1 para função ALDH2). Além disto, seria bastante pertinente analisar a influência das assinaturas citadas anteriormente (i.e., 124, 459 e 303) na relação evolutiva entre ALDH1 e ALDH2 e nas preferências por substrato. Este objetivo pode ser aproximado estudando em detalhe a função das diversas ALDHs de cordados invertebrados em ensaios enzimáticos diretos. Portanto, o estudo destas das ALDHs se apresenta como uma nova ferramenta para entender como estas desenvolvem novas funções e suas correlações evolutivas, além de contribuir para a compreensão dos mecanismos de mudança de atividade catalítica e

seletividade de uma enzima (BLOOM; ARNOLD, 2009; EISENBE; EISENBE, 2010; GLASNER; GERLT; BABBITT, 2010; GLASNER; GERLT; BABBITT, 2006).

Sobreira et al., 2011 propuseram que algumas ALDH1s de organismos cordados, como cefalocordados ou tunicados, se assemelham às ALDH2s destes organismos quanto à sequência de aminoácidos, estrutura molecular e padrão de expressão, (B. floridae: ALDH1B, ALDH1C, ALDH1D, ALDH1E, ALDH1F e C. intestinalis: ALDH1B, ALDH1C, ALDH1D, listados na Tabela 1). Para estabelecer se estas ALDH1 possuem atividades correspondentes ao perfil de detoxificação semelhante as ALDH2 de vertebrados, faz-se necessário desenvolver metodologia sensível para determinar a atividade destas enzimas frente a um intervalo significativo de substratos aldeídicos. A caracterização funcional das ALDHs de B. floridae e C. intestinalis nos trará importantes elementos para compreender o papel destas enzimas nestes animais e entender o seu processo evolutivo. Adicionalmente, a análise funcional e estrutural destas proteínas nos fornecerá ferramentas para compreender os mecanismos envolvidos na relação entre as regiões conservadas e a atividade catalítica dessa superfamília enzimática. Também será possível compreender melhor as implicações estruturais das ALDHs na via metabólica de formação do AR, essencial nos vertebrados em seu processo evolutivo. Por isto, utilizando as enzimas destes organismos, será possível analisar como elas tornaram-se funcionalmente distintas ao longo da evolução e estabelecer a direcionalidade do seu processo evolutivo, que trará novos dados moleculares acerca da controversa "lei" de Dollo.

Espécie	Nome	Número de Acesso à sequência	Base de Dados
Branchiostoma floridae	ALDH1a	261794	JGI
	ALDH1b	118947	JGI
	ALDH1c	86762	JGI
	ALDH1d	124720	JGI
	ALDH1e	113974	JGI
	ALDH1f	206892	JGI
	ALDH2	106815	JGI
Ciona intestinalis	ALDH1a	ENSCING0000007939	Ensembl
	ALDH1b	ENSCING0000007835	Ensembl
	ALDH1c	ENSCING0000007853	Ensembl
	ALDH1d	BW049365/XM_002123383	Genebank
	ALDH2	AK112485	Genebank

Tabela 1 – Genes de C. intestinalis e B. floridae e suas respectivas entradas ao banco de dad	os.
---	-----

### 2 OBJETIVOS

#### 2.1 Objetivos Gerais

Determinar a relação entre os modelos estruturais e a função das aldeído desidrogenases envolvidas em vias de sinalização e detoxificação nos organismos *Branchiostoma floridae* e *Ciona intestinalis* e testar a hipótese de que diferenças estruturais na região do CES são suficientes para explicar as reiteradas reversões funcionais entre ALDH1 e ALDH2 que ocorreram durante o processo evolutivo de animais cordados.

#### 2.2 Objetivos específicos

Sub-clonar os genes ALDH1 e ALDH2 de *Branchiostoma floridae* e *Ciona intestinalis* em vetores adequados para expressão recombinante em *Escherichia coli*; Expressar, extrair e purificar essas proteína; Estabelecer e realizar ensaios de atividade para as ALDHs e determinar suas funções frente a um espectro de substratos de aldeído de cadeias curtas e longas; Realizar a caracterização biofísica e de cinética enzimática das ALDHs como modo de caracterizar suas funções nativas.

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 3.1 Subclonagem

Os genes sintéticos dos genes da ALDH1 (e homólogos) e da ALDH2 de B. floridae e C. intestinalis (tabela 1) foram selecionados para subclonagem em diferentes vetores de expressão (pET28a+, pET28a+SUMO). Para inserção em cada vetor, amplificamos as sequencias de ALDH através de PCR (Polimerase Chain Reaction), na qual os primers utilizados tiveram, além da sequência inicial do gene, uma sitio de clivagem para enzimas de restrição específicas para sua devida inserção no vetor. Seguinte à amplificação, utilizamos estas enzimas para clivar o sítio especifico tanto no gene amplificado quanto no vetor. Após a inativação das enzimas de restrição, foram utilizadas DNA ligases que uniram o gene ao vetor através da complementariedade dos sítios que foram clivados. Por fim, o produto final inteiro foi clivado novamente pelas enzimas de restrição e conferido através de eletroforese em gel de agarose, para confirmar a ligação do inserto através da visualização das bandas correspondentes ao gene inserido ou clivado. Também foi realizado o sequenciamento para verificar a efetividade da amplificação e a exatidão da sequência de nucleotídeos.

#### 3.2 Expressão e purificação

Em consonância com o descrito na seção de Materiais e Métodos, as sequências das diversas ALDHs sintetizadas foram inicialmente subclonadas em vetor pET28a+ e transformadas em bactérias apropriadas em protocolo padrão para todas. De acordo com o grau de dificuldade específica encontrada para purificação de cada ALDH, lançamos à mão de recursos adicionais. Por exemplo: o gene da ALDH2 de C. intestinalis foi clonado em vetor pET28a+SUMO para melhorar a eficiência da expressão da proteína na fase solúvel. Em seguida o gene ALDH2 de *C. intestinalis* foi expresso em E. coli Rosetta II, que codifica sete códons pouco utilizados por estas cepas, auxiliando a expressão da enzima. Por último, a ALDH2 de *B. floridae* foi purificada em resina de níquel (batch) (Figura 7). Em resumo, nesta etapa inicial identificamos a ALDH1A de *C. intestinalis* como um protótipo de ALDH para o início das caracterizações biofísicas e cinéticas.

#### 3.3 Análises funcionais

Ensaios enzimáticos foram realizados para verificar a atividade das ALDH1 e ALDH2 de *B. floridae* e *C. intestinalis.* Nestes ensaios foram obtidos os parâmetros de atividade das enzimas nativas e mutantes. Nesse método, o NADH formado na conversão dos aldeídos pelas ALDHs será utilizado pela enzima diaforase, que por sua vez reduz a resasurina à resorufina (Figura 6), emitindo assim a fluorescência a ser detectada (excitação/emissão, 564/590), que é proporcional à atividade enzimática2. Além disto, utilizamos aldeídos diferentes com afinidades conhecidas para a ALDH1 e a ALDH2, como o acetaldeído e o retinaldeído, a fim de estabelecer a relação funcional destas em *B. floridae* e *C. intestinalis*.

Figura 5 – Esquema da reação de conversão da resazurina em resorufina, com utilização de NADH.

![](_page_35_Figure_4.jpeg)

Os experimentos foram realizados em condições otimizadas que incluem estabilidade ótima das das proteínas e valores de velocidade inicial relativos aos primeiros 10% de substrato consumido ou de produto formado, necessários para definir a linearidade da curva de progressão da reação enzimática. A partir destes dados, podem ser definidos alguns parâmetros cinéticos iniciais como Vmax e Km.

#### 3.4 Análise estatística

Os dados da análise enzimática serão demonstrados através da média ± desvio padrão, obtidos da repetição independente de experimentos em triplicata, que melhora a robustez experimental. Utilizando os testes de Tukey e ANOVA, as médias obtidas das constantes cinéticas (Vmax e Km) serão comparadas entre enzimas, substratos e

aos valores encontrados na literatura para os substratos utilizados, a fim de determinar a função das enzimas nos seus respectivos organismos.

## 4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

#### 4.1 Sub-clonagem

Realizamos inicialmente a síntese de seis dos onze genes de interesse, sendo três de *B. floridae* e três de *C. intestinalis*. Escolhemos inicialmente as ALDH2 dos organismos (Tabela 1), que apresentam um perfil de expressão condizente com a função de detoxificação, além da estrutura do CES coincidir com os dados estruturais das suas homólogas em vertebrados. Também selecionamos duas ALDH1 de cada organismo (Tabela1), devido as suas relações com tamanho do canal e aminoácidos chave mais semelhantes com o perfil das ALDH1 de vertebrados.

#### 4.2 Expressão e purificação

Em consonância com o descrito na seção de Materiais e Métodos, as sequencias das diversas ALDHs estudadas foram inicialmente subclonadas em vetor pET28a+ e transformadas em bactérias apropriadas em protocolo padrão para todas. De acordo com o grau de dificuldade específica encontradas para cada vetor de expressão, lançamos à mão de recursos adicionais. Por exemplo: o gene da ALDH2 de *C. intestinalis* foi clonado em vetor pET28a+SUMO para melhorar a eficiência da expressão da proteína na fase solúvel. Em seguida o gene ALDH2 de *C. intestinalis* foi expresso em *E. coli* Rosetta II, que codifica sete códons pouco utilizados por estas cepas, auxiliando a expressão da enzima. Por último, a ALDH2 de *B. floridae* foi purificada em resina de níquel (batch) (Figura 7), aguardando a realização das etapas consecutivas. Em resumo, nesta etapa inicial identificamos a ALDH1A de *C. intestinalis* como um protótipo de ALDH para o início das caracterizações biofísicas e cinéticas. Figura 6 – ALDHs de Ciona intestinalis e Branchiostoma floridae após purificação por batch e FPLC (B. floridae ALDH2, B. floridae ALDH1A, B floridae ALDH1B, C. intestinalis ALDH2, C. intestinalis ALDH1C, C. intestinalis ALDH1A). Note que a proporção de ALDH1A de C. intestinalis pura é consideravelmente maior do que a obtida para outras ALDHs, o que justifica sua escolha para o início das caracterizações posteriores

![](_page_38_Figure_2.jpeg)

#### 4.3 Ensaios biofísicos

Os primeiros ensaios biofísicos foram realizados com ALDH1A de *C. intestinalis*, escolhida a partir da melhor taxa de produção/purificação. Desta forma, condições como tampão, pH, dispersão da molécula na amostra, estabilidade térmica foram verificadas, utilizando paralelamente, como parâmetro de comparação, uma enzima semelhante já bastante estudada, a ALDH1A2 humana (a.k.a RALDH2). Estes testes foram importantes para a realização das etapas posteriores, que demandam proteína estável para ser armazenada em boa condição de ensaio.

Os testes realizados com as duas proteínas descritas acima avaliaram as condições de enovelamento, espécies moleculares e termoestabilidade. Esses dados contribuem para aperfeiçoar os ensaios de atividade enzimática. Para otimizar a qualidade da proteína produzida também avaliamos através de Dynamic Light Scattering (DLS) qual a quantidade de agregados proteicos (não-ordenados) apresentada após concentração. Através dessa técnica, que emite um feixe de luz através de uma solução de proteínas, podemos ter noção do raio médio hidrodinâmico de seus monômeros. Uma vez que a ALDH não é uma proteína perfeitamente globular, os valores encontrados (4nm) condizem com seu provável raio de giro, que leva em consideração o raio máximo da proteína em relação ao centro de massa. Os testes foram executados com a ALDH1A2 humana e ALDH1A de *C. intestinalis* (Figura 2). Figura 7 – Dynamic light scattering (DLS) realizado com as proteínas ALDH1A2 de *H. sapiens* (R2m1GF) e ALDH1A de *C. intestinalis* (Cialdh1A\_GF) obtidas após filtração em gel (GF). R = Raio de giro. %Pd = Índice de polidispersão. %Int = Intensidade da população. A %Int indica a proporção de cada espécie molecular, enquanto a %Pd indica a variação da dispersão da espécie molecular em solução.

![](_page_39_Figure_2.jpeg)

DYNAMICS<sup>™</sup> - Version 6.12.0.3 15:46:31 Wednesday, October 16, 2013

![](_page_39_Figure_4.jpeg)

![](_page_39_Figure_5.jpeg)

—[ Results Summa	y - Cialdh1A_GF	_ph6.5_11]	-
------------------	-----------------	------------	---

Item	R	%Pd	MW-R	%Int	%Mass
	(nm)		(kDa)		
» Peak 1	0.0	0.0	0	0.4	100.0
» Peak 2	5.0	11.2	147	99.6	0.0

#### 4.4 Ensaios de "Thermal Shift"

Os ensaios de "Thermal Shift" quantificam as mudanças observadas na temperatura de desnaturação apresentada pelas proteínas em diversas condições experimentais. Por este motivo, o ensaio é útil para avaliar a estabilidade da estrutura terciária de uma amostra de proteínas, servindo de indicador indireto de sua gualidade para ensaio. Em nosso caso utilizamos thermal shift para verificar se poderíamos melhorar a condição inicial das enzimas no contexto dos tampões utilizados na purificação das ALDHs. O Thermal Shift consiste em avaliar a estabilidade da estrutura terciária de uma proteína a uma determinada variação de temperatura, utilizando-se combinações de variações de tampão, pH, concentração de amostra e fluoróforo (Sypro Orange). Desta forma, no momento que a porção hidrofóbica da proteína for exposta através de sua desnaturação por aumento de temperatura, haverá ligação ao Sypro, que será detectada através de fluorescência. Com isso, podemos adquirir informações sobre a temperatura de melting (Tm) da proteína. Analisando qual condição ocasiona no aumento da Tm, notamos que, de um modo geral, diminuindo-se o pH para 6,5 e introduzindo-se cátions divalentes como magnésio ou zinco no tampão conseguíamos aumentar a estabilidade da proteína. Na prática, isto nos sugeria condições para conservar a proteína e prepara-la para os ensaios. Apesar disso, foi necessário promover alterações nos tampões várias vezes antes de padronizarmos as condições para obtenção de dados de cinética enzimática. Isso pode ser explicado pela característica intrínseca de cada proteína: uma condição ideal para a catálise nem sempre é a mais estável para a proteína. Isto pode ser confirmado através do Gel nativo realizado com as amostras das ALDHs purificadas, que indicou que ambas amostras possuíam o mesmo perfil monomérico. O gel nativo, que verifica o padrão de bandas em uma corrida de eletroforese baseada em peso molecular e ponto isoelétrico, mostrou que apresentamos uma mesma população (provavelmente monomérica) em uma amostra, o que nos autorizou a iniciar os ensaios enzimáticos.

Figura 8 – Gel Nativo de proteínas. As bandas dentro do retângulo mostram que há presença de uma única espécie molecular de ALDH1A de *Ciona intestinalis* (duplicata).

![](_page_41_Picture_2.jpeg)

Os protocolos de purificação foram desenhados de maneira a se explorar e combinar as características físico-químicas inerentes a cada uma das construções de interesse de modo a diferenciá-las dos contaminantes bacterianos. Essas características englobam a presença de caudas de fusão, ponto isoelétrico e tamanho/peso, dentre outras, tendo como objetivo final a obtenção de amostras com alto grau de pureza e homogeneidade em relação às espécies moleculares. Utilizamos a cepa Rosetta II para expressar nossas proteínas, uma vez que nossos testes anteriores já haviam demonstrado que esta era a melhor opção de cepa de expressão. Entre os passos para produção, está a purificação por afinidade a metais imobilizados (batch) e filtração

em gel, empregando-se a resina de afinidade por metais Talon (Clontech) e coluna cromatográfica Hiload Superdex 16/60 200/75 da GE, respectivamente. No processo de purificação por afinidade, a proteína interage com a fase estacionária (resina de Níquel) da coluna de afinidade, através da interação da cauda de histidina (HisTag) inserida em seu N-terminal. Desta forma, após as sequências de lavagem, a proteína é eluida através de gradiente de imidazol em várias frações puras. Já a filtração em gel emprega a separação das moléculas através da sua massa molecular, de modo automatizado, coletando as frações baseado na quantidade de proteína medida através de ultravioleta, da mais pesada a mais leve. É necessário realizar um gel de SDSPAGE para verificar qual a massa aproximada da fração eluída (e presença de contaminantes).

Testamos os dois sistemas de purificação aludidos acima seguindo o protocolo descrito por Dos SANTOS et al. (2011). O batch, apesar de não ser automatizado, é uma técnica mais simples, rápida e barata, além de necessitar de menos amostras. Já a filtração em gel oferece vantagem por ser um método automatizado, apesar de necessitar de uma quantidade maior de amostra (para diminuir a proporção de perda de amostra). Desta forma, decidimos utilizar o batch e em seguência o FPLC para melhorar as condições de purificação. Para contornar as perdas, aumentamos o volume de produção das proteínas que apresentavam baixa eficiência de expressão. Assim, para cada proteína e dependendo das necessidades de uso, foi decidido utilizar entre 5 e 20 litros de cultura de *E. coli* contendo nosso vetor de expressão. Além disto, a metodologia de extração (etapa anterior à purificação) foi padronizada alterando o tempo de sonicação e aumentando a quantidade de lisozima na solução de lise (que torna a lise celular mais eficaz). A sonicação utiliza como base a lise da célula através de alta frequência sonora, utilizando inibidores de protease no tampão para reduzir a perda de amostra e realizando-se todo o experimento em baixa temperatura, para evitar aquecimento da amostra. Com isso, a ALDH1A de *C. intestinalis* apresentou uma melhora significativa de produção (Figura 7), sendo escolhida para os passos seguintes de ensaios biofísicos, cinéticos e estruturais.

Para as outras enzimas ALDH que não apresentaram uma condições satisfatórias de purificação com os passos descritos acima utilizamos várias medidas como redução do tempo de incubação em resina de afinidade, o que diminui a taxa de contaminantes ligados à resina, e fracionamento gradual das eluições por imidazol, que separa melhor os contaminantes aderidos à resina.

Foram realizadas a expressão e purificação das ALDH1A, ALDH1C e ALDH2 de Ciona intestinalis e ALDH1B de *B. floridae* seguindo o mesmo protocolo previamente estabelecido para ALDH1A, com algumas alterações para aumento da eficiência. A expressão consistia anteriormente em duas etapas, uma de crescimento da cepa Rosetta II em meio LB a 37ºC em agitação a 200 rpm e outra de indução da expressão das ALDHs a 18°C por 18h, utilizando Isopropyl β-D-1- thiogalactopyranoside (IPTG). Para estas enzimas, a etapa de indução era executada com uma densidade ótica de 0,6 (OD600nm) mas descobrimos que utilizar 1,6 aumentava a produção. Além disso, reduzimos o tempo de incubação da etapa de purificação por afinidade à resina de cobalto, que ocorre através da interação da cauda de histidina da proteína com a fase estacionária. A resina é ativada com uma solução 5mM de imidazol em tampão fosfato a 50mM e adicionada ao extrato da lise das bactérias, mas vimos que os 45 minutos utilizados traziam mais componentes indesejados na purificação. Por isso, decidimos reduzir esse tempo para 30 minutos, o que trouxe uma melhora significativa na purificação após a etapa de cromatografia por gel filtração (Figuras 10 e 11).

Figura 9 – Gel de eletroforese em SDS-Page de ALDH1C (A) e ALDH2 (B) de Ciona intestinalis, mostrando que as adaptações introduzidas nos protocolos de purificação resultaram em frações mais limpas após a gel filtração. As bandas correspondem as ALDHs com ~58kDa.

![](_page_43_Figure_3.jpeg)

Figura 10 – Gráfico da leitura de ultravioleta (UV) da cromatografia em gel filtração, mostrando os picos eluídos em aproximadamente 80mL e coletados em frações de 1mL, contendo as proteínas ALDH1C (A) e ALDH2 (B) purificadas (picos >100mAU).

![](_page_44_Figure_2.jpeg)

### 4.5 O desafio de purificação da ALDH1C de *Ciona intestinalis* e aperfeiçoamentos à técnica

Durante experimentos preliminares de cinética enzimática com a ALDH1C de *C. intestinalis* purificada observamos que esta apresentou características bastante diferentes das outras ALDHs. Para verificar se este perfil enzimático contrastante era o resultado de um artefato experimental como a presença de um contaminante, de condições inapropriadas de estabilidade da enzima nos tampões de reação, ou mesmo de diferenças de pureza associadas especificamente às preparações e lotes de ALDH1C, decidimos investigar o problema através de diversas metodologias.

Uma das hipóteses para explicar o problema referido acima, a do contaminante, não recebeu apoio de nossos dados em cromatografia em gel filtração e SDS-Page, pois não houve nenhuma evidência significativa de impurezas (Figuras 10 e 11). Não obstante, adicionamos mais uma etapa de purificação por troca iônica, na qual a amostra é adicionada a uma matriz contendo 6% de agarose com alta afinidade a partículas carregadas, que são removidas na eluição através de gradiente de um tampão contendo 1M de NaCI. Obtivemos alguns picos diferentes, que apresentaram a mesma massa molecular após a corrida em gel de SDS-Page (não mostrado), o que vai de encontro à hipótese de contaminante proteico.

Para testar mais profundamente o grau de purificação da ALDH1C de *C. intestinalis* realizamos mais experimentos de DLS para avaliar a natureza das espécies proteicas presentes na amostra. Uma vez que o raio médio hidrodinâmico varia até mesmo em diferentes conformações da mesma proteína, o DLS nos permite verificar a proporção destes diferentes componentes, se presentes. Como representado na Figura 12 A, o DLS mostrou que a amostra de ALDH1C estava com uma excelente qualidade, monodispersa e com 100% da massa representado por uma única espécie proteica, o que sugere que todas as populações que possuem raio hidrodinâmico mensurável são na verdade um único componente. Utilizamos a ALDH2 como controle, uma vez que já obtivemos dados cinéticos desta amostra, e esta apresentou-se como monodispersa, representando 99,9% da massa com alguns poucos agregados, que podem ser eliminados por centrifugação e não interferem na atividade enzimática (Figura 12B). Figura 11 – Experimentos de Dynamic light scattering (DLS) com enzimas ALDH sequencialmente purificadas e imediatamente após etapa de cromatografia por gel filtração. A- ALDH1C de *Ciona intestinalis*. B- ALDH2 de *C. intestinalis*. É possível observar uma amostra pura e monodispersa de ALDH1C, enquanto a ALDH2 apresenta alguns agregados, representados pelos picos maiores que 10nm. C- A mesma amostra de ALDH1C foi utilizada para ultracentrifugação apresentando perfil semelhante ao observado através do DLS.

![](_page_46_Figure_2.jpeg)

Após os dados obtidos com DLS, testamos a proteína ALDH1C de C. intestinalis, outra alíquota do mesmo lote, em um paradigma de ultracentrifugação. A ultracentrifugação separa os diferentes componentes por massa através do cálculo da velocidade de sedimentação, que pode ser obtido por detecção de absorbância em 280nm da passagem da amostra dentro de uma câmara translúcida (Cole JL, 2008). Os dados deste experimento representado na Figura 12 sugerem a presença de um componente de aproximadamente 200kDa para a ALDH1C (essencialmente o mesmo valor em três concentrações diferentes), podendo-se tratar de tetrâmero da enzima (em consonância com os dados obtidos por DLS). Em resumo, coletivamente, os dados apoiam a noção de que nossa preparação de ALDH1C de *C. intestinalis* apresenta pureza suficiente para a execução de ensaios cinéticos enzimáticos.

## 4.6 Em busca de um protocolo de purificação de ALDHs otimizado pela experiência

Como descrito nas seções anteriores, expressamos e purificamos as ALDH1A, ALDH1C e ALDH2 de C. intestinalis e ALDH1B de B. floridae seguindo o mesmo protocolo previamente estabelecido na ALDH1A, com algumas alterações para aumento da eficiência. A expressão consistia anteriormente em duas etapas, uma de crescimento da cepa Rosetta II em meio LB a 37ºC em agitação a 200 rpm e outra de indução da expressão das ALDHs a 18ºC por 18h, utilizando Isopropyl β-D-1- thiogalactopyranoside (IPTG). Em contraste ao normalmente preconizado, nossos estudos empíricos mostraram que a etapa de indução por IPTG deve ser executada para maior eficiência após um crescimento bacteriano compatível com o turvamento do meio até uma densidade óptica de 1,6 (OD600nm), ao invés de 0,6 (OD600nm) como usual. Além disso, reduzimos o tempo de incubação da etapa de purificação por afinidade à resina de cobalto, que ocorre através da interação da cauda de histidina da proteína com a fase estacionária. A resina é ativada com uma solução 5mM de imidazol em tampão fosfato a 50mM e adicionada ao extrato da lise das bactérias, mas vimos que os 45 minutos utilizados traziam mais componentes indesejados na purificação. Por isso, decidimos reduzir esse tempo para 30 minutos, o que trouxe uma melhora significativa na purificação, após a etapa de cromatografia por gel filtração (Figura 8 e 9). Quanto à purificação por resina de cobalto, adicionamos uma etapa de recarga a cada 4 utilizações, que consiste em retirar os íons de cobalto utilizando ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), e ionização através de sulfato de cobalto heptahidratado, lavando

com Nacl 0,3M e H2O para retirar excesso de cobalto não ligado. Essa decisão foi tomada pois a eficiência da purificação era drasticamente após esse período.

#### 4.7 Ensaios cinéticos

#### 4.7.1 Experiência inicial com reações catalisadas por ALDHs

Os primeiros passos em direção ao estabelecimento de um método de avaliação da atividade das ALDHs de *C. intestinalis* e *B. floridae* clonadas expressas e purificadas em nosso laboratório consistiram no uso de preparações comerciais de ALDH2 de *Saccharomyces cerevisiae*. A experiência obtida com esta enzima foi útil para selecionar condições iniciais para a otimização do ensaio com as proteínas de interesse. Nestes ensaios preliminares testamos temperaturas, tampões, concentração de DMSO e uso de agentes redutores. Como indicado na Figura 13, determinamos os Kms para acetaldeído e para NAD, que foram, respectivamente, 0,3 mM e 0,2mM, próximos aos valores encontrados para a ALDH2 de humanos (RASHKOVETSKY; MARET; KLYOSOV, 1994; HO et al., 2005) (0,2 mM e 0,12mM, respectivamente).

Figura 12 – Km e Vmax da ALDH2 de *Saccharomyces cerevisiae* obtidos para acetaldeído e NAD.

![](_page_48_Figure_6.jpeg)

![](_page_48_Figure_7.jpeg)

Conhecendo a reação global das ALDHs (Figura 4), e sabendo da relação entre a enzima escolhida como modelo para este ensaio, a ALDH1A2 humana, e o tamanho

de seus melhores substratos aldeídicos, (Klyosov, A.A. 1996; Sobreira, T.J.P. 2011), escolhemos o octanal para iniciar a padronização do método (Klyosov, A.A. 1996). A escolha do octanal também foi interessante, pois ele possui Km semelhantes para enzimas do tipo ALDH1 (como a ALDH1A2) e ALDH2, o que se mostrou útil no desenho dos ensaios.

Em primeiro lugar, estabelecemos as melhores condições de tampão para os ensaios de atividade. Assim, partindo do protocolo descrito por Klyosov, A.A. (1996), estabelecemos o pH de 8,5 para a início dos testes (50mM de fosfato, 150mM KCl, 250mM NaCl). O ensaio foi idealizado e executado em placas de 96 poços de fundo chato, transparente, concentrando nossa atenção na produção de NADH em 340 nm (produção do NADH é proporcional ao consumo do aldeído).

A primeira etapa consistiu em encontrar a concentração ideal de proteína para obter um bom sinal em condições de velocidade inicial (Brooks, H.B. 2004; Iversen, P.W. 2004; Strelow, J. 2004). Fixando uma concentração para os dois substratos (NAD e Octanal, 5mM e 2,2mM, respectivamente), pudemos padronizar as concentrações de proteína para o início dos testes em 125 nM.

A segunda etapa consistiu em fixar a concentração de proteína e de um dos substratos (125 nM para a proteína e 5 mM para o NAD), variando a concentração do outro substrato (octanal). Assim, fixando um tempo de leitura da absorbância da placa, plotamos os valores de velocidade em um gráfico velocidade versus concentração do substrato estudado (octanal) (Figura 14). Apesar das curvas de progresso mostradas na Figura 14 indicarem uma correta progressão da reação de ALDH, a sensibilidade de detecção do método se mostrou insatisfatória para pequenas concentrações de octanal. Esta falta de sensibilidade efetivamente inviabiliza o ensaio, pois impede uma estimativa realista de constantes cinéticas da enzima, como o Km e o Vmax.

Em conclusão, o ensaio de ALDHs através da monitoração da produção de NADH se mostrou pouco sensível para nosso propósito de comparar a atividade das ALDHs de cordados invertebrados.

Figura 13 – Curvas de progresso da atividade enzimática de ALDH1A2 humana expressa em bactérias e purificada em laboratório (A) e curva de saturação (B). Note que apesar de boa atividade apresentada com altas concentrações de substrato (superiores a 800 uM de octanal), a reação não produziu sinal suficiente para registro em baixas concentrações de substrato, (~5 uM), impedindo assim um cálculo realista de Vmax e Km.

![](_page_50_Figure_2.jpeg)

![](_page_50_Figure_3.jpeg)

A utilização da absorbância a 340nm da forma reduzida de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) como método parecia inicialmente ser a mais indicada por conta de sua tradição (Klyosov, A.A. 1996). No entanto, como discutido acima, os dados

indicaram que, em nossas condições, o método se associava a grandes limitações de detecção na região de baixas concentrações de substrato.

Para contornar as limitações associadas à monitoração do NADH a 340 nm, tentamos padronizar um ensaio de fluorescência por NADH. Durante estas tentativas, observamos que um dos problemas ligados ao ensaio era a precipitação proteica observada após diálise para o tampão de ensaio. Diferentes tampões com força iônica e naturezas foram tentados sem sucesso. Entretanto, conseguimos identificar que neste ensaio o principal problema era a baixa estabilidade em longo prazo (>12h) da ALDH1A2 e de outras ALDHs no pH 8 necessário para a realização do ensaio cinético. Assim, optamos por manter a enzima no tampão de purificação e diluí-la diretamente na preparação do ensaio. Para realizar a medida de fluorescência do NADH, foram utilizados os mesmos componentes do ensaio com absorbância, mas em uma placa escura, apropriada a tais medidas. Os valores do espectro de excitação e emissão do NADH foram usados como base no contexto do software do equipamento (EnSpire® Multimode Plate Reader, PerkinElmer), no qual são realizadas otimizações baseadas na detecção para definir novos valores, que em nosso caso foram 340 nm para excitação 462 nm de emissão. Entretanto, o ensaio mostrou-se também difícil de ser padronizado sob estas condições, pois o sinal era muito fraco e comprometia a diferença entre sinal e ruído (Resultados não apresentados).

#### 4.7.4 Padronização de um ensaio sensível para atividade de ALDH

Com o intuito de amplificar nossa capacidade de detecção dos produtos da reação de ALDH e melhorar a relação entre sinal e ruído em baixas concentrações de substrato, testamos um ensaio acoplado, no qual a enzima diaforase utiliza o NADH produzido pela ALDH para reduzir a resazurina à sua forma fluorescente, a resorufina (Figura 6). Como a segunda reação (redução da resazurina e geração da resorufina) é diretamente proporcional à reação da ALDH em uma razão 1:1, é lícito utiliza-la como medida das constantes cinéticas das ALDHs em estudo. Para tanto, é necessário que a enzima diaforase esteja sempre presente em quantidade suficiente, e que sua velocidade de reação seja adequada (superior à das ALDHs em teste), para que não haja limitação artificial ao teste de atividade das enzimas desejadas. Estas condições ótimas de ensaio foram estabelecidas de forma sistemática em todos os ensaios através da realização de um controle positivo simples da atividade de diaforase, que consistia na adição suficiente de NADH. Em nossa experiência, estabelecemos que a concentração de resazurina deve manter-se no máximo a 10 uM, para evitar acréscimo de ruído à reação.

# 4.7.5 Constantes cinéticas enzimáticas para a ALDH1A de *Ciona intestinalis:* modelo de estudo

Os primeiros ensaios foram realizados com a ALDH1A de C. *intestinalis* e obtivemos sucesso em utilizar o octanal como substrato. Devido a alguns problemas de solubilização dos aldeídos, optamos por solubilizá-los em metanol 100% e utilizar no máximo 1% final para não comprometer o ensaio. Utilizando concentrações fixas de NAD (1mM) e octanal (1mM), diluímos a nossa proteína em diferentes concentrações em tampão fosfato, pH 8, até obter uma curva linear que conservasse as condições de velocidade inicial com sinais de suficiente qualidade para detecção. Uma vez obtida a concentração da enzima, fixamos a concentração do octanal e variamos a concentração de NAD para 500 nM e 2 mM. Para casos nos quais a inclinação da curva de progressão não variasse, fixamos a concentração de NAD em 1mM. Por último, utilizamos diferentes diluições de aldeído a fim de obter uma faixa de concentrações que nos fornecesse uma boa curva de concentração de substrato versus velocidade de reação. Obtivemos, assim sucesso ao padronizar esta rotina de procedimentos e realizamos múltiplos experimentos para diferentes aldeídos e ALDHs.

![](_page_53_Figure_1.jpeg)

![](_page_53_Figure_2.jpeg)

## 4.7.6 Parâmetros cinéticos para ALDH1 (ALDH1A2, a.k.aRALDH2) e ALDH2 de *Homo sapiens*

Os primeiros ensaios cinéticos após a padronização satisfatória da metodologia foram realizados com a ALDH1A de *C. intestinalis*. Como discutido anteriormente, esta enzima apresentou características muito favoráveis de expressão, purificação e ensaio, especialmente com octanal como substrato. Uma vez que obtivemos sucesso em padronizar uma metodologia moderna e sensível para a determinação das constantes cinéticas de enzimas ALDH (Km e Vmax), nosso próximo passo foi estabelecer uma comparação entre enzimas ALDH de cordados invertebrados, tendo como controles enzimas ALDH de *Homo sapiens*. Assim, reportamos os resultados obtidos com as constantes cinéticas Km e Vmax das seguintes ALDHs de cordados invertebrados: ALDH1A e ALDH2 de *C. intestinalis* e ALDH1B de *B. floridae*:

Para estabelecer com precisão as relações entre os tamanhos previstos dos canais de acesso ao substrato das ALDHs e o volume do substrato, bem como a provável função das enzimas de *B. floridae* e *C. intestinalis*, plotamos o número de carbonos presentes em cada aldeído com os dados cinéticos observados nas ALDHs. Como nosso estudo baseia-se em dados prévios da análise das ALDHs de vertebrados (Sobreira, TJP, 2011), utilizamos, para comparação, dados obtidos previamente por Klyosov, 1996 para duas destas enzimas que desempenham papéis importantes em humanos, uma com um maior canal de acesso ao substrato (ALDH1A1, a.k.a. RALDH1) e outra com um canal muito menor (HsALDH2). Além disto, estas duas proteínas apresentam funções distintas que estão relacionadas a uma maior atividade em relação a determinados substratos (Retinaldeído e acetaldeído, respectivamente).

A determinação da atividade dessas enzimas na presença desses substratos foi um passo importante na realização das caracterizações das enzimas dos invertebrados abordados neste estudo, principalmente por considerarmos o papel evolutivo destas funções metabólicas no surgimento dos vertebrados (Sobreira, TJP, 2011). Ao analisarmos os valores de Km, podemos definir a afinidade aparente das enzimas humanas para cada substrato e, conhecendo as suas relações funcionais na oxidação do acetaldeído pela HsALDH2 (Klyosov, A. A., 1996) e retinaldeído pela RALDH1 (Campo-Paysaa, F., 2008), é possível confirmar que o alto controle que as ALDHs humanas apresentam sobre a disponibilidade de seus substratos está ligado à afinidade relativa observada para substratos preferenciais (retinaldeído para RALDH1) e (acetaldeído para ALDH2) (Figura 16). Figura 15 – km para acetaldeído e retinaldeído determinados para representantes humanos do grupo das enzimas ALDH1 (ALDH1A1, a.k.a. RALDH1) e ALDH2 (HsALDH2). Note que as maiores diferenças entre Km se observam em relação ao substrato mais volumoso, ou seja, ao retinaldeído, enquanto que diferenças bem menos substanciais são encontradas para o acetaldeído, que apresenta uma molécula comparativamente muito menor. Os dados também nos permitem especular em favor de uma maior especialização da enzima RALDH1 (ALDH1A1). Os valores correspondentes às enzimas humanas ALDH1A1/RALDH1 e HsALDH2 foram extraídos de Klyosov, 1996.

![](_page_55_Figure_2.jpeg)

## 4.7.7 Parâmetros cinéticos para ALDH1 e ALDH2 de *Ciona intestinalis e Branchios*toma floridae

Na Figura 17 representamos os dados de Km definidos em ensaios enzimáticos para as enzimas ALDH1A e ALDH2 de *C. intestinalis* e para a ALDH1B de *B. floridae*. Estes resultados inéditos lançam luz sobre a curiosa história evolutiva das ALDHs e nos permitem compreender as funções associadas a estas enzimas. Consistente com a estrutura molecular sugerida por nossas simulações de seu canal de acesso ao substrato, a enzima ALDH1A de *C. intestinalis* apresenta um perfil de afinidades (definidos pela análise de seus Km para aldeídos de vários volumes) muito semelhante ao estabelecido para a ALDH1A1 (RALDH1) humana, a qual se notabiliza por seu papel fundamental na sinalização via AR, representada na Figura 17 (HsALDH1). No perfil observado para a RALDH1 (HsALDH1) e para a *C. intestinalis* ALDH1A, a afinidade, interpretada como proporcional à recíproca do Km, eleva-se rapidamente quando o volume dos substratos aldeídicos aumenta de pequeno a moderado, assim representado pelo número de carbonos (2, 4, 6, 8 e 10 carbonos). Portanto, este perfil do tipo ALDH1 é compatível com a interpretação de que, em certo limite, quanto maior o volume do substrato, maior a afinidade da enzima para ele, o que está associado com

um amplo canal de acesso ao substrato, como modelado anteriormentepor Sobreira et al., 2011. O perfil tipo ALDH1 contrasta eloquentemente com o perfil típico de ALDH2 de vertebrados. Como mostrado por Klyosov, 1996, a afinidade da ALDH2 humana (HsALDH2) por substratos de volume crescente se mantém praticamente invariável, como confirmado na Figura 17 com os mesmos substratos caracterizados para as ALDH1. Este resultado sugere que o canal de acesso ao substrato das ALDH2 de vertebrados é bem adaptado a aldeídos menores, e que, no limite, moléculas volumosas como o retinaldeído não seriam admitidas próximo ao centro catalítico no fundo do canal e, portanto, não seriam oxidadas, o que se mostra correto do ponto de vista experimental (Klyosov, 1996 e Figura 17).

Um bom resumo operacional para a comparação entre ALDH1 e ALDH2, é que a primeira evoluiu com seletividade para melhores eficiências ligadas a aldeídos médios e grandes, enquanto que a segunda mantém um padrão menos variável de afinidade ligada a aldeídos de pequeno e médio volume, mas completamente excludente para grandes substratos como o retinaldeído. No contexto do paradigma discutido acima, uma análise do perfil da ALDH1B de outro animal cordado invertebrado, o Anfioxo *B. floridae*, é inteiramente compatível com o modelo delineado acima. A exemplo do representante das ALDH1 humanas, a RALDH1/ALDH1A1, e da ALDH1A de *C. intestinalis*, a ALDH1B de *B. floridae* também mostra claro aumento de afinidade (entendida como proporcional à recíproca do Km) com o aumento do volume dos substratos aldeídicos. Este padrão mais uma vez sugere que enzimas com esta conformação e volume de canal de acesso ao substrato típicos de ALDH1 apresentam preferência por aldeídos de médio a grande porte, sendo capazes, de processar grandes moléculas como o precursor do AR, o retinaldeído.

Apesar de apresentar assinaturas moleculares compatíveis com as ALDH2, curiosamente a ALDH2 de *C. intestinalis* mostrou-se muito semelhante às enzimas tipo ALDH1 de *H. sapiens, C. intestinalis* e de *B. floridae,* contrastando com o perfil típico das ALDH2 de vertebrados (Figura 17). Este resultado, embora um tanto curioso, não foi de todo inesperado, posto que a modelagem dos canais de acesso ao substrato das ALDH1 e ALDH2 de *C. intestinalis* indica que estas enzimas exibem volumes comparativamente maiores do que os verificados em vertebrados como *H. sapiens* e em cefalocordados como o *B. floridae*<sup>19</sup>. Assim, não é surpresa que, apesar de ser classificada como ALDH2 segundo suas sequencia e assinatura moleculare, as enzimas ALDH2 de *C. intestinalis* se comporte de modo semelhante a uma ALDH1, em virtude de seu largo e espaçoso CES (Figura 17).

Figura 16 – Relação entre Km (Log) e número de carbonos dos substratos aldeídicos para as ALDHs (aldeído desidrogenases) dos cordados invertebrados *C. intestinalis e B. floridae* representada em escala semi-logarítmica. Note que as ALDH1 de *C. intestinalis* (CiALDH1A) e de *B. floridae* (BfALDH1B) testadas, exibiram o padrão típico do grupo ALDH1, com aumento de afinidade (proporcional à recíproca do Km) paralelo ao incremento no volume do substrato (número de carbonos dos aldeídos), típico das ALDH1 humanas, como a HsALDHA1. Curiosamente, em contraste com a ALDH2 humana, que essencialmente não variou o Km em resposta ao incremento no volume do substrato, a ALDH2 de *C. intestinalis* mostrou comportamento semelhante às das enzimas do tipo ALDH1, crescendo o Km em paralelo ao volume do substrato. Os dados relativos às ALDHs de cordados invertebrados foram obtidos diretamente de nossos ensaios enzimáticos, enquanto que os valores correspondentes às enzimas humanas foram extraídos de Klyosov, 1996.

![](_page_57_Figure_2.jpeg)

#### 4.7.8 A eficiência catalítica das ALDHs de Ciona intestinalis e Branchiostoma floridae

Apesar de útil, a informação oferecida pelo parâmetro do Km precisa ser complementada por outros elementos de cinética enzimática. Assim, torna-se necessário analisar a taxa catalítica (kcat) e a sua relação com a constante de afinidade (Km), para que possamos estabelecer um indicador que reflita a eficiência comparativa da catálise de uma enzima para um substrato específico dentre um determinado conjunto de opções (Anderson, VE 2015). O kcat representa a taxa de conversão de um substrato em produto por uma unidade catalítica da enzima, enquanto que a razão entre kcat/Km simboliza eficiência catalítica, um importante parâmetro para distinguir-se a preferência enzimática quando diferentes substratos estão presentes em uma reação, por exemplo: quando uma enzima atua na presença de diversos substratos dentro de um organismo. Assim, calculamos os valores de kcat/Km para as ALDHs de *C. intestinalis* e *B. floridae* e os comparamos como os dados equivalente para as ALDHs humanas HsALDH1A1 e HsALDH2 determinados por Klyosov, 1996.

Uma comparação entre as eficiências catalíticas (kcat/Km) de ALDH1A1/RALDH1 e ALDH2 de Homo sapiens frente aos substratos acetaldeído e retinaldeído mostra que RALDH1 apresenta grande eficiência catalítica para o volumoso substrato retinaldeído, em contraste com o comparativamente diminuto acetaldeído. Por seu vez, a ALDH2 de *H. sapiens* não apresenta distinções importantes entre estes substratos (Figura 17A). Na Figura 17B comparamos as eficiências catalíticas (kcat/Km) da ALDH1A de C. intestinalis (CiALDH1A, verde) e da ALDH2 de C. intestinalis (CiALDH2, marron), representadas em escala semi-logaritmica. Observe que a ALDH1A de C. intestinalis apresenta eficiência catalítica duas ordens de magnitude superior à apresentada pela ALDH2 de C. intestinalis, principalmente na região de 6 a 8 carbonos. Os dados de eficiência catalítica são apoiados quando representamos os dados de Km para diferentes substratos em uma escala de maior ampliação (escala linear) na Figura 17B, que indica as claras diferenças entre comportamentos ALDH1 e ALDH2. Concluimos que, apesar de apresentar comportamentos superficialmente semelhantes em análise de maior escala (logarítmica), CiALDH1A e CiALDH2 apresentam os comportamentos esperados de enzimas do tipo ALDH1 e ALDH2, ainda que a eficiência catalítica da CiALDH2 não se aproxime dos grandes valores exibidos pela ALDH2 humana, que possui kcat/Km quase duas ordens de magnitude superior (Compare Figura 17A com Figura 17B).

![](_page_59_Figure_1.jpeg)

![](_page_59_Figure_2.jpeg)

Figura 18 – Painel da esquerda. Comparação entre as eficiências catalíticas (kcat/Km) da ALDH1 (CiALDH1A, verde) e da ALDH2 (CiALDH2, marron) de *C. intestinalis* representadas em escala semi-logaritmica. Painel da direita. Os dados de eficiência catalítica são apoiados pela representação em paralelo da evolução dos Km das enzimas frente aos diferentes substratos quando representados em escala linear.

![](_page_59_Figure_4.jpeg)

#### 4.7.9 O curioso comportamento da ALDH1C de Ciona intestinalis

Os mesmos ensaios de cinética enzimática realizados para as ALDHs de C. intestinalis e B. floridae apresentados anteriormente foram realizados utilizando a ALDH1C de C. intestinalis. Contudo, interessantemente, a enzima ALDH1C apresentava atividade de óxido-redução aparente, mesmo na ausência de um substrato. Este fenômeno foi observado durante as análises dos controle experimentais sem aldeído presente, que exibiram excelentes curvas de progresso. Para compreender a natureza insólita deste fenômeno executamos testes com cada um dos componentes do ensaio bioquímico, isolados ou em combinação, com o intuito de identificar uma possível contaminação das soluções com substrato (e.g. Diaforase, resazurina, NAD, solução contendo ALDH1C, tampão). em combinação, para verificar qual deles causou a interferência . Desta forma, 1 10 100 1000 10000 100000 1000000 0 2 4 6 8 10 12 Log Km Número de carbonos BfALDH1B CiALDH2 CiALDH1a HsALDH2\* HsALDH1\* vimos que algo presente na solução saía na purificação e estava produzindo NADH, necessário para a obtenção de sinal. Através dos ensaios biofísicos já citados, podemos inferir que nossa enzima está presente na amostra e portanto poderíamos subtrair o branco em alguma etapa. Além disso, estando monodispersa no DLS, é pouco provável que outro componente proteico esteja na solução, a não ser que esteja fortemente ligado à enzima e ainda possua mesma massa molecular, visto que no SDS-Page não foi possível detectar outra proteína. Sendo assim, algumas hipóteses são a que nossa enzima reduz o NAD de alguma forma sem a presença do aldeído ou existe um outro componente proteico, como uma chaperona, que está sendo copurificada fortemente ligada à nossa enzima. Novos ensaios, como espectrometria de massas podem nos ajudar a elucidar esta questão.

# 5 CONCLUSÃO

Os resultados que obtivemos durante o período relativo ao desenvolvimento desta tese, nos permitem concluir que houve sucesso considerável na padronização de um ensaio moderno e confiável para a avaliação da atividade das ALDHs dos invertebrados cordados *C. intestinalis e B. floridae*. A conclusão satisfatória deste objetivo, claramente o mais importante de todos, nos coloca em excelente posição para compreender, de modo direto, com ensaios cinéticos bioquímicos, as afinidades reais das enzimas supracitadas contra substratos altamente diversos como o precursor do AR, o retinaldeído, e o aldeído tóxico, acetaldeído. Após difícil jornada, durante a qual executamos várias tentativas, definimos um protocolo satisfatório para o progresso da linha de pesquisa sobre a origem da sinalização pelo AR em nosso laboratório.

O segundo tópico que destacamos foi a exitosa e inédita purificação de nada mais do que quatro (04) ALDHs de cordados invertebrados em excelentes condições de isolamento entre outras proteínas, de pureza geral, e de adequação para ensaios cinéticos, um desempenho muito satisfatório para um programa de pesquisa inédito em nosso laboratório.

De grande importância em nossa avaliação, é a análise preliminar da afinidade das enzimas ALDH1 e ALDH2 de *C. intestinalis* e *B. floridae* que reportamos. Embora o conjunto de dados ainda não esteja completo, as noções que estabelecemos neste trabalho já nos permitem tecer considerações valiosas para a interpretação das diferenças estruturais ligadas à emergência de enzimas do tipo ALDH1 com estrutura variante em cordados invertebrados (i.e. ALDH1s de *B. floridae e C. intestinalis* que adquiriram várias das características mais comumente associadas às ALDH2s (SOBREIRA et al., 2011).

Os resultados que obtivemos podem ser interpretados em duas escalas distintas. Em um escala mais abrangente, cobrindo várias ordens de magnitude de Km, foi interessante observar que todas as ALDHs de invertebrados cordados que analisamos, incluindo duas ALDH1 e uma ALDH2, apresentaram um padrão semelhante ao exibido pela ALDH1 de vertebrados utilizada para comparação (ALDH1A1/RALDH1 de *Homo sapiens*). Este perfil, quando plotado contra o número de carbonos dos substratos aldeídicos, mostra uma clara preferência para aldeídos de volume crescente, em contraste com pequenos aldeídos, para os quais o perfil indica afinidades muito baixas. No padrão ALDH1, portanto, é possível observar a redução do Km à medida em que o tamanho do substarato aumenta, o que contrasta enfaticamente com a relativa constancia do Km da ALDH2 humana e sua clara competência para a oxidação de aldeídos pequenos. Assim, é apropriado indagar: que tipo de ALDH representa uma enzima ALDH1 variante de cordado invertebrado? Na escala de comparação da Figura 16, que cruza cerca de seis ordens de magnitude, a resposta para a pergunta acima é clara. As ALDH1s de cordados invertebrados comportam-se, efetivamente, como ALDH1s, isto é, exibem preferência crescente por substratos mais volumosos. A surpresa nos resultados que obtivemos, foi o comportamento tipo ALDH1 presentado pela ALDH2 de *C. intestinalis*. Como já comentado acima, a surpresa foi relativa, pois, de acordo com nossas simulações (SO-BREIRA et al., 2011). , o CES da ALDH2 de *C. intestinalis* é bastante volumoso, um traço que é comum em todas as ALDH1, e que explica a preferencia por substratos mais volumosos. Infelizmente, ainda não conseguimos obter a enzima ALDH2 de *B. floridae* em condições de pureza para ensaio. A disponibilidade de parâmetros enzimáticos desta enzima de cefalocordado para comparação nos permitiria concluir se o curioso carater de ALDH1 exibido pela ALDH2 de *C. intestinalis* é uma peculiaridade da enzima deste tunicado, ou reflete uma condição mais geral das enzimas ALDH2 de cordados invertebrados (i.e. cefalocordados mais tunicados).

Se a comparação efetuada utilizando-se as largas escalas logaritmicas da Figura 16 aponta uma curiosa associação da ALDH2 de C. intestinalis com o fenótipo enzimático de ALDH1, uma análise mais focada, utilizando escalas mais restritas e parâmetros mais precisos como o kcat e a eficiência catalítica (kcat/Km) indica que tanto a ALDH1A, quanto a ALDH2 de *C. intestinalis* apresentam as características esperadas. Assim, a ALDH1A exibe eficiência catalítica quase duas ordens de magnitude superior àquela apresentada pela ALDH2 de C. intestinalis, e esta mostra, embora em escala mais restrita, uma menor tendência para aumentar sua afinidade com o incremento do volume de seus substratos aldeídicos, uma característica típica de ALDH2 (Figura 18B)

Em vários aspectos, o que chama mais atenção na Figura 16 é o padrão da ALDH2 humana. A enzima, altamente eficiente na degradação de pequenos aldeídos, praticamente não exibe aumento de afinidade para substratos com volume crescente, em grande contraste com as outras enzimas estudadas. Esse comportamento é consistente com a presença de um CES estreito e pouco volumoso, como sugerimos anteriormente (SOBREIRA et al., 2011). O pequeno CES da ALDH2 humana em particular, e das ALDH2 de vertebrados em geral pode representar um caso específico de adaptação deste tipo de enzimas a pequenos aldeídos, ou, como sugerimos, refletir uma condição do ancestral de todas as enzimas da clade ALDH1/2 (SOBREIRA et al., 2011).

Nossos resultados indicaram que as ALDH1 variantes de cordados invertebrados ALDH1A de *C. intestinalis* e ALDH1B de *B. floridae* possuem capacidade de atuar como enzimas ALDH1, apesar de terem incorporado assinaturas típicas das ALDH2. Não sabemos ainda se o perfil de ALDH1 por nós atribuído para a ALDH1A de *C. intestinalis* e ALDH1B de *B. floridae* se traduzirá em habilidade de processar o volumoso retinaldeído, o precursor do morfógeno AR. Quanto à ALDH2 de *C. intestinalis*, sabemos hoje que ela é capaz de processar pequenos aldeidos como o acetaldeido e apresenta, assim como a ALDH2 de *H.sapiens*, uma clara inabilidade de aumentar progressivamente sua afinidade para substratos de volume crescente. Embora semelhante nestes aspectos à ALDH2 humana, a ALDH2 de *C. intestinalis* se mostra claramente menos eficaz, quando comparamos suas eficiências catalíticas. Em resumo, acreditamos que nosso trabalho, embora ainda não totalmente completo, avançou de modo significativo a compreensão da evolução das enzimas ALDH no âmbito do grande grupo dos animais cordados. Novos experimentos serão necessários para consolidar, ou reavaliar, as noções que avançamos, mas, sem dúvida, o método foi estabelecido e os principais caminhos já trilhados.

## Referências

AHARONI, A. et al. The 'evolvability' of promiscuous protein functions. *Nature Genetics*, v. 37, p. 73 – 76, Nov 2005.

ALBALAT, R. et al. Evolution of Retinoid and Steroid Signaling: Vertebrate Diversification from an Amphioxus Perspective. *Genome Biology and Evolution*, Oxford University Press, v. 3, p. 985 – 1005, 2011. ISSN 1759-6653. Disponível em: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3184775/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3184775/</a>.

B., J. et al. Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. *Hum Genomics*, v. 4, n. 5, p. 283 – 303, May 2011.

BLOOM, J. D.; ARNOLD, F. H. In the light of directed evolution: Pathways of adaptive protein evolution. *PNAS*, v. 1, n. 106, p. 9995 – 10000, Jun 2009.

BOYD, K. N.; O'BUCKLEY, T. K.; MORROW, A. L. The Role of Acetaldehyde in Ethanol-Induced Elevation of the Neuroactive Steroid  $3\alpha$ -hydroxy- $5\alpha$ -pregnan-20-one in Rats. *Alcohol Clin Exp Res*, v. 10, n. 32, p. 1774 – 1781, Oct 2008.

BRIDGHAM, J. T.; ORTLUND, E. A.; THORNTON, J. W. An epistatic ratchet constrains the direction of glucocorticoid receptor evolution. *Nature*, v. 461, p. 515 – 519, Sep 2009.

CAMPO-PAYSAA, F. et al. Retinoic acid signaling in development: tissue-specific functions and evolutionary origins. *Genesis*, v. 11, n. 46, p. 640 – 656, Nov 2008.

CAÑESTRO, C.; YOKOI, H.; POSTLETHWAIT, J. Evolutionary developmental biology and genomics. *Nat Rev Genet*, v. 8, n. 12, p. 932 – 942, Dec 2007.

CHEN, C. et al. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science*, v. 5895, n. 321, p. 1493 – 1495, Sep 2008.

CHEN, C. et al. An Activator of Mutant and Wildtype Aldehyde Dehydrogenase Reduces Ischemic Damage to the Heart. *Science (New York, N.Y.)*, v. 321, n. 5895, p. 1493 – 1495, 9 2008. ISSN 0036-8075. Disponível em: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2741612/>">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2741612/></a>.

CHEN, C.; SUN, L.; MOCHLY-ROSEN, D. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase and cardiac diseases. *Cardiovasc Res.*, v. 1, n. 88, p. 51 – 57, Oct 2010.

COLLIN, R.; MIGLIETTA, M. Reversing opinions on Dollo's Law. *Trends Ecol Evol.*, v. 11, n. 23, p. 602 – 609, Nov 2008.

DOLLO, L. THE LAWS OF EVOLUTION. In: \_\_\_\_. [S.I.: s.n.], 1893. VII, p. 164 – 166.

DUESTER, G. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell*, v. 6, n. 134, p. 921 – 931, Sep 2008.

EISENBE, S.; EISENBE, S. Evolutionary mechanism as a template for protein engineering. *J. Peptide Sci*, v. 16, n. 10, p. 538 – 544, Oct 2010.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst.*, v. 1, n. 60, p. 2126 – 2132, Dec 2004.

GLASNER, M.; GERLT, J.; BABBITT, P. Mechanisms of Protein Evolution and their Application to Protein Engineering. In: \_\_\_\_\_. *Advances in Enzymology*: And related areas of molecular biology. [S.I.]: ohn Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2010.

GLASNER, M. E.; GERLT, J. A.; BABBITT, P. C. Evolution of enzyme superfamilies. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 5, n. 10, p. 492 – 497, Oct 2006.

HO, K. et al. Differential effects of Mg2+ ions on the individual kinetic steps of human cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases. *Biochemistry*, v. 22, n. 44, p. 8022 – 8029, Jun 2005.

HOCHGREB, T. et al. A caudorostral wave of RALDH2 conveys anteroposterior information to the cardiac field. *Development*, n. 130, p. 5363 – 5374, 2003.

HOLLAND, L. Z. et al. The amphioxus genome illuminates vertebrate origins and cephalochordate biology. *Genome Research*, v. 18, p. 1100 – 1111, Jun 2008.

HOLLAND, L. Z.; LAUDET, V.; SCHUBERT, M. The chordate amphioxus: an emerging model organism for developmental biology. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, v. 61, n. 18, p. 2290 – 2308, Sep 2004.

HUA, Q.; WEISS, M. A. Mechanism of insulin fibrillation the structure of insulin under amyloidogenic conditions resembles a protein-folding intermediate. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 20, p. 21449 – 21460, Feb 2004.

LEMAIRE, P.; SMITH, W. C.; NISHIDA, H. Ascidians and the Plasticity of the Chordate Developmental Program. *Current Biology*, v. 18, n. 14, p. R620 – R631, Jul 2008.

LYNCH, M.; KATJU, V. The altered evolutionary trajectories of gene duplicates. *Trends Genet.*, v. 20, n. 11, p. 544 – 549, Nov 2004.

MA, H. et al. Aldehyde Dehydrogenase 2 Knockout Accentuates Ethanol-Induced Cardiac Depression: Role of Protein Phosphatases. *Journal of molecular and cellular cardiology*, v. 49, n. 2, p. 322 – 329, 8 2010. ISSN 0022-2828. Disponível em: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2885537/>">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2885537/></a>.

MA, H. et al. Aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) rescues myocardial ischaemia/reperfusion injury: role of autophagy paradox and toxic aldehyde. *Eur Heart J.*, v. 8, n. 32, p. 1025 – 1038, Apr 2011.

MA, H. et al. Aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) rescues myocardial ischaemia/reperfusion injury: role of autophagy paradox and toxic aldehyde. *European Heart Journal*, Oxford University Press, v. 32, n. 8, p. 1025 – 1038, 4 2011. ISSN 0195-668X. Disponível em: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3076664/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3076664/</a>.

MA, H. et al. Aldehyde dehydrogenase 2 knockout accentuates ethanol-induced cardiac depression: Role of protein phosphatases. v. 49, n. 2, p. 322 – 329, Aug 2010.

MARCHITTI, S. A. et al. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, v. 4, n. 6, p. 697 – 720, 6 2008. ISSN 1742-5255. Disponível em: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2658643/>">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2658643/></a>.

MARLÉTAZ, F. et al. Retinoic acid signaling and the evolution of chordates. *Internacional Journal of Biological Sciences*, v. 2, n. 2, p. 38 – 47, Apr 2006. ISSN 1449-2288.

MARSHALL, C. R.; RAFF, E. C.; RAFF, R. A. Dollo's law and the death and resurrection of genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 25, n. 91, p. 12283 – 12287, Dec 1994.

NIEDERREITHER, K. et al. Genetic evidence that oxidative derivatives of retinoic acid are not involved in retinoid signaling during mouse development. *Nature Genetics*, v. 31, p. 84 – 88, Apr 2002.

PEREZ-MILLER, S. et al. Alda-1 is an agonist and chemical chaperone for the common human aldehyde dehydrogenase 2 variant. *Nat Struct Mol Biol.*, v. 2, n. 17, p. 159 – 164, Feb 2010.

RASHKOVETSKY, L.; MARET, W.; KLYOSOV, A. Human Liver Aldehyde Dehydrogenases: New Method of Purification of the Major Mitochondrial and Cytosolic Enzymes and Re-Evaluation of Their Kinetic Properties. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA*, p. 301 – 307, 1994.

ROMERO, P. A.; ARNOLD, F. H. Exploring protein fitness landscapes by directed evolution. *Nature reviews. Molecular cell biology*, v. 10, n. 12, p. 866 – 876, 12 2009. ISSN 1471-0072. Disponível em: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2997618/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2997618/</a>.

SALASPURO, M. Acetaldehyde and gastric cancer. *J Dig Dis.*, v. 2, n. 12, p. 51 – 59, Apr 2011.

SCHUBERT, M. et al. Amphioxus and tunicates as evolutionary model systems. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 21, n. 5, p. 269 – 277, May 2006.

SHI-YAN LI; MARK GOMELSKY; JINHONG DUAN; ZHAOJIE ZHANG; LARISSA GOMELSKY; XIAOCHUN ZHANG; PAUL N. EPSTEIN; JUN REN. Overexpression of Aldehyde Dehydrogenase-2 (ALDH2) Transgene Prevents Acetaldehyde-induced Cell Injury in Human Umbilical Vein Endothelial Cells ROLE OF ERK AND p38 MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE. *The Journal of Biological Chemistry*, n. 279, p. 11244 – 11252, Mar 2004.

SIMÕES-COSTA, M. S.; AZAMBUJA, A. P.; XAVIER-NETO, J. The search for non-chordate retinoic acid signaling: lessons from chordates. *J. Exp. Zool.*, v. 310B, p. 54 – 72, Nov 2006.

SJ., G. Dollo on Dollo's law: irreversibility and the status of evolutionary laws. *J Hist Biol.*, p. 189 – 212, 1970.

SOBREIRA, T. J. P. et al. Structural shifts of aldehyde dehydrogenase enzymes were instrumental for the early evolution of retinoid-dependent axial patterning in metazoans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 1, n. 108, p. 226 – 231, Jan 2011.

STRELOW, J. et al. Mechanism of Action Assays for Enzymes. [S.I.], 2012.

SWALLA, B. J.; XAVIER-NETO, J. Chordate origins and evolution. *Genesis*, v. 46, n. 11, p. 575 – 579, Nov 2008.

WIENS, J. Re-evolution of lost mandibular teeth in frogs after more than 200 million years, and re-evaluating Dollo's law. *Evolution*, v. 5, n. 65, p. 1283 – 1296, May 2011.

YOSHIDA, A. et al. Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur J Biochem.*, v. 3, n. 251, p. 549 – 557, Feb 1998.

ZHANG, Y.; REN, J. ALDH2 in Alcoholic Heart Diseases: Molecular Mechanism and Clinical Implications. *Pharmacology & therapeutics*, v. 132, n. 1, p. 86 – 95, 10 2011. ISSN 0163-7258. Disponível em: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3144032/>">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3144032/></a>.