

MODELAGEM E ESTUDOS ESTRUTURAIS COMPUTACIONAIS DA PROTEÍNA UDP-N-ACETILMURAMOIL-L-ALANIL-D-GLUTAMATO-2,6-DIAMINOPIMELATO LIGASE DE *Pseudomonas aeruginosa*

COMPUTATIONAL MODELING AND STRUCTURAL STUDIES OF THE UDP-N-ACETYLMURAMOYL-L-ALANYL-D-GLUTAMATE-2,6-DIAMINOPIMELATE LIGASE PROTEIN FROM PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Flavio Teodoro – Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

RESUMO:

A relevância hospitalar da *Pseudomonas aeruginosa* é considerável, portanto, devem ser realizados estudos a respeito de proteínas presentes na bactéria que sejam alvos terapêuticos para a descoberta de novos fármacos antimicrobianos. Assim, enzimas, como a UDP-N-acetilmuramoil-L-alanil-D-glutamato-2,6-diaminopimelato ligase (MurE), que apresentam papel metabólico importante e não são homólogas nos mamíferos, são valiosos alvos em potencial para o desenvolvimento de novas drogas (AMERA *et al.*, 2019). A MurE participa da síntese da mureína, uma substância envolvida na formação da parede celular bacteriana, um item indispensável à sobrevivência do microrganismo. Assim, neste trabalho realizou-se a modelagem computacional por homologia com os programas de bioinformática Modeller e T-Coffee. Espera-se que estas informações teóricas possam ser agregadas aos conhecimentos bioquímicos, para que, num próximo estudo, auxiliem na identificação de ligantes para a MurE como alvo terapêutico.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Modelagem por Homologia. MurE.

ABSTRACT:

The hospital relevance of *Pseudomonas aeruginosa* is considerable, therefore, studies should be conducted on proteins present in the bacterium that serve as therapeutic targets for the discovery of new antimicrobial drugs. Thus, enzymes such as UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate-2,6-diaminopimelate ligase (MurE), which play an important metabolic role and are not homologous in mammals, represent valuable potential targets for the development of new drugs (AMERA *et al.*, 2019). MurE participates in the synthesis of murein, a substance involved in the formation of the bacterial cell wall, an indispensable component for the microorganism's survival. In this study, computational homology modeling was performed using the bioinformatics programs Modeller and T-Coffee. It is expected that these theoretical findings may be integrated with biochemical knowledge so that, in a future study, they may assist in the identification of ligands for MurE as a therapeutic target.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. Homology Modeling. MurE.

1. INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa está entre as principais bactérias que apresentam grande relevância clínica (NEVES *et al.*, 2011), sobretudo nas infecções hospitalares, por ser resistente a múltiplos antimicrobianos (BORDIGNON; LIMA, 2017). Dessa forma, estudos estruturais de

enzimas específicas desta espécie podem se tornar valiosos para a pesquisa de novos antimicrobianos. Dentre elas, encontra-se a UDP-N-acetilmuramoil-L-alanil-D-glutamato-2,6-diaminopimelato ligase (MurE), enzima essencial na biossíntese da parede celular bacteriana e que não possui homólogas em seres humanos (AMERA *et al.*, 2019). Informações estruturais podem ser obtidas através das técnicas experimentais, entretanto, quando do insucesso experimental, pode-se recorrer aos métodos computacionais, no sentido de se obter uma predição da estrutura da proteína, por exemplo, com base em estruturas de proteínas homólogas previamente determinadas (VERLI, 2014).

2 MARCO TEÓRICO

A MurE é responsável por adicionar ácido mesodiaminopimélico ao precursor nucleotídico, denominado UDP-N-acetilmuramoil-L-alanil-D-glutamato, durante a síntese de mureína (peptidoglicano) no citoplasma. Diante desse fato, a MurE tem um impacto notável na sobrevivência da bactéria, visto que a parede celular protege o microrganismo contra a lise osmótica, o que poderia causar seu rompimento (GORDON *et al.*, 2000).

Destaca-se, além disso, que o conhecimento da estrutura tridimensional de proteínas (principalmente enzimas) tem grande importância por constituir-se como um fator auxiliar às informações bioquímicas no planejamento de novos compostos de interesse farmacológico. Tais informações estruturais podem ser obtidas experimentalmente através das técnicas difração de raios X e ressonância magnética nuclear, por exemplo (VERLI, 2014).

2. MATERIAL E MÉTODO

Obteve-se a sequência dos aminoácidos da MurE da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* da base de dados *Seattle Structural Genomics Center for Infectious Disease (SSCGID)*. Com a sequência de aminoácidos da MurE, utilizou-se a ferramenta de busca *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*, com base nos dados do *Protein Data Bank (PDB)*. O objetivo era encontrar proteínas homólogas, presentes em outros microrganismos, que tivessem suas estruturas 3D resolvidas. Ao total, 19 resultados foram obtidos, todavia, foram selecionadas apenas 4 proteínas homólogas considerando-se os parâmetros “*E-value*”, “% de cobertura” e a questão da similaridade e diferença das estruturas em comparação com a PaMurE. Assim, proteínas homólogas com diferenças significativas estruturais foram descartadas. As proteínas homólogas selecionadas foram:

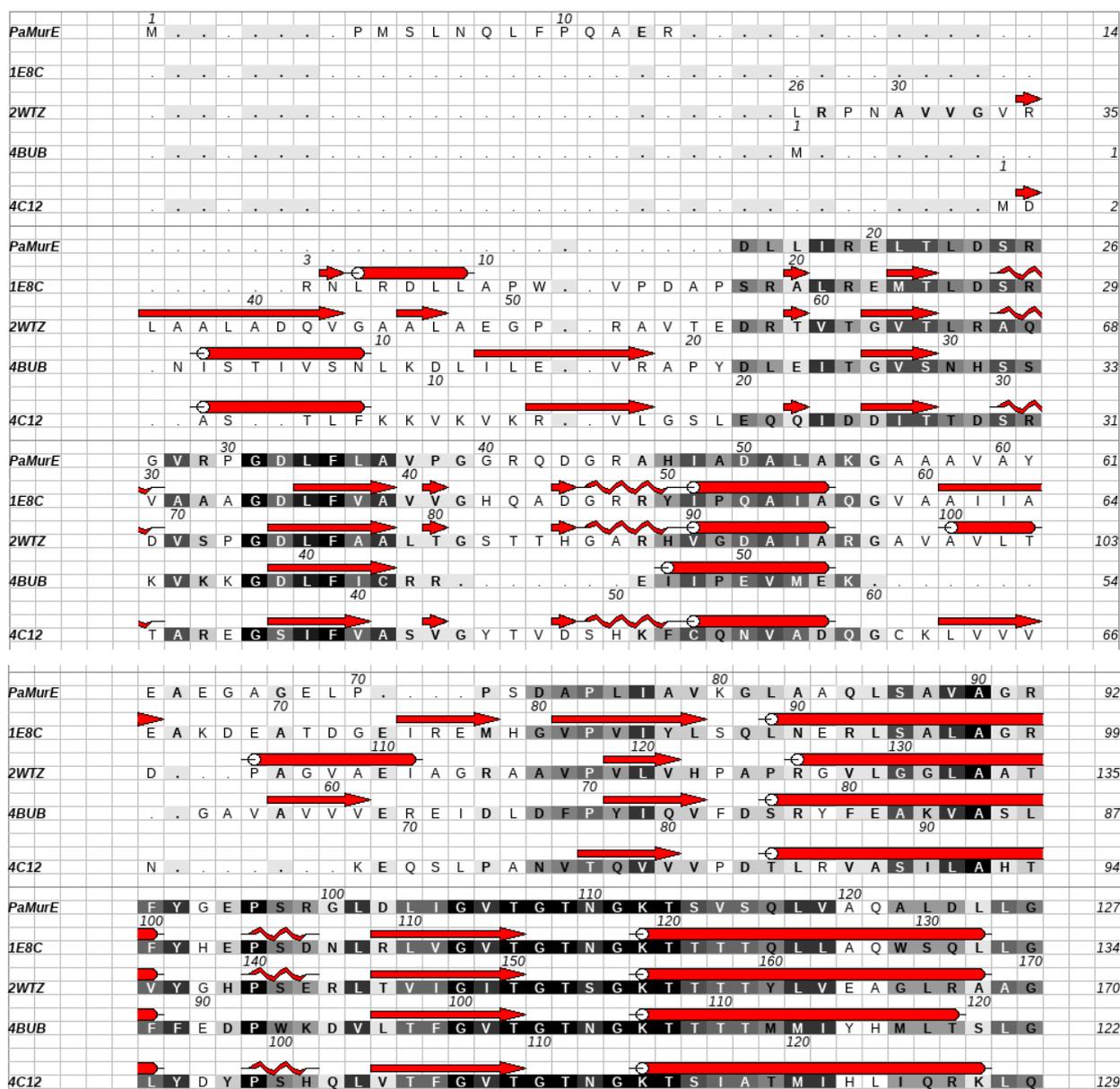
uma de *Escherichia coli* (PDB: 1e8c), uma de *Mycobacterium tuberculosis* (PDB: 2wtz), uma de *Staphylococcus aureus* (PDB: 4c12) e uma de *Thermotoga maritima* (PDB: 4bub).

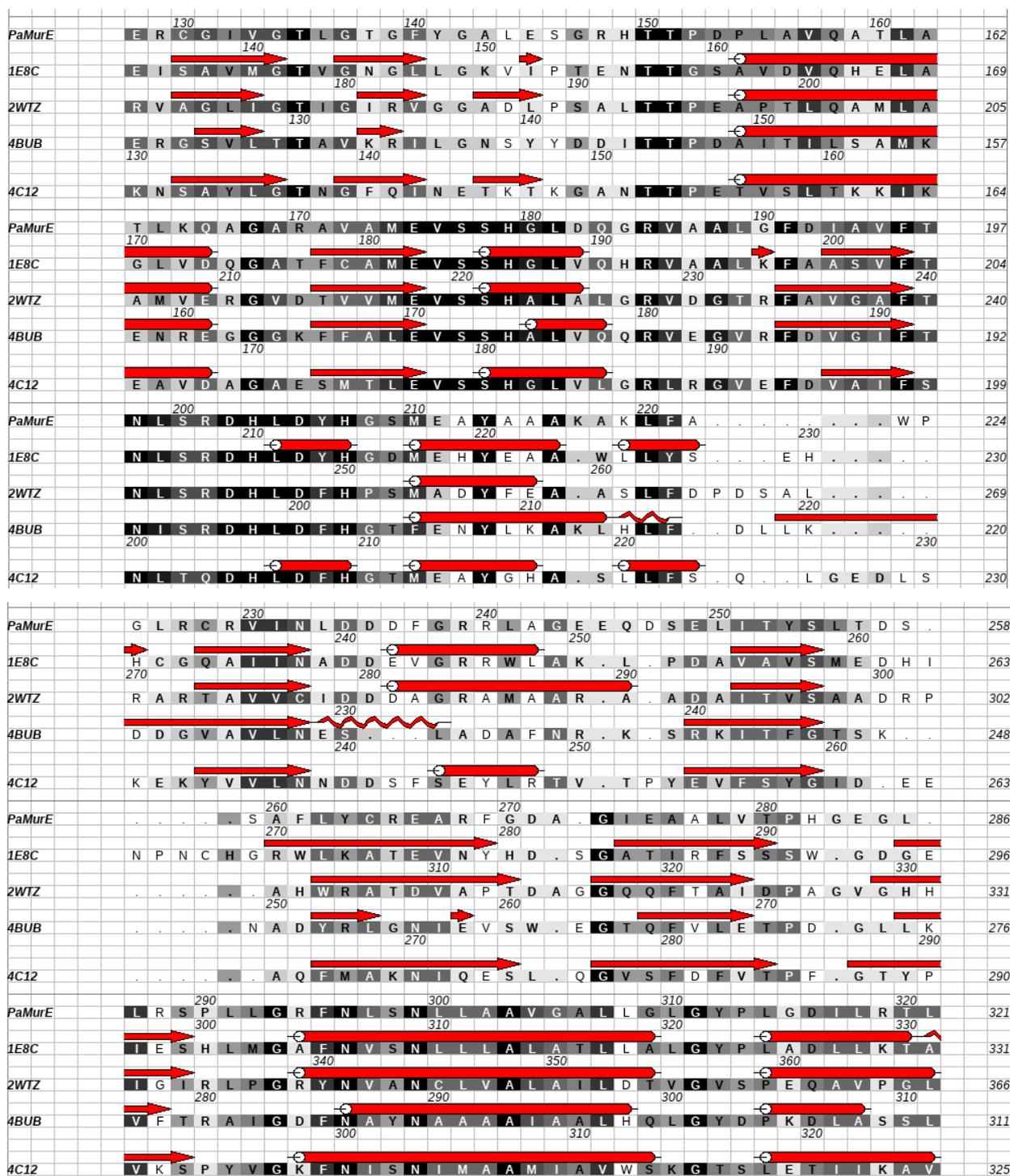
Com o auxílio do módulo SALIGN (SALI; SHEN, 2006) do programa Modeller e também através do programa T-Coffee, foi possível obter os alinhamentos estruturais com as proteínas homólogas e a própria MurE de *Pseudomonas aeruginosa* (PaMurE). Assim, pôde-se verificar quais regiões são conservadas em relação aos aminoácidos (Figura 1).

Com o programa Modeller, realizou-se a construção de 500 modelos empregando-se a técnica de modelagem por homologia, por meio da satisfação de restrições espaciais. Após essa etapa, os modelos construídos foram avaliados quanto à qualidade estereoquímica e ao enovelamento, considerando-se as estruturas secundária, terciária e quaternária. O melhor modelo obtido referente à menor pontuação DOPE foi representado pela estrutura de número 302. Com relação à qualidade estereoquímica, foram obtidos os gráficos de Ramachandran, através do programa PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993), para todas as proteínas molde utilizadas e para o modelo selecionado da PaMurE.

Por meio do programa PyMOL, foram representadas as estruturas tridimensionais, nas quais as alfa-hélices estão destacadas em vermelho, as alças e voltas em verde e as fitas-beta em azul (Figuras 2-6). A Figura 7 mostra a sobreposição de todas as estruturas utilizadas no projeto. No gráfico de Ramachandran, as regiões representadas em vermelho são as mais favoráveis, aquelas destacadas em amarelo são as regiões favoráveis, as representadas em bege são as menos favoráveis e as regiões em branco são as desfavoráveis. Os dados coletados em relação a essas regiões estão descritos na Tabela 1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO





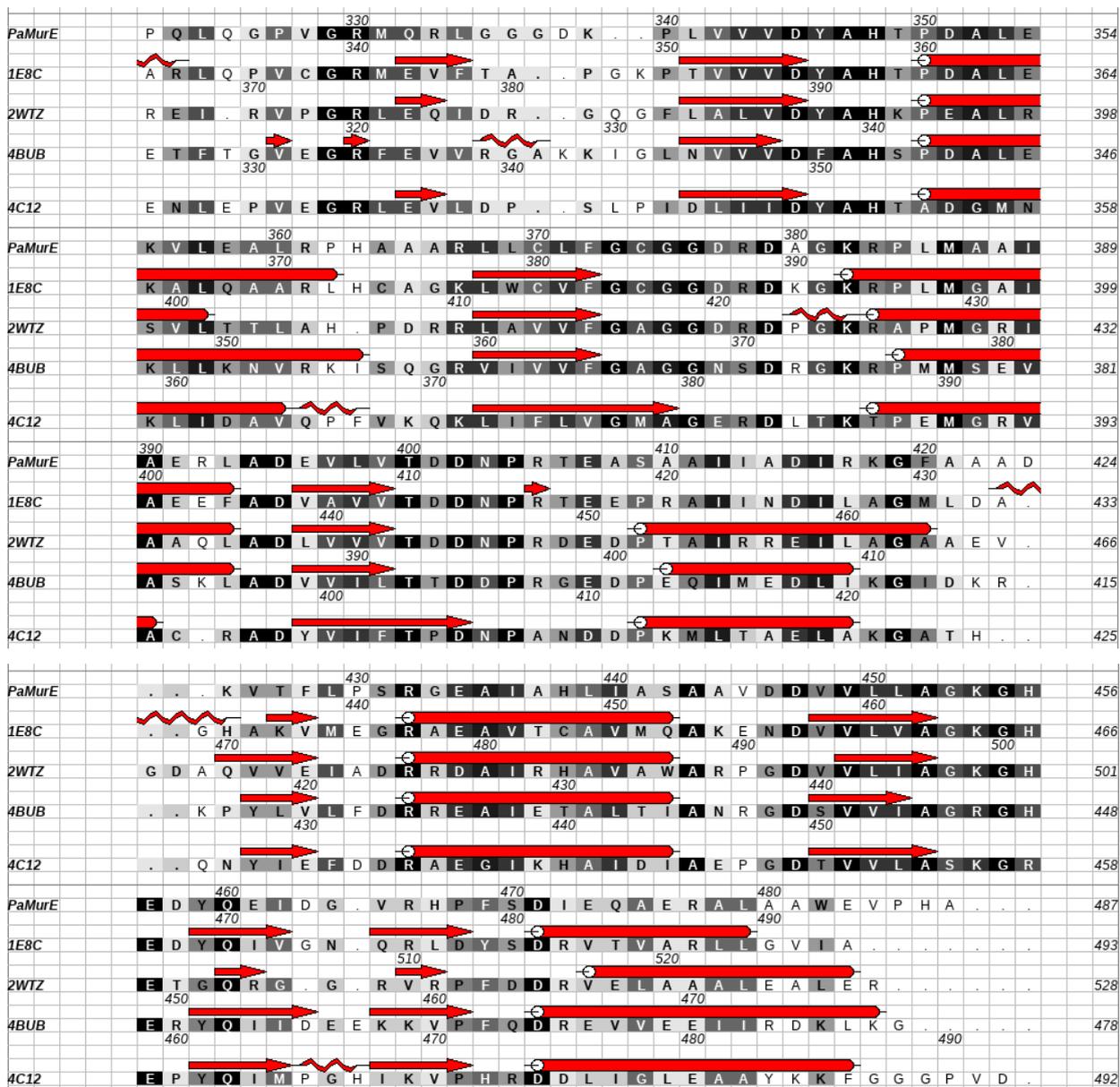


Figura 1. A ferramenta ALSCRIPT Calcon do programa Aline permite identificar as regiões mais e menos conservadas. As regiões conservadas estão identificadas pela cor preta, ao passo que as menos conservadas estão coloridas por cinza claro. A estrutura secundária de cada proteína está representada pelos cilindros (alfa-hélice) e setas (fita-beta) e também é possível observar a hélice 3₁₀.

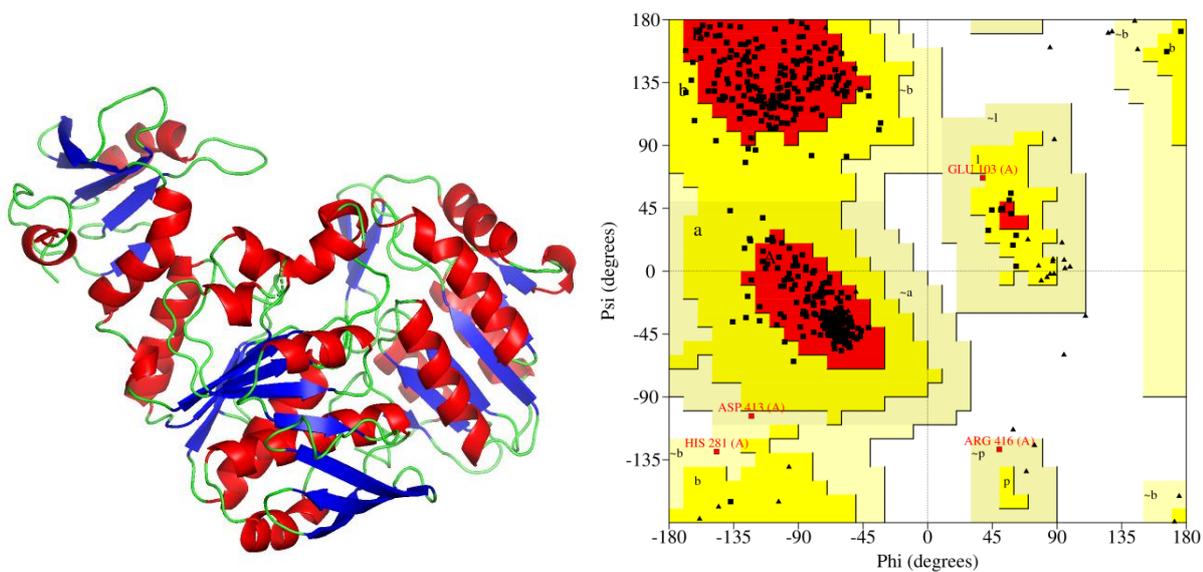


Figura 2. Estrutura tridimensional da MurE de *E. coli* (PDB: 1e8c) obtida pelo programa PyMOL e seu respectivo gráfico de Ramachandran.

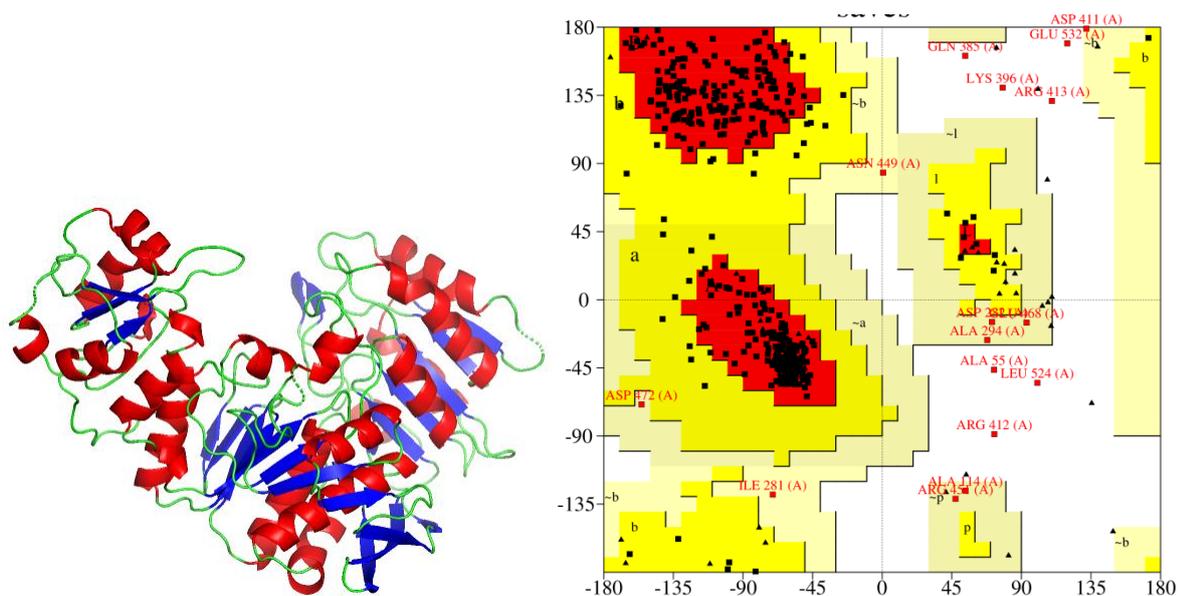


Figura 3. Estrutura tridimensional da MurE de *M. tuberculosis* (PDB: 2wtz) obtida pelo programa PyMOL e seu respectivo gráfico de Ramachandran.

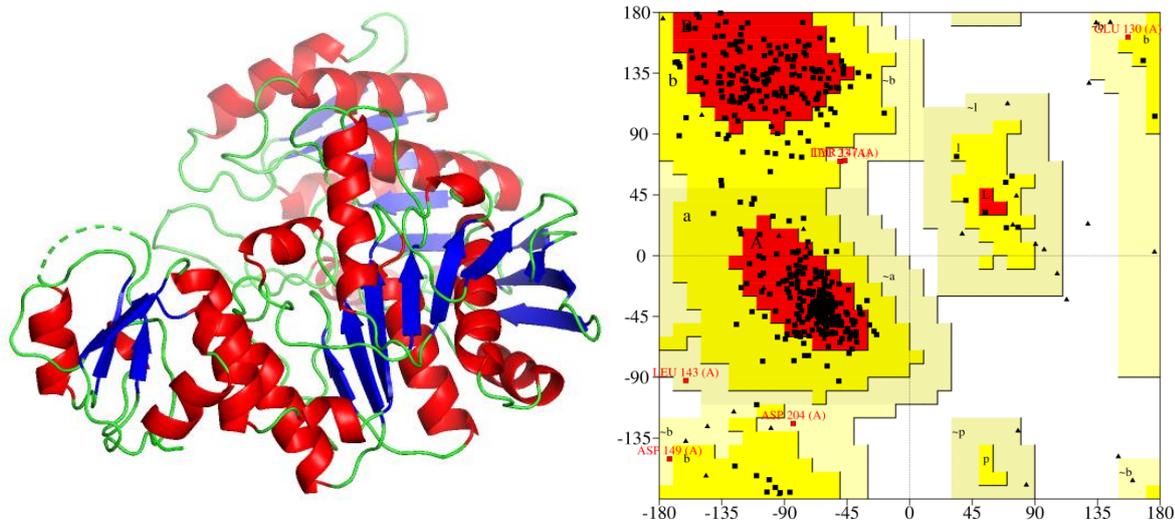


Figura 4. Estrutura tridimensional da MurE de *T. maritima* (PDB: 4bub) obtida pelo programa PyMOL e seu respectivo gráfico de Ramachandran.

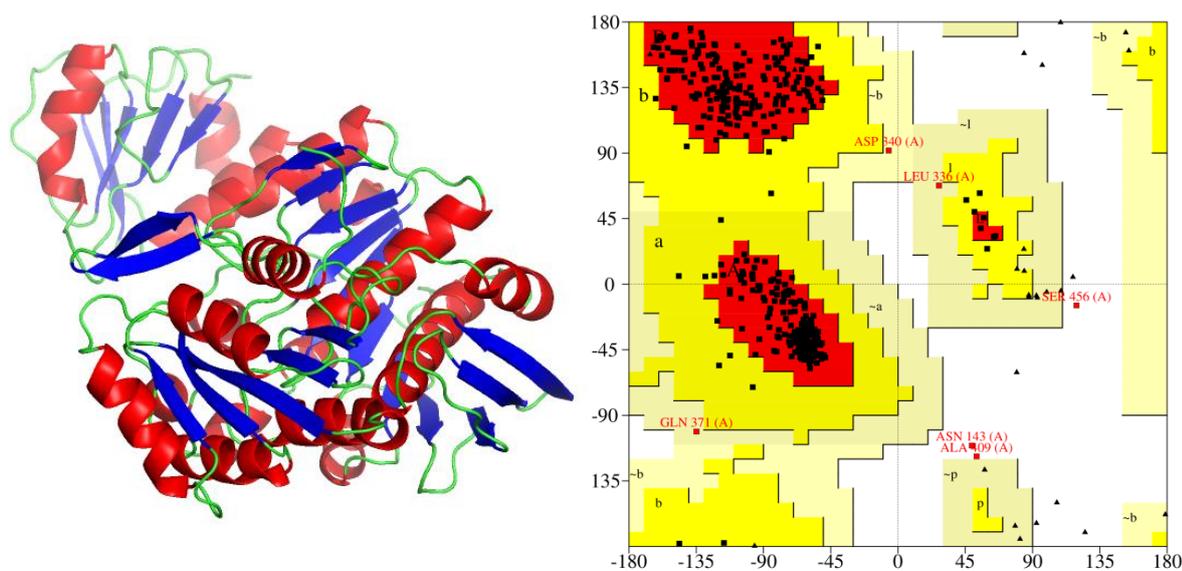


Figura 5. Estrutura tridimensional da MurE de *S. aureus* (PDB: 4c12) obtida pelo programa PyMOL e seu respectivo gráfico de Ramachandran.

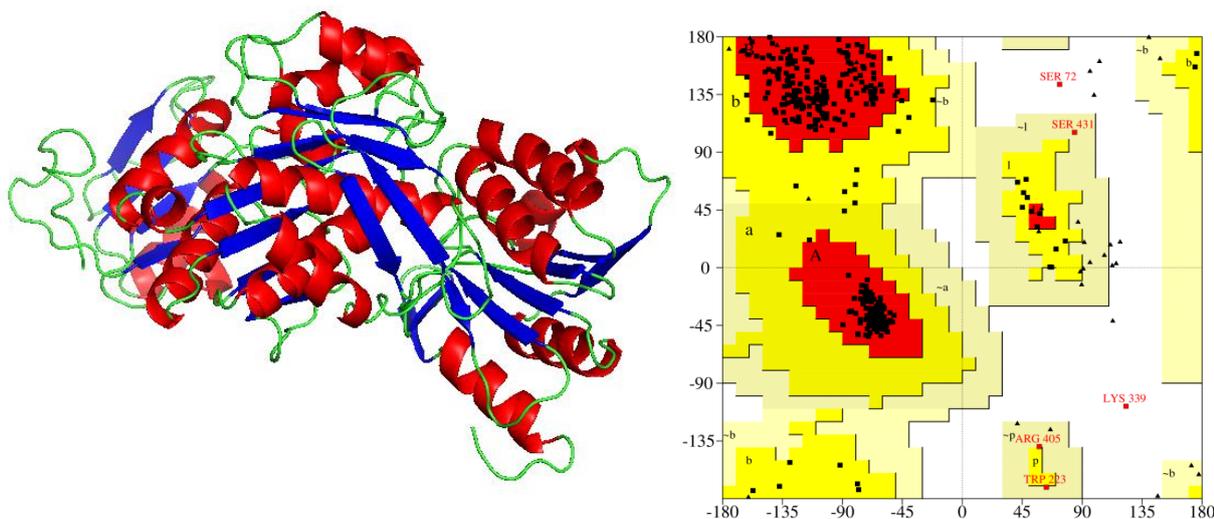


Figura 6. Estrutura tridimensional do melhor modelo teórico obtido da *PaMurE* em estudo, obtida pelo programa PyMOL, e seu respectivo gráfico de Ramachandran.

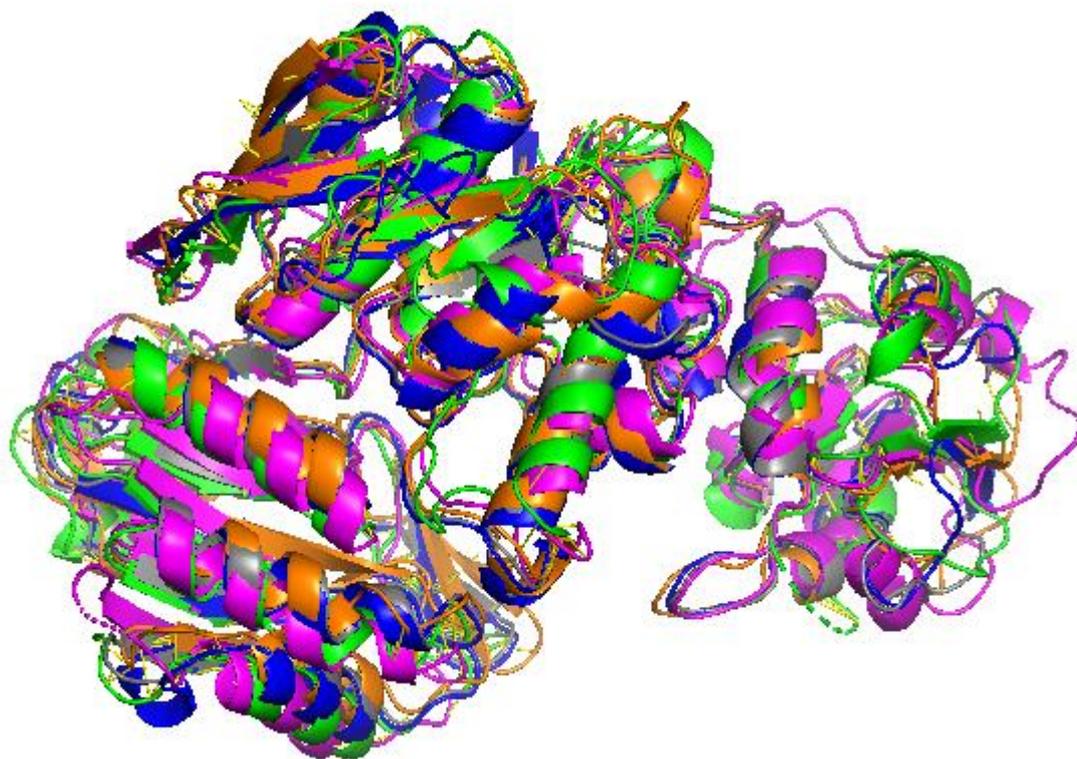


Figura 7. Sobreposição de todas as estruturas envolvidas no estudo (azul: *E. coli*; magenta: *M. tuberculosis*; verde: *T. maritima*; laranja: *S. aureus*; cinza: *P. aeruginosa* (modelo teórico)). Observa-se que a sobreposição indica regiões distintas entre as proteínas, o que é esperado, visto que em determinadas regiões os aminoácidos são diferentes, proporcionando interações hidrofílicas e hidrofóbicas diferentes, causando torções específicas nas estruturas.

Tabela 1. Gráfico de Ramachandran. Os valores em porcentagem referem-se a cada uma das homólogas incluídas no estudo além da *PaMurE*.

Região do gráfico de Ramachandran / %	Porcentagem de resíduos				
	<i>PaMurE</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>T. maritima</i>	<i>M. tuberculosis</i>
Mais favoráveis	90,9	90,9	94	79,8	86,7
Adicionalmente permitidas	7,8	8,2	4,6	18,8	9,4
Generosamente permitidas	0,7	0,9	0,7	1,4	2,2
Não permitidas	0,5	0	0,7	0	1,7

Com o gráfico de Ramachandran, pode-se verificar que mais de 90% dos resíduos estão posicionados corretamente no modelo *PaMurE*, o que mostra boa fidedignidade do melhor modelo obtido no alinhamento.

Conforme Ruane *et al.* (2013), o sítio ativo de ligação do UMT, produto final da reação mediada pela enzima MurE, é representada pelos resíduos R383, D406 e E460 no *S. aureus* e pelos resíduos R389, D413, N414, R416 e E468 na *E. coli*. Por outro lado, Gordon *et al.* (2001) citam os seguintes resíduos responsáveis pelo sítio ativo do mesmo composto, na *E. coli*: S28, H43, Q44, A45, N156, Q190, R192, S184, T157, T158, R389, D413, N414, R416 e E468 e afirmam que a ligação com o UMT faz muitas ligações polares com a proteína.

De acordo com o estudo de Paradis-Bleau *et al.* (2009), a maioria dos resíduos de aminoácidos que formam o sítio ativo da MurE tanto na *P. aeruginosa* quanto na *E. coli* são conservados, à exceção de um loop nas posições 42-47 na MurE da *E. coli*. Essa região interage com o pirofosfato do produto do composto UDP-MurNAc-Ala-Glu-ácido-2-diaminopimélico. Além disso, N156 é substituído, na *P. aeruginosa*, por H150, ou seja, mudança de um aminoácido polar neutro para outro polar básico.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As informações estruturais adquiridas do modelo serão úteis, sobretudo aquelas referentes aos aminoácidos que realizam contatos com os substratos, durante as etapas subsequentes relacionadas à escolha de ligantes para a etapa de *docking* molecular. Dessa forma, obter-se-á um melhor conjunto de respostas referentes a interações que sejam mais efetivas e que garantam a inativação adequada da enzima. O intuito é fornecer base para os estudos posteriores, no que tange ao desenvolvimento de novos antimicrobianos com foco na enzima MurE, fornecendo, dessa forma, mais alternativas eficazes para o combate das infecções hospitalares causadas por *P. aeruginosa*.

REFERÊNCIAS

AMERA, G. M.; KHAN, R. J.; PATHAK, A.; KUMAR, A.; SINGH, A. K. Structure based in-silico study on UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate-2,6-diaminopimelate ligase (MurE) from *Acinetobacter baumannii* as a drug target against nosocomial infections. **Informatics in Medicine Unlocked**, Nova Iorque, v. 16, ago. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352914819301066>. Acesso em: 28 set. 2022.

BORDIGNON, J. C.; LIMA, L. R. Etiologia de infecções hospitalares e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em um hospital do sudoeste do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 49, n. 3, set. 2017. Disponível em: <http://www.rbac.org.br/wp-content/uploads/2017/11/RBAC-vol-49-3-2017-ref-566-corr.pdf>. Acesso em 19 set. 2022.

GORDON, E. et al. Crystal Structure of UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate:meso-Diaminopimelate Ligase from *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 276, n. 14, abr. 2001. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)34540-5/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)34540-5/fulltext). Acesso em 19 set. 2022.

NEVES, P. R.; MAMIZUKA, E. M.; LEVY, C. E.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 4, p. 409-420, ago. 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpm/a/kwn5RVkLXyYLzpQf5mbwCTt/abstract/?lang=pt>. Acesso em 5 out. 2022.

PARADIS-BLEAU, C.; LLOYD, A.; SANSCHAGRIN, F.; MAAROUFI, H.; CLARKE, T.; BLEWETT, A.; DOWSON, C.; ROPER, D.; BUGG, T.; LEVESQUE, R. C. *Pseudomonas aeruginosa* MurE amide ligase: enzyme kinetics and peptide inhibitor. **Biochemical Journal**, New Haven, v. 421, n. 2, p. 263-272, abr. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19400768/>. Acesso em 18. out. 2022.

RUANE, K. M. et al. Specificity determinants for lysine incorporation in *Staphylococcus aureus* peptidoglycan as revealed by the structure of a MurE enzyme ternary complex. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 288, n. 46, p. 33439-33448, nov. 2013. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24064214/>. Acesso em 18 out. 2022.

VERLI, H. *Bioinformática: da biologia à flexibilidade moleculares*. 1. ed. São Paulo: SBBq, 2014. 282 p.