

Estudos por modelagem molecular da enzima serina hidroximetiltransferase de *Yersinia pestis*

Nathalia de Almeida Marques*

Leandro Alegria Vieira**

e Tanos Celmar Costa França***

RESUMO

A serina hidroximetiltransferase (SHMT) é uma das três enzimas pertencentes ao ciclo do folato e converte serina em glicina pela transferência de um grupo metileno para o tetrahidrofolato. Diferente das outras enzimas desse ciclo (dihidrofolato redutase e timidilato sintase), a SHMT é pouco estudada como um alvo molecular para a quimioterapia. No presente trabalho, a SHMT de *Yersinia pestis* (YpSHMT), o agente de guerra biológica causador da peste bubônica, é proposta como um potencial alvo para o planejamento de fármacos seletivos contra essa doença. Como não há estrutura cristalográfica dessa enzima disponível no banco de dados de proteínas (Proteins Data Bank – PDB), também foi proposto um modelo construído por modelagem, por homologia, usando como moldes as SHMT de *Escherichia coli* (EcSHMT) e *Bacillus stearothermophilus* (BsSHMT). Esse modelo foi posteriormente validado e submetido a etapas adicionais de otimização. A superposição deste com a SHMT humana (HssSHMT), a determinação dos resíduos pertencentes ao seu sítio ativo e a determinação das energias de ancoramento de potenciais inibidores de SHMT, nos sítios ativos de ambas as enzimas, revelaram características importantes que podem ser exploradas no planejamento de inibidores seletivos para a YpSHMT.

PALAVRAS-CHAVE

Defesa biológica; Agentes de guerra biológica; *Yersinia pestis*; Serina hidroximetiltransferase; Projeto de fármacos.

INTRODUÇÃO

A peste é uma zoonose que pode ser transmitida por picada de pulga ou via oral e atinge

humanos, cães, ratos, gado e roedores silvestres. O homem também pode ser infectado pelo contato direto com animais infectados ou, mais raramente, por secreções de pessoas infectadas. Essa doença é

* Aluna do 4º ano do curso de Engenharia Química do IME;

** 1º Ten aluno do 5º ano do curso de Engenharia Química do IME;

***Capitão QEM, engenheiro químico (UFRRJ, 1993), engenheiro militar (CFO-IME, 1996), mestre em Química Orgânica (UFRJ, 1998), doutor em Química (IME, 2004). E-mail: tanos@ime.eb.br

causada pelo bacilo Gram negativo *Yersinia pestis*, uma bactéria surgida entre 1.500 e 20.000 anos atrás, derivada da *Y. pseudotuberculosis* [1].

A *Y.pestis* já foi responsável por três grandes e devastadoras pandemias de peste, causando mais mortes que qualquer outro agente infeccioso conhecido e só deixou de ser uma grande ameaça à saúde pública a partir de 1925, quando a grande população de ratos das cidades passou a ser controlada com mais eficiência, reduzindo assim a transmissão para os seres humanos. Todavia, atualmente, a *Y. pestis* ainda persiste endemicamente na maioria dos países do mundo, causando epidemias locais [2]. O esquema da Figura 1 ilustra os ciclos silvestre e urbano da peste.

A infecção mais comum causada pela *Y.pestis* é a bubônica, palavra oriunda de bubão, nome dado aos linfonodos infectados pela bactéria. A

pode ser potencialmente transmitida de uma pessoa para outra, pelos perdigotos, iniciando epidemias devastadoras.

Além das pandemias naturais que provocou, a *Y. pestis* também se destacou ao longo da história como agente de guerra biológica, tendo sido usada para esse fim desde a antiguidade [3]. Há registros do uso da peste como arma biológica pelos espartanos contra os atenienses na guerra do Peloponeso, entre 431 e 404 a.C, nas guerras ao longo de toda a Idade Média, quando era comum a prática de lançar cadáveres pestilentos para dentro de cidades sitiadas (como fizeram os turcos contra os genoveses no cerco à cidade fortaleza de Kafka, na Crimeia, em 1346) e também na Segunda Guerra Mundial, quando o Japão foi acusado de lançar vasos contendo pulgas contaminadas sobre cidades chinesas na Manchúria [3].

A *Y. pestis* também fez parte dos programas de desenvolvimento de armas biológicas dos EUA e da antiga União Soviética até a década de 1950, nos quais foram desenvolvidos novos métodos para a transmissão da doença independente de um vetor e formas de incorporar a *Y. pestis* em armamentos (*weaponization*), além da tecnologia para a produção da *Y.pestis* em grande escala [3,4].

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) [5], se 50kg de *Y. pestis* forem lançados por aerosol sobre uma cidade com 5 milhões de habitantes, ocorrerá a infecção de aproximadamente 150.000 pessoas, e o óbito de em torno de 36.000. O espaço afetado pelo lançamento seria de 10km, e o tempo de vida útil desse agente, de 1 hora.

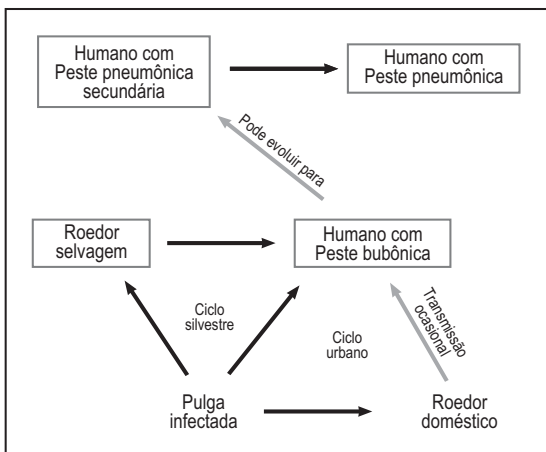


Figura 1 – Ciclos silvestre e urbano da *Y.pestis*. As setas pretas indicam transmissão direta.

forma bubônica é letal em 50 % dos casos e pode evoluir para a forma septicêmica, quando a bactéria cai na corrente sanguínea, ou pneumônica, quando atinge as meninges e os pulmões. Em ambas as formas, a doença é letal em 100% dos casos, sendo a pneumônica a mais perigosa, pois

Quimioterapia da peste

A peste bubônica, além de ser uma doença grave, instala-se rapidamente no organismo. Isso faz com que haja necessidade da administração

imediate do tratamento quimioterápico, antes mesmo dos resultados de exames laboratoriais.

A *Y. pestis* é vulnerável à maioria dos antibióticos, com exceção da penicilina e seus derivados. A sulfonamida prontossil (Figura 2) foi um dos primeiros fármacos utilizados no combate à doença, tendo reduzido a letalidade das formas pneumônica e septicêmica de 100% para 50% [5–7]. Atualmente, estreptomicina, gentamicina, oxitetraciclina, tetraciclina, cloranfenicol e doxiciclina (Figura 2) são os fármacos em uso no combate à peste. Todavia a estreptomicina ainda é o fármaco de escolha para o tratamento da doença. Contudo, já foram detectadas cepas de *Y. pestis* multiresistentes a esses antibióticos em razão da aquisição de plasmídeos transportadores de genes de resistência. Essa característica, por ser plasmidial, pode ser transmitida a outras cepas, o que aumenta os riscos de a *Y. pestis* provocar outra pandemia

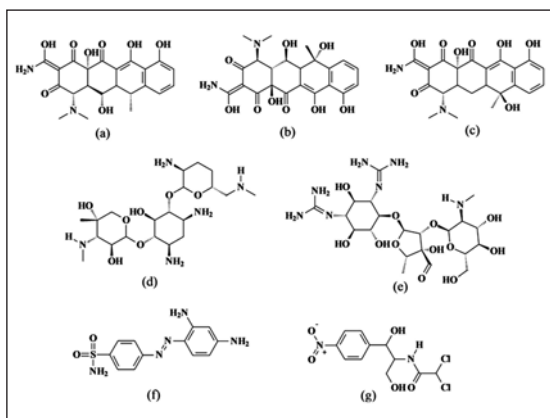


Figura 2 – Principais fármacos usados no tratamento da peste: (a) Oxidociclina, (b) Oxitetraciclina, (c) Tetraciclina, (d) Gentamicina, (e) Estreptomicina, (f) Prontosil, (g) Cloranfenicol.

natural de proporções mundiais. Também existe o risco de essas modificações serem feitas por engenharia genética, criando artificialmente cepas multiresistentes e altamente virulentas de *Y. pestis*, que podem ser utilizadas para fins terroristas. Sen-

do assim, é imprescindível a busca constante por novos alvos moleculares em *Y. pestis*, a serem utilizados no projeto de novos fármacos, como uma alternativa no combate à doença.

Atualmente, há uma vacina disponível contra a peste, mas é recomendada somente em casos de proteção imediata, que inclui somente grupos de alto risco, como pesquisadores e funcionários de laboratórios, expostos frequentemente à contaminação. Tal procedimento requer a aplicação de muitas doses, e o período de imunização é bem curto, variando de um a dois anos. Além disso, a vacina só é eficiente contra cepas nativas da *Y. Pestis* [8-10].

Ciclo do folato. Potencial alvo para a ação de novos fármacos anti peste

O ciclo de síntese do ácido tetra-hidrofólico constitui, atualmente, um dos principais alvos para a quimioterapia de diversas doenças de origem bacteriana. Inibidores do metabolismo do folato são importantes não apenas na quimioterapia dessas doenças, como também na do câncer [11], visto que o folato age como coenzima em várias reações celulares fundamentais e é necessário na divisão celular em virtude de seu papel na biossíntese de purinas e pirimidinas e, consequentemente, na formação dos ácidos desoxirribonucléico (ADN) e oxirribonucléico (ARN).

Uma perturbação nos caminhos do folato, seja pelas sulfas, inibidoras da síntese *de novo* de folato, ou por pequenos análogos do folato, que inibem a reciclagem do metileno tetra-hidrofolato, rapidamente leva a desequilíbrios na concentração de nucleotídeos e à morte celular [12,13]. Detalhes das três reações envolvidas na reciclagem do metileno tetra-hidrofolato (MTHF) são mostrados na Figura 3. Na reação da timidilato sintase (TS), essencial para a biossíntese

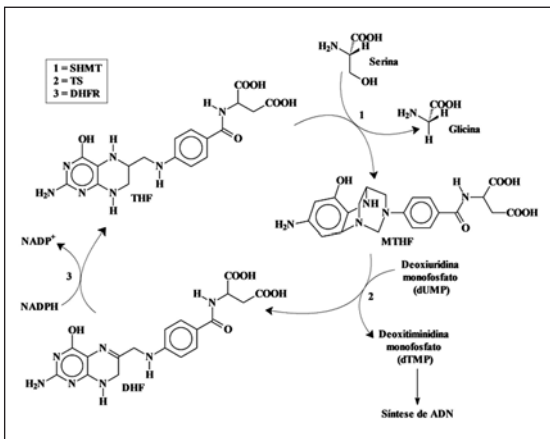


Figura 3 – Ciclo metabólico do folato

de novo de pirimidina e replicação de ADN, o MTHF é convertido em dihidrofolato (DHF). Subsequentemente, o DHF é processado pelas enzimas dihidrofolato redutase (DHFR), até tetrahidrofolato (THF), e SHMT, que regenera o MTHF [14].

A Serina hidroximetiltransferase

A SHMT é uma das três enzimas que compõem o ciclo do folato e converte serina em glicina, transferindo um grupo metileno ao THF. Diferente das outras enzimas do ciclo, essa enzima é pouco estudada e não tem sido vista na literatura como um alvo para quimioterapia.

Neste trabalho, a *YpSHMT* foi proposta como um alvo potencial para o desenvolvimento de fármacos anti-pestes. Como não há estrutura tridimensional dessa enzima disponível no PDB [15,16], foi proposto e validado um modelo teórico de baixa resolução, construído por modelagem por homologia, para essa enzima. Esse modelo foi posteriormente utilizado no estudo das possíveis diferenças entre a *YpSHMT* e a *HssSHMT*, na expectativa de vislumbrar oportunidades que poderiam ser úteis para o planejamento de potenciais protótipos de novos fármacos anti-pestes. O estudo por

ancoramento molecular de potenciais inibidores de SHMT propostos em um trabalho anterior [17] revelou que esses fármacos têm potencial para ser empregados como inibidores seletivos da *YpSHMT*.

METODOLOGIA

Construção do modelo

A modelagem da *YpSHMT* foi feita utilizando o servidor *SWISS-MODEL* [18-19] e o programa *Swiss-PdbViewer* [20]. Como a menor unidade funcional dessa enzima consiste em um dímero, composto de dois monômeros, construiu-se, inicialmente, um modelo para cada um dos monômeros, que depois foram reunidos para a construção do modelo dimérico.

A sequência primária monomérica da *YpSHMT* utilizada foi obtida do banco de dados ExPasy [21], sob o código Q8ZCR1, e a primeira etapa foi uma busca pelas SHMTs com estruturas tridimensionais depositadas no PDB [15,16], visando selecionar potenciais moldes para a construção do modelo. Para isso, utilizou-se o programa BLAST [22] no cálculo do alinhamento múltiplo da sequência monomérica da *YpSHMT* com as sequências das enzimas afins. Como a similaridade sequencial mínima entre a enzima alvo e os moldes para a construção de modelos por homologia é de 35,00%, foram selecionadas as SHMTs com identidade sequencial acima desse valor então disponíveis no PDB [15,16]: a de *E. coli* (código PDB: 1DFO; identidade sequencial=89,60%) [23] e a de *Bacillus Stearothermophilus* (código PDB: 1KKJ; identidade sequencial=58,70%) [24]. As duas enzimas foram, então, escolhidas como moldes para a construção do modelo, por alinhamento múltiplo, para a *YpSHMT*.

O alinhamento múltiplo da sequência monomérica da enzima alvo (*YpSHMT*), obtida previ-

amente em formato FASTA (Figura 3) a partir do site ExPasy [21], foi feito com o monômero A de cada enzima molde. Esse alinhamento foi ajustado manualmente de acordo com os alinhamentos de SHMTs propostos por Alfadhli *et al.* [14] e por Scarsdale *et al.* [23] e submetido ao servidor SWISS-MODEL [18-21] na opção “modo de abordagem inicial” (*first approach mode*), com o objetivo de se obter o modelo monomérico tridimensional inicial chamado de “molde protomérico”. Tal molde da cadeia A obtido com esse procedimento foi, então, sobreposto às cadeias B das enzimas molde, previamente sobrepostas, em uma janela do programa SPDBViewer [20], com o intuito de gerar as coordenadas do molde protomérico do monômero B do modelo. Depois desse procedimento, as coordenadas do molde protomérico B foram copiadas para o mesmo arquivo de coordenadas do molde protomérico A, gerando-se, assim, um único arquivo de texto reunindo as coordenadas dos dois monômeros. Esse arquivo foi, posteriormente, aberto no progra-

```
>sp1Q8ZCR1|GLYA_YERPE Serine hydroxymethyltransferase
MLKREMNIAIDYDADLWRAMEQEVVRQEEHIELIASENYTSPRVMQAQGSQITNKYAEQYF
GKRYYGCEYVDVVEQLAIDRAKALFGADYANVQPHSGSQANVAVYSALLKPGDVTLMGN
LAHGGLHTGSPVNFSGKLYNIVPYGIDESGQIDYEDLARQAEIHKPRMIIGGFSAYSIGI
VDWAKMREIADSIDAWFFVDMHVAAGLVAAAGVYFNPVPHAHIVTTTHTKLAGPRGGLIL
AKGGDEDLYKKLNSVFPNGQGGPLMHVIAAGKAVALEAMEPEFKIYQQQVAKNAKAMVA
VFLERGVKVSQGTDNHLFLDLVDKDI TGKDADAALGRANITVKNKSVNDPKSPFVTS
GVRIGSPAITRRGFKEAESRELAGWMCVDLNDINDEATIERVKQKVLAI CARLPVYA
```

Figura 4 – Sequência monomérica da *YpSHMT* no formato FASTA.

ma SPDBViewer [20] e convertido em um arquivo no formato .pdb. Dessa forma foi obtido o molde protomérico do dímero da *YpSHMT* por alinhamento múltiplo.

Montagem e validação das holoenzimas

A montagem da holoenzima *YpSHMT*/coenzima/cofator, depois da construção do modelo inicial para a apoenzima, foi feita pela da sobreposição, utilizando o programa SPDBViewer [20], do

esqueleto do modelo à estrutura tridimensional da *EcSHMT*, complexada com a coenzima Piridoxal fosfato ligada a glicina (PLG) e com o cofator THF na forma de 5-formil-tetrahidrofolato (FFO) (Figura 4). Nesse procedimento, as coordenadas da coenzima e do cofator da estrutura cristalina, no formato .pdb, foram copiadas para o arquivo .pdb da apoenzima (*YpSHMT*).

O complexo *HssSHMT*/PLG/FFO foi montado da mesma forma que o complexo *YpSHMT*/PLG/FFO descrito anteriormente. Para isso, utilizou-se a estrutura tridimensional monomérica da *HssSHMT* depositada por Renwick *et al.* [25] no PDB [15,16], depois da montagem do dímero da *HssSHMT* nos mesmos moldes que para o dímero da *YpSHMT*.

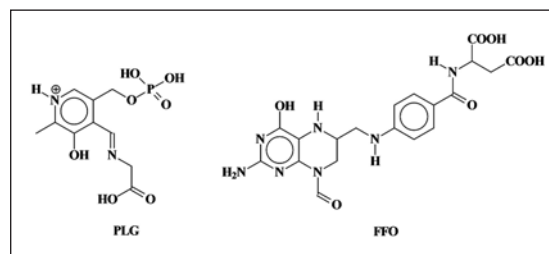


Figura 5 – Estruturas do PLG e do FFO.

As holoenzimas obtidas conforme o procedimento descrito acima foram colocadas em caixas d’água virtuais de aproximadamente 250nm³ (nm=nanômetro), contendo em torno de 9.000 moléculas de água cada e minimizadas com o campo de forças GROMOS 96 [26], implementado no pacote GROMACS 4.0 [27, 28]. As etapas de minimização foram conduzidas, inicialmente, usando o algoritmo do máximo declive seguido do algoritmo dos gradientes conjugados até atingir um gradiente de 1.0 Kcal.mol⁻¹.nm⁻¹.

Para checar a qualidade do modelo, ele foi submetido à validação no servidor *Biotech Validation Suite* para estruturas de proteínas [29]. Foram executadas as análises de volume atômico

pelo PROVE [30], a análise geométrica completa pelo PROCHECK [31] e todas as análises do programa WHAT IF [32] disponíveis no servidor. Adicionalmente, o modelo foi também submetido ao servidor para avaliação de estruturas Verify3D [33-35], com o objetivo de checar o ambiente químico de cada resíduo, e teve o seu *Z-score* calculado pelo programa PROSA 2003 [36].

Identificação dos resíduos pertencentes ao sítio ativo

Para a identificação dos resíduos pertencentes ao sítio ativo do modelo, foi feita inicialmente a identificação nos alinhamentos propostos por Alfadhli *et al.* [14] e Scarsdale *et al.* [23], dos resíduos correspondentes aos sítios ativos das estruturas cristalográficas da *EcSHMT* e da *BsSHMT*. Conhecendo esses resíduos, foi possível identificar os resíduos correspondentes ao sítio ativo da *YpSHMT* através do alinhamento múltiplo com *EcSHMT* e *BsSHMT* proposto inicialmente para a construção do modelo.

Estudos por ancoramento molecular

As estruturas do PLG, do FFO e dos cinco potenciais inibidores de SHMT estudados foram construídas usando o programa Gaussian View do pacote Gaussian 98® [37]. Depois desse procedimento, as moléculas tiveram suas cargas atômicas parciais calculadas no nível Hartree Fock com a base 6-31G*, usando a abordagem CHELPG do pacote Gaussian98® [37], e seus arquivos de topologia foram gerados no servidor Dundee PRODRG [38].

Os cálculos das energias de ancoramento do FFO e dos cinco potenciais inibidores nos sítios ativos da *YpSHMT* e da *HssSHMT* foram feitos por programas AutoDockTools e Autodock 4.0 [39].

Os arquivos de entrada no formato adequado para o Autodock 4.0 [39] (.pdbq) foram gerados no servidor Dundee PRODRG [38]. Os arquivos de entrada da *YpSHMT* e da *HssSHMT* usados para os cálculos das energias de ancoramento foram os arquivos de saída depois da minimização de energia com o programa GROMACS 4.0 [27,28].

Os *grids* utilizados para os estudos de ancoramento nas enzimas foram definidos como 60x70x60Å (envolvendo todo o sítio ativo) para ambas as enzimas com 0,375Å de espaço entre os pontos do *grid* ou em torno de um quarto de uma ligação C-C. Como parâmetro para o ancoramento molecular, foi empregado o algoritmo genético lamarkiano ou AGL [39], uma combinação entre o algoritmo genético e os algoritmos de busca local *Pseudo-Solis* e *Wets* (psw1) [39]. O número de conformações previstas para as simulações foi de 100, e o número máximo de corridas realizadas pelo algoritmo foi 27.000. As 100 conformações de menor energia foram selecionadas pelo programa como as melhores conformações dos ligantes nos sítios receptores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Construção da apoenzima

Na primeira etapa deste trabalho, a sequência monomérica primária da *YpSHMT* foi alinhada às sequências primárias monoméricas da *EcSHMT* e da *BsSHMT*, utilizando o servidor BLAST [22]. Os resultados mostraram que a *YpSHMT* tem, respectivamente, 89,60% e 58,70% de similaridade sequencial com as enzimas mencionadas acima. Diante desses moldes com alta identidade sequencial em relação à enzima alvo, decidiu-se utilizá-los para construir um modelo por homologia para a *YpSHMT* por alinhamento

múltiplo. O alinhamento final utilizado para a construção do modelo foi obtido depois de ajustes manuais no alinhamento inicial fornecido pelo servidor BLAST [22]. Esses ajustes se fizeram necessários depois de uma inspeção visual, que mostrou as regiões importantes das sequências de SHMT não serem bem alinhadas pelo servidor. O alinhamento final obtido é apresentado na Figura 6.

O monômero do modelo foi sobreposto aos dos moldes e da *HssSHMT* com o objetivo de calcular os valores de desvio da raiz média quadrática (DRMQ) e checar sua compatibilidade estrutural com os moldes e com a *HssSHMT*. Os valores de DRMQ obtidos foram de 0,08Å e 1,44Å em relação à *EcSHMT* e à *BsSHMT* respectivamente, e 1,07Å em relação à *HssSHMT*, confirmando, assim, que os moldes são adequados para a constru-

YpSHMT	1	MLKREMIAD	YDADLWRAME	QEVVRQEEHI	ELIASENYTS	PRWIAQGSQ
BsSHMT	1	MKYL PQ	QDPQVFAAIE	QERKRQAKI	ELIASENFVS	RAMIEAQGSV
EcSHMT	1	MLKREMIAD	YDAELWQAME	QEVVRQEEHI	ELIASENYTS	PRWIAQGSQ
YpSHMT	51	LTKNYAEGYP	GKRYYGCCYEY	VDVVEQLAID	RAKALFGADY	ANVQPHSGSQ
BsSHMT	47	LTKNYAEGYP	GRRYVGGCEY	VDVVEQLASE	RAKQLFGAEH	ANVQPHSGAQ
EcSHMT	51	LTKNYAEGYP	GKRYYGCCYEY	VDVVEQLAID	RAKALFGADY	ANVQPHSGSQ
YpSHMT	101	ANVAVYSALL	KPGDVLQGN	LANGHGLTHG	SPVNFSGKLY	NIVPYGDES
BsSHMT	97	ANVAVYFTVL	EHGDTVLQGN	LSHGHLTHG	SPVNFSGVQY	NFVAYGDPE
EcSHMT	101	ANFAVYFALL	EPGDTVLQGN	LANGHGLTHG	SPVNFSGKLY	NIVPYGIDAT
YpSHMT	151	G-QIDYEDLA	RQAEIHKPKM	IIGGFSAYSG	IVDWAKMREI	ADSIDANFVY
BsSHMT	147	THVIDYDVR	EKARLHRPKL	IIVAASAYPR	IIDFAKREI	ADEVGAYLVY
EcSHMT	151	-GHIDYADLE	KQAKEHKPKM	IIGGFSAYSG	VVDWAKMREI	ADSIDAYLVY
YpSHMT	200	DMAHVAGLVA	AGVYPNPVPH	AHIVTTTHK	TLAGPRGLI	LAKGGDED--
BsSHMT	197	DMAHAGLVA	AGLHPNPVPH	AHFVTTTHK	TLRGRGGMI	LC--QEQ--
EcSHMT	200	DMAHVAGLVA	AGVYPNPVPH	AHIVTTTHK	TLAGPRGLI	LA--KGGSE
YpSHMT	248	-LYKLNSSV	FPQGQGPLM	HVIAGKAVAL	KEAMEPEFKI	YQQQVAKNAK
BsSHMT	242	-FAKIDKAI	FPGIQGPLM	HVIAKAVAF	GEALQDFKA	YAKRVVDNAK
EcSHMT	247	ELYKLNNAV	FPQGQGPLM	HVIAGKAVAL	KEAMEPEFKT	YQQQVAKNAK
YpSHMT	297	AMVAVFLERG	YKVVSGGTDN	HLFLDLVDK	DITGKDADAA	LGRANITVTK
BsSHMT	291	RLASALQNEG	FTLVSGGTDN	HLLLVDRPQ	QLTGKTAEKV	LDEVGITVTK
EcSHMT	297	AMVAVFLERG	YKVVSGGTDN	HLFLDLVDK	HLTGKADAA	LGRANITVTK
YpSHMT	347	NSVVPNDKSP	FVTSQVRIGS	PAITRRGFKE	AESRELAGM	CDVLDNINDE
BsSHMT	341	NTIPYDPEP	FVTSQIRIGT	AAVTRGFGL	EEMDEIAAI	GLVLKNVGE
EcSHMT	347	NSVVPNDKSP	FVTSQIRVGT	PAITRRGFKE	AEAKELAGM	CDVLDNINDE
YpSHMT	397	ATIERVKQKV	LATCARLPVY	A		
BsSHMT	391	QALERARQV	AALTD			
EcSHMT	397	AVIERIKGV	LDICARYPVY	A-		

Figura 6 – Alinhamento da sequência monomérica da *YpSHMT* com as sequências dos moldes escolhidos.

ção do modelo, uma vez que essa faixa de DRMQ se encontra no que normalmente se observa para modelos gerados por homologia.

Quanto mais baixo o valor de DRMQ, maior a similaridade entre as estruturas comparadas. Um DRMQ igual a zero indica que as estruturas são

idênticas. O valor de DRMQ de 1,07Å, obtido em relação à *HssSHMT*, indica que o modelo, embora apresente uma boa semelhança estrutural com a enzima humana, pode apresentar diferenças estruturais no sítio ativo suficientes em relação à *HssSHMT*, para a proposição de inibidores seletivos. Todavia uma inspeção cuidadosa da sobreposição entre as duas enzimas será necessária para a verificação dessas diferenças e análise de sua viabilidade para a proposição de inibidores seletivos.

Validação do modelo

O gráfico de Ramachandran [40], obtido no site do PROCHECK [31] (Figura 7) para o modelo, apresenta 98,3% dos resíduos nas regiões favoráveis.

Em relação às propriedades da cadeia principal, não foram encontrados contatos ruins nem distorções de carbões alfa ou problemas de ener-

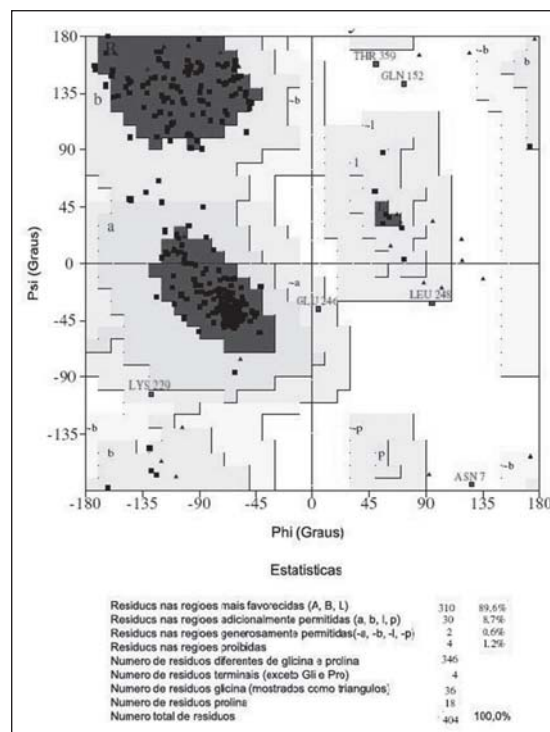


Figura 7 – Gráfico de Ramachandran para o monômero A do modelo.

gia de ligações de hidrogênio. Também não foram encontradas distorções dos ângulos de torção das cadeias laterais, e todos os demais testes realizados apresentaram resultados dentro da normalidade para modelos construídos por homologia. O modelo dimérico também apresenta os principais elementos de estrutura secundária característicos das SHMTs, como pode ser observado na sobreposição com a *Ec*SHMT apresentada na Figura 8.

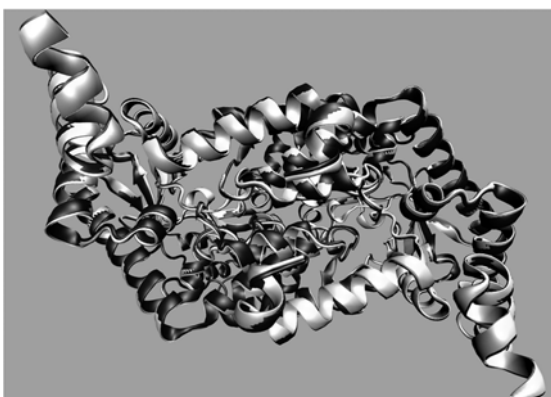


Figura 8 – Sobreposição entre as estruturas diméricas da *Yp*SHMT (preto) e da *Ec*SHMT (cinza).

Determinação dos resíduos do sítio ativo

A determinação dos resíduos correspondentes ao sítio ativo da *Yp*SHMT foi feita com base no alinhamento aos moldes. Os resíduos da sequência da *Yp*SHMT que alinhavam com aqueles correspondentes aos resíduos dos sítios ativos dos moldes seriam os resíduos do sítio ativo do modelo. Foi observada maior similaridade em relação ao sítio ativo da *Ec*SHMT, com todos os resíduos idênticos e da *Bs*SHMT, que apresentou apenas um resíduo diferente. Em relação à *Hss*SHMT, foram encontrados três resíduos diferentes; são eles: Thr(A)145, Asp(A)146 e Lis(A)148, em vez de Val(A)133, Asn(A)134 e um *gap* em *Yp*SHMT (veja Tabela 1). Inicialmente parece difícil planejar inibidores seletivos para *Yp*SHMT com base ape-

nas nessas pequenas diferenças. Todavia, se isso for possível, esses compostos podem ser mais duráveis como eficientes fármacos contra a peste, uma vez que a grande similaridade entre SHMTs de diferentes espécies pode ser um indicador de baixo potencial de mutação para essa enzima.

Estudos por ancoramento molecular

Nessa etapa do trabalho, o FFO e as estruturas de moléculas anteriormente propostas por

Tabela 1 – Resíduos pertencentes aos sítios ativos da *Hss*SHMT, dos moldes e da *Yp*SHMT. Os resíduos diferentes daqueles da *Yp*SHMT são mostrados em negrito

<i>Hss</i> SHMT	<i>Bs</i> SHMT	<i>Ec</i> SHMT	<i>Yp</i> SHMT
Ser(A)43	Ser(A)31	Ser(A)35	Ser(A)35
Tir(B)63	Tir(B)51	Tir(B)55	Tir(B)55
Glu(B)65	Glu(B)53	Glu(B)57	Glu(B)57
Tir(B)72	Tir(B)60	Tir(B)64	Tir(B)64
Tir(B)73	Tir(B)61	Tir(B)65	Tir(B)65
Gli(A)110	Gli(A)95	Gli(A)98	Gli(A)98
Ser(A)111	Ala(A)96	Ser(A)99	Ser(A)99
Leu(A)133	Leu(A)107	Leu(A)121	Leu(A)121
Gli(A)137	Gli(A)111	Gli(A)125	Gli(A)125
His(A)138	His(A)112	His(A)126	His(A)126
Leu(A)139	Leu(A)113	Leu(A)127	Leu(A)127
Thr(A)145	Val(A)119	Val(A)133	Val(A)133
Asp(A)146	Asn(A)120	Asn(A)134	Asn(A)134
Lis(A)148	—	—	—
Ser(A)193	Ser(A)173	Ser(A)175	Ser(A)175
Asp(A)218	Asp(A)198	Asp(A)200	Asp(A)200
His(A)221	His(A)200	His(A)203	His(A)203
Thr(A)244	Thr(A)223	Thr(A)226	Thr(A)226
His(A)246	His(A)225	His(A)228	His(A)228
Lis(A)247	Lis(A)226	Lis(A)229	Lis(A)229
Gli(B)293	Gli(B)256	Gli(B)263	Gli(B)263
Asn(A)377	Asn(A)341	Asn(A)347	Asn(A)347
Arg(A)392	Arg(A)357	Arg(A)363	Arg(A)363

da Silva et al [17] como potenciais inibidores seletivos para a SHMT de *Plasmodium falciparum* (PfSHMT) (Figura 9) tiveram suas energias de ancoramento nos sítios ativos da YpSHMT e da HssSHMT avaliadas pelo Programa AutoDock4.0 [39].

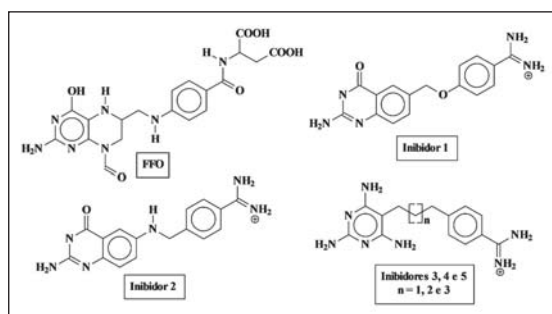


Figura 9 – Estruturas do FFO e das cinco propostas de inibidores.

Depois da otimização pelo PRODRG [38], as propostas foram ancoradas nos sítios ativos da HssSHMT e da YpSHMT com a finalidade de fazer uma comparação entre as suas energias de ancoramento nos sítios ativos de ambas as enzimas.

Para o cálculo das energias de ancoramento, foram utilizados os arquivos .pdb da HssSHMT e da YpSHMT, depois da minimização de energia no GROMACS 4.0 [27, 28]. As coordenadas originais da molécula de FFO foram retiradas de cada sítio ativo para que, em seu lugar, fossem ancorados o próprio FFO e os inibidores. As respectivas energias de ancoramento foram calculadas pelo programa AutoDock 4.0 [39]. Depois do cálculo dessas energias, foram analisadas as 100 melhores conformações geradas para cada proposta dentro de cada sítio ativo, pelas energias finais de ancoramento – EFA (*final docking energies*). As EFA são calculadas adicionando-se a energia intermolecular final (*final intermolecular energy*) à energia interna final do ligante (*final internal energy of ligand*).

Os valores médios das energias de ancoramento (EA) calculados para cada ligante são apre-

sentados na Tabela 2, juntamente com os principais resíduos dos sítios ativos que interagem com cada ligante. Os resultados apresentados na Tabela 2 indicam que as interações tendem a ocorrer nos sítios ativos de ambas as enzimas, e os inibidores, em todos os casos, apresentam melhor energia de ancoramento média que o FFO. Isso é um indicativo de que os cinco inibidores propostos têm potencialmente mais afinidade pelos sítios ativos das enzimas que o seu substrato natural (FFO). Como também pode ser observado na Tabela 2, todos os inibidores apresentam valores de EFA bem melhores (mais negativos) com a YpSHMT do que com a HssSHMT, resultado que sugere que eles têm mais afinidade pela YpSHMT e, portanto, podem ser considerados, preliminarmente, como seletivos para a YpSHMT.

Tabela 2 – Valores de EFA (Kcal.mol⁻¹) para as melhores conformações

Lig	HssSHMT	YpSHMT	DEFA*,#
FFO	-3,35	-4,29	0,94
Inib1	-5,75	-7,99	2,24
Inib2	-6,70	-9,43	2,73
Inib3	-5,15	-7,48	2,33
Inib4	-5,05	-7,06	2,01
Inib5	-5,10	-7,41	2,31

*Kcal.mol⁻¹; #DEFA = EFA_{HssSHMT} – EFA_{YpSHMT}

CONCLUSÕES

No presente trabalho, um modelo teórico para a YpSHMT foi construído e validado pelas técnicas de modelagem molecular. Esse modelo foi o ponto de partida para as etapas posteriores do presente trabalho, que envolveram comparações com o sítio ativo da HssSHMT e estudos por cálculos de energias de ancoramento de potenciais inibidores seletivos. Na compara-

ção entre os resíduos dos sítios ativos, pôde ser observado que há três resíduos no sítio ativo da *HssSHMT* diferentes do sítio ativo da *YpSHMT*. A proposição de inibidores seletivos para essa enzima deverá ser feita com base nas interações dos ligantes com esses resíduos que poderão ser observadas em estudos futuros por dinâmica molecular.

Os resultados dos cálculos das energias de ancoramento apresentados na Tabela 2 mostram que tanto o FFO quanto as propostas de inibidores apresentam valores melhores (mais negativos) com a *YpSHMT* que com a *HssSHMT*. Entre os inibidores, o melhor resultado foi para o inibidor 2, que apresentou, além do menor valor de energia de ancoramento, a maior diferença em relação a *HssSHMT* ($2,73\text{Kcal.mol}^{-1}$). Esse resultado sugere que essa proposta de inibidor é muito promissora como inibidor seletivo para a *YpSHMT*. Embora tenham apresentado valores de energia de ancoramento um pouco mais altos que o inibidor 2, todas os demais inibidores apresentaram uma diferença de energia de ancoramento superior a $2,00\text{Kcal.mol}^{-1}$ em rela-

ção a *HssSHMT* e, conseqüentemente, também podem ser considerados como potenciais inibidores seletivos da *YpSHMT*.

Partindo dos resultados do presente trabalho, faz-se necessária agora a execução de simulações por dinâmica molecular para avaliar o comportamento fisiológico da *YpSHMT* e da *HssSHMT* com esses ligantes ancorados em seus sítios ativos, com o objetivo de verificar as interações favoráveis à inibição seletiva da *YpSHMT*. Essa informação é de extrema importância para a eventual posterior otimização das estruturas desses inibidores visando à obtenção de análogos potencialmente mais efetivos como inibidores seletivos da *YpSHMT*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, à FAPERJ, à CAPES, ao Ministério da Defesa (edital CAPES/PRODEFESA 2008) e ao IME, por proporcionarem o financiamento e a infraestrutura necessários ao desenvolvimento de suas atividades de pesquisa na área de defesa contra agentes de guerra química e biológica.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ACHTMAN, M.; ZURTH, K.; MORELLI, G.; TORREA, G.; GUIYOULE, A.; CARNIEL, E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 14043-8.
- [2] LAHTEENMAKI, K.; KUKKONEN, M.; KORHONEN, T.K.; The Pla surface protease/adhesin of *Yersinia pestis* mediates bacterial invasion into human endothelial cells, *FEBS Lett.*, 2001, 504, 69-72.
- [3] CRODDY, E.; PEREZ-ARMENDARIZ, C.; HART, J.; Chemical and Biological Warfare. A Comprehensive Survey for the Concerned Citizen. Springer-Verlag, New York, 2002.
- [4] INGLESBY, T.V.; DENNIS, D.T.; HENDERSON, D.A.; BARTLETT, J.G.; ASCHER, M.S.; EITZEN, E.; FINE, A.D.; FRIEDLANDER, A.M.; HAUER, J.; KOERNER, J.F.; LAYTON, M.; MCDADE, J.; OSTERHOLM, M.T.; O'TOOLE, T.; PARKER, G.; PERL, T.M.; RUSSELL, P.K.; SCHOCH-SPANNA, M.; TONAT, K.; Plague as a Biological Weapon: Medical and Public Health Management *JAMA*, 2000; 283, 2281-90.
- [5] <http://www.who.int/en/> acessado em janeiro de 2010.
- [6] CARMAN, J.A.; Prontosil in the treatment of oriental plague; *East Afr. Med. J.*, 1938, 14, 362-66.
- [7] KUPFERSCHMIDT, H.; Die Epidemiologie der Pest, *Gesnerus*, 1993, 43 (Suppl.), 1-222.
- [8] MEYER, K.F.; Effectiveness of live or killed plague vaccines in man. *Bull. WHO*. 1970, 42, 653-666.
- [9] MEYER, K.F.; CAVANAUGH, D.C.; BARTELLONI, P.J.; MARSHALL, J.D.; Plague immunization. I. Past and present trends. *J. Infect. Dis.*, 1974, 129 (Suppl.):S13-S18.
- [10] MARSHALL, J.D.; BARTELLONI, P.J.; CAVANAUGH, D.C.; KADULL, MEYER, K.F.; Plague immunization. II. Relation of adverse clinical reactions to multiple immunizations with killed vaccine *J. Infect. Dis.*, 1974, 129 S19-S25.
- [11] HUENNEKENS, F.M.; DUFFY, T.H.; VITOLS, K.S.; Folic acid metabolism and its disruption by pharmacologic agents, *NCI Monogr*, 1987, 5, 1-8.

- [12] INGRAHAM, H. A.; DICKEY, L.; GOULIAN, M.; DNA fragmentation and cytotoxicity from increased cellular deoxyuridilate, *Biochemistry*, 1986, 25, 3225–30.
- [13] YOSHIDA, A.; TANAKA, S.; HIRAOKA, O.; KOYAMA, Y.; HIROTA, Y.; AYUSAWA, D.; SENO, T.; GARRETT, C.; WATAYA, Y.; Deoxyribonucleoside triphosphate imbalance. 5-Fluorodeoxyuridine-induced DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and the mechanism of cell death., *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 8235–41.
- [14] ALFADHLI, S.; RATHOD P.K.; Gene organization of a *Plasmodium falciparum* serine hydroxymethyltransferase and its functional expression in *Escherichia Coli*; *Mol and Biochem. Parasit.*, 2000, 110, 283–91.
- [15] BERNSTEIN, F.C.; KOETZLE, T.F.; WILLIAMS, G.J.; MEYER, E.E.; BRICE, M.D.; RODGERS, J.R.; KENNARD, O.; SHIMANOUCI, T.; TASUMI, M.; The protein data bank. A computer-based archival file for macromolecular structures, *J. Mol. Biol.*, 1977, 112, 535–42.
- [16] BERMAN, H.M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T.N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I.N.; BOURNE, P.E.; The protein data bank, *Nucleic Acids Res.* 2000, 28, 235–42.
- [17] DA SILVA, M. L.; GONCALVES, A. S.; BATISTA, P. R.; VILLAR, J. D. F.; PASCUTTI, P. G.; FRANÇA, T. C. C.; Design, Docking Studies and Molecular Dynamics of New Potential Selective Inhibitors of *Plasmodium falciparum* Serine Hydroxymethyltransferase. *J. Mol. Sim.*, 2010, 36, 5 – 14.
- [18] PEITSCH, M. C.; Protein modeling by e-mail. From amino acid sequence to protein structure: a free one-hour service, *Biotechnology*, 1995, 13, 658–60.
- [19] PEITSCH, M. C.; Biochem Promod and SWISS-MODEL: internet-based tools for automated comparative protein modeling, *Biochem. Soc. Trans.*, 1996, 24, 274–79.
- [20] GUEX, N.; PEITSCH, M. C.; SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling, *Electrophoresis*, 1997, 18, 2714–23.
- [21] <http://au.expasy.org/>, acessado em janeiro de 2010.
- [22] ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J.; Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 1990, 215, 403–10.
- [23] SCARSDALE, J. N.; KAZANINA, G.; RADAEV, S.; SCHIRCH, V.; WRIGHT, T.; Crystal Structure of Rabbit Cytosolic Hydroxymethyltransferase at 2,8Å Resolution: Mechanistic Implications, 1999, *Biochemistry*, 38, 8347–58.
- [24] TRIVEDI, V. A.; GUPTA, V. R.; JALA, P.; SARAVANAN, G. S. J.; RAO, N. A.; SAVITHRI H. S.; SUBRAMANYA, H. S.; Crystal structure of binary and ternary complexes of Serine Hydroxymethyltransferase from *Bacillus Stearothermophilus*., *J. Biol. Chem and Mol. Biol.*, 2002, 19, 17161–69.
- [25] RENWICK, S. B.; SNELL, K.; BAUMANN, U.; The crystal structure of human cytosolic serine hydroxymethyltransferase: a target for cancer chemotherapy; *Structure*, 1998, 6, 1105–16.
- [26] JORGENSEN, W.L.; TYRADO-REEVES, J.; The OPLS potential functions for proteins. Energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin; *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 1657–66.
- [27] VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B.; VAN BUUREN, A. R.; APOL, E.; MEULENHOF, P. J.; TIELEMAN, D. P.; SUBBERS, A. L. T. M.; FEENSTRA, K. A.; VAN DRUNEN R.; BERENDSEN, H. J. C.; Gromacs User Manual version 4.0, www.gromacs.org (2005).
- [28] BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VANDRUNEN, R.; GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation, *Comput. Phys. Commun.*, 1995, 91, 43–56.
- [29] <http://biotech.ebi.ac.uk/cgi-bin/sendquery> acessado em janeiro de 2010.
- [30] PONTIUS, J.; RICHELLE, J.; WODAK, S. J.; Deviations from Standard Atomic Volumes as a Quality Measure for Protein Crystal Structures, *J. Mol. Biol.* 1996, 264 121–36.
- [31] LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M.; PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.* 1993, 26, 283–91.
- [32] VRIEND, G. J.; WHAT IF: a molecular modeling and drug design program; *Mol. Graph.* 1990, 8, 52–6.
- [33] BOWIE, J. U.; LUTHY, R.; EISENBERG, D.; A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure, *Science*, 1991, 253, 164–170.
- [34] LUTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D.; Assessment of protein models with three-dimensional profiles, *Nature*, 1991, 356, 1992, 83–5.
- [35] <http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify3D/> acessado em outubro de 2009.
- [36] SIPPL, M. J.; Recognition of errors in three-dimensional structures in proteins, *Proteins*, 1993, 17, 355–62.
- [37] FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; ZAKREWSKI, V. G.; MONTGOMERY, J. A.; STRATMAN, R. E.; VURANT, J. C.; DAPPRICH, S.; MILLAM, J. M.; DANIELS, A. D.; KUDIN, K. N.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; TOMASI, J.; BARONE, V.; COSSI, M.; CAMMI, R.; MENNUCI, B.; POMELLI, C.; ADAMO, C.; CLIFFORD, S.; OCHTERSKI, J.; PETERSSON, G. A.; AYALA, P. Y.; CUI, Q.; MOROKUMA, K.; MALICK, D. K.; RABUCH, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; CIOŚLOWSHI, J.; ORTIZ, J. V.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; GOMPERS, R.; MARTIN, R. L.; FOZ, D. J.; ALLAHAM, T. M.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; GONZALEZ, C.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JONSON, B.; CHEN, W.; WONG, M. W.; ANDRES, J. L.; GONZALEZ, C.; HEAD-GORDON, M.; REPLOGE, E. S.; POPE, J. A.; Gaussian 98, revision A.6, Gaussian, Inc., Pittsburg, PA, 1998.
- [38] SCHUETTELKOPF, A. W.; VAN AALTEN, D. M. F.; PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein–ligand complexes, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2004, 60, 1355–63.
- [39] MORRIS, G. M.; GOODSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J.; Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and Empirical Binding Free Energy Function; *J. Comp. Chem.*, 1998, 19, 1639–62.
- [40] RAMACHANDRAN, G. N.; SASISEKHARAN, V.; Conformations of polypeptides and proteins; *Adv. Protein. Chem.*, 1968, 23, 283–437.