

PROSPECÇÃO DE INIBIDORES PARA A ENZIMA O-ACETILSERINA(TIOL) LIASE (OAS-TL) POR TÉCNICA *IN SILICO*.

Luana de Oliveira Cardoso¹ (PIBIC/CNPq/UEM), Ana Paula Boromelo¹, Amanda Castro Comar¹, Rogério Marchiosi¹, Erika Wakida¹, Paulo Sérgio Alves Bueno¹ (Coorientador), Wanderley Dantas dos Santos¹ (Orientador). E-mail: wdsantos@uem.br.

¹Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica, Maringá, PR.

Ciências Biológicas, Biofísica/ Biologia Molecular.

Palavras-chave: Varredura virtual; Dinâmica molecular; Herbicidas;

RESUMO

A enzima OAS-TL desempenha um importante papel na síntese de cisteína em plantas, processo vital na fixação do enxofre. A inibição de sua atividade pode resultar na inviabilidade da planta. Portanto, a descoberta de inibidores específicos para essa enzima pode abrir caminho para o desenvolvimento de novos herbicidas. Neste estudo, foram empregadas abordagens *in silico* para identificar potenciais candidatos a inibidores da OAS-TL. A partir de uma extensa biblioteca contendo 141.000 ligantes, foram conduzidas varreduras virtuais usando a técnica de docking molecular. Ao final dessas varreduras por dois programas distintos, emergiu um candidato denominado ABZ, que exibiu maior afinidade em relação ao substrato natural da enzima (OAS). Através de simulações de dinâmica molecular com uma duração de 100 nanossegundos, foi possível observar o comportamento termodinâmico do homodímero da OAS-TL interagindo com um ABZ em cada um dos seus sítios ativos. Durante a equilibração do sistema, um dos ABZ complexados foi expelido, enquanto o outro manteve sua estabilidade ao longo de toda a simulação. Apesar das interações distintas com os dois monômeros, os resultados evidenciaram a afinidade do ABZ com a OAS-TL. Para validar completamente o potencial de inibição do candidato ABZ, são indispensáveis ensaios experimentais *in vitro* e *in vivo*.

INTRODUÇÃO

A via de assimilação do enxofre foi indicada por HIRASE e MOLIN (2003) como um potencial alvo metabólico para desenvolvimento de novos herbicidas. O enxofre é um macronutriente tanto para plantas e animais, as plantas podem captar e reduzir as formas inorgânicas do enxofre e assimilá-lo em uma variedade de compostos orgânicos. A O-acetilserina(tiol)liase (OAS-TL) realiza um passo essencial para a assimilação do enxofre na L-cisteína, o precursor para todos os compostos orgânicos que contém enxofre em plantas e animais. Desta forma, neste estudo o objetivo foi prospectar potenciais candidatos a inibidores da OAS-TL de milho por

metodologias *in silico*, como varredura virtual pelo método de docking molecular e simulações de dinâmica molecular.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Varredura Virtual

O homodímero da enzima OAS-TL de milho complexada com seu substrato (OAS) foi utilizada neste estudo. Sua estrutura foi determinada pela técnica de modelagem molecular anteriormente (dados ainda não publicados). Para a varredura virtual foram testados e validados protocolos de docking molecular no sítio ativo da enzima, por meio de *redocking*, em todos os programas disponíveis em nosso laboratório. Através dos valores de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) do substrato OAS, foram selecionados os melhores programas para serem utilizados. Após isso foram construídas duas bibliotecas de ligantes, a partir do banco de dados Zinc (zinc.docking.org), contendo os compostos dos catálogos das empresas Sigma-Aldrich e Acros, totalizando 141.000 ligantes. As bibliotecas foram filtradas pelos critérios ADMETOX (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) através do Programa DataWarrior (Sander, 2015) e pelas Regras de Lipinski (Lipinski, 2016). Os ligantes então filtrados, foram submetidos a um dos programas validados, para a seleção daqueles ligantes com maior pontuação (pseudoenergia) com relação ao substrato OAS. Por último, um segundo programa foi utilizado para a seleção do melhor candidato.

2. Dinâmica Molecular

Em cada monômero da enzima OAS-TL foi complexada a melhor pose do ligante selecionado na etapa de varredura virtual. Este complexo foi virtualmente mergulhado em uma caixa com água em condições periódicas de contorno, além de uma quantidade suficiente de NaCl para a sua neutralização. O processo de dinâmica molecular (DM) foi realizado em cinco etapas pelo programa NAMD2 (PHILLIPS et al., 2005). Na primeira etapa os átomos do ligante e do cofator foram fixados no espaço, enquanto que a proteína e demais átomos do sistema foram mantidos livres para se movimentar, em uma minimização de 30.000 passos por Gradiente Conjugado (CG). Na próxima etapa todos os átomos do sistema foram minimizados por 30.000 passos de CG. Na terceira etapa os átomos da proteína e ligantes foram mantidos fixos enquanto que as águas e sais foram submetidos a 40 picosegundos de DM de equilíbrio. Na quarta etapa, todos os átomos foram submetidos a um novo ciclo de CG por 30.000 passos. Por fim, todo o sistema foi submetido a 100 nanosegundos de DM de equilíbrio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os protocolos de docking molecular foram validados nos programas AutoDock Vina (Trott e Olson, 2010) e AutoDock-4 (Dallakyan e Olson, 2015), com um RMSD

abaixo de 2,0 Å, algoritmos padrões de busca e pontuação, *grid* de 0,375 Å, com centro de busca nos eixos x, y e z de 67, 49, -19 para ambos, e tamanho da caixa em cada eixo de 10 e 30, respectivamente. O valor de pontuação obtido para o substrato OAS foi de -6,6 kcal/mol para os dois programas. Esta pontuação foi utilizada como referência na varredura virtual para encontrar ligantes candidatos que tenham uma maior afinidade pela enzima. Por meio dos critérios ADMETOX e Regras de Lipinski, gerou-se uma biblioteca de 57.000 ligantes. Na primeira etapa da varredura virtual foi utilizado o programa Autodock para a seleção de 2.000 ligantes. Ao repetir esta seleção no mesmo programa foi possível eliminar falsos-positivos, chegando ao número de 16 ligantes. Por fim, foram realizadas mais três repetições no programa Vina, que possibilitou identificar o ligante de código ZINC1531037 (denominado internamente de ABZ). Ele apresentou uma pontuação média de $-6,7 \pm 0,14$ kcal/mol e $-7,1 \pm 0,00$ kcal/mol nos programas Autodock e Autodock Vina, respectivamente.

Na etapa de DM, foi observado o comportamento termodinâmico da enzima OAS-TL homodimérica em complexo com o ligante ABZ. Os resultados são apresentados pelo cálculo de RMSD da cadeia proteica (Fig. 1A), RMSD do ligante ABZ (Fig. 1B) e RMSF - *root-mean-square fluctuation* (Fig. 1C). O RMSD médio do homodímero, indica que a proteína tende a assumir o equilíbrio por volta de 20 ns. Porém, nesse momento o ligante ABZ vibra em com maior frequência em um dos monômero até se soltar do sítio de ligação. Este resultado por ser verificado analisando a Figura 1B, onde foram calculados o RMSD para os dois ABZ complexados. Observa-se um aumento do valor de RMSD de um ABZ em comparação ao outro, que manteve-se vibrando em uma frequência constante durante toda a simulação. O cálculo de RMSF (Fig. 1C) reflete a flutuação da posição dos resíduos de aminoácidos de cada monômero. O padrão de flutuação é diferente para os dois monômeros. O monômero com o ABZ em equilíbrio possui regiões no sítio de ligação que flutuam menos em comparação com o outro complexo.

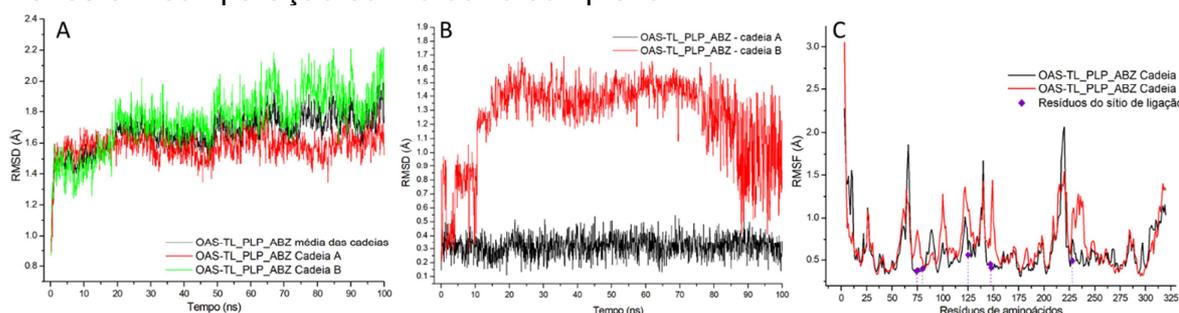


Figura 1 – Simulações de dinâmica molecular por 100 ns do complexo OAS-TL com o ligante ABZ. A) Cálculo de RMSD das cadeias A e B da OAS-TL; B) RMSD do ligante ABZ; C) Cálculo de RMSF.

Foi calculado também a frequência de contato dos resíduos de aminoácidos que mais interagem com o ligante ABZ. Para o monômero que manteve o ABZ complexado durante toda a simulação, os resíduos Gln-147, Ser-75, Thr-74, Phe-148 e Met-125 apresentaram interação acima de 96% do tempo com o ligante. Eles estão representados na Figura 1C. Ao analisar o outro monômero, somente os

quatro primeiros resíduos interagiram com o ABZ, por um período de 32, 85 e 76% do tempo, respectivamente.

A análise dos dados apresentados permite inferir que o ligante tem a capacidade de influenciar na inibição da enzima OAS-TL. No entanto, sua interação ocorre com alta afinidade em apenas um monômero. Possivelmente, a presença do ABZ em um dos sítios de ligação da enzima OAS-TL, interfere no outro sítio de forma negativa. Este evento somente é previsto na etapa de DM, onde a proteína tem flexibilidade. Na etapa de varredura virtual isso não é possível, pois no processo a cadeia proteica é mantida rígida.

CONCLUSÕES

O ligante ABZ demonstrou ser um candidato para inibição da enzima OAS-TL, embora com interações diferenciadas nos monômeros. Estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários para avaliar sua capacidade de inibição.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao CNPq que propiciou uma bolsa ao projeto. Agradeço também aos professores envolvidos, alunos e ao Laboratório de Bioquímica de Plantas da UEM pelo suporte.

REFERÊNCIAS

DALLAKYAN, S.; OLSON, A. J.; Small-Molecule Library Screening by Docking with PyRx. **Methods Mol Biol**, v. 1263. p 243-50, 2015.

HIRASE, K., MOLIN, W.T. Sulfur assimilation in plants and weed control: Potential targets for novel herbicides and action sites of certain safeners. **Weed Biology and Management**, v. 3, p. 147–157, 2003.

PHILLIPS, J.C., BRAUN, R., WANG, W., GUMBART, J., TAJKHORSHID, E., VILLA, E.,CHIPOT, C., SKEEL, R.D., KALE, L., SCHULTEN, K. Scalable molecular dynamics with NAMD. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1781-1802, 2005.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p 455-461, 2010.