

ANÁLISE *IN SILICO* DE CHALCONAS E AURONAS CONTRA A NTPDase 5 DE *Homo Sapiens*

G.M. Marion¹, V.C. Souza², P.V.S.Z. Capriles³

¹ Graduando em Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, gabrielmacedoujf@gmail.com

² Doutorando em Modelagem Computacional, Universidade Federal de Juiz de Fora, carius.nara@gmail.com

³ Doutora em Modelagem Computacional, Universidade Federal de Juiz de Fora, priscila.capriles@ufjf.edu.br

Resumo- Atualmente, a resistência à medicamentos por alguns parasitos faz a busca por novos compostos uma necessidade e uma questão humanitária, tendo em vista que a maioria das doenças causadas por parasitos são negligenciadas. Nesse contexto, o conjunto de enzimas NTPDases têm ganhado destaque, devido sua presença tanto nos vermes, como nos seres humanos, garantindo um importante alvo terapêutico. Além disso, tais enzimas são exploradas por também estarem envolvidadas em processos patológicos do próprio ser humano, sendo assim, seu estudo pode ajudar também no tratamento de doenças do próprio ser humano. Assim, o presente estudo descreve o processo de modelagem por homologia da isoforma 5 da NTPDase de *Homo sapiens*, enzima envolvida em algumas doenças auto-imunes, e o estudo de *docking* receptor-ligante contra derivados de chalconas e auronas.

Palavras-chave: Modelagem por Homologia; *Docking* proteína-ligante; NTPDases; *Homo sapiens*.

Área do Conhecimento: Ciências Exatas e da Terra.

1 INTRODUÇÃO

A compreensão da função de uma proteína normalmente exige o conhecimento de sua estrutura tridimensional (3D), sendo essa determinada por sua sequência de aminoácidos. Os métodos experimentais, como ressonância magnética nuclear (RMN) e cristalografia por raios-X são caros e demorados e isso fica claro quando se tem uma noção numérica da quantidade de estruturas resolvidas experimentalmente disponíveis, que é em torno de 2%. Além disso, o número de sequências cresce em um ritmo mais acelerado que o número de estruturas resolvidas, o que traz a necessidade de métodos mais rápidos, baratos e com qualidade aceitável para validação de estudos computacionais (XU, 2011).

Neste contexto, a modelagem por homologia ganha destaque, por ser barata, simples e confiável. Este método é baseado na relação evolutiva entre as estruturas que são utilizadas, chamadas de *templates*, para gerar o modelo tridimensional da proteína alvo. Resumidamente, o processo de modelagem requer os seguintes passos: identificação do(s) *template(s)*; seleção do(s) *template(s)*; construção do modelo e validação dos modelos gerados. Atualmente, o principal repositório público de estruturas 3D resolvidas experimentalmente é o PDB (*Protein Data Bank*), e com o auxílio de ferramentas de alinhamento de sequências é possível achar um *template* que mais se aproxima da proteína alvo (BIASINI et al., 2014).

Uma proteína de interesse para estudos *in silico* é a NTPDase de humanos. Tendo em vista as vantagens e acessibilidade aos métodos computacionais aqui descritos, foi realizado neste trabalho a modelagem por homologia da NTPDase 5 de *Homo sapiens* (HsNTPDase5), para testes de *docking* contra compostos derivados de chalconas e auronas.

1.1 ATP difosfohidrolases

As NTPDases, também chamadas apirases, NTPases ou ATP difosfohidrolases, são proteínas presentes em diversos organismos, indicando que essas enzimas possuem um papel fundamental no metabolismo celular (SOARES, 2007). Essa família de enzimas tem como função a hidrólise dos nucleosídeos difosfatados e trifosfatados em nucleosídeos monofosfatados, na presença de cátions bivalentes,

principalmente o cálcio e o magnésio. Uma característica em comum das NTPDases é a ocorrência de cinco regiões conservadas chamadas de ACR (*Apyrase Conserved Regions*), sendo que todas estão localizadas em torno do sítio ativo das NTPDases (NUNES, 2015). Há atualmente oito isoformas de NTPDases conhecidas em humanos, sendo estas agrupadas em três grupos: isoformas 1, 2, 3 e 8 localizadas na superfície celular; isoformas 5 e 6 localizadas intracelularmente, podendo ser secretadas, e isoformas 4 e 7, sendo estas presentes em organelas (SANSOM, 2012).

A expressão das NTPDases por várias células em vários tecidos, como o nervoso e o vascular, influencia os processos patofisiológicos. Alguns exemplos de processos em que as NTPDases agem são o metabolismo celular, adesão e ativação celular, agindo também no desenvolvimento, em processos como proliferação, diferenciação e apoptose. A participação das NTPDases em algumas doenças já é conhecida, como por exemplo a aterosclerose e algumas doenças neurológicas degenerativas (ROBSON *et al*, 2006).

Alguns parasitos, como *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma mansoni*, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis* têm sido estudados por expressar as NTPDases e por estas estarem associadas a virulência patológica. Um dos possíveis mecanismos de ação sugeridos é o de escape do mecanismo de defesa do organismo hospedeiro (SOARES, 2007).

Assim, o objetivo da modelagem computacional da NTPDase 5 de humanos (HsNTPDase5) é permitir um estudo de *docking* receptor-ligante comparativo com as NTPDases de parasitos, com o intuito de se avaliar o potencial das moléculas testadas em inibir somente as enzimas parasitárias e também dar início a estudos alternativos, onde serão realizados testes com foco em tratamento de doenças do próprio organismo humano.

2 METODOLOGIA

Para a modelagem da HsNTPDase5 foi utilizada a sequência da proteína alvo disponível no banco de dados Uniprot, sob o código O75356 (ENTP5_HUMAN). A sequência possui 428 resíduos, sendo os 20 primeiros detectados como peptídeo sinal através dos programas SignalP (NIELSEN, 2017) e TMHMM (KROGH, 2001) e, por isso, esses resíduos não foram incluídos no processo de modelagem. A estrutura do *template* 4BR0 (NTPDase 2 de *Rattus norvegicus*, RnNTPDase2) obtida por difração de raios-X foi retirado do banco de dados PDB.

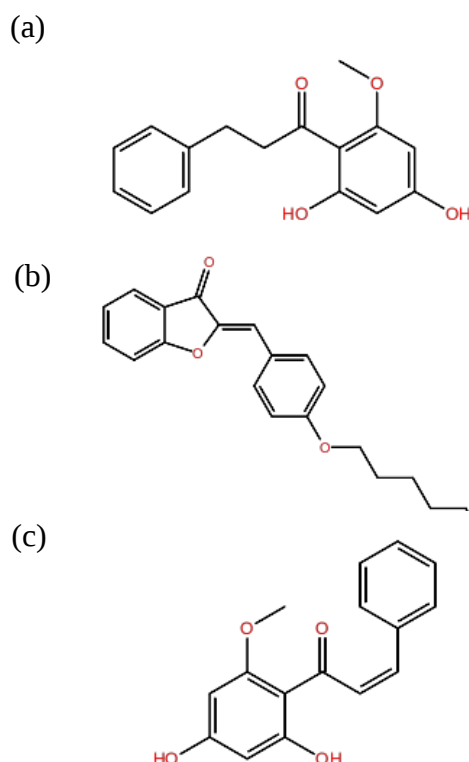
Com o auxílio de preditores de estrutura secundária, como o NetSurfP, JUFO, Porter, Psipred, e de interpretadores de estrutura secundária, como o DSSP e Stride, foi possível a comparação das sequências de aminoácidos das duas proteínas alinhadas e de suas respectivas estruturas secundárias. Desta forma, ajustes foram realizados a fim de se obter os melhores modelos por meio do programa de modelagem por homologia, Modeller - versão 9.15 (WEBB, 2014). Os modelos finais gerados possuem restrição de fita- β entre os resíduos 138-146 e de folha- β entre os resíduos 105-146. Passos de otimização no modo “*very slow*” foram aplicados para gerar 25 modelos 3D da HsNTPDase5.

Depois da modelagem, as estruturas passaram por um processo de validação. Essa validação consta de uma checagem, utilizando os programas Molprobit (CHEN, 2012) e Procheck (LASKOWSKI, 1996) que geram os gráficos de Ramachandran, onde é possível avaliar se todos os resíduos estão em regiões energeticamente favoráveis ou desfavoráveis (FILHO, 2003). Por ser uma metodologia estocástica, é possível que nos modelos gerados existam resíduos considerados *outliers*. Assim, cabe aos especialistas envolvidos no processo decidir se tais *outliers* terão alguma influência negativa na continuação dos seus estudos e, por meio de ajustes no preparo da proteína, eliminar o(s) *outlier*(s) desejados, reavaliando as estruturas com os programas já citados.

Para os estudos de *docking* receptor-ligante, a *grid* para os cálculos de energia foi construída usando o programa GLIDE versão 5.8.518. O tamanho da *grid* para a enzima foi de 32 Å (18 Å externo, 14 Å interno) e centrada próxima aos resíduos catalíticos SER37, THR38 e GLU152, localizados no sítio ativo. A *grid* para a HsNTPDase5 foi centrada nas posições X = 22,27, Y = 34,51 e Z = 21,62.

A estrutura dos compostos presentes na figura 1 foram desenhados no programa ChemSketch versão 11.0 e preparados no campo de força OPLS2005 em pH 7,4 $\pm$ 0,2, usando a versão 4.0.518 do Ligprep.

Figura 1: Compostos usados nos estudos de docking contra a HsNTPDase5. (a) Uvangoletina, (b) LS24 e (c) Cardamonina.



Os estudos de docking molecular com os compostos mais promissores (Uvangoletina, LS24 e Cardamonina) foram realizados utilizando o pacote Schrödinger Maestro 9.3.5. As imagens foram geradas utilizando o programa PyMOL, versão 1.4.1.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O alinhamento entre as sequências de aminoácidos da proteína alvo HsNTPDase5 e seu *template* RnNTPDase2 (PDB 4BR0) apresentou uma porcentagem de similaridade de 43% e uma identidade de 28%. A modelagem foi baseada somente em um *template* devido ao fato de as outras estruturas com boa similaridade no alinhamento serem provenientes de cristais de NTPDases na conformação considerada aberta. Este conceito de conformação aberta e fechada vem do mecanismo de ação proposto por Matthias Zebisch e colaboradores em seu artigo “*Crystallographic Snapshots along the Reaction Pathway of Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolases*”, de 2013, onde a aproximação das unidades da NTPDase, chamada de fechamento, ocorre com a presença do substrato no sítio ativo.

Na etapa de modelagem com o programa Modeller, foram feitas sucessivas modelagens e a cada resultado, alterações no alinhamento e no arquivo do *template* foram feitas, de modo a adequar as estruturas secundárias da proteína alvo com o desejado, preservando as ACRs. Houve uma restrição de fita- β entre os resíduos 138-146, porém o programa não foi capaz de gerar a estrutura secundária desejada, mesmo quando se deletou a região correspondente no *template* do arquivo pdb. A região compreendida

entre os resíduos 276-278 também foi deletada do pdb, com o objetivo de que o programa conseguisse construir duas fitas entre os resíduos 256-270 na proteína alvo (figura 2).

Os 25 modelos finais gerados passaram por uma triagem inicial com os programas Molprobit e Procheck, onde foi possível escolher os melhores modelos que seriam preparados e dentre eles, o que seria usado em estudos de *docking*.

O modelo 12 foi escolhido por apresentar um número menor de *outliers*, apenas dois resíduos. Porém, o resíduo SER310, considerado como um *outlier*, encontra-se próximo ao sítio ativo, ponto de interesse do estudo desenvolvido. Assim, como não foi possível a remoção desse *outlier* durante o preparo do modelo 12, duas versões dele foram feitas: uma com a SER310 em sua posição original e outro com ela reorientada dentro do sítio ativo, de maneira a analisar a influência dela nos resultados dos futuros *dockings*.

A figura 2 representa o modelo final gerado da HsNTPDase5 e a figura 3 evidencia a diferença de posicionamento do resíduo serina 310.

Figura 2: Modelo de HsNTPDase5 escolhido após a modelagem computacional. Em destaque é apresentada a região de folha- β que sofreu restrição de estrutura secundária e distância.

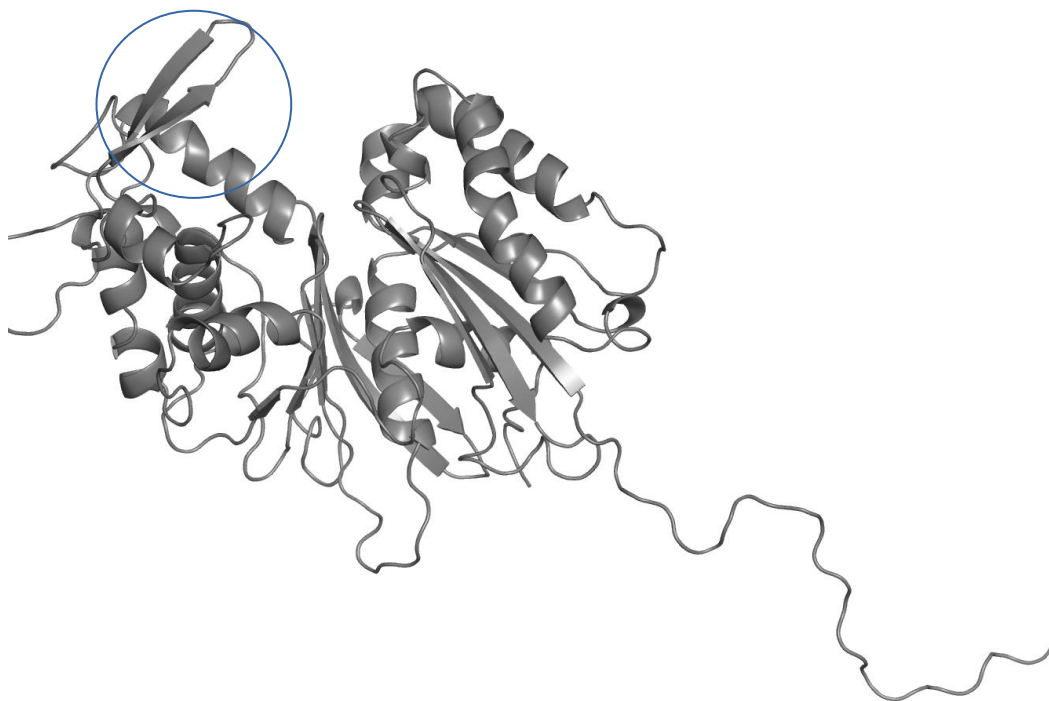
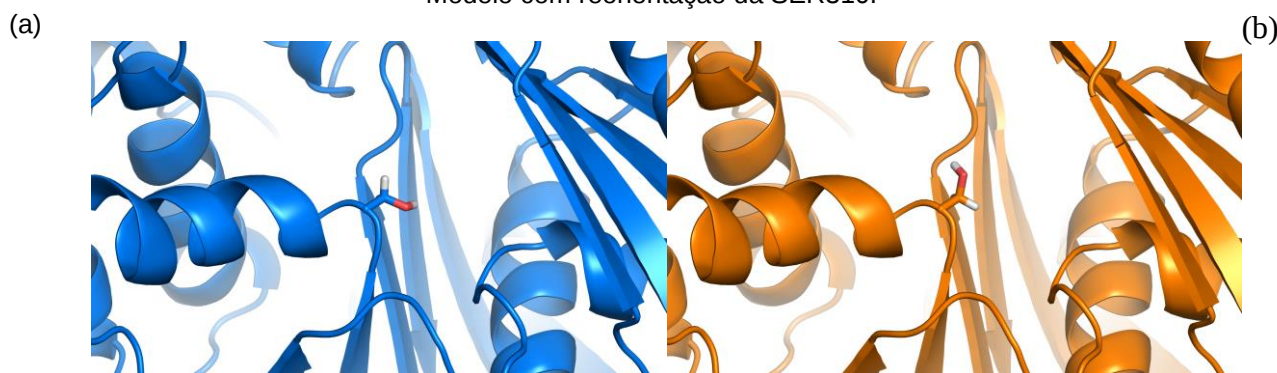


Figura 3: Diferença entre os resíduos de SER310 nos dois modelos 3D construídos. (a) Modelo inicial. (b) Modelo com reorientação da SER310.



Os dois modelos gerados foram utilizados para a realização de estudos de *docking*, onde se testou tanto moléculas com potencial de inibição da HsNTPDase5, como moléculas com potencial vermífico. As mais promissoras na inibição da HsNTPDase5 dentre as moléculas testadas foram as chalconas uvangoletina e cardamonina e o composto LS24 (aurona), sendo seus melhores resultados observados no *docking* com a estrutura que possui a SER310 reorientada. Os resultados estão descritos na tabela 1 e nas figuras 4, 5 e 6.

Tabela 1 – Resultados do *docking* molecular entre a enzima HsNTPDase5 e os compostos Uvangoletina, Cardamonina e LS24, utilizando o programa Schrodinger Maestro 9.3.5.

Compostos	Glide gscore (kcal.mol ⁻¹)	Interações	Ki calculado (μM)
Uvangoletina	-7,16	LigH: SER37; THR38, GLU152. Stacking: TYR313.	5,65
Cardamonina	-6,63	LigH: THR38 , SER37, GLU152, TRP392.	13,67
LS24	-5,97	LigH: SER37 , THR38.	42,22

Figura 4: Representação do *docking* molecular entre o composto LS24 e a enzima HsNTPDase5.

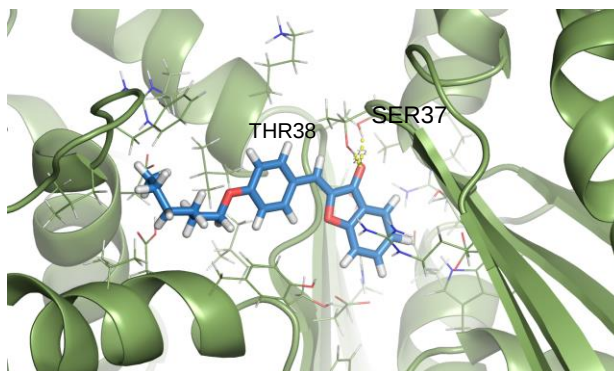


Figura 5: Representação do *docking* molecular entre o composto cardamonina e a enzima HsNTPDase5.

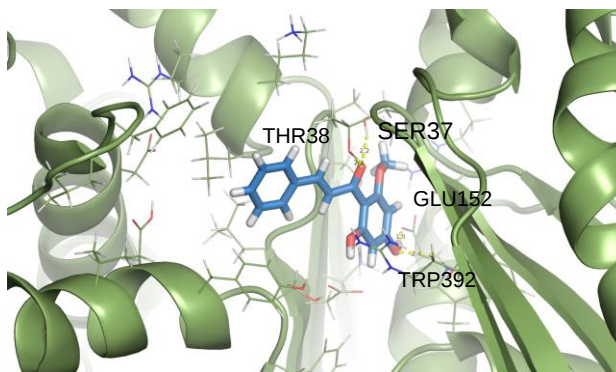
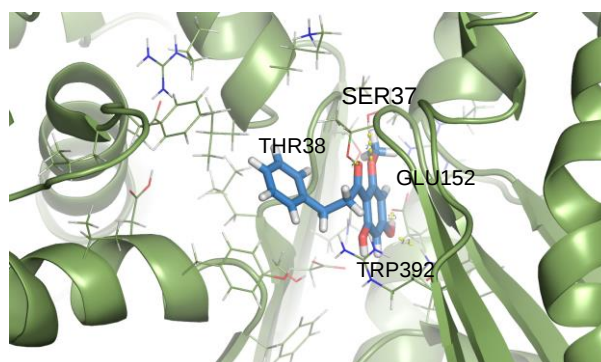


Figura 6: Representação do *docking* molecular entre o composto uvangoletina e a enzima HsNTPDase5.



O tamanho dos ligantes uvangoletina e cardamonina e a presença de mais átomos de oxigênio próximo aos resíduos catalíticos justifica o valor mais negativo do Glide gscore (-7,16 Kcal/mol e -6,63 Kcal/mol, respectivamente), ao contrário do que acontece com o composto LS24 (-5,97 Kcal/mol). Consequentemente, os valores de K_i calculado, que são obtidos através da função exponencial com os valores do Glide gscore, são melhores para os dois primeiros compostos.

4 CONCLUSÃO

A construção do modelo tridimensional da HsNTPDase5 por meio da modelagem por homologia mostrou-se consistente e permitiu o avanço dos estudos desenvolvidos pelo Grupo de Modelagem Computacional Aplicada da UFJF. Tais estudos irão auxiliar no melhor entendimento do mecanismo de interação dos substratos com a enzima, destacando quais resíduos são importantes, e por consequência, seu mecanismo de hidrólise, garantido pela utilização de um modelo confiável.

Os estudos de *docking* apontam a uvangoletina como sendo o composto de melhor interação com a HsNTPDase5, interagindo com os resíduos considerados como os responsáveis pela atividade catalítica dessa enzima. Estudos comparativos de *docking* receptor-ligante da HsNTPDase5 com os estudos realizados na apirase de batata (*Solanum tuberosum*), enzima considerada modelo de validação dos estudos de NTPDases em diversos organismos, serão realizados para validação dos resultados *in silico* em relação aos resultados experimentais.

5 REFERÊNCIAS

- BIASINI, M. *et al.* SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research** v. 42, n. W1, 2014.
- CHEN, V. B. *et al.* MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **International Tables for Crystallography** p. 694–701, Jan. 2012.
- FILHO, O. A. S.; ALENCASTRO, R. B. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova** v. 26, n. 2, p. 253–259, 2003.
- KROGH, A. *et al.* Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes¹¹ Edited by F. Cohen. **Journal of Molecular Biology** v. 305, n. 3, p. 567–580, 2001.
- LASKOWSKI, R. *et al.* AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. **Journal of Biomolecular NMR** v. 8, n. 4, 1996.

NIELSEN, H. Predicting Secretory Proteins with SignalP. **Methods in Molecular Biology Protein Function Prediction** p. 59–73 , 2017.

NUNES, V. S. P. **Análise comparativa das Ecto-NTPDase 1 de *Homo sapiens* e *Schistosoma mansoni* por meio de modelagem tridimensional, dinâmica molecular e docking receptor-ligante**. 2015. 153 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência da Computação, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.

PETERSEN T.N., BRUNAK S., VON HEIJNE G., NIELSEN H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, 8:785-786, 2011.

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p.409-430, 2006.

SANSOM, Fiona M. The role of the NTPDase enzyme family in parasites: what do we know, and where to from here? **Parasitology**, v. 139, n. 08, p. 963–980, 2012.

SOARES, F. A. R. **ATP DIFOSFOHIDROLASE EM FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania (Viannia) braziliensis*: CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DE DOMÍNIOS COMPARTILHADOS COM A APIRASE DE *Solanum tuberosum***. 2007. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2007. Cap. 15. Disponível em: <<https://repositorio.ufjf.br/jspui/bitstream/ufjf/5566/1/fabriciaaparecidarezendessoares.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2017.

The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.

XU, Ying; XU, Dong; LIANG, Jie. **Computational methods for protein structure prediction and modeling**. Springer, 2011.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**, 2014.

ZEBISCH, M. *et al.* Crystallographic Snapshots along the Reaction Pathway of Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolases. **Structure** v. 21, n. 8, p. 1460–1475, 2013.