

# USO DE FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA PARA OBTENÇÃO DE MUTANTE DA PROTEÍNA GLUTATIONA S TRANSFERASE: UMA COMBINAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR, CÁLCULO DE ENERGIA LIVRE E SCAN DE ALANINA

Adonis de Melo LIMA

LIMA, Adonis de Melo. Projeto de investigação científica **Uso de ferramentas de bioinformática para obtenção de mutante da proteína glutathione S transferase: uma combinação de dinâmica molecular, cálculo de energia livre e scan de alanina**, do Curso de Biomedicina – Centro Universitário Fibrá, Belém, 2016.

Julga-se ser relevante conhecer a estrutura tridimensional das proteínas da família das GSTs do mosquito *A. darlingi* para elucidar com mais acurácia suas prováveis funções biológicas não esclarecidas ainda. Essa é a razão de o estudo aqui realizado utilizar ferramentas de bioinformática para elucidar as interações entre a enzima GST e seu cofator GSH de *Anopheles darlingi* encontrado na região amazônica. O principal vetor da malária no Brasil é o *Anopheles darlingi*, presente no interior de todo o território. Pesquisas sobre esses culicídeos são importantes fontes de dados para auxiliar os programas de controle. O objetivo das ações de controle vetorial em

saúde pública é diminuir a transmissão de doenças por meio da eliminação de parte da população de mosquitos infectados que frequentemente está em contato com o homem. Essa eliminação pode ser feita com base no combate a larvas ou adultos por meio da extinção de criadouros (controle físico), da utilização de organismos naturalmente predadores dos mosquitos (controle biológico) ou do uso de produtos capazes de matar os mosquitos (controle químico). Esta última é uma das metodologias mais utilizadas como parte de programas de combate aos vetores, principalmente por meio de ações como a borrifação intradomiciliar, a nebulização espacial e, mais recentemente no Brasil, o uso de mosquiteiros impregnados. Atualmente, os inseticidas utilizados em saúde pública são derivados de piretroide, uma classe de inseticidas que surgiu em substituição aos organoclorados, representados, principalmente, pelo DDT, muito utilizados no combate à malária até a década de 1990. O uso inadvertido desse produto, tanto em saúde pública quanto na agricultura, pode ter sido um dos causadores de um efeito indesejado em um produto dessa classe: o desenvolvimento de resistência por parte da praga-alvo. Um dos mecanismos envolvidos no

processo resistência está relacionado à presença da família enzimática glutathione S transferases (GSTs), envolvida no processo de desintoxicação, desempenhando um mecanismo fundamental de defesa desses insetos a inseticidas. Os modelos teóricos das GSTs do mosquito *Anopheles darlingi* podem resolver as interações que ocorrem entre os átomos da proteína e seu cofator por meio da dinâmica molecular, entretanto, primeiramente, deve-se acoplar essa enzima ao seu substrato, utilizando o processo de docagem molecular. Os procedimentos adotados foram: identificar o sítio ativo da proteína GST gerada por modelagem molecular comparativa; realizar docagem molecular do cofator GSH no sítio ativo da GST; selecionar a conformação mais estável do complexo enzima-cofator; realizar o Scan de Alanina com a ferramenta ABS-Scan; e proceder a simulações de dinâmica molecular no complexo enzima-cofator. Os cálculos realizados foram processados em uma placa de vídeo NVIDIA GTX 970 com 1664 núcleos CUDA. A sequência de aminoácidos-alvo foi retirada do banco de dados GenBank (ID: ETN63518.1). O servidor Protein Data Bank (PDB) foi utilizado para buscar sequências homólogas. O alinhamento da sequência-alvo

com a sequência homóloga escolhida (PDB ID: 1jvl) e a construção do modelo tridimensional teórico foi realizado com o programa Modeller 9.10. O programa Pymol foi utilizado para fazer as comparações visuais gerais entre o modelo gerado e o pdb 1jlv. Um gráfico de Ramachandram foi plotado no servidor RAMPAGE, para verificar os ângulos diédricos phi e psi nos aminoácidos do modelo construído e o servidor ANOLEA foi utilizado para avaliar a energia de conformação de cada resíduo da sua cadeia lateral. A estrutura tridimensional do substrato GSH foi retirada do banco de dados PubChem. O acoplamento do substrato no modelo teórico foi realizado com o programa Molegro, adotando flexibilidade apenas para o substrato. Foram rodados 150ns de dinâmica molecular no modelo construído e no pdb 1jlv com o pacote de programas Amber12, adotando o campo de força ff99SB. O sistema modelo-substrato foi solvatado com o programa tleap, utilizando uma caixa de 10 Å com o modelo de água TIP3P. O programa Sander realizou 5 passos de minimização da energia de ligação do sistema solvatado e 15 passos de aquecimento e equilíbrio necessários para dar início a simulação de dinâmica molecular. A trajetória total gerada foi analisada pelo

programa xmGrace, que plotou um gráfico de Root Mean Square Deviation (RMSD) e Root Mean Square Fluctuation (RMSF). O servidor ChandraLab foi utilizado para encontrar os resíduos participantes do sítio de interação com o substrato GSH. O método Scan de Alanina foi aplicado, com o programa Sietraj, para verificar a relevância energética dos aminoácidos do sítio de interação. As pontes de hidrogênio entre o substrato e o modelo foram medidas com o programa Visual Molecular Dynamics (VMD), que, juntamente com o programa Chimera, foi utilizado para análises visuais. As sequências de aminoácidos do modelo construído e do pdb 1jlv obtiveram 96% de identidade ao serem alinhadas e pôde-se observar a conservação estereoquímica de todos os resíduos do sítio de interação com o substrato GSH. O modelo construído apresentou a forma canônica das GST's, com cinco alfa-hélices e quatro beta-folhas. Para uma melhor visualização, os 11 resíduos finais da estrutura foram deletados. O pdb do modelo construído foi sobreposto ao pdb 1jlv e apresentou um RMSD com apenas 0.097Å de desvio. O gráfico de Ramachandran gerado mostrou 97,7% dos aminoácidos com ângulos phi e psi corretos para sua conformação espacial. No servidor

ANOEA foram identificados somente três aminoácidos da cadeia lateral, participantes do sítio de interação com o substrato GSH do modelo, com alta energia. Após os 150ns de dinâmica molecular realizados, observou-se uma diminuição das energias totais de interação. Os gráficos de RMSD e RMSF mostraram flutuações abaixo de 3Å, que confirmaram o bom andamento da simulação. Todas as pontes de hidrogênio entre o modelo e o substrato medidas obtiveram valores de aproximadamente 2Å, assegurando que a posição do substrato durante o processo de dinâmica não se alterou de forma relevante. O scan de alanina revelou que o aminoácido valina na posição 65 possui a maior interação com o substrato GSH, sendo o mais importante para sua estabilidade no sítio de interação do modelo. Pôde-se verificar no modelo construído a forma canônica das GST's. Seis alfa-hélices e quatro beta-folhas. Um domínio N-terminal com 78 aminoácidos e um domínio C-terminal com 132 aminoácidos. O desvio quadrático médio (RMSD) e o desvio de flutuação média (RMSF) se mantiveram abaixo de 3 Å durante toda a simulação. Notou-se que o cofator GSH interagiu por meio de ligações de hidrogênio com os aminoácidos SER9,

HIS50, VAL52, GLU64, SER65, ARG66, constituintes do sítio ativo conhecido na literatura como sítio G e o servidor ABS-scan a serina na posição 9 como sendo o resíduo de maior contribuição energética e, portanto, o mais importante para a estabilidade do cofator GSH no sítio ativo. Durante os 210 ns de dinâmica molecular, o sistema não demonstrou grandes alterações conformacionais, confirmando a qualidade das análises realizadas. A conservação dos resíduos do sítio G permitirá o estudo das interações entre a enzima e o inseticida DDT.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bioinformática. Proteína glutathione S transferase. Dinâmica molecular. Scan de alanina.