ESTUDO DE PROTEÍNAS NA ÁREA FARMACÊUTICA E BIOMÉDICA POR MEIO DE FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA

Ronaldo Correia da SILVA

SILVA, Ronaldo Correia da. Projeto de investigação científica **Estudo de proteínas na área farmacêutica e biomédica por meio de ferramentas de bioinformática,** do Curso de Biomedicina – Centro Universitário Fibra, Belém, 2016.

Este trabalho objetivou caracterizar a estrutura molecular uma L-asparaginase de de linhagem da uma cianobactéria Limnothrix sp. oriunda da Amazônia brasileira, juntamente com seu substrato dipeptidio β-Asp-Arg. Foram utilizadas ferramentas de bioinformática, usando modelagem por homologia, docagem e dinâmica molecular. O estudo é pioneiro em caracterizar a estrutura funcional de uma asparaginase de Limnothrix sp. de cianobactéria. As asparaginases (L-asparagina amidohidrolase E.C. 3.5.1.1, L-ASNase), produzidas por muitas espécies de procariotos e eucariotos, são enzimas responsáveis pela catálise da reação de hidrólise do aminoácido L-asparagina, que resulta na produção de ácido aspártico e amônia, mas que, de acordo com o

papel da L-asparagina, podem desempenhar diferentes funções em diferentes organismos [1]. Um terceiro tipo do papel das asparaginases do tipo I e II [2, 3] foi observado recentemente em Escherichia coli com estrutura semelhante à asparaginase de planta. A isoaspartil aminopeptidase/asparaginase (EcAIII) catalisa a hidrólise da asparagina em aspartato e amônia e também a dipeptídeos isoaspartil, hidrólise de а partir da degradação da cianoficina [4, 5], um polipeptídeo ramificado [6, 7] com importante interesse biotecnológico, fazendo com que o ácido oligo-arginil poliaspártico obtido possa ser utilizado como um substituto biodegradável em vários produtos, incluindo os derivados do petróleo, além da utilização em processos técnicos e na área médica [8]. A análise da diversidade de L-asparaginase de fungos e cianobactérias tem sido negligenciada. Foram gerados modelos tridimensionais por meio de modelagem homologia molecular das seguências primárias de proteínas disponíveis no Genbank; validados os modelos construídos considerando a qualidade estereoquímica, a energia livre e a similaridade estrutural da proteína; determinado o melhor modo de ligação dos ligantes complexados no sitio ativo por simulações de docagem molecular, utilizando o programa Molegro Virtual Dock. A seguência nucleotídica-alvo foi obtida a partir de uma análise genômica da cianobactéria Limnothrix sp., isolada de uma amostra de água superficial do reservatório da Usina Hidrelétrica de Tucuruí, Pará, Brasil (3º49'55" S, 49°38'50" W). As leituras genômicas foram geradas por meio da plataforma 454 (Roche), em que, após obtenção dos contigs, a ORF predita e anotada como codificante de L-asparaginase, por meio da ferramenta RAST [9], foi programa Geneious submetida ao versão 7.0.4 (http://www.geneious.com/), utilizando o código genético bacteriano, para a obtenção da respectiva sequência de aminoácidos, cujo resultado foi confirmado com a ferramenta BlastX [10]. A seguência de aminoácidos-alvo foi submetida ao servidor Protein Data Bank – PDB para alinhamento e busca de estrutura homóloga. A visualização do alinhamento entre alvo e referência selecionada foi obtida com auxílio do servidor ESPript 2.2 [11]. Para a construção do modelo da L-asparaginase, foi utilizado o programa Modeller v9.16 [12]. Essas três validacões foram realizadas, respectivamente, com auxílio do servidor MolProbity [13], Verify3D [14] e Root Mean Square Deviation (RMSD) [15]. Foi construído o

mapa de potencial eletrostático, que revela as regiões eletrofílicas e nucleofílicas por meio do servidor Solver PBEQ [16]. O substrato dipeptidio β-Asp-Arg descrito por Michalska [17] e obtido no banco de dados de compostos químicos Zinc¹² [18], Código 2564466, foi docado, por meio de um conjunto de parâmetros pré-determinados e seguindo o protocolo de publicação [19]. Foram utilizadas como referência três funções de pontuação, todas do Molegro: MolDock Score, ReRank Score e HBond. As docagens foram realizadas na referência e alvo, e os valores obtidos foram comparados com os dados experimentais disponíveis. A partir do alinhamento inicial, a L-asparaginase de Limnothrix SP apresentou maior homologia com a sequência do precursor da enzima isoaspartil peptidase/L-asparaginase de Escherichia coli (código PDB 2ZAL), que foi escolhido como referência para a construção do modelo molecular da isoaspartil de Limnothrix sp. O alinhamento entre o alvo e a referência resultou nos seguintes parâmetros: 33% de identidade, 46% de similaridade, score de 100,91 bits (250) e 5% (15/275) de gaps. O mínimo de 30% de identidade entre sequências de resíduos de aminoácidos pode resultar em excelente sobreposição das cadeias principais [20]. A

referência selecionada apresenta duas cadeias ($\alpha \in \beta$) com aproximadamente 320 resíduos de aminoácidos cada, que foi classificada como um novo tipo de asparaginase semelhante às asparaginases de planta. Sua estrutura foi determinada experimentalmente com resolução de 1.95 Å na cristalografia de raio-X. O modelo gerado para a L-asparaginase revelou uma estrutura contendo 8 β-folhas e 4 α-hélices, tratando-se de uma isoaspartil peptidase/asparaginase (EcAIII). De acordo com a referência, esta enzima é produzida na forma inativa heterotetrâmero. dímero de como um heterodímeros ($\alpha\beta$)₂. Ainda em comparação à referência, o sítio catalítico da EcAIII cianobacteriana apresentou-se inteiramente conservado. A qualidade estereoquímica do modelo 3D foi avaliada pelo gráfico de Ramachandran construído pelo servidor MolProbity, avaliando assim a disposição dos resíduos com base nos ângulos de torção $\Phi \in \psi$ de cada um deles. O gráfico de Ramachandran apresentou 93,5% dos resíduos em regiões favoráveis no modelo. O outro método de validação do modelo (Verify 3D) pode ser visualizado na sessão de Materiais Suplementares. O RMSD avalia a similaridade estrutural por meio da distância apresentada entre os Ca de cada molécula, que é medida a partir da sobreposição do modelo gerado com a referência. Para este parâmetro, são esperados valores próximo de 0. O resultado obtido, igual a 0,28Å, indica uma elevada conservação estrutural da enzima. Com o objetivo de investigar como o substrato dipeptidio se comporta no sitio ativo da EcAIII de ambas as estruturas, foram obtidos cinco poses do ligante, com cálculos computacionais durante o processo de docagem molecular. Foi escolhida a melhor posição, de acordo com as distâncias, maior número de interações e energia de afinidade com o substrato. As distâncias médias obtidas entre os resíduos do sítio ativo da proteína-alvo com o substrato peptídeo foram plotadas. Verificou-se que os valores teóricos eram próximos dos valores experimentais. O substrato dipeptídeo forma ligações de hidrogênio com distâncias de até 3Å com a treonina catalítica, além das interações com os resíduos Gly207 (199), Asp218 (210) e Gly237 (233) na proteína-alvo (entre parêntesis estão os resíduos equivalentes no modelo de referência). O átomo de hidrogênio do resíduo Thr187 (179) interage fortemente com o átomo de oxigênio substrato, por meio de uma distância de 2,55Å (2,21Å), menor que aquela obtida em dados experimentais (> 3Å).

O modelo obtido apresentou maior similaridade com a enzima EcAIII de E. coli, que é semelhante às asparaginases de planta, na qual participa da hidrólise da L-asparagina e de dipeptídeos isoaspartil, que são formados pelo metabolismo de síntese proteica da célula. A docagem e a dinâmica molecular, além do cálculo de mostraram distâncias e energia livre. energias semelhantes, sugerindo funções da EcAIII de Limnothrix sp similares às de *E.coli*, porém sem dados experimentais para comparação. Sugere-se que se realizem testes experimentais com o substrato dipeptídeo para confirmar a semelhança catalítica entre as duas enzimas. Essas estratégias perspectivas abrem de para estudos mutagênse com o objetivo de otimizar o potencial biotecnológico das asparaginases de cianobactérias.

PALAVRAS-CHAVE: Proteínas. Área farmacêutica e biomédica. Bioinformática.

REFERÊNCIAS

1. HALEY E (1968) Purification and properties of a beta-Aspartyl peptidase from Escherichia coli. The Journal of Biological Chemistry 243:5748-5752

2. SRIKHANTA YN, ATACK JM, BEACHAM IR, JENNINGS MP (2013) Distinct physiological roles for the two I-asparaginase isozymes of Escherichia coli. Biochemical and Biophysical Research Communications 436 (3):362-365.

doi:<u>http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.05.066.</u>

3. MÜLLER HJ, BOOS J Use of I-asparaginase in childhood ALL. Critical Reviews in Oncology / Hematology 28 (2):97-113. doi:10.1016/s1040-8428(98)00015-8

4. BROWN SP, MUCHMORE SW (2006) High-Throughput Calculation of Protein-Ligand Binding Affinities: Modification and Adaptation of the MM-PBSA Protocol to Enterprise Grid Computing. Journal of Chemical Information and Modeling 46 (3):999-1005. doi:10.1021/ci050488t

5. HOU T, WANG J, LI Y, WANG W (2011) Assessing the Performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 1. The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations. Journal of Chemical Information and Modeling 51 (1):69-82. doi:10.1021/ci100275a

6. PAPALEO E, SALADINO G, LAMBRUGHI M, LINDORFF-LARSEN K, GERVASIO FL, NUSSINOV R (2016) The Role of Protein Loops and Linkers in Conformational Dynamics and Allostery. Chemical Reviews. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00623

7. CASE DA, CHEATHAM TE, DARDEN TOM, GOHLKE H, LUO RAY, MERZ KM, ONUFRIEV A, SIMMERLING C, WANG B, WOODS RJ (2005) The Amber Biomolecular Simulation Programs. Journal of Computational Chemistry 26 (16):1668-1688. doi:10.1002/jcc.20290

8. SCHWAMBORN M (1998) Chemical synthesis of polyaspartates: a biodegradable alternative to currently used polycarboxylate homo- and copolymers. Polymer Degradation and Stability 59:39-45.

9. MICHALSKA K, HERNANDEZ-SANTOYO A, JASKOLSKI M (2008) The Mechanism of Autocatalytic Activation of Plant-type L-Asparaginases. Journal of Biological Chemistry 283 (19):13388-13397

10. SIMMONS TL, ANDRIANASOLO E, MCPHAIL K, FLATT P, GERWICK WH (2005) Marine natural products as anticancer drugs. Molecular Cancer Therapeutics 4 (2):333-342

11. AZIZ R, BARTELS D, BEST A, DEJONGH M, DISZ T, EDWARDS R, FORMSMA K, GERDES S, GLASS E, KUBAL M, MEYER F, OLSEN G, OLSON R, OSTERMAN A, OVERBEEK R, MCNEIL L, PAARMANN D, PACZIAN T, PARRELLO B, PUSCH G, REICH C, STEVENS R, VASSIEVA O, VONSTEIN V, WILKE A, ZAGNITKO O (2008) The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. BMC Genomics 9 (1):75 12. ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ (1990) Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215 (3):403-410. doi:<u>http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2</u>

13. GOUET P, COURCELLE E, STUART DI, M \sqrt{c} TOZ F (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. Bioinformatics 15 (4):305-308

14. ESWAR N, WEBB B, MARTI-RENOM MA, MADHUSUDHAN MS, ERAMIAN D, SHEN M-Y, PIEPER U, SALI A (2001) Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. In: Current Protocols in Protein Science. John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/0471140864.ps0209s50

15. CHEN VB, ARENDALL WB, III, HEADD JJ, KEEDY DA, IMMORMINO RM, KAPRAL GJ, MURRAY LW, RICHARDSON JS, RICHARDSON DC (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. Acta Crystallographica Section D 66 (1):12-21

16. EISENBERG D, LÜTHY R, BOWIE JU (1997) [20] VERIFY3D: Assessment of protein models with threedimensional profiles. In: Charles W. Carter Jr RMS (ed) Methods in Enzymology, vol Volume 277. Academic Press, pp 396-404. doi:<u>http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(97)77022-8</u>

17. ENGH RA, HUBER R (1991) Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. Acta Crystallographica Section A 47 (4):392-400

18. MORRIS G, LIM-WILBY M (2008) Molecular Docking. In: Kukol A (ed) Molecular Modeling of Proteins, vol 443. Methods Molecular Biology™. Humana Press, pp 365-382. doi:10.1007/978-1-59745-177-2_19

19. MICHALSKA K, BRZEZINSKI K, JASKOLSKI M (2005) Crystal Structure of Isoaspartyl Aminopeptidase in Complex with I-Aspartate. Journal of Biological Chemistry 280 (31):28484-28491

20. IRWIN JJ, STERLING T, MYSINGER MM, BOLSTAD ES, COLEMAN RG (2012) ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. Journal of Chemical Information and Modeling 52 (7):1757-1768. doi:10.1021/ci3001277