

### **Dados do Proponente:**

**Nome:** Ana Carolina Ramos Guimarães – Pesquisador em Saúde Pública

**Filiação:** Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

**Endereço:** Avenida Brasil, 4365 – Pavilhão Leônidas Deane, sala 104 – Manguinhos, Rio de Janeiro/RJ Cep: 21040-900

**e-mail:** [carolg@fiocruz.br](mailto:carolg@fiocruz.br)

### **Projeto:**

**Título do Projeto:** Identificação e avaliação computacional de possíveis inibidores alostéricos e competitivos de PEPCK-M humana: uma alternativa para a terapia contra o carcinoma de pulmão.

**Palavras-chave:** inibição alostérica, inibição competitiva, PEPCK-M, carcinoma de pulmão

### **Introdução:**

O câncer é a segunda maior causa de morte no mundo, representando um enorme problema para a medicina moderna. Os diferentes tipos de câncer apresentam, entre outras características, capacidade de divisão celular descontrolada, invasão de tecidos (metástase) e formação de novos vasos sanguíneos para suportar seu crescimento. O aumento do número de células, resultado da divisão celular descontrolada, leva a um requerimento cada vez maior do consumo de glicose. O crescimento do tumor em condições de limitação metabólica, especialmente com diminuição da disponibilidade de glicose, é comum, sugerindo que as células tumorais apresentam grande plasticidade metabólica. De fato, diversos tipos de câncer apresentam adaptações metabólicas que permitem contornar a deficiência de glicose consumindo, por exemplo, lactato e aminoácidos. Central a essa adaptação está a enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) que participa da etapa inicial da gliconeogênese. Esta enzima atua na formação reversível de fosfoenolpiruvato (PEP) a partir de oxaloacetato (OAA). Devido a sua função gliconeogênica, a expressão diferencial das isoformas citoplasmática (PEPCK-C) e mitocondrial (PEPCK-M) está associada à diferentes tipos de câncer, independentemente. Esta alteração parece ser fundamental em câncer de pulmão, em que células tumorais submetidas à baixos níveis de glicose aumentam a expressão de PEPCK-M. Além disso, a inibição ou *knockdown* da enzima PEPCK-M em culturas de células tumorais de pulmão levaram ao aumento na morte celular e na apoptose. Estes estudos mostram a importância desta enzima para a prevalência do câncer.

## **Objetivos:**

O presente projeto visa estudar identificar compostos que se liguem a enzima PEPCK-M, utilizando uma abordagem de desenho de fármacos assistido por computador, na tentativa de propor uma terapia alternativa contra o câncer de pulmão.

## **Metodologia:**

### **Avaliar a afinidade de ligação da PEPCK-M humana com os inibidores descritos para rato:**

Análogos dos substratos da enzima PEPCK foram testados in vitro com a enzima citoplasmática de ratos (Stiffin et al. 2008). Para avaliar a eficiência dos programas de docking Glide (Friesner et al. 2006) e Autodock Vina (Trott & Olson 2010), serão realizados experimentos redocking e crossdocking dos substratos e inibidores utilizando as estruturas determinadas experimentalmente com a enzima PEPCK-C de ratos. As proteínas serão preparadas com o Protein Preparation Wizard, do Maestro (Schrödinger) (Friesner et al. 2006). Esta etapa tem por objetivo adicionar hidrogênios, atribuir a rotação dos ângulos Chi (Chi flip) dos resíduos de Asn, Gln e His e corrigir erros nas estruturas. Os estados de protonação das cadeias laterais ionizáveis serão definidos com base no mecanismo de reação proposto para PEPCK-C de rato (Carlson & Holyoak 2009) e pelo resultado do pKa do programa PROPKA para o pH 7. Os íons bivalentes Mn serão mantidos no sítio ativo. O docking molecular será realizado com o programa DOCKTHOR. Os substratos e inibidores obtidos dos arquivos pdb serão preparados utilizando o módulo Ligprep do Maestro, considerando a protonação em pH 7.

### **Avaliar o impacto funcional das mutações existentes nas regiões de sítio catalítico e alostérico da PEPCK-M encontradas em câncer de pulmão:**

As mutações comumente observadas na enzima PEPCK-M em câncer de pulmão serão avaliadas quanto ao seu efeito na estabilidade da enzima em sua afinidade pelos substratos. As mutações mais frequentes serão identificadas utilizando o banco de mutações COSMIC (Forbes et al. 2006). As mutações pontuais serão modeladas utilizando o programa MODELLER 9.17 (Shen & Sali 2006). Para identificar a estabilidade das estruturas terciárias das proteínas mutadas, ensaios de dinâmica molecular serão realizados. As simulações de dinâmica molecular permitem avaliar o sistema ao longo do tempo. O programa GROMACS será utilizado para as simulações de dinâmica molecular (Van Der Spoel et al. 2005). Serão utilizados os campos de força OPLS e Amber e solvatação explícita utilizando o modelo SPC de água (Case et al. 2005; Robertson et al. 2015). As simulações serão realizadas com condições periódicas de contorno em ensemble de Gibbs (NPT), à temperatura fisiológica humana (T=310K) com termostato v-rescale e pressão atmosférica (1 bar) com o barostato de Berendsen (Victor 2007).

**Analisar a interação das estruturas variantes observadas em PEPCK-M humana com os inibidores descritos na literatura:** Os modelos para as mutações, obtidas na etapa anterior, observadas na enzima PEPCK-M humana serão submetidos a ensaios de docking molecular utilizando o programa com melhor eficiência na predição de poses (redocking e crossdocking) e no ranqueamento dos inibidores testados experimentalmente descritos na literatura (Stiffin et

al. 2008)

**Realizar triagem virtual de compostos naturais para a enzima PEPCK-M de humanos:** Os conjuntos de compostos naturais NuBBE (2218 compostos) e o banco de compostos naturais com atividade contra o câncer (1613 compostos) serão utilizados. Para realizar a triagem virtual de alta vazão, propomos a utilização do programa DockThor\_v2 ([www.dockthor.lncc.br/v2/](http://www.dockthor.lncc.br/v2/)).

**Perspectivas:**

- Avaliar os compostos com boa afinidade predita e explorá-los para testes de otimização.
- Identificar a existência de diferenças nos padrões de interação entre as enzimas PEPCK-M mutantes descritas em pacientes com câncer e a enzima canônica.



Dra Ana Carolina Ramos Guimarães