

CANDIDATOS A FÁRMACOS POR MEIO DE SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL

Ronaldo Correia da SILVA

SILVA, Ronaldo Correia da. **Candidatos a fármacos por meio de simulação computacional**. Projeto de investigação científica do Curso de Biomedicina – Centro Universitário Fibrá, Belém, 2017.

O objetivo desta pesquisa foi realizar análise *in silico* do potencial biotecnológico de asparaginases de *Escherichia coli* (Proteobactéria) e *Limnotrix* sp. CACIAM 69D (Cyanobacteria). Asparaginases (EC 3.5.1.1) são amino-hidrolases que catalisam a hidrólise de asparagina (ou glutamina) em aspartato (ou glutamato) e amônia. Essas enzimas desempenham um papel importante no metabolismo dos aminoácidos em uma variedade de organismos. São de grande interesse biotecnológico. A L-asparaginase, por exemplo, é um componente-chave da terapia para leucemia linfoblástica aguda e outros cânceres sanguíneos relacionados. As asparaginases constituem um grupo diversificado de enzimas produzidas

por microorganismos, plantas e animais, que incluem L-asparaginases microbianas e L-asparaginases vegetais. As L-asparaginases podem ser divididas em três tipos: (i) L-asparaginases de tipo bacteriano, (ii) L-asparaginases tipo planta, também denominadas tipo III e (iii). L-asparaginases do tipo bacteriana são ainda classificadas nos subtipos I e II, de acordo com sua localização intra e extracelular, afinidade do substrato e forma oligomérica. O tipo I (citossólico) tem menor afinidade para a L-asparagina, enquanto o tipo II (periplasmático) tem alta afinidade pelo substrato. As L-asparaginases do tipo bacteriano catalisam a hidrólise do grupo amida de L-asparagina, produzindo ácido L-aspártico e amônia, enquanto as asparaginases do tipo planta e seus homólogos bacterianos hidrolizam a ligação amida da cadeia lateral da asparagina ou de dipeptídeos de isoaspartato resultando na liberação de L-Asp. Esse cenário estimula a criação de novos ligantes e o estudo das diversas abordagens de engenharia *in silico*. Outro cenário importante faz referência ao suprimento de fármacos usados em oncologia e oncohematologia, os quais têm sido a causa de grande preocupação para os sistemas de saúde, inclusive com risco de

desabastecimento mundial do mercado de medicamentos hematológicos e oncohematológicos, o que implicaria, imediatamente, a suspensão do tratamento de doenças, tais como, a hemofilia, a leucemia mieloide aguda e o mieloma múltiplo. Considerando que vários estudos relatam compostos de *E.coli* e cianobacterianos com atividade otimizada (TASI *et al.*, 1993) estudar a estrutura dessas proteínas e sua interação com ligantes, além de modificar seu sítio catalítico com vistas a alterar sua atividade enzimática pode ser uma alternativa para otimizar a atividade anticancerígena (caso da asparaginase de *E. coli*, EcAll) e de acúmulo de dipeptídeos no interior do microorganismo (caso da asparaginase semelhante à de planta). Apesar de sua importância, as formulações de L-ASNases comercialmente disponíveis apresentam elevadas taxas de reações de hipersensibilidade, que são mediadas provavelmente por IgG e raramente IgE, ou estão relacionadas à ativação de complemento. As reações de hipersensibilidade atingem de 15 a 73% dos pacientes, crianças ou adultos, tratados com a enzima e são acompanhadas de formação de anticorpos anti-L-asparaginase, o principal fator envolvido na redução da

meia vida da enzima no plasma. Entre essas reações são observadas, urticária, edema, febre, erupções na pele e mais raramente choques anafiláticos fatais. Foram realizadas consultas no banco de dados Pfam, que classifica motivos protéicos funcionais. O objetivo foi recuperar informações acerca dos domínios catalíticos da proteína estudada para posterior construção de modelo. Foram construídos diversos modelos tridimensionais para cada uma das sequências de L-asparaginases, utilizando-se o programa de modelagem comparativa MODELLER versão 9.10, partindo do alinhamento entre o alvo e a proteína-modelo. Após a construção do modelo e busca do ligante, foi utilizada a técnica de docagem molecular com o objetivo de ancorar os substratos naturais da enzima em seu sitio catalítico. A anotação realizada pela ferramenta RAST, confirmada pela BlastX, indicou inicialmente que a sequência de aminoácidos obtida era de uma asparaginase, porém, sem determinar o subtipo da enzima, o qual só foi identificado por meio da análise *in silico*. A identificação funcional que foi realizada nesta tese caracterizou o alvo como uma isoaspartil peptidase/asparaginase, uma asparaginase tipo planta. As enzimas tipo L-asparaginase tipo 2 apresentam um

domínio conservado, isto é, sítio ativo, que pode afetar a anotação correta de uma ORF. Por meio do alinhamento das sequências e análise por homologia no PDB, esta foi, de fato, identificada como uma isoaspartil peptidase/asparaginase tipo III, semelhante às de planta, reforçando a importância dos estudos teóricos para o refinamento da correta anotação de sequências nucleotídicas, no âmbito da análise genômica. 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. A estrutura cristalina contendo 320 resíduos pertence à família de nucleófilos N-terminal (Ntn) -hidrolases. Foi determinada com resolução de 1,9 Å, complexado com aspartato. Trata-se de um dímero de heterodímeros, $(\alpha\beta)_2$. O heterodímero $(\alpha\beta)$ é gerado por clivagem autoproteolítica da proteína imatura, exibe uma dobra de sanduíche $\alpha\beta\beta\alpha$, típica para Ntn-hidrolases. O alinhamento entre o alvo e a referência aspartil peptidase/asparaginase, tipo III, semelhante às de planta. De acordo com a referência, essa enzima é

produzida na forma inativa como heterotetrâmero, um dímero de heterodímeros $(\alpha\beta)_2$. A forma ativa, o dímero $\alpha\beta$, é produzida por um processo de autoclivagem que propicia a formação do sítio catalítico presente na porção N-terminal da subunidade β . Ainda em comparação à referência, o sítio catalítico da enzima cianobacteriana apresentou-se inteiramente conservado. A comparação estrutural entre a EcAIII de *E. coli* e isoaspartil de *Limnothrix* sp. revela que não há diferenças significativas no sítio de ligação do substrato de dipeptídeo. Dado que a atividade catalítica do modelo teórico de *Limnothrix* sp. não pôde ser avaliado apenas pela modelagem de homologia, também usamos a docagem e dinâmica molecular, mapa de potencial eletrostático e ferramentas para o cálculo de energia livre de ligação para auxiliar a entender a função principal desta asparaginase, que é a degradação do dipeptídeo L-asp-L-leu. A qualidade estereoquímica do modelo 3D foi avaliada pelo gráfico de Ramachandran, construído pelo servidor MolProbity, observando a disposição dos resíduos com base nos ângulos de torção Φ e ψ de cada um deles. A estrutura deve apresentar mais de 90% dos resíduos em regiões favoráveis para que a conformação seja considerada

possível. O gráfico de Ramachandran apresentou 93,5% dos resíduos em regiões favoráveis no modelo. O mapa de potencial eletrostático permite a visualização das regiões com alta densidade de elétrons (vermelho) e com baixa densidade de elétrons (azul). A comparação entre os mapas do alvo e referência revela similaridade entre as moléculas na distribuição das cargas, com a região do sítio ativo apresentando baixa densidade de elétrons em ambas. Isso favorece o ataque nucleofílico e é característico da família das hidrolases nucleofílicas N-Terminais, um grupo de enzimas ativadas autocataliticamente. Foram obtidas cinco conformações do ligante, com cálculos computacionais durante o processo de docagem molecular. A melhor posição foi escolhida, de acordo com as distâncias, maior número de interações e energia de afinidade com o substrato. As trajetórias foram verificadas e analisados os valores de RMSD. O monitoramento desses valores permitiu verificar se as simulações atingiram estabilidade durante a DM. Os resultados mostraram boa estabilidade da referência em solução aquosa. A estabilidade do alvo só foi adquirida após 50 ns e com RMSD elevado devido à quantidade de alças do modelo, o que permite maiores mudanças

conformacionais. As distâncias médias obtidas entre os resíduos do sítio ativo da proteína alvo com o substrato peptídeo foram plotadas. Verificamos que os valores teóricos eram próximos dos valores experimentais. O L-Asp-L-Leu 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). Outro detalhe importante é que o átomo de hidrogênio do resíduo Thr187 (179) interage fortemente com o átomo de oxigênio substrato, através de uma distância de 2,55Å (2,21Å), menor que aquela obtida em dados experimentais ($> 3\text{\AA}$). Uma característica da técnica de experimental é que a amostra cristalográfica é obtida na sua forma sólida, sem descrever o comportamento da molécula ao longo de um período de tempo, em contraste com os estudos de simulação computacional em meio aquoso ocorrem em função do tempo. Uma série de estudos mostra que os membros da família Ntn-hidrolases apresentam uma treonina como um nucleófilo na clivagem do substrato dipeptídico. Da mesma forma, a isoaspartil peptidase/asparaginase de *Limnothrix* sp.

apresenta um resíduo de Thr, na posição 187, que é o resíduo catalítico essencial. O resíduo Gly207 faz uma ligação de hidrogênio com o grupo carboxila do substrato dipeptídico, mantendo-o próximo ao local ativo. As cadeias lateral e principal dos resíduos Asp218 e Gly233, respectivamente, realizam ligações de hidrogênio com o grupo amina do substrato, proporcionando pontos de fixação no sítio ativo. Os resíduos Arg207 e Asp218 são responsáveis por outra ligação de hidrogênio com o peptídeo. Interações eletrostáticas desempenham um papel importante em sistemas biológicos. Foi observado que os resíduos Thr154 no alvo, Asn66 e Arg148 no modelo de referência, além da Thr187 (179) e Gly207 (216) realizam interações eletrostáticas com o substrato dipeptídeo, estabilizando-o no sítio ativo para que possa ocorrer o ataque eletrofílico da treonina catalítica Thr187 (179). Após a estabilidade do modelo, os últimos 10ns foram utilizados para calcular a energia livre de ligação. A interação entre a enzima e o substrato foi elucidada a partir das trajetórias obtidas pelas simulações de DM. Entretanto, a análise termodinâmica é necessária para se observar a relação entre os dados teóricos e os dados experimentais. Os cálculos de energia livre de ligação

foram realizados para o complexo proteína-ligante. A energia livre foi obtida aplicando os métodos MM-PBSA, MM-GBSA. Os resíduos Thr154 no alvo, Asn66 e Arg148 no modelo de referência, além da Thr187 (179) e Gly207 (216), realizam interações eletrostáticas com o L-Asp-L-Leu, estabilizando-o no sítio ativo para que possa ocorrer o ataque eletrofílico da treonina catalítica Thr187 (179). De todos os resíduos do sítio catalítico, apenas a treonina catalítica apresenta baixa energia livre de ligação com o substrato e apresenta distância média de 2.43 Å e 2.21 Å, no alvo e referência, respectivamente. Essa distância é próxima o suficiente para uma ligação forte de hidrogênio com o grupo carboxila, favorecendo o ataque eletrofílico, característico desta família de enzimas, concordando com os dados da literatura. Ressalta-se que a literatura carece de dados experimentais do L-Asp-L-Leu. Os átomos dos outros resíduos interagem fortemente com suas cadeias laterais, mostrando pouca variação durante a simulação de DM. Das quatro moléculas citadas, Asn66 e Thr187 (179) são descritas como altamente conservadas nessa família de enzimas. A asparagina é um importante metabolito doador de nitrogênio em organismos enquanto o aspartato é um precursor da biossíntese de

outros aminoácidos, como isoleucina, glicina e serina. Assim, a enzima isoaspartil aminopeptidase/asparaginase pode estar envolvida em diferentes vias metabólicas relacionadas ao crescimento e ao desenvolvimento do organismo. Do ponto de vista da biotecnologia, o aspartato possui aplicações como substituto do poliacrilato não biodegradável na indústria do óleo, papel e tintas. Além disso, em cianobactérias, a isoaspartil aminopeptidase/asparaginase atua no metabolismo da cianoficina, levando o produto da degradação da cianoficina pela cianoficinase, que pode ser usado como polímero biodegradável em diferentes situações. A inibição da isoaspartil aminopeptidase/asparaginase resulta em um acúmulo de dipeptídeo de cianoficina que poderia ser usado como aditivo natural na indústria farmacêutica e alimentar. A otimização da atividade da isoaspartil aminopeptidase/asparaginase pode resultar em uma melhoria da produção de aspartato, que também é uma aplicação interessante do seu potencial biotecnológico. Este estudo foi pioneiro na caracterização da estrutura funcional de uma asparaginase identificada em uma cianobactéria, neste caso, *Limnothrix* sp. CACIAM69d. O modelo obtido mostra alta similaridade

com asparaginase EcAIII de *E. coli*. Essa enzima catalisa a hidrólise de ambos os dipeptídeos L-asparagina e isoaspartil, formados no metabolismo das proteínas celulares. Os resultados obtidos suportam a hipótese de que a estrutura-alvo possui uma função semelhante ao modelo de referência e abre perspectivas para otimização de sua atividade, tendo em vista a obtenção de aspartato, produto com importante interesse biotecnológico. Em relação à EcAII de *E. coli*, o acoplamento com o substrato ASN mostrou sua afinidade ao sítio catalítico da enzima, corroborando os estudos de mecanismo catalítico enzimático e abrindo perspectivas para simulações de mutações pontuais no sítio da enzima, com o objetivo de otimizar sua atividade asparaginase e reduzir sua atividade glutamisase, com objetivo biotecnológico e terapêutico.

PALAVRAS-CHAVE: Fármacos; Simulação computacional. Asparaginases.

REFERÊNCIA

TASI, G.; PALINKÓ, I.; NYERGES, L.; FEJES, P.; HORST, F. Calculation of electrostatic potential maps and

atomic charges for large molecules. J. Chem. Inform. Comput. Sci. 1993;33:296-299.