

ANÁLISE DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO, FARMACÊUTICO E BIOMÉDICO DE ENZIMAS L- ASPARAGINASES

Ronaldo Correia da SILVA

SILVA, Ronaldo Correia da. **Análise do potencial biotecnológico, farmacêutico e biomédico de enzimas L-asparaginases.** Projeto de investigação científica, do Curso de Biomedicina – Centro Universitário Fibra, Belém, 2018.

Utilizar ferramentas de bioinformática para construir um modelo teórico da enzima L-Asparaginase de apenas uma linhagem de fungos, obtida no GenBank, foi o objetivo desta investigação. 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, dado o seu mercado e aplicações. As asparaginases constituem um grupo diversificado de enzimas produzidas por microorganismos, plantas e animais, que incluem L-asparaginases microbianas e L-

asparaginases vegetais. Podem ser divididas em três tipos: (i) L-asparaginases de tipo bacteriano, (ii) L-asparaginases tipo planta, também denominadas tipo III e (iii) Enzimas semelhantes à asparaginase de *Rhizobium* metli. 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, com risco de desabastecimento mundial do mercado, o que implicaria, imediatamente, a suspensão do tratamento de doenças, como a hemofilia, a leucemia mieloide aguda e o mieloma múltiplo. 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. Estudar a estrutura de compostos de *E.coli* e cianobacterianos com atividade otimizada e sua interação com ligantes (TASI *et al.*, 1993), além de modificar seu sitio catalítico com vistas a alterar sua atividade enzimática (MORAES *et al.*, 2016), pode ser uma alternativa para otimizar a atividade anticancerígena (caso da asparaginase de *E. coli*, EcAll) e de acúmulo de dipeptídios no interior do microorganismo (caso da asparaginase semelhante à de planta). Esta pesquisa foi baseada na análise de sequências de fungosoriunda do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Foram realizadas consultas no banco de dados Pfam (FINN *et al.*, 2010), que classifica motivos proteicos 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 sítio catalítico. 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). 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* do presente estudo. No entanto, 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. 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 (MARTÍ RENOM *et al.*, 2000). 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 resultou nos seguintes parâmetros: 40% de identidade, 50% de similaridade, escore de 51,2174 bits e 0 de *e-value*. O mínimo de 30% de identidade entre sequências de resíduos de aminoácidos pode resultar em excelente sobreposição das cadeias principais (BENNER *et al.*, 1998). 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, 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 foi usada 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 dessa asparaginase, que é a degradação do dipeptídeo L-asp-L-leu. Resultados semelhantes foram relatados para outras asparaginases de tipo planta, que apresentam a atividade da asparaginase, mas têm maior afinidade com os dipeptídeos isoaspartil. Foram obtidas cinco conformações do ligante, com cálculos computacionais durante o processo de docagem molecular, e escolhida a melhor posição, de acordo com

as distâncias, maior número de interações e energia de afinidade com o substrato. No complexo enzimático, uma treonina atua 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. A construção do modelo teórico da enzima L-asparaginase de fungos confirmou a conservação do sítio ativo e da maioria de suas estruturas secundárias. Portanto a modelagem por homologia mostrou ser uma boa alternativa para elucidação de estruturas tridimensionais em curto espaço de tempo, confirmando que a presente metodologia é uma importante ferramenta no estudo teórico de complexos enzimáticos. Além disso, o acoplamento com o substrato endógeno 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, visando a otimizar sua atividade asparaginase e a reduzir sua atividade glutamisase, com fins biotecnológicos e terapêuticos.

PALAVRAS-CHAVE: Enzimas L-asparaginases. Docagem molecular. Modelagem por homologia.

REFERÊNCIAS

BRENNER, S. E.; CHOTHIA, C.; HUBBARD, T. J. Assessing sequence comparison methods with reliable structurally identified distant evolutionary relationships. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 95, p. 6073–6078, 1998.

FINN, R. D. [The Pfam protein families database](#). *Nucleic Acids Research*, v. 38, p. 211-222, 2010.

MARTI-RENOM, M. A. *et al.* Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, v. 29, p. 291-325, 2000.

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.