

ESTUDO BIOTECNOLÓGICO DA LECTINA CIANOBACTERIANA MICROVIRINA

Adonis de Melo LIMA

LIMA, Adonis de Melo. Projeto de investigação científica **Estudo biotecnológico da lectina cianobacteriana microvirina**, do Curso de Biomedicina – Centro Universitário Fibra, Belém, 2018.

Justifica-se esta investigação especialmente pela constante necessidade de desenvolvimento de novos fármacos frente à alta capacidade de incorporação de mutações genéticas que tornam o VIH resistente aos antivirais pré-existentes. Realizar análises *in silico* da microvirina de *Microcystis aeruginosa* CACIAM 03 para sua otimização estrutural visando à melhora da interação receptor-ligante foi objetivo almejado. A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) é uma doença do sistema imunológico humano decorrente da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida humana (VIH), o qual infecta células T-helper, macrófagos e células dendríticas (“DeCS Server -- List Exact Term”, [s.d.]). Nos seres humanos, a condição é manifestada por falha progressiva do sistema imunológico (AKKOUH *et al.*, 2015). O

paciente acometido pela doença apresenta também aumento na susceptibilidade a infecções oportunistas e neoplasias malignas. As manifestações clínicas incluem emagrecimento extremo (emaciação) e demência. Esses elementos refletem os critérios para a SIDA de acordo com o Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (“DeCS Server - List Exact Term”, [s.d.]). O VIH que já infectou cerca de 60 milhões de pessoas ao redor do mundo tem, na África subsaariana, onde 1 em cada 20 adultos está infectado, a região mais afetada (“REPORT ON THE GLOBAL AIDS EPIDEMIC, 2012”, [s.d.]). Esse cenário levou os cientistas a trabalharem no desenvolvimento de novas medidas para a prevenção de infecções por VIH (GIBSON *et al.*, 2010). Existem vários medicamentos disponíveis no mercado e ainda 30 novos medicamentos anti-VIH já foram aprovados (RUELAS; GREENE, 2013). A quimioterapia encontra obstáculos, já que à medida que o VIH apresenta resistência a certos medicamentos, que podem também provocar vários efeitos colaterais. Outro grande problema da quimioterapia é que os inibidores de protease (IPs), da *Nucleoside reverse transcriptase inhibitors* (NRTI) e *Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors* (NNRTIs)

visam à paralisação do processo de replicação viral numa fase em que o VIH já infectou células T CD4+ (SOUZA, 2005). Uma promissora abordagem para o desenvolvimento de fármacos anti-VIH envolve a lectina microvirina (MVN), que é produzida pela cianobactéria *Microcystis aeruginosa*. Em comparação com outra lectina cianobacteriana, a cianovirina-N (CVN), a MVN apresenta menor toxicidade, mantendo sua potente ligação a carboidratos do envelope viral, dessa forma estabelecendo a sua atividade microbicida por meio da interação com a manose da glicoproteína gp120 localizada na superfície do vírus (HUSKENS *et al.*, 2010). Souza *et al.* (2016), avaliando mutações *in silico* no resíduo Asp 53 da microvirina de *Microcystis aeruginosa* (PDB 2YHH), observaram que o Trp mostrou os melhores resultados após o estudo computacional, com valores mais favoráveis, usando métodos de cálculos de energia. As lectinas antivirais são muitas vezes resistentes ao baixo pH e altas temperaturas, bem como são inodoras, o que se caracteriza como uma propriedade que faz das lectinas antivirais importantes alvos para o desenvolvimento de fármacos (“Ziolkowska, N. E. & Wlodawer, A. Structural studies of algal lectins with anti-

HIV activity. *Acta Biochim. Pol.* 53, 617-626 (PDF Download Available"), [s.d.]). A simulação computacional tem-se constituído em uma ferramenta poderosa para a compreensão dos fenômenos físicos e químicos em sistemas proteicos, e tem ajudado a entender que as estruturas biomoleculares são estruturas dinâmicas (KARPLUS; MCCAMMON, 2002). Porém é quase certo que um modelo teórico possua erros, devendo passar por um processo de refinamento da geometria, envolvendo minimização de energia. Após a construção do modelo teórico, a Dinâmica Molecular (DM) pode ser utilizada para refiná-lo e, assim, diminuir sua energia, podendo prever seu comportamento dinâmico em meio aquoso em um determinado período de tempo. Além disso, é possível estudar as interações da proteína predita com diversos inibidores e substratos existentes (MARTI-RENOM *et al.*, 2002). Neste projeto, foi utilizado o programa Amber, desenvolvido para simular sistemas moleculares a partir de mecânica molecular. Foram realizados cálculos de dinâmica molecular para um tempo de 50 ns do complexo enzima-substrato, necessário para que pudessem ser verificadas possíveis mudanças, dentro de uma caixa de água, na intenção de simular o entorno proteico.

Moléculas de água TIP3 (MAHONEY; JORGENSEN, 2000) foram acrescentadas no entorno proteico do sistema. Os valores de pKa dos resíduos de aminoácidos foram determinados por meio do servidor PROPKA 2.0, considerando o pH neutro. a. Após adicionar os átomos de hidrogênio na estrutura, uma série de algoritmos de otimização foi aplicada. Depois, o sistema foi totalmente relaxado e a proteína colocada em uma caixa de água cúbica de 80 Å, utilizando o substrato como centro geométrico. Durante a simulação, foi calculado o RMSD da trajetória. O servidor web, Alanine Binding-Site scan (ABS scan), foi usado para a mutagênese por varredura de alanina no sítio proteína-ligante. O ABS scan combina os pacotes de software mais utilizados -- Modeller para a mutação de alanina específica no local e Autodock para funções de pontuação de complexo proteína-ligante (ANAND *et al.*, 2014). Esse fluxo de trabalho permitiu o envio do complexo proteína-ligante por meio do upload do arquivo no formato PDB. O cut-off usado para definir a distância entre os átomos do ligante e os resíduos do sítio de ligação foi de 4,5Å. Foi feita a seleção 58 do ligante específico, em torno do qual a mutagênese de varredura de alanina *in silico* foi realizada. Uma vez que a interface

de entrada foi preparada, o pacote Modeller foi usado para realizar mutagênese específica em todos os resíduos selecionados, levando em consideração o cut-off de 4,5Å, juntamente com etapas de minimização de energia. Cada interface mutada foi submetida ao Autodock para cálculo de energia das interações proteína-ligante. A essencialidade de um resíduo pôde ser determinada pela comparação de energias intermoleculares de sítios mutados com a do tipo selvagem por meio de valores de $\Delta\Delta G$, os valores de valor $\Delta\Delta G$ neste caso indicam indiretamente a perda na energia de ligação de interação proteína-ligante devido à mutação para alanina. Quanto maior o valor, mais importante é a contribuição do resíduo, que foi mutado para a alanina, para o reconhecimento do ligante. O valor foi obtido a partir da subtração da energia de ligação do tipo selvagem com o ligante e o mutante com o ligante obtido a partir do score de atracamento molecular e esses resultados foram usados como referência para as mutações apresentadas nesta tese. O MM-PBSA também foi usado para o cálculo de energia livre por meio do programa MMPBSA.py. Vários modelos implícitos de solvatação estão disponíveis com MMPBSA.py, incluindo

o modelo de PoissonBoltzmann, o Generalized Born Model, e o Reference Interaction Site Model. As frequências vibratórias podem ser calculadas usando o modo normal ou análise quasiharmônica para aproximar a entropia do soluto. As interações específicas também podem ser dissecadas usando a decomposição de energia livre. Uma implementação paralela acelera significativamente o cálculo dividindo os quadros uniformemente entre os processadores disponíveis (MILLER *et al.*, 2012). Para o cálculo da energia livre de ligação por meio dos métodos MM-PB(GB)AS, foi necessária uma simulação para cada estado analisado. Para reduzir o custo computacional, os três ensembles foram obtidos da simulação do complexo em solvente explícito, utilizando a técnica denominada de protocolo de trajetória simples. O módulo CPPTRAJ (ROE; CHEATHAM, 2013) implementado no pacote Amber16 foi utilizado para extrair as informações necessárias para a realização dos cálculos. Para cada simulação, os últimos 10 ns de simulação por DM, de um total de 210 ns produzidos, foram extraídos para serem submetidos às análises de MM-GBSA, utilizando o módulo do pacote Amber16 MMPBSA.py (MILLER *et al.*, 2012). Após

aplicada a técnica de modelagem comparativa, foi possível visualizar a estrutura tridimensional com os seus principais resíduos de interação MVN-manose: Asn 44, Asn 55, Gln 54, Glu 58, Thr 59, Gln 81, Thr 82, Met 83, Asp 46 e Ile 45 (Fig. 01). A composição residual e a disposição espacial se assemelharam bastante com a estrutura resolvida experimentalmente. O modelo da MVN apresentou 97% dos resíduos situados em regiões energeticamente favoráveis, 2% em regiões permitidas e apenas 1% em regiões não permitidas, mostrando que a modelagem por homologia conferiu conformação energeticamente estável para a MVN. A partir do Scan de alanina, os resíduos localizados no ponto de interação com a manose, o AA que apresentou menor contribuição energética para a ligação com a manose foi o resíduo Thr82, sendo este alvo para mutação. Foi gerado o gráfico de RMSD, para se poder observar a estabilidade do mutante Thr82Arg ao longo da simulação por dinâmica molecular, durante o tempo de 100ns. Os valores abaixo de 3 angstroms comprovam uma estabilidade conformacional em meio aquoso. Tal comportamento reforça a importância dessa lectina, que tem função adaptativa nas cianobactérias. A investigação demonstrou

resultados satisfatórios da interação da proteína com a manose. As características estruturais obtidas da proteína de *Microcystis aeruginosa* apontaram um mutante, trabalhado e aprimorado para geração de uma proteína otimizada que possa ser estável em ambiente aquoso. Os fluidos corporais possuem em sua composição uma grande quantidade de água e os resultados corroboram um excelente comportamento do mutante desenhado em meio aquoso.

PALAVRAS-CHAVE: Lectina cianobacteriana microvirina. Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. Dinâmica molecular.

REFERÊNCIAS

AKKOUH, O. *et al.* Lectins with Anti-HIV Activity: A Review. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 648–668, 6 jan. 2015.

ANAND, P. *et al.* ABS–Scan: In silico alanine scanning mutagenesis for binding site residues in protein–ligand complex. **F1000Research**, v. 3, p. 214, 1 dez. 2014.

SOUZA, Conceição de; R. *et al.* Investigating the effects of point mutations on the affinity between the cyanobacterial

lectin microvirin and high mannose-type glycans present on the HIV envelope glycoprotein. **Journal of Molecular Modeling**, v. 22, n. 11, 2016.

DeCS Server - List Exact Term. Disponível em: <<http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decssserver/>>. Acesso em: 21 maio. 2017.

GIBSON, D. G. *et al.* Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 329, n. 5987, p. 52–6, 2 jul. 2010.
Global AIDS response progress reporting 2015. Disponível em: <http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/JC2702_GARPR2015guidelines_en.pdf>. Acesso em: 19 jul. 2015.

HUSKENS, D. *et al.* Microvirin, a novel alpha(1,2)-mannose-specific lectin isolated from *Microcystis aeruginosa*, has anti-HIV-1 activity comparable with that of cyanovirin-N but a much higher safety profile. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 32, p. 24845–54, 6 ago. 2010.

KARPLUS, M.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nature structural biology**, v. 9, n. 9, p. 646–52, set. 2002.

MAHONEY, M. W.; JORGENSEN, W. L. A five-site model

for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid, nonpolarizable potential functions. http://oasc12039.247realmedia.com/RealMedia/ads/click_ix.ads/www.aip.org/pt/adcenter/pdfcover_test/L-37/20939943/x01/AIPPT/JCP_ArticleDL_0117/PTBG_orange_1640x440.jpg/434f71374e315a556e61414141774c75?x, 5 maio 2000.

MARTI-RENOM, M. A. *et al.* Reliability of assessment of protein structure prediction methods. **Structure (London, England : 1993)**, v. 10, n. 3, p. 435–40, mar. 2002.

MILLER, B. R. *et al.* MMPBSA.py: An efficient program for end-state free energy calculations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 8, n. 9, p. 3314–3321, 2012.

REPORT ON THE GLOBAL AIDS EPIDEMIC, 2012.

Disponível em:

<http://www.unaids.org.br/documentos/UNAIDS_GR2012_em_en.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2015.

ROE, D. R.; CHEATHAM, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 9, n. 7, p. 3084–3095, 9 jul. 2013.

RUELAS, D. S.; GREENE, W. C. An integrated overview of HIV-1 latency. **Cell**, v. 155, n. 3, p. 519–29, 24 out.

2013.

SOUZA, M. V. N. DE. Fuzeon, o primeiro medicamento de uma nova classe anti-HIV denominada inibidores de fusão. **Rev. Bras. Farm**, v. 86, p. 112–116, 2005.