

MODELAGEM E ESTUDOS ESTRUTURAIS COMPUTACIONAIS DA PROTEINA 6-HIDROXIMETIL-7,8-DIHIPTERINA PIROFOSFOQUINASE DE *Pseudomonas aeruginosa*

COMPUTATIONAL MODELING AND STRUCTURAL STUDIES OF THE PROTEIN 6-HYDROXYMETHYL-7,8-DIHYDROPTERIN PYROPHOSPHOKINASE FROM *Pseudomonas aeruginosa*

Flavio Teodoro – Universidade Estadual de Ponta Grossa

RESUMO

Devido à alta taxa de mortalidade referente às infecções hospitalares causadas pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, é relevante realizar estudos a respeito de proteínas presentes na bactéria que sejam alvos terapêuticos para a descoberta de novos fármacos antimicrobianos. Enzimas que não são encontradas no organismo humano, a exemplo da 6-hidroximetil-7,8-dihidropterina pirofosfoquinase (HPPK), apresentam papel metabólico importante para os microrganismos e, portanto, são valiosos alvos em potencial (CHHABRA *et al.*, 2012). A enzima HPPK faz parte da via biosintética do folato, um composto muito importante no que diz respeito ao correto funcionamento das células de *P. aeruginosa*. Assim, neste trabalho foi realizada a modelagem computacional por homologia da HPPK de *P. aeruginosa* (PaHPPK). Especificamente, foram obtidos modelos da PaHPPK em diversos estados conformacionais, correspondentes à cada etapa da reação da pirofosfoquinase, aos quais procurou-se modelar também os substratos e produtos. As melhores estruturas modeladas foram escolhidas considerando-se o menor valor da pontuação DOPE (SALI E SHEN, 2006) e observou-se, através da comparação dos modelos, um potencial mecanismo de acoplamento entre a região de ligação da adenina do ATP e o loop que cobre este substrato. Espera-se que estas informações teóricas possam ser agregadas aos conhecimentos bioquímicos, para que auxiliem na identificação de ligantes para a HPPK como alvo terapêutico.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, Modelagem por Homologia, *Docking* Computacional, 6-hidroximetil-7,8-dihidropterina pirofosfoquinase, HPPK.

ABSTRACT

Due to the high mortality rate associated with hospital infections caused by the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, it is relevant to conduct studies on bacterial proteins that may serve as therapeutic targets for the discovery of new antimicrobial drugs. Enzymes not found in the human organism, such as 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase (HPPK), play an important metabolic role in microorganisms and are therefore valuable potential targets (CHHABRA *et al.*, 2012). HPPK is part of the folate biosynthetic pathway, a compound essential for the proper functioning of *P. aeruginosa* cells. Thus, in this work, homology-based computational modeling of *P. aeruginosa* HPPK (PaHPPK) was performed. Specifically, models of PaHPPK were obtained in different conformational states corresponding to each step of the pyrophosphokinase reaction, in which substrates and products were also modeled. The best-constructed structures were selected based on the lowest DOPE score (SALI & SHEN, 2006), and comparison of the models suggested a potential coupling mechanism between the adenine-binding region of ATP and the loop that covers this substrate. It is expected that these theoretical insights may complement

biochemical knowledge and assist in the identification of ligands targeting HPPK as a therapeutic candidate.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Homology Modeling, Computational Docking, 6-Hydroxymethyl-7,8-Dihydropterin Pyrophosphokinase, HPPK.

1. INTRODUÇÃO

A infecção hospitalar é um problema tão antigo, que remonta desde primeiros locais alocados para albergar pessoas doentes. Além disso, tanto na sociedade antiga quanto na moderna, essa modalidade de infecção sempre causou impacto e preocupação devido ao seu alto índice de mortalidade (SANTOS, 2004). Segundo relatório da OMS realizado em 2014, a *Pseudomonas aeruginosa* está entre as principais espécies de bactérias resistentes a antibióticos (BORDIGNON; LIMA, 2017). A *P. aeruginosa* pertence à família Pseudomonadaceae e é descrita como um bastonete Gram-negativo reto ou ligeiramente curvo, aeróbio estrito, podendo ser observada como células isoladas, aos pares ou em cadeias curtas, com presença de flagelo (FERREIRA, 2005). Esta espécie apresenta relevância clínica devido à sua múltipla resistência frente a drogas antibacterianas e à sua difícil erradicação; consequentemente, a bactéria está relacionada a altos índices de morbidade e mortalidade (NEVES *et al.*, 2011). A dificuldade de erradicação da bactéria se deve ao fato de ela sobreviver por períodos prolongados em ambientes úmidos, equipamentos e utensílios hospitalares – respiradores e nebulizadores -, bem como o fato de soluções antissépticas, desinfetantes e de uso terapêutico lhe servirem de reservatório (FERREIRA, 2005).

Destaca-se que o conhecimento da estrutura tridimensional de proteínas (principalmente enzimas) tem grande importância por constituir-se como um fator auxiliar as 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. Entretanto, quando do insucesso experimental, pode-se recorrer aos métodos computacionais, no sentido de se obter uma predição da estrutura de proteínas, por exemplo, com base em estruturas de proteínas homólogas previamente determinadas (VERLI, 2014).

2 MARCO TEÓRICO

Devido à relevância destes organismos multirresistentes no ambiente hospitalar, estudos de algumas de suas enzimas, que sejam específicas à espécie, podem se tornar valiosos ao apontarem potenciais alvos terapêuticos para elaboração de fármacos antimicrobianos. Um desses possíveis alvos é a enzima 6-hidroximetil-7,8-dihidropterina pirofosfoquinase (HPPK), essencial na biossíntese de ácido fólico e que não é produzida em organismos humanos. Esses estudos podem estimular a pesquisa e desenvolvimento de inibidores específicos de HPPK (DERRICK, 2008) de *P. aeruginosa*. A HPPK catalisa a transferência de um grupo pirofosfato de uma molécula de adenosina trifosfato (ATP) a 6-hidroximetil-7,8-dihidropterina (HP), resultando em adenosina monofosfato (AMP) e 6-hidroximetil-7,8-dihidropterina pirofosfato (HPPP) (BLASZCZYK *et al.*, 2007).

2. MATERIAL E MÉTODO

A sequência de aminoácidos da enzima 6-hidroximetil-7,8-dihidropterina pirofosfoquinase (HPPK) de *Pseudomonas aeruginosa* foi obtida do portfólio de genes do SSGCID (*Seattle Structural Genomic Center for Infectious Disease*). Esta sequência foi utilizada para construir um alinhamento sequencial, através da ferramenta BLAST do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), a qual auxiliou no procedimento de escolha das estruturas de proteínas homólogas moldes (requeridas na etapa de construção do modelo) com base em grau de similaridade, identidade, função e completeza sequencial. Alinhamentos estruturais produzidos com o módulo SALIGN do programa MODELLER (SALI E BLUNDELL, 1993) foram utilizados para melhorar a acurácia do procedimento de modelagem. Procedeu-se à construção de 500 modelos empregando-se modelagem por homologia através da satisfação de restrições espaciais como implementada no programa MODELLER. A escolha do melhor modelo foi realizada com base no menor valor da pontuação DOPE (SALI E SHEN, 2006). Também foram sobrepostos todos os modelos teóricos obtidos, referentes aos estados da enzima HPPK, utilizando-se como base para construção os PDB 1hka, 1rao, 1eq0, 1q0n e 1rb0. Os modelos foram avaliados quanto à sua qualidade estereoquímica e enovelamento (estruturas secundária, terciária e quaternária). Com

o intuito de destacar as diferenças e/ou similaridades entre suas estruturas, utilizaram-se comparações do modelo obtido com as estruturas de enzimas homólogas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As modelagens foram realizadas em duas etapas e foi empregada a sequência de aminoácidos completa da PaHPPK (proteína HPPK da *P. aeruginosa*). Na primeira, com o propósito de se obter um modelo da PaHPPK na forma apo, foi realizada uma busca por estruturas homólogas com a ferramenta BLAST, que forneceu 20 proteínas molde. A segunda etapa consistiu em utilizar apenas uma homóloga, representativa de cada um dos estados da reação da PaHPPK (com base nos seguintes PDBs: 1HKA, 1RB0, 1EQ0, 1RAO e 1Q0N), para se obter um modelo do complexo da PaHPPK com substratos e produtos em cada caso. A razão para esta divisão é que estes estados apresentam alterações conformacionais bastante grandes, características da conformação assumida pela HPPK em cada etapa reacional (YAN E JI, 2011), portanto, o objetivo foi evitar a introdução de restrições espaciais que não fossem próprias de um estado em particular.

A qualidade estereoquímica dos modelos selecionados foi avaliada com o gráfico de Ramachandran gerado pelo programa PROCHECK (LASKOWSKI *et al.*, 1993). As figuras 1-5 trazem o modelo de menor energia e o respectivo gráfico de Ramachandran para os modelos de estrutura de cada uma das etapas da reação. O número relativo de resíduos em cada região do gráfico de Ramachandran é fornecido na Tabela 1.

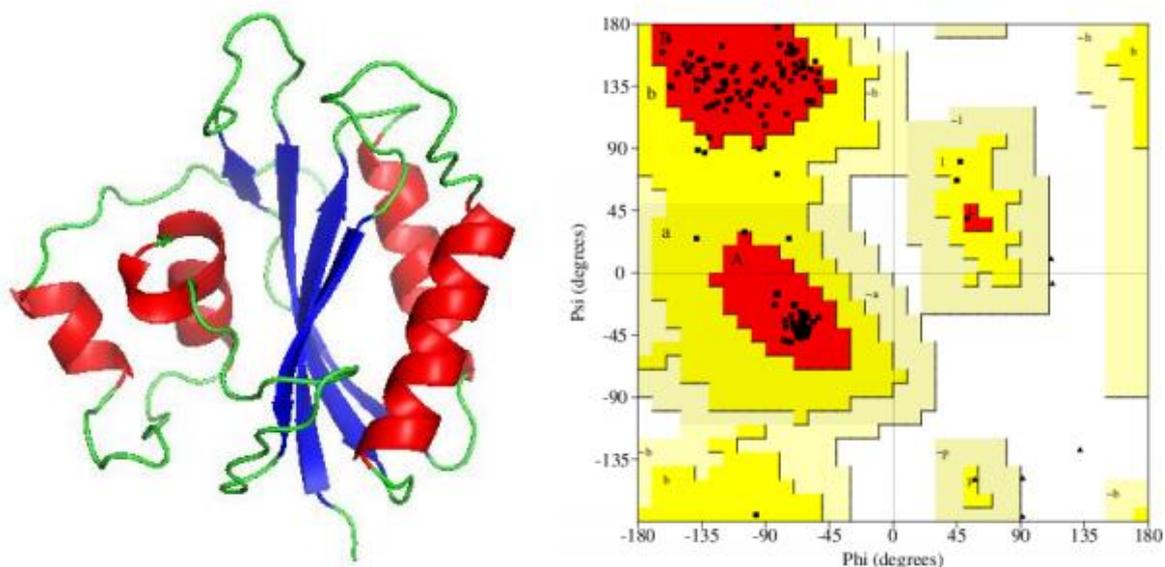


Figura 1. Estrutura apo-PaHPPK e gráfico de Ramachandran. Os tipos de estruturas secundárias foram coloridos da seguinte maneira: alfa-hélices em vermelho, beta-fitas em azul e alças em verde.

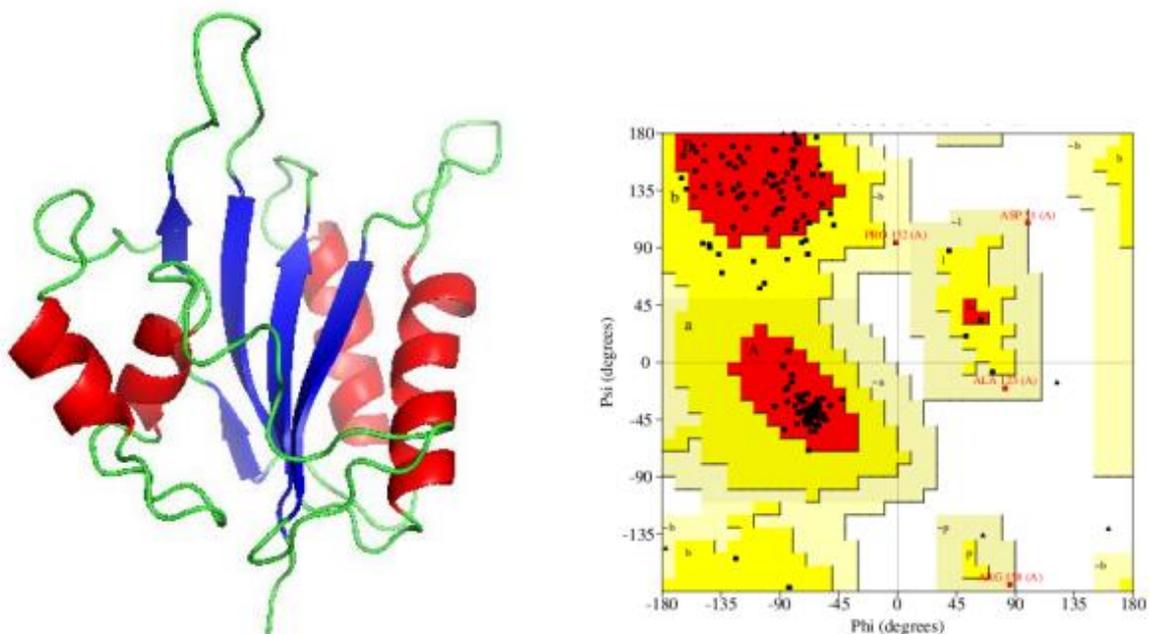


Figura 2. Estrutura HPPK-MgAMPPCP e gráfico de Ramachandran. Os tipos de estruturas secundárias foram coloridos da seguinte maneira: alfa-hélices em vermelho, beta-fitas em azul e alças em verde.

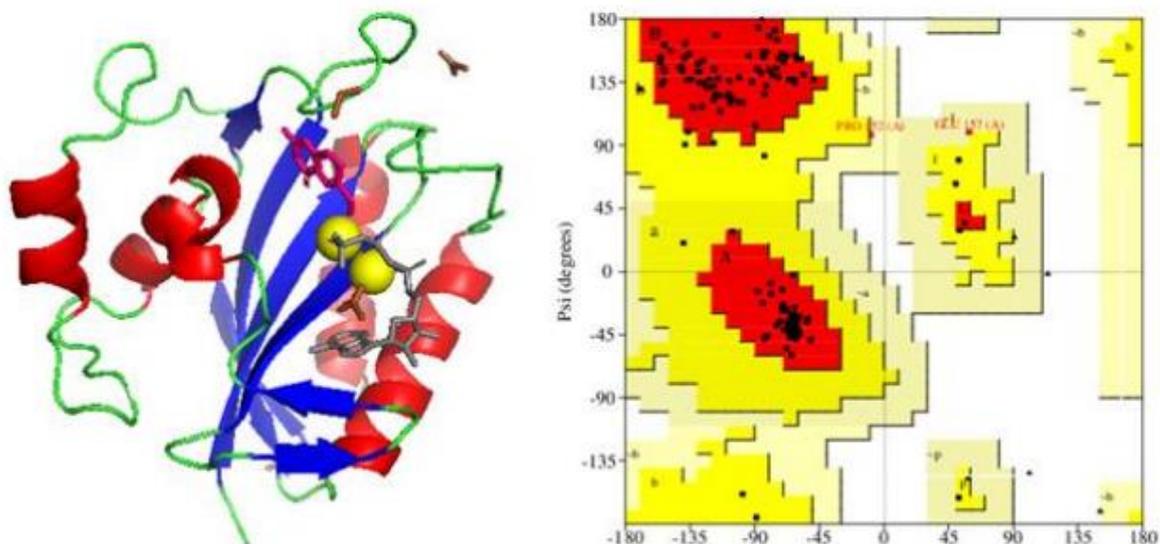


Figura 3. Estrutura HPPK-MgAMPPCP-HP e gráfico de Ramachandran. Os tipos de estruturas secundárias foram coloridos da seguinte maneira: alfa-hélices em vermelho, beta-fitas em azul, alças em verde, íons magnésio em amarelo, ACT em marrom, APC em cinza e PH2 em rosa.

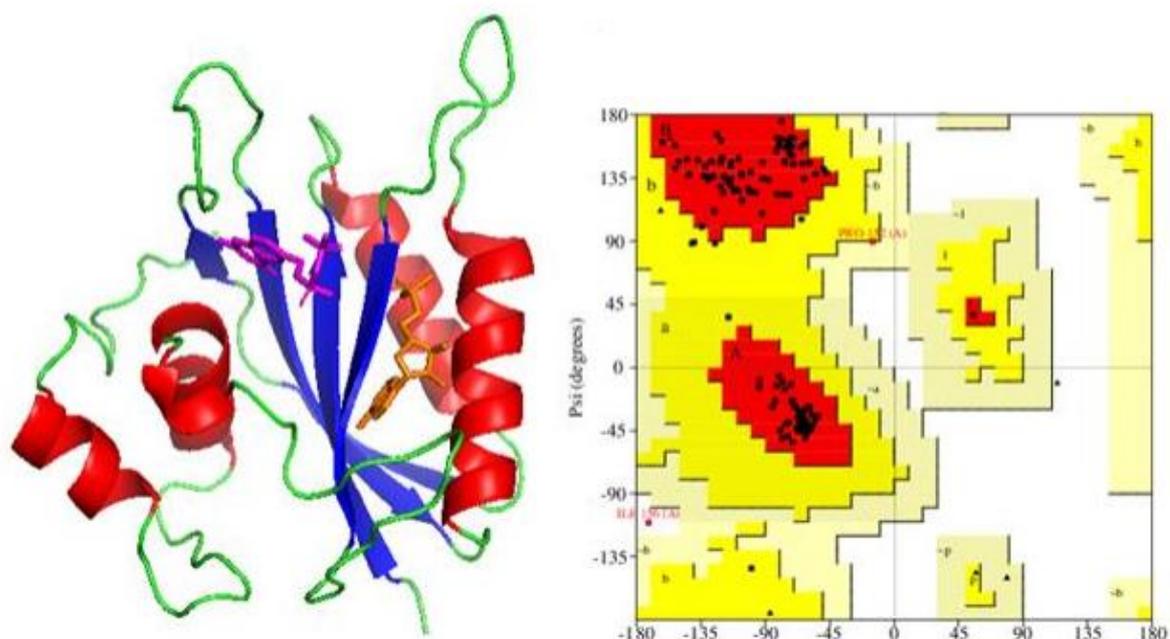


Figura 4. Estrutura HPPK-AMP-HPPP e gráfico de Ramachandran. Os tipos de estruturas secundárias foram coloridos da seguinte maneira: alfa-hélices em vermelho, beta-fitas em azul, alças em verde, AMP em laranja e HH2 em rosa.

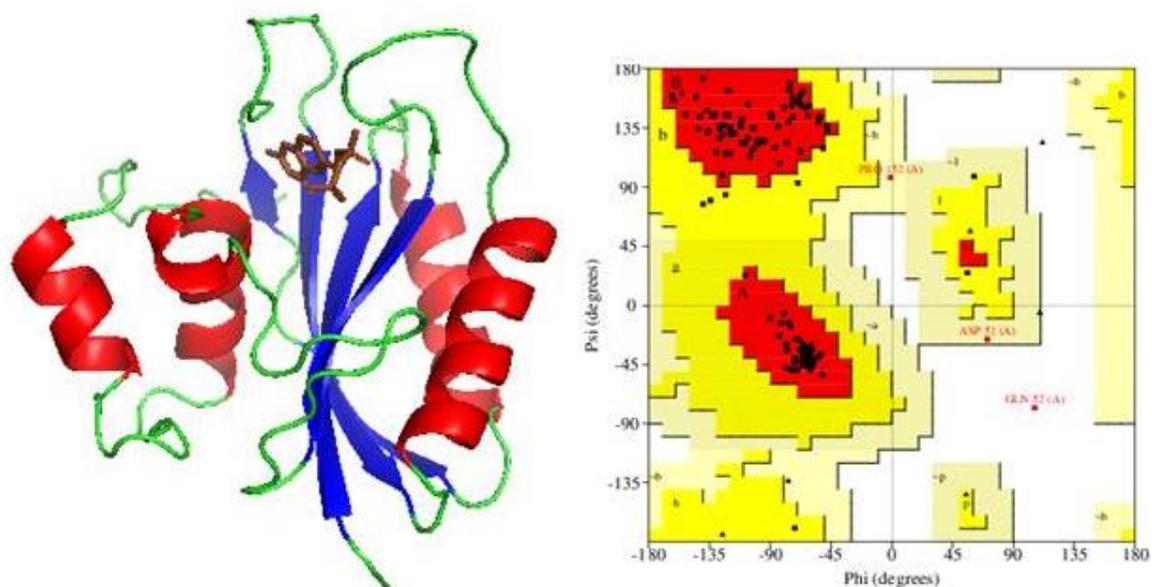


Figura 5. Estrutura HPPK-HPPP e gráfico de Ramachandran. Os tipos de estruturas secundárias foram coloridos da seguinte maneira: alfa-hélices em vermelho, beta-fitas em azul, alças em verde e HH2 em marrom.

Tabela 1. Gráfico de Ramachandran. Os valores em porcentagem se referem a cada um dos estados conformacionais do modelo PaHPPK.

Região do gráfico de Ramachandran / %	Porcentagem de resíduos				
	apo-HPPK	HPPK-MgAMPPCP	HPPK-MgAMPPCP-HP	HPPK-AMP-HPPP	HPPK-HPPP
Mais favoráveis	93,3	81,5	89,6	94,1	94,1
Adicionalmente permitidas	6,7	16,3	9,6	5,2	4,4
Generosamente permitidas	0,0	2,2	0,7	0,0	0,7
Não permitidas	0,0	0,0	0,0	0,7	0,7

Com relação à interação de resíduos com o substrato propriamente dito, observa-se que a 6-hidroxi-metil-7,8-dihidropterina (HP) interage com nove resíduos da enzima HPPK da *Escherichia coli*: G8, T42, P43, L45, Y53, N55, W89, D95 e F123. Há interações hidrofóbicas devidas aos resíduos G8, L45, Y53, W89 e F123. Por outro lado, doze resíduos

estão envolvidos na ligação do AMPCPP (um análogo do ATP): Q74, E77, R84, R88, W89, R92, I98, R110, T112, H115 e Y116 (BLASZCZYK *et al.*, 2000).

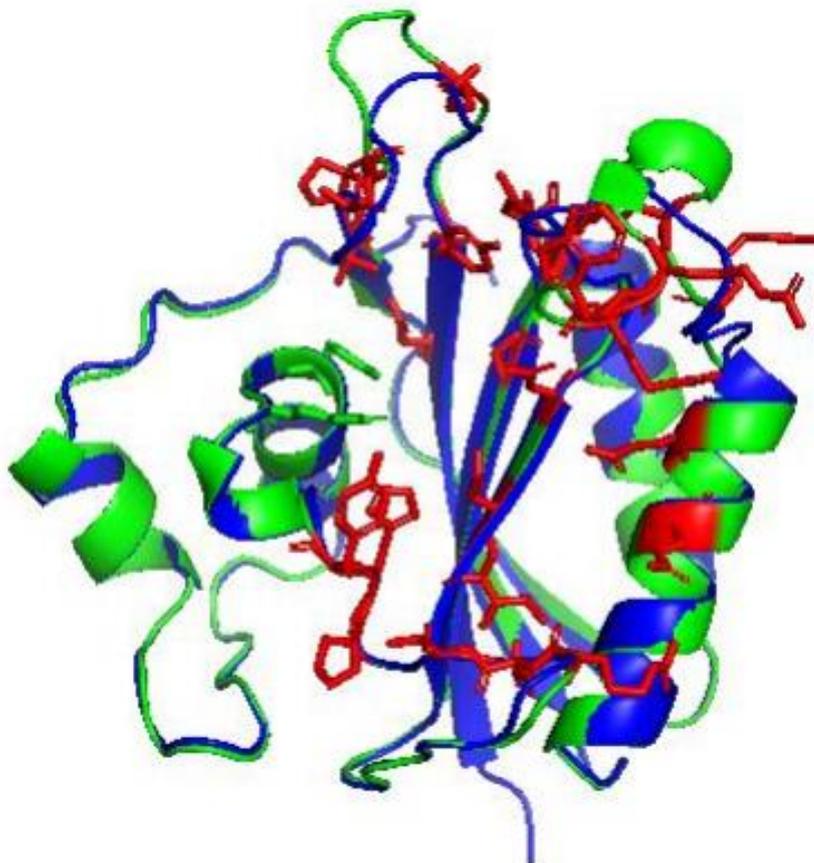


Figura 6. Sobreposição realizada pelo programa PyMOL da apo-HPPK de *Escherichia coli* (PDB: 1hka) ao melhor modelo teórico de PaHPPK obtido pelo programa Modeller. Em vermelho, os resíduos que compõem o sítio ativo dessa conformação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da sobreposição dos modelos nos diversos estados (Figura 7), observa-se que ligação do ATP induz alterações conformacionais em uma região tipo *hairpin*, que é responsável pelos contatos polares com a adenina (além do *loop 3*). Segundo (BLASZCZYK *et al.*, 2000), quando o ATP se encontra ligado, o plano que contém as duas fitas- β posiciona-se aproximadamente na direção horizontal na imagem. Entretanto, nos estados correspondentes à forma apo e nos dois posteriores à ocorrência da reação, o plano sofre uma

inclinação. Esta inclinação aumenta a distância entre a adenina e os resíduos que a mantêm no seu sítio e, conseqüentemente, reduz a afinidade do AMP permitindo que seja liberado para a solução à medida que o *loop 3* passa a assumir a conformação aberta. Além disso, o movimento da *hairpin* afeta o posicionamento da cadeia lateral da R111 (localizada na *hairpin*) que faz interações iônica e polar com as cadeias laterais de D73 e Q76 (ambos na hélice- α imediatamente abaixo), respectivamente. As interações entre estes três resíduos poderiam representar uma maneira pela qual o *loop 3* e a *hairpin*, mediados pela hélice- α , se acoplam durante o evento de reconhecimento do ATP (BLASZCZYK *et al.*, 2000).

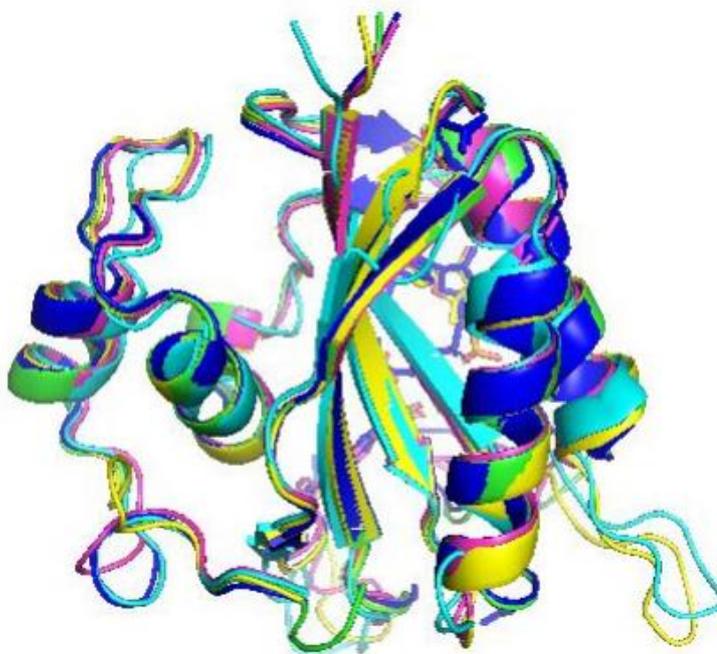


Figura 7. Sobreposição dos modelos teóricos de todos os estados da enzima PaHPPK.

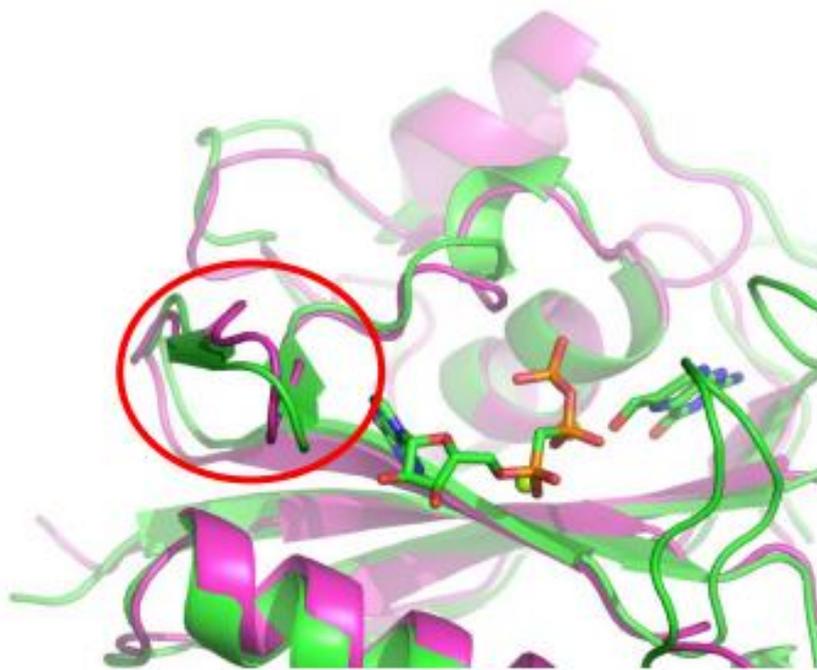


Figura 8. Sobreposição da região *hairpin* (assinalada em vermelho). Em verde o modelo PaHPPK-MG-AMPCPP-HP (o cofator está representado em esferas verdes (Mg^{2+}) e em bastões estão representados AMPCPP e HP); em magenta, o modelo apo-PaHPPK.

As informações estruturais adquiridas dos modelos serão úteis, sobretudo aquelas referentes aos aminoácidos que realizam contatos com os substratos, durante as etapas subsequentes relacionadas à escolha de ligantes para *docking*.

REFERÊNCIAS

BLASZCZYK, J. et al. Catalytic Center Assembly of HPPK as Revealed by the Crystal Structure of a Ternary Complex at 1.25 Å Resolution. **Structure**, Vol. 8, 1049–1058, 2000.

BLASZCZYK, J. et al. Structure and activity of *Yersinia pestis* 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase as a novel target for the development of antiplague therapeutics. **Acta Cryst.** v. D63, p. 1169–1177, 2007.

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 – RBAC**. ISSN 2448-3877, 2017.

CHHABRA, S. et al. Structure of *S. aureus* HPPK and the Discovery of a New Substrate Site Inhibitor. **PLOS ONE**. v. 7, p. 1-15, 2012.

DERRICK, J. P. The structure and mechanism of 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase. **Elsevier – Vitamins & Hormones**. Vol. 79, 2008, p. 411-433.

FERREIRA, L. B. Estrutura clonal e multirresistência em *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertação em Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária – Fundação Oswaldo Cruz. 99 p. 2005.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, p. 283, 1993.

MORRIS, G. M.; et al. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. **J. Computational Chemistry** 2009, v.16, p. 2785-2791.

NASCIMENTO, M. G. et al. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Quim. Nova**, Vol. 27, No. 4, 623-630, 2004.

NEVES, P. R. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. V. 47, n. 4, p. 409-420. Agosto 2011.

SALI A., BLUNDELL T. L. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. **J. Mol. Biol.** v. 234, p. 779–815, 1993.

SALI, A; SHEN, M. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. **Protein Sci.**, v. 15, p. 2507-2524, 2006.

SANTOS, N. de Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto Enfermagem**, vol. 13, núm. Esp, 2004, pp. 64-70.



VERLI, H. *Bioinformática: da Biologia à flexibilidade molecular*. 1. ed. São Paulo: SBBq, 2014.

YAN, H.; JI, X. Role of Protein Conformational Dynamics in the Catalysis by 6- 12 Hydroxymethyl-7, 8-Dihydropterin Pyrophosphokinase”. **Protein & Peptide Letters** (2011) 18: 328.