

Determinação estrutural do proteasoma 20S de *Schistosoma Mansoni* por modelagem comparativa

GONÇALVES, J. P. M.¹; SA, R. G.²; COMAR JR., M.¹; TARANTO, A. G.¹

RESUMO

Proteasomas são proteínas com atividade proteolíticas sendo alvos moleculares para o desenvolvimento de fármacos. Neste estudo, a estrutura da subunidade $\beta 1$ do proteasoma de *Schistosoma mansoni* foi construído por modelagem comparativa empregando o programa Swiss-PdbViewer conforme protocolo padrão previamente descrito. Como resultado, a estrutura cristalográfica sob o código PDB 3UNB, complexado com peptídeo mimético, foi utilizada como molde por apresentar 59% de identidade. O modelo de proteasoma de *S. mansoni* possui 4 α -hélices e 10 folhas- β se dispoem de forma simétrica entre si. O ligante se complexa sobretudo através de ligação hidrogênio e interações de van der Waals. Estes achados poderão contribuir para o desenvolvimento de novos compostos com atividade contra o *Schistosoma mansoni*.

Palavras-chave: Homologia, Desenvolvimento de Fármacos com Auxílio do Computador, modelagem molecular.

INTRODUÇÃO

Proteasomas são máquinas moleculares encontrados no núcleo e no citoplasma de todas as células eucarióticas. Elas compreendem um conjunto compartimentado de proteínas em que as atividades proteolíticas são separadas do resto do ambiente celular. Assim, as subunidades individuais contribuem para o reconhecimento do substrato levando a hidrólise da ligação peptídica de uma maneira altamente eficiente. A regulação da função do proteassoma é rigidamente controlado para evitar a proteólise

indesejável. Assim, o núcleo da subunidade 20S pode ser associada com a atividade reguladora, sendo ATP-dependente. Adicionalmente, esta regula a morte celular através da modulação dos níveis de moléculas pró e antiapoptóticas. Estudos proteômicos em *Schistosoma mansoni* foram viabilizado por extenso sequenciamento resultando no projeto genoma (www.schistodb.org).¹ Dessa forma, a liberação da sequência primária desta proteína nos motiva a sua construção por modelagem comparativa por homologia. De posse desta estrutura 3D estudos de desenvolvimento de fármacos baseado na estrutura do alvo molecular podem ser realizados para que no final do processo se tenha uma molécula com atividade esquistossomísida.

MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, a sequência primária da subunidade $\beta 1$ do proteasoma do *S. mansoni* (Fig. 1) foi obtida através do banco de dados *schistodb*.¹ A seguir, uma busca por proteínas homólogas foi realizada pelo servidor de modelagem comparativa SWISS-MODEL Workspace. Após a identificação da estrutura molde complexada com ligante, o modelo foi gerado utilizando o protocolo previamente descrito através do programa Swiss PdbViewer.² As coordenadas atômicas do ligante foram transferidas da estrutura molde para o modelo. Finalmente, o modelo foi validado através do valor *root mean square deviation* (RMSD) e descrição do sítio ativo.

Figura 1: Sequencia FASTA da subunidade $\beta 1$ do proteasoma de *S. mansoni*.

```
>Subunidade Beta
1VLNANQKKLNDFTDDTKGISTGTTLFACEYDGGVVIGADSRSSGTYVVNRVTDKLTQLTKSIY
CCRSQSAADTQAVADMVRYQLDFHRLEMNREPTVLEAAVSCKHFCYNRDDLAVAGIIVAGWD
EELGGQIYSIPLGGMLIRQPIVIGGSGSTYTYGYVDHGFVKGMTREECVSVLKGVALAINRDGSS
GGCVRLAIISKDGVVERILTKGDEVPVYRFS
```

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as várias estruturas encontradas pela busca por proteínas

¹ Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Centro oeste (CCO) - Avenida Sebastião Gonçalves Coelho, 400, Bairro Chanadour, 35501-296, Divinópolis, Minas Gerais, Brasil.

² Universidade Federal de Ouro Preto – Departamento de Ciências Biológicas, ICEB, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil. E-mail: joaominerim@hotmail.com

homólogas, a cristalográfica do proteassoma de rato depositada no *Protein Data Bank* (PDB) sob o código 3UNB³ 59% de identidade (Fig. 2) foi utilizada com estrutura molde.

Figura 2: Alinhamento entre os proteasomas de rato (3UNB) com de *S. mansoni*.

```

Query: 26  TTLFACEYDGGVVIGADSRITSSGTYVVRVTDKLTQLTKSIYCCRSGSAADTQAVADMVR 85
          TT+ A +++GGVV+GADSRIT++G+Y+ NRVIDKLT + I+CCRSGSAADTQAVAD V
Sbjct: 1   TTIMAVQFNGGVVLGADSRITTTGSYIANRVTDKLTPIHDHIFCCRSGSAADTQAVADAVT 60

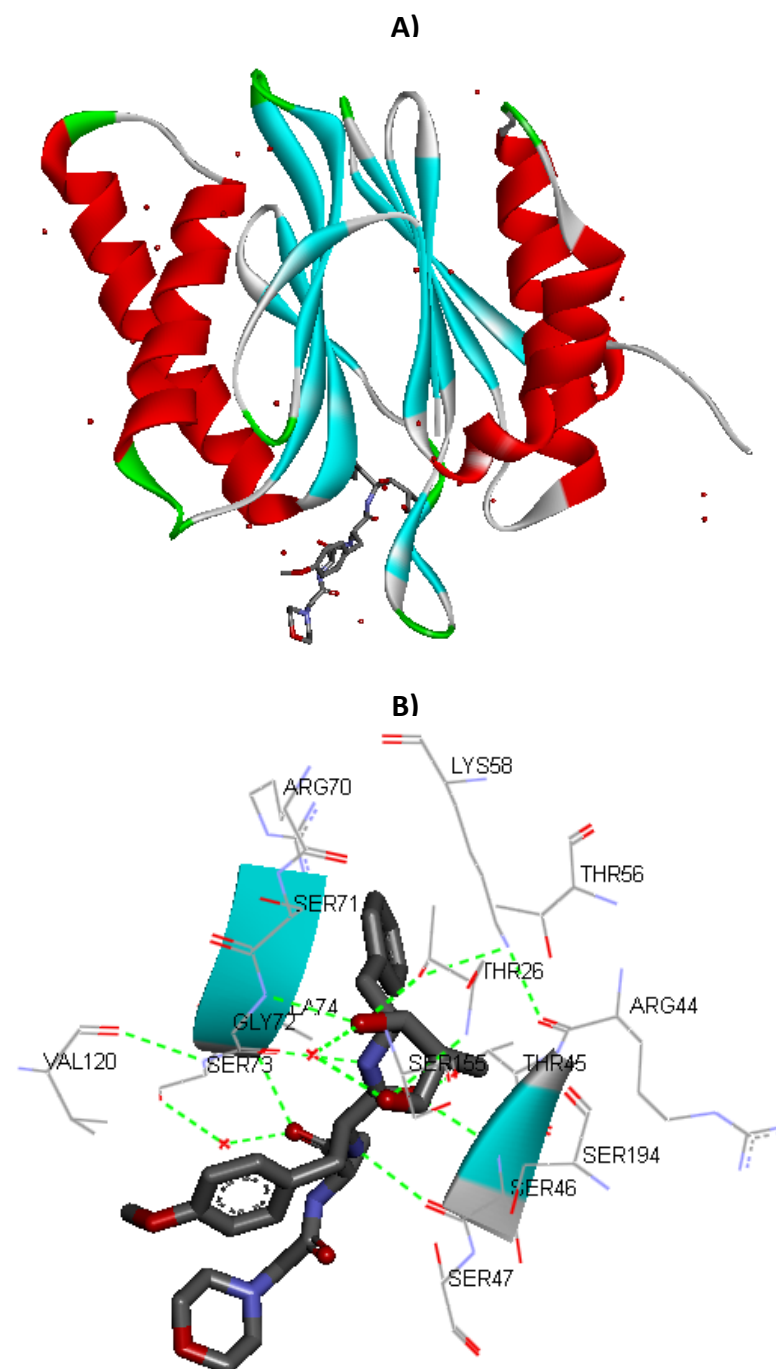
Query: 86  YQLDFHRLEMNREPTVLEAAVSCKHFCYNYRDDLAVAGIIVAGWDEELGGQIYSIPLGGML 145
          YQL FH +E+N P V AA K CY YR+DL+AGII+AGWD + GGQ+YS+P+GGM+
Sbjct: 61  YQLGFHSIELNEPPLVHTAASLFFKEMCYRYREDLMAGIIIIAGWDPQEGGQVYSVPMGGMM 120

Query: 146 IRQPIVIGSGSSTYTYGYVDHGFVKGMTREECVSFVLKGVVALAINRDGSSGGCVRLAIIS 205
          +RQ IGGSGS+Y YGYVD +R+GMT++EC+ F +ALA+ RDGSSGG +RLA I
Sbjct: 121 VRQSFVIGSGSSSYIYGYVDATYREGMTKDECLQFTANALALAMERDGSSTGGVIRLAAIQ 180

Query: 206 KDGVERILTKGDEVPVY 222
          + GVER + GD++P +
Sbjct: 181 ESGVERQVLLGDQIPKF 197
    
```

A seguir, a estrutura 3D do proteassoma de *S. mansoni* foi construída através alinhamento estrutural utilizando o programa Swiss PdbViewer. Como resultado, a estrutura modelo possui 10 folhas- β e 4 α -hélices de forma simétrica (Fig. 3A). O ligante situa-se entre as folhas- β . O valor de RMSD dos carbonos α entre a estrutura molde e cristalográfica foi de 0,06 Å. Os valores obtidos para a identidade (acima de 30%) e RMSD (abaixo de 1,2 Å) mostram que o modelo possui qualidade geométrica pela semelhança com a estrutura cristalográfica. Conseqüentemente, o sítio ativo está conservado, o qual é composto pelos resíduos Arg44, Thr45, Ser46, Ser47, Thr56, Lys58, Arg70, Ser71, Gly72, Ser73, Ala74, Val120, Ser155, Ser194 (Fig. 3B). Adicionalmente, duas moléculas de água também estão presentes na estrutura do alvo molecular. O ligante peptídico mimético está complexado sobretudo através de ligações hidrogênio, van de Waals e uma interação cátion- π com o resíduo de Lys58.

Figura 3: A) Estrutura 3D do proteassoma de *S. mansoni* representada na forma de *ribbon*, enquanto que o ligante está na forma de tubo. As alfas hélices e folhas betas estão representadas de vermelho e azul, respectivamente. B) Destaque do sítio ativo complexado com o peptídeo mimético. As linhas tracejadas em verde mostram ligações hidrogênio Os pontos em vermelho representam as moléculas de água.



CONCLUSÕES

De posse da estrutura 3D do proteassoma, e da descrição das principais interações de reconhecimento molecular entre o ligante e o receptor, é possível o emprego das metodologias de *fragment based drug design*, *de novo design* e ancoragem molecular. Estas metodologias são capazes de gerar novos ligantes além de predizer a energia de interação entre ligante e receptor, podendo ser aplicadas no desenvolvimento de potenciais compostos protótipos contra a esquistossomose.

AGRADECIMENTOS

Gonçalves, J. P. M. agrade a UFSJ pela bolsa de estudos concedida.

REFERÊNCIAS

- (1) CASTRO-BORGES, W. et al. The 20S proteasome of *Schistosoma mansoni*: a proteomic analysis. **Proteomics**, v. 7, n. 7, p. 1065-75, Apr 2007.
- (2) BORDOLI, L. et al. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2009.
- (3) HUBER, E. M. et al. Immuno- and constitutive proteasome crystal structures reveal differences in substrate and inhibitor specificity. **Cell**, v. 148, n. 4, p. 727-38, Feb 17 2012.