

DINÂMICA MOLECULAR DA PROTEÍNA NS5 DO VÍRUS ZIKA

Adonis de Melo LIMA

LIMA, Adonis de Melo. **Dinâmica molecular da proteína NS5 do vírus ZIKA**. Projeto de investigação científica do Curso de Biomedicina – Centro Universitário Fibrá, Belém, 2017.

O vírus Zika é um flavivírus (família Flaviviridae) transmitido por *Aedes aegypti*, que foi originalmente isolado de uma fêmea de macaco Rhesus febril na Floresta Zika, localizada próximo de Entebbe na Uganda, em 20 de abril de 1947. O vírus Zika tem causado doença febril, acompanhada por ocorrência de cefaleia, exantema, mal-estar, edema e dores articulares. Apesar da aparente benignidade da doença, mais recentemente na Polinésia Francesa e no Brasil, quadros mais severos, incluindo comprometimento do sistema nervoso central (síndrome de Guillain-Barré, mielite transversa e meningite), associados ao Zika, têm sido registrados. Reconhecida quase simultaneamente, em fevereiro de 2015 na Bahia e em São Paulo, a circulação da doença causada pelo vírus Zika foi rapidamente confirmada pelo

uso de métodos moleculares e, posteriormente, no Rio Grande do Norte, Alagoas, Maranhão, Pará e Rio de Janeiro, mostrando uma capacidade de dispersão impressionante, somente vista no Chikungunya nos últimos dois anos nas Américas. Em relação as suas características moleculares, o vírus Zika possui uma proteína não-estrutural 5 (NS5), que é a mais conservada proteína dos Flavivirus. Acredita-se que possua função de RNA-polimerase RNA-dependente de RNA (RpRd) em sua porção C-terminal e como uma metiltransferase em sua porção N-terminal, que é responsável pela formação do CAP 5' no RNA viral. Há estudos que mostram que a NS5 também atua na evasão à resposta imune do organismo hospedeiro antagonizando a sinalização do interferon-1 e assim impedindo a transcrição de proteínas que garantam uma resposta da célula à presença do vírus. Esse mecanismo é comum aos flavivírus e é possível que o vírus Zika – ZIKV, se comporte da mesma forma, logo se mostra importante a elucidação da estrutura (3D) da proteína NS5. O objetivo foi utilizar ferramentas de bioinformática para estudar estrutura molecular da proteína NS5 do vírus Zika. Os passos dados foram: validar modelo gerado por métodos

computacionais; realizar docagem molecular; realizar três dinâmicas moleculares de 210 nano segundos; selecionar a conformação mais estável da NS5 entre as dinâmicas obtidas. A docagem molecular é um método baseado na estrutura do receptor, que prediz a presença, a conformação e a orientação da estrutura do complexo formado entre um ligante (uma pequena molécula ou até mesmo uma proteína) e um receptor (enzima, DNA, canais iônicos, receptores, dentre outros). O estudo de docagem molecular dos substratos no sítio ativo de enzimas foi realizado por simulação usando os pacotes de modelagem molecular AutoDock, com a função de busca baseada no algoritmo genético Lamarckiano. Para efeito comparativo de metodologia de docagem molecular, também foi utilizado o programa Molegro Virtual Docker (MVD), seguindo o protocolo de Thomsen & Christensen (2006). Nas simulações, as coordenadas da enzima e dos ligantes foram preparadas usando o programa ADT- AutoDock Tools, seguindo o protocolo original de Thomsen & Christensen (2006), bem como o programa Chimera. Os processos foram realizados em fases como obtenção do alvo no PDB e preparação, obtenção do ligante/substrato e preparação, docagem e

avaliação da docagem e seus resultados. Após a construção do modelo teórico, a DM foi utilizada para refiná-lo e, assim, diminuir sua energia e prever seu comportamento dinâmico em meio aquoso em um determinado período de tempo. Foi utilizado o programa Amber, desenvolvido para simular sistemas moleculares a partir de mecânica molecular. Ele suporta uma enorme variedade de cálculos, como o aperfeiçoamento da geometria molecular. Foram realizados cálculos de dinâmica molecular para um tempo de 210 ns do complexo enzima-substrato, dentro de uma caixa de água na intenção de simular o entorno proteico. O tempo proposto foi necessário para que pudessem ser verificadas possíveis mudanças conformacionais do substrato e sua interação com a enzima, assim como o devido refinamento da proteína. Moléculas de água TIP3 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. Após adicionar os átomos de hidrogênio na estrutura, uma série de algoritmos de otimização foi aplicada. Depois disso, o sistema foi totalmente relaxado e a proteína foi colocada em uma

caixa de água cúbica de 12 Å, utilizando o substrato como centro geométrico. Durante a simulação, foi calculado o RMSD da trajetória com o objetivo de avaliar a estabilidade do modelo, realizar o cálculo de energia usando as abordagens MMPBSA e MMGBSA, fazer o scan de alanina para verificar a contribuição energética de aminoácidos específicos e calcular as distâncias médias dos átomos do substrato com os átomos dos resíduos do sítio catalítico da enzima. Foram obtidas cinco conformações do ligante, com cálculos computacionais durante o processo de docagem. Foi escolhida a melhor posição, de acordo com as distâncias, maior número de interações e energia de afinidade com o substrato. As coordenadas tridimensionais foram avaliadas por meio do gráfico de Ramachandran, construído pelo servidor MolProbity, que mostra um mapa de avaliação da qualidade estereoquímica da estrutura tridimensional por meio da relação dos ângulos Φ e Ψ . A maioria dos resíduos do modelo gerado foi encontrada ocupando as regiões mais favoráveis do gráfico, e os outros resíduos ocuparam outras regiões permitidas. No modelo gerado, 97% dos resíduos foram encontrados em regiões favoráveis, 2% em regiões permitidas e 1% em

regiões não permitidas. O atracamento molecular foi realizado no sistema do alvo NS5, antes e depois da dinâmica molecular. Foi possível observar que o melhor resultado de MolDock e o maior número de interações ocorreram após o processo de simulação de dinâmica molecular. Foram realizados 30 cálculos de atracamento molecular com tamanho populacional de 250 em cada uma delas. Foram obtidas dessa forma 5 conformações com os melhores candidatas com base nas pontuações de MolDock, Rerank e Hbond. A melhor conformação obtida, antes da dinâmica molecular, apresentou pontuação de -178,78 no MolDock, -90,236 no Re-Rank e Hbond -7,894. E as principais interações descritas experimentalmente foram mantidas após o atracamento. Os resultados obtidos após os 210ns da DM03 mostraram um número maior de interações, melhores valores de MolDock Score, Rerank Score e Hbond. A melhor conformação obtida depois da dinâmica molecular apresentou pontuação de -190,696 no MolDock e -93,407 no Re-Rank. O estudo é pioneiro na caracterização da estrutura funcional da NS5 do vírus Zika. O modelo obtido mostra alta similaridade com o modelo experimental e os

resultados suportam a uma função semelhante ao modelo de referência.

PALAVRAS-CHAVE: Dinâmica molecular. Proteína NS5 do vírus Zika. Bioinformática.

REFERÊNCIA

THOMAS A. HALGREN, Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94, J. Comp. Chem.; 1996; 490-519.