

Utilização e desenvolvimento de ferramentas computacionais para análise de proteínas

Letícia dos Santos, Luiz Paiva

1 Objetivos

Em um dos projetos buscamos analisar diversos aspectos relacionados à ligação de íons metálicos (em especial o de Zn) em proteínas, sendo eles: como as ligações ocorrem, quais proteínas homólogas poderiam apresentar tais ligações e como a presença dos metais afeta a estrutura e dinâmica da proteína. No segundo projeto o objetivo foi desenvolver uma ferramenta para calcular o grau de similaridade entre as interfaces das cadeias de uma proteína.

2 Metodologia

O projeto de íons metálicos partiu de um trabalho anterior[1] que descreveu a estrutura da transtirretina humana na presença de Zn(2+). Devido às implicações da ligação do Zinco na TTR humana, buscamos entender como tais íons se ligam nessa proteína e se há algum padrão de ligação em outras proteínas da mesma família.

Nesse sentido, foram analisadas 9 proteínas de diferentes espécies, dentre elas: TTR humana (tanto na forma padrão quanto em diferentes mutações), TTR Wallaby, TTR E. coli, entre outras.

Os objetos de estudo foram as estruturas cristalinas de tais proteínas, obtidas a partir de um banco de dados aberto, o PDB. Esse banco de dados nos apresenta as mais variadas informações sobre a estrutura das proteínas, em especial a posição de cada átomo dentro do complexo. Tendo essa informação, foi desenvolvido um algoritmo capaz de identificar as ligações entre os íons de Zn e os aminoácidos da proteína, informando, para cada íon, quais os aminoácidos aos quais ele se liga.

Pensando em descobrir quais proteínas homólogas à TTR humana apresentam os sítios de ligação de Zn foi utilizado o método de alinhamento de proteínas, que identifica regiões de similaridade entre um conjunto de proteínas. Foi utilizado um conjunto de mais de 19000 proteínas homólogas pertencentes a diversas espécies.

Identificadas as regiões de similaridade, foi criado um algoritmo para verificar quais outras proteínas do conjunto apresentam sítios de Zn em regiões equivalentes às regiões de ligação da TTR humana.

No projeto de interfaces entre cadeias buscamos desenvolver um algoritmo que funcionasse independente da forma como a proteína foi cristalizada. Para isso utilizamos estruturas cujos arquivos PDB apresentavam unidades assimétricas diferentes, totalizando 5 estruturas que nos permitiram testar todos os casos de interesse: monômeros, dímeros, tetrameros e octâmeros.

O código desenvolvido compara as interfaces entre as cadeias, verificando, para um par de cadeias, quantas de suas ligações também estão presentes em um outro par de cadeias. A saída do programa permite avaliar, em porcentagem, quão simétricas são as interfaces.

3 Resultados

Para identificar os sítios de ligação de Zn(2+) nas proteínas analisadas, foi desenvolvido um código em Python que processa arquivos no formato PDB. Esse código verifica quais átomos estão a uma distância menor que 3,5 Å de um íon de zinco, identificando os resíduos que compõem o sítio de ligação.

A tabela 1 apresenta os sítios de Zn(2+) identificados para cada estrutura analisada.

Sítio	Estruturas
ASP-61, HIS-102, HIS-104	7RLK
ASP-61, HIS-89	2G2N
CYS-10, HIS-56	3DGD, 3DID, 3GPS, 3GRB, 3GRG
GLN-3, HIS-96, SER-114	2G2P
GLU-61	3DGD
GLU-62	3DGD
GLU-83, GLU-87	2G2N
HIS-31, ASP-74	3DGD, 3DID, 3GPS, 3SSG, 3GRG
HIS-31, GLU-72	3GRB
HIS-31, GLU-72, ASP-74	2DID, 3GPS, 3GRB, 3GRG
HIS-88, HIS-90	3DGD
HIS-88, HIS-90, GLU-92	3DGD, 3DID, 3GPS, 3GRB, 3GRG
HIS-9, HIS-98	2G2N, 2G2P
HIS-90, GLU-92	3SSG
HIS-96, HIS-98, SER-114	2G2N, 2G2P
HIS-96, SER-114	2G2N, 2G2P
LYS-70	7RLK

Table 1: Sítios de zinco encontrados para cada estrutura analisada.

Com base nos dados obtidos, observa-se que certos resíduos, como a HIS, aparecem com maior frequência nos sítios de ligação ao zinco, sugerindo possíveis padrões estruturais para a interação com esse metal. Além disso, algumas diferenças foram encontradas entre as espécies, o que pode indicar variações funcionais ou estruturais.

Normalmente a TTR humana apresenta 3 sítios de Zn. Ao procurar pelos sítios nas proteínas homólogas, foram encontradas 18 estruturas que compartilham do sítio Zn1, 58 que compartilham do sítio Zn2 e 1030 que compartilham do sítio Zn3. Dentre os resultados podemos destacar a presença de várias espécies de primatas, o que já era esperado devido à semelhança genética, mas também algumas espécies mais distantes, como peixes (e.g. *Platycephalus bassensis*) e bactérias (e.g. *Burkholderiales bacterium*), o que abre espaço para novas pesquisas sobre como tal característica pode ter aparecido em organismos tão diferentes.

Na tabela 2 podem ser vistos os resultados do cálculo do grau de similaridade das interfaces da estrutura 8VE0, que possui 4 cadeias na unidade assimétrica:

Interface 1	Interface 2	Similaridade
A-B	C-D	0.84
A-C	B-D	1.0
A-D	B-C	0.571

Table 2: Similaridade entre as interfaces de um tetrâmero (8VE0)

Os resultados foram de acordo com o esperado, visto que as interfaces que apresentam baixa similaridade (A-D e B-C) estão cruzadas no espaço.

4 Conclusão

Os resultados obtidos permitiram identificar potenciais sítios de ligação de $Zn(2+)$ nas proteínas analisadas. O uso de ferramentas computacionais mostrou-se eficaz para a identificação dessas regiões, oferecendo um ponto de partida para estudos mais aprofundados sobre a interação entre zinco e essas proteínas.

Como próximos passos, sugere-se realizar simulações de dinâmica molecular para verificar a estabilidade dessas interações e compreender melhor os efeitos do zinco na estrutura proteica. Além disso, se viável, análises experimentais serão conduzidas para validar as previsões computacionais e confirmar a ocorrência dessas interações *in vitro*.

References

- [1] Juliana B B Freire Lucas Bleicher Igor Polikarpov Fabio C L Almeida Debora Foguel Leonardo de C Palmieri, Luis Mauricio T R Lima. Novel zn^{2+} -binding sites in human transthyretin. *Journal of Biological Chemistry*, 2010.
- [2] Marcelo Querino Lima Afonso, Neli J. Jr. da Fonseca, Lucas Carrijo de Oliveira, Francisco Pereira Lobo, and Lucas Bleicher. Coevolved positions represent key functional properties in the trypsin-like serine proteases protein family. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(2):1060–1068, 2020. PMID: 31895561.
- [3] Natan Gonçalves Pedersolli Fernanda Aparecida Heleno Batista Ana Carolina Migliorini Figueira Rafaela Salgado Ferreira Ronaldo Alves Pinto Nagem Laila Alves Nahum Lucas Bleicher Lucas Carrijo de Oliveira, Mariana Amalia Figueiredo Costa. Reenacting the birth of a function: Functional divergence of hhuases and transthyretins as inferred by evolutionary and biophysical studies. *Journal of Molecular Evolution*, 89:370–383, 2021.
- [4] Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, and Lubert Stryer. *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, New York, 8th edition, 2015.