ESTUDOS DE DINÂMICA MOLECULAR COM COMPOSTOS SELECIONADOS POR TRIAGEM VIRTUAL FRENTE AO COMPLEXO ENZIMÁTICO ANTÍGENO 85 DO *Mycobacterium tuberculosis*

Elivelton de Jesus Cerqueira¹; Manoelito Coelho dos Santos Júnior²; Isis Bugia Santana³

1. Bolsista PIBIC-Af/CNPq, Graduando em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

tomcerqueira2@gmail.com

2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: manoelito@uefs.br

3. Colaborada, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: isisbugia@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: Triagem virtual hierárquica; *Mycobacterium tuberculosis*; antígeno 85.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma afecção causada pela *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) que, dentre as doenças infecciosas, é a principal causa de morte no mundo, estimando-se que em 2015 ela tenha acarretado o óbito de 1,4 milhões de pessoas (WHO, 2016). A resistência bacteriana aos fármacos utilizados no tratamento configura um dos principais desafios para o controle da doença (WHO, 2016). Logo, é urgente a busca por novas alternativas terapêuticas no combate a TB.

No sentido de intervir em vias ligadas à virulência da *Mtb*, as proteínas antígeno 85, representadas pelos antígenos 85A, 85B e 85C apresentam-se como alvos promissores para fármacos por catalisar a biossíntese de micolatos, elementos essenciais para a composição da parede celular da bactéria, e por transferi-los ao arabinogalactano (Ronning *et al.* 2000). Sendo assim, a modulação exclusiva do Ag85C é justificada no fato das proteínas apresentarem sítio ativo altamente conservado, com 100% de identidade para os resíduos da tríade catalítica (Ronning *et al.* 2004).

No intuito de buscar potenciais inibidores para o Ag85C, a triagem virtual é empregada para selecionar compostos promissores frente a determinado alvo terapêutico com o intuito de priorizar moléculas com elevado potencial de atividade biológica para os posteriores testes biológicos (Rodrigues *et al.* 2012). Estratégias como a triagem virtual hierárquica, que associa a triagem baseada no alvo com a triagem baseada no ligante, contribuem para a seleção dessas moléculas promissoras.

Logo, esse trabalho teve como objetivo principal identificar potenciais inibidores frente ao Ag85C, por triagem virtual, e como específicos: selecionar compostos oriundos do banco de produtos naturais; realizar estudos de acoplamento molecular com os compostos selecionados; classificar os melhores compostos ranqueados de acordo a regra de Lipinski; realizar estudos de dinâmica molecular e construir mapas de interação intermolecular entre compostos selecionados e a enzima alvo.

METODOLOGIA

Inicialmente foi organizado um banco de inibidores com atividade conhecida frente ao Ag85C, no qual, uma parte foi oriunda do banco de dados ChEMBL (Bento *et al.* 2014), com IC₅₀ < 50 µM e a outra do trabalho de Ibrahim e colaboradores (2012), com Ki < 50 µM. Um banco de compostos naturais (BIOGENICS) foi obtido do ZINC15 (Sterling & Irwin, 2015).

A triagem virtual por similaridade química foi realizada utilizando como moléculas de referência os inibidores do Ag85C. A partir de então utilizou-se o programa *DataWarrior* 4.2.2 (Sander *et al.* 2015).

Para a realização do acoplamento molecular foi selecionada a estrutura cristalográfica do Ag85C (PDB ID 1VA5), co-cristalizada com o ligante octil tioglicosídeo (OGS), o preparo da mesma foi realizado no UCSF Chimera 1.9.

O acoplamento molecular foi realizado com o pacote de programas DOCK 6.7 (Ewing *et al.* 2001). Com o programa SPHGEN foi construído um conjunto de esferas com base na superfície molecular. A avaliação dos parâmetros do acoplamento molecular foi realizada através da análise do valor de RMSD (do inglês *Root Mean Square Deviation*). Para pontuação das moléculas foi utilizada a função padrão *Grid Score*.

Os compostos melhores ranqueados pelo acoplamento molecular foram classificados segundo a regra do 5 de Lipinski no servidor *Molinspiration* 2012.05 (Ertl, 2010).

O composto selecionado como melhor potencial inibidor foi submetido a simulações por dinâmica molecular (DM) junto ao Ag85C. A minimização inicial dos complexos foi realizada no pacote de programas GROMACS 5.1.2 (Pronk *et al.* 2013) empregando-se o método de mecânica molecular com o campo de força GROMOS96 53a6 (Oostenbrink *et al.* 2004). A minimização de energia foi realizada empregando-se os algoritmos Steepest Descent e posteriormente Gradiente conjugado, ambos com e sem restrição.

Após as etapas de minimização de energia, utilizando o integrador Verlet (Verlet, 1967), o sistema foi equilibrado e aquecido à temperatura constante de 300K numa simulação de dinâmica molecular (1ns) utilizando o algoritmo LINCS. Em seguida, nas mesmas condições, foi realizada uma simulação de dinâmica molecular de 30ns, sem restrições.

As interações intermoleculares do complexo foram analisadas por meio do servidor *Protein-Ligand Interaction Profiler* (PLIP) (Salentin *et al.* 2015) para a construção dos mapas de interações em 3D, tanto para o acoplamento quanto para a dinâmica molecular.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na pesquisa realizada no ChEMBL (Bento *et al.* 2014) selecionou-se cinco compostos, os quais são identificados como: ChEMBL325304, ChEMBL118252, ChEMBL326268, ChEMBL227546 e ChEMBL418868; já no trabalho de Ibrahim e colaboradores (2012) selecionou-se os compostos 13a, 13b e 14.

Os resultados da busca por similaridade demonstraram que para os inibidores retirados do ChEMBL não foram encontrados compostos com similaridade maior que 0,7; no entanto foram obtidos 1.363 compostos similares aos inibidores 13a, 13b e 14.

O resultado do reacoplamento molecular indicou RMSD = 1,23 Å para a função de pontuação *Grid Score*, mostrando sucesso em reposicionar o ligante OGS. Após a realização do acoplamento molecular e aplicação do filtro de Lipinski o composto ZINC000107283125, com energia de afinidade igual a -84,655426 Kcal/mol, foi designado para os estudos de dinâmica molecular.

Durante a simulação de DM a energia do total do sistema (forma APO e HOLO) manteve-se em torno de - 6,7 kJ/mol, certificando o enovelamento da proteína durante todo o tempo de simulação. Para a análise da estabilidade estrutural foi possível observar que a forma APO estabilizou a partir de 15 ns de simulação, apresentando desvio padrão médio para as posições atômicas de 5,6 e uma variação em torno de 2,75 Å, enquanto a forma HOLO estabilizou a partir de 11 ns com desvio padrão médio de 2,3 e variação em torno de 2,25 Å. Essa maior estabilidade do complexo, em comparação à forma APO, pode ser devido à realização de interações intermoleculares que influenciam diretamente na oscilação das posições atômicas.

Na verificação da contribuição de determinadas regiões da proteína através do RMSF (do inglês *Root Mean Square Fluctuation*) da cadeia principal, observou-se que as regiões de alça demonstraram maior instabilidade conformacional em relação às demais estruturas secundárias (Figura 1). A proteína APO apresentou desvio padrão médio para a flutuação dos resíduos de 9,5, já a HOLO de 5,3. Logo, pode-se afirmar que ZINC000107283125 foi capaz de induzir modificações conformacionais, aumentando a estabilidade na área de catálise e diminuindo em regiões próximas, mas que, de modo geral, tenderam a estabilizar a estrutura. Destaca-se ainda que a tríade catalítica (Ser125, Glu229 e His261), na forma HOLO apresentou menores flutuações do que na APO.

Figura 1 - Representação gráfica do RMSF para a cadeia principal (*backbone*) da forma APO e da forma HOLO durante a simulação por DM, destacando os resíduos da tríade catalítica.

Com a estrutura representativa da DM foi possível verificar que ZINC000107283125 (Figura 2) realizou interações hidrofóbicas com os resíduos Trp159, Leu162, Leu165, Leu228. Foram verificadas também a realização de ligações de hidrogênio do tipo aceptora com Ser125, Ala225, e Asn222; e do tipo doadora a Asn222.

Figura 2: Mapa de interações intermoleculares do composto ZINC85627062 com o Ag85C da DM. Linha preenchida azul: ligação de hidrogênio. Linha tracejada cinza: interação hidrofóbica.

CONCLUSÕES

A abordagem baseada na triagem virtual hierárquica híbrida pôde, de forma significativa, diminuir o tempo de busca por um potencial inibidor do Ag85C e o custo computacional associado a mesma. A aplicação da similaridade química reduziu o BIOGENICS para aproximadamente 1,5%, e direcionou para seleção de estruturas químicas pertencentes ao um espaço químico biologicamente.

Utilizando a função de pontuação Grid Score, selecionou-se a molécula ZINC000107283125. Com os resultados da DM foi possível verificar o complexo Ag85C/ZINC000107283125 manteve-se estável durante a fase produtiva. Assim, os resultados com os estudos realizados contribuíram para a pesquisa de novos fármacos mais seletivos e potentes frente ao Ag85C e, possivelmente, às demais proteínas antígeno 85 da *Mtb*.

REFERÊNCIAS

- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2016. Global tuberculosis report 2016. 20. ed. Geneva: WHO.
- RONNING, D. R. *et al.* 2000. Crystal structure of the secreted form of antigen 85C reveals potential targets for mycobacterial drugs and vaccines. *Nature Structural Biology* 7(2).
- RONNING, D. R. *et al.* 2004. *Mycobacterium tuberculosis* Antigen 85A and 85C Structures Confirm Binding Orientation and Conserved Substrate Specificity. *The Journal of Biological Chemistry* 279(35), 36771-7.
- RODRIGUES, R.P. *et al.* 2012. Estratégias de triagem virtual no planejamento de fármacos. *Revista Virtual de Química* 4(6): 739-776.
- BENTO, A.P. *et al.* 2014. The ChEMBL bioactivity database: an update. *Nucleic Acids Research* 42: 1083-1090.
- IBRAHIM, D. A. *et al.* 2012. Design, synthesis, and x-ray analysis of a glycoconjugate bound to *Mycobacterium tuberculosis* Antigen 85C. *Bioconjugate Chemistry* 23: 2403–2416.
- IRWIN, J.J. *et al.* 2012. ZINC – A free tool to discover chemistry for biology. *Journal of chemical information and modeling* (1): 1-40.
- SANDER, T. *et al.* 2015. DataWarrior: an open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. *Journal of chemical information and modeling* 55(2): 460-73.
- EWING, T.J.A. *et al.* 2001. DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 15(5): 411-428.
- ERTL, P. 2010. Molecular Structure Input on the Web. *Journal of Cheminformatics* 2(1).
- OOSTENBRINK, C. *et al.* 2004. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *Journal of Computational Chemistry* 25(13): 1656–76.
- VERLET, L. 1967. Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Physical Review*, 159(1): 98-103.
- SALENTIN, S. *et al.* 2015. PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Research* 43: W443-W447.