

## ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA HIDROXINITRILA LIASE (HNL) RELACIONADA A CIANOGENESE EM MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz).

Sandra Barbosa de SOUSA<sup>1</sup>, Nelcimar Reis SOUSA<sup>2</sup>, Miguel DIAS<sup>2</sup>, Gilvan Ferreira da SILVA<sup>2</sup>

**RESUMO:** A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é importante cultura de subsistência e seu consumo pode ser determinado em função do conteúdo cianogênico. Cultivares com elevado conteúdo de HCN são mais apropriadas para o consumo na forma de farinha, enquanto, as cultivares com baixo conteúdo de HCN são preferidas para consumo na forma cozida ou frita. Os glicosídeos cianogênicos são liberados após sofrerem injúrias ou cortes. A enzima Hidroxinitrila liase (HNL) está envolvida na liberação de glicosídeos cianogênicos. O objetivo do trabalho foi analisar e caracterizar HNL de *M. esculenta*, inferir sobre a conservação da seqüência de nucleotídeos e relações filogenéticas das espécies vegetais produtoras HCN. A caracterização da proteína HNL foi realizada a partir de seqüências depositadas no banco de dados NCBI. A análise filogenética confirma uma evolução convergente de HNL entre diferentes grupos de plantas.

**Palavras-chave:** *Manihot esculenta*; ácido cianídrico; hidroxinitrila liase; filogenia.

**SUMMARY:** Cassava is a important food-crop for subsistence farmers and that the consumption can be determined in function of the hydrogen cyanide acid (HCN) content. Roots of bitter cultivars have a high HCN content and are consumed only after processing, Sweet cultivars have low HCN content and can be consumed without any kind of processing. The release of cyanogenic glucosides results in (HCN) production when cassava tissues are mechanically damaged and hydroxynitrile lyase enzyme (HNL) is involved in the breakdown of stored cyanogenic glucosides. The objective of this paper was analyze and characterize HNL of *M. esculenta*, inferring about the conservation of the sequence of nucleotídeos and relationship among crop species that produce cyanogenic glycosides. The characterization of the protein HNL was carried out from sequences deposited in NCBI protein database. The phylogenetic analysis confirms a convergent evolution of HNL between different plants.

**Keywords:** HCN content, cyanide acid, cyanogenesis

---

<sup>1</sup> Iniciação Científica PAIC/FAPEAM

<sup>2</sup> Embrapa Amazônia Ocidental, Rodovia AM-010, Km 29, Caixa Postal 319, 69010-970, Manaus, AM.

## INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma espécie que o consumo pode ser determinado em função do conteúdo cianogênico. Cultivares com mais de 100 mg eq. HCN/kg de polpa das raízes são classificadas como bravas ou amargas e são mais apropriadas para o consumo na forma de farinha, enquanto, as cultivares mansas ou doces, com menos de 100 mg eq. HCN/kg de polpa das raízes são preferidas para consumo na forma cozida ou frita. A toxicidade por HCN pode ser acidental decorrente de confusão na identificação de cultivares ou processamento inadequado da farinha. Por outro lado, a cianogênese é considerada um mecanismo de defesa vegetal por vários autores, o que apóia o emprego do líquido extraído durante o processamento da farinha como inseticida natural (manipueira).

Plantas cianogênicas são caracterizadas por acumular precursores cianogênicos nos vacúolos, que são liberados após sofrerem injúrias ou cortes. A enzima Hidroxinitrila liase (HNL) está envolvida na liberação de glicosídeos cianogênicos e sua análise por meio de abordagem comparativa pode gerar informações importantes para a biotecnologia da mandioca. A hidroximetil liase de *M. esculenta* é classificada como HNL do tipo II, que é caracterizada pela ausência do cofator FAD (flavin adenine dinucleotide). Esse grupo de proteínas é mais heterogêneo e tem sido identificado nas famílias Poaceae, Euforbiaceae, Linaceae, Olacaceae e Filicaceae (Sherma et al. 2005; Hickel et al. 1996). O objetivo do trabalho foi analisar e caracterizar HNL de *M. esculenta*, inferir sobre a conservação da seqüência de nucleotídeos e relações filogenéticas das espécies vegetais produtoras HCN.

## MATERIAL E MÉTODOS

A caracterização da proteína HNL foi realizada a partir de seqüências depositadas no banco de dados NCBI. Para análise comparativa da substituição de aminoácidos entre HNL de *M. esculenta* foram utilizadas 20 sequencias cujos acessos são: (3YAS\_A, 1YB6\_A, 1YB7\_A, AAC49184, 4YAS\_A, CAA11428, CAA11219, S45682, CAA82334, PS2705\_3, AAV52635, AAZ67612, CAB80381, CAB16760, CAD12888, 1GX5\_D, 3GDN\_B, P52707\_ e BAH23314). As inferências filogenéticas entre 19 sequencia pertencente a 6 espécies foi realizada por meio do software Mega 4.0 (Kumar et al 2008). As seqüências foram alinhadas com o auxílio do programa ClustalX versão 2.0 (Larkin et al 2007) e editadas com o software Bioedit (<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Encontra-se depositadas no NCBI seis seqüências do gene que codifica a proteína HNL cujos acessos são CAA82334,S45682 e PS2705 oriundos de triagem em biblioteca de cDNA de cotilédones (Hughes et.al.1994) e dois CAA11219, CAA11428 obtidos de biblioteca gemônica da cultivar MBRA534 (Hughes et.al.1998) e AAV52632. O alinhamento destas seqüências tem revelado que a isoforma (CAA11428) apresenta uma substituição de Serina por Fenilalanina na posição 78, que provavelmente ocorreu por transição (C→T), uma vez que as trincas de nucleotídeos que codificam o aminoácido Serina são TCT, TCC, TCA e TCG; enquanto as que codificam a Fenilalanina são TTT e TTC. Nos acessos (CAA11219 e CAA11428) a Histidina 248 foi substituída por Glutamina e Glicina, respectivamente. A modificação (His→Glu) possivelmente ocorreu por transversão (C→G), enquanto (His→Gli) seria preciso duas mutações nos dois primeiros nucleotídeos (CA por GG). Outra modificação observada foi a substituição da Alanina 185 por Treonina na cultivar MBR354 (CAA11428). As combinações possíveis para Alanina e Treonina são respectivamente (GCT,GCC,GCA e GCG) e (ACT,ACC,ACA e ACG), contudo a mutação por transição (G→ A) da primeira base pode explicar a mudança.

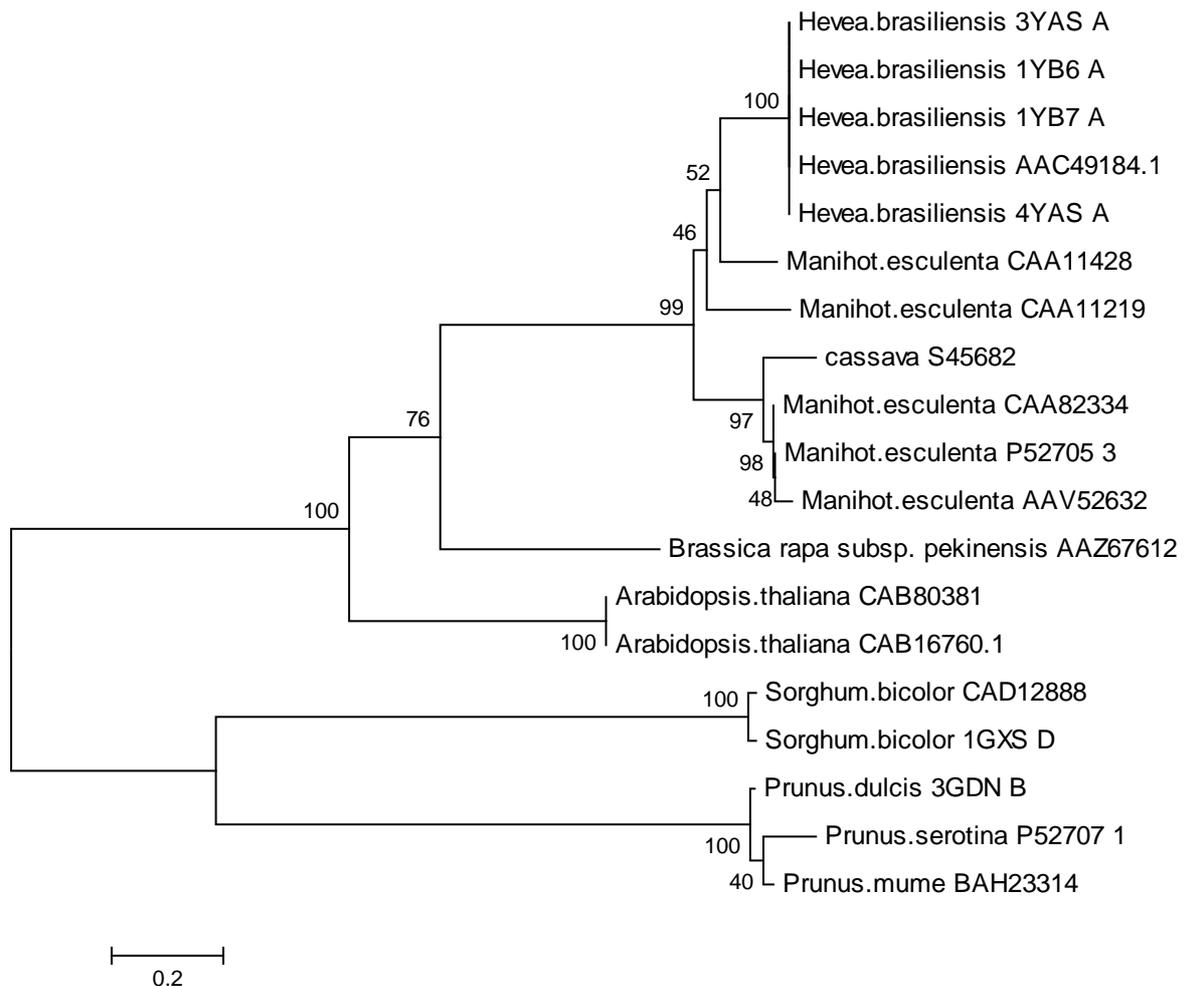
|            |                 |                  |
|------------|-----------------|------------------|
| * : * ***  | ** : * : * ** : | * . : * : * ** : |
| MRKGSRLFQN | KTEEV AHILQEV   | QNVLAQRPKFTEK    |
| TRKGFRLFQN | KTKEIAQILQEV    | QNILTKREKFTEE    |
| TRRGSLFQS  | KTNEIAGILQKV    | QSILAQRKFKFTEK   |

**Fig.2:** Comparação, alinhamento e modificações em seis sequencias de HNL em *M. esculenta*.

Em populações naturais cultivares de mandioca com diferentes potenciais para biossíntese de HCN pode está relacionada as mutações na sequência de nucleotídeos do gene que codifica HNL. Mutagenese sítio direcionada tem sido realizada tem sido utilizada em HNL em *M. esculenta* com objetivo de elucidar o papel de vários resíduos relacionados ao sítio ativo envolvido na ligação do substrato, os resultados tem revelado que a substituição desses resíduos podem reduzir atividade enzimática ou aumentá-la. (Lauble et al 2002). Os aminoácidos que estão relacionados com o sítio ativo são: Serina (Ser 84), Triptofano (Trp 132), Cisteína (Cis 85), Treonina (Thr 15) e Histidina (His 240), Nos acessos números (IE8D\_B, IE8D\_A, IE89\_B e IE89\_A) a Ser 84 foi substituída pela Alanina

por meio de mutagenese sitio direcionada. Do mesmo modo ,o Trp 132 foi substituído pela Alanina nos acessos (IEB9\_B ,IEB9\_A ,IEB8\_B e IEB8\_A). A mutação Thr11Ala mostrou um drástico efeito nas propriedades da enzima e uma queda de 95% na atividade (Lauble et al 2001).

A análise filogenética Figura 2 agrupou as espécies em dois cladogramas, sem correlação em tipo I ou II, *Hevea brasiliensis* e *M. esculenta* estão mais relacionadas entre se como esperando. HNL de *Sorghum bicolor* e *Prunus* tiveram a mesma origem evolutiva.



**Fig.2** Análise de filogenética da proteína HNL

A análise filogenética revelou que a proteína HNL apresenta uma evolução do tipo convergente, representada duas origens diferentes. Houve a formação de quatro grupos, sendo um deles composto pelos gêneros *Manihot* e *Hevea*, que pertencem à mesma família, Euphorbiaceae.

## CONCLUSÕES

A análise filogenética confirma uma evolução convergente de HNL entre diferentes grupos de plantas. Em virtude do reduzido número de seqüências do gene que codifica HNL de *M. esculenta* disponível nos bancos de dados, a clonagem e caracterização de novas HNLs de cultivares com diferente potencial cianogênico poderá contribuir para determinar os mecanismos bioquímicos relacionados a síntese de HCN. Esclarecendo inclusive se a biossíntese está relacionada à diferenças na produção de transcritos do gene ou a mutações em importantes sítios da proteína. Permitindo, desse modo, a seleção cultivares para diferentes aplicações como controle biológico de pragas (elevada síntese de HCL) e uso alimentar (baixo potencial cianogênico).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HUGHES, J; KERESZTESSY, Z; BROWN,K; SUHANDONO, S; HUGHES,M.A;Genomic organization and structure of alpha-hydroxynitrile lyase in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Archives of Biochemistry Biophysics**, vol.356, 107-116,1998.
- HUGHES,J; CARVALHO, F.J.P.C;HUGHES,M.A;Purification,Characterization,and Cloning of alpha Hydroxynitrile Lyase from Cassava(*Manihot esculenta* Crantz). **Archives of Biochemistry and Biophysics** ,vol.311,496-502,1994.
- LAUBLE, H; MIEHLICH,B; FORSTER, S;KOBLE,C;WAJANT,H;EFFENBERGER,F; Structure determinants of substrate specificity of hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta*. **Protein Science**, Germany, v. 11 , p. 65-71, 2001.
- LAUBLE, H., MIEHLICH, B., FORSTER, S., WAJANT, H., AND EFFENBERGER, F. MECHANISTIC Aspects of Cyanogenesis from active-site Mutant Ser80Ala of Hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* in Complex with Acetone Cyanohydrine. **Protein Science**, Germany, v.10, p.1015-1022, 2001.
- SHARMA, M.; SHARMA, N.N.; BHALLA, T.C. Hydroxynitrile lyases: at the interface of biology and chemistry. **Enzyme Microb Technol**, v. 37, p. 279–294, 2005.