



ESTUDO DA ENZIMA β -LACTAMASE OXA-499 E DA HALOGENASE WELO5 POR TÉCNICAS DE BIOINFORMÁTICA

Palavras-Chave: BIOINFORMÁTICA, DOCKING, CINÉTICA ENZIMÁTICA.

Autores/as:

RAFAEL ROSPENDOWSKI [ENGENHARIA QUÍMICA]

Prof.^a Dr.^a DENIZE CRISTINA FAVARO (orientadora) [INSTITUTO DE QUÍMICA]

INTRODUÇÃO:

Devido à atual imperatividade de aplicação de tecnologias mais limpas e atreladas à conceitos como por exemplo a química verde, o emprego de métodos orgânicos para produção e tratamento de compostos químicos se torna cada vez mais vigente (SILVA; LACERDA; JUNIOR, 2005). Com essa realidade, têm-se como ótima alternativa a utilização de biocatalisadores (enzimas) em pontos chave de processos que possam ser adaptados para tal (PRADO, 2003).

Porém, a aplicação sintética de proteínas (enzimas) em sua forma nativa apresenta algumas limitações quando destinadas a áreas industriais ou estações de tratamento de esgoto, como por exemplo instabilidade térmica e frente ao meio em questão (como por exemplo pH e força iônica), considerável perda de eficiência com o decorrer de sua aplicação (ASSIS et al., 2010) e complicações econômicas envolvidas com a dificuldade de recuperar os biocatalisadores aplicados (NETTO; ANDRADE; TOMA, 2009). Devido à esse fato, algumas medidas podem ser tomadas para melhoramento desses processos como um todo, contornando justamente alguns desses problemas, entre elas, têm-se a alteração da estereoespecificidade, termoestabilidade e atividade envolvendo técnicas de biologia molecular de mutações sítio dirigidas ou aleatórias (CONTI; RO-DRIGUES; MORAN, 2001) e ainda, quando possível, a imobilização proteica como solução para certos problemas de estabilidade e da própria recuperação e reaproveitamento do mesmo (NETTO; ANDRADE; TOMA, 2009).

E para tal melhoramento de processo, no caso, o melhoramento da eficiência catalítica e seletividade desse biocatalisador, existe a necessidade de um amplo conhecimento da estrutura tridimensional e do mecanismo catalítico da enzima (CONTI; RODRIGUES; MORAN, 2001). E nesse exato contexto, devido justamente à essa necessidade, têm-se a importância da bioinformática, que com uma definição mais abrangente de Verli (2014), pode ser entendida como: "o emprego de ferramentas computacionais no estudo de problemas e questões biológicas, abrangendo também as aplicações relacionadas à saúde humana como o planejamento de novos fármacos". Isto posto, a aplicação dessas técnicas computacionais, como por exemplo o *Docking*, a Dinâmica Molecular e Métodos Híbridos QM/MM podem fornecer importantes informações sobre o sistema em questão, como por exemplo: prever o modo de ligação e a afinidade de pequenas moléculas dentro do sítio ativo de um receptor de interesse, calcular a distribuição e o movimento de partículas de um sistema de muitos corpos e relacionar as propriedades observadas experimentalmente através da mecânica estatística e ainda, no caso dos métodos híbridos, considerar sistemas complexos como duas partes distintas, uma parte clássica (*MM – Molecular Mechanics*) e outra parte quântica (*QM – Quantum Mechanics*) quimicamente ativa, na qual se aplica o método de estrutura eletrônica à fim de se conciliar a descrição de processos eletrônicos, como reações químicas ou transferências de carga, com uma descrição apropriada dos efeitos do meio (biomolecular ou solvente) (SILVA, 2015).

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver um estudo inicial das enzimas OXA-499 e WeLO5 - que são uma β -Lactamase e uma halogenase respectivamente, ou seja, são capazes de hidrolisar antibióticos com anéis β -Lactâmicos e adicionar halogênios em determinadas moléculas orgânicas - com o amparo de técnicas de bioinformática (*docking* molecular).

Devido as atuais condições sanitárias, o projeto foi adaptado para uma abordagem remota, na qual a cerne do trabalho foi avaliar possíveis substratos para a halogenase WeLO5 e OXA-499 livre por meio de *docking* molecular. Até o presente momento, alguns dados referentes à essa linha de pesquisa já foram relatados em outros projetos (como por exemplo parâmetros cinéticos e estruturais da enzima), dessa forma,

relatam-se aqui apenas os resultados de *docking* molecular para a enzima WelO5, visto que as simulações com a enzima OXA-499 ainda estão sendo finalizados.

METODOLOGIA:

Os cálculos com a enzima WelO5 foram realizados utilizando a estrutura A do PDB (<https://www.rcsb.org/search>): 5IQT (que já inclui os cofatores Fe²⁺, Cl⁻ e 2-oxo-glutarato) para a WelO5, por meio do programa *Molegro 6.0 Virtual Docker* com o *MolDock Score* como função. Todos os *dockings* foram realizados na ausência de moléculas de água. Já as estruturas dos ligantes analisados foram obtidas da biblioteca PubChem (**Para a enzima WelO5**: 12-Epi-Hapalindole C - CID: 21676627; Ambiguine C Isonitrile - CID: 21610114; Ambiguine H Isonitrile - CID: 16069590; Ambiguine I Isonitrile - CID: 16109784; Ambiguine L Isonitrile - CID: 44139241; Hapalindole U - CID: 16069589.).

As melhores poses foram definidas por meio de uma análise da distância entre o íon cloreto e o átomo de carbono onde ocorre a cloração (obtido da estrutura cristalográfica 5IQT) para o caso da enzima WelO5, além de uma análise de energia do complexo enzima-substrato. Tendo o conhecimento da melhor pose na primeira rodada, essa foi utilizada como *input* para a próxima e assim sucessivamente. A decisão sobre a melhor pose foi feita a cada rodada, através da análise da distância mencionada acima e da energia do complexo em relação à etapa anterior. Os mapas de interação dos ligantes reportados nas FIGURAS foram obtidos utilizando a estrutura presente no PDB 5IQT da WelO5 e as melhores poses obtidas no *docking* foram analisadas no programa DiscoveryStudio 2021.

Quanto às cinéticas realizadas com a técnica de ressonância magnética nuclear, os experimentos foram realizados em espectrômetros Bruker Avance-III operando a 600,17 MHz na frequência de hidrogênio ¹H a 25 °C. Utilizando sempre uma sequência pseudo-2D (espectros 1D de ¹H em sequência com intervalos de tempo constante) com supressão do sinal da água durante o período de espera - pseudo2D-zgpr.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Para o caso do 12-epi-hapalindole C (**Figura 1**) as interações são muito semelhantes à observada para o 12-epifischerindole U, além da distância C-Cl ser favorável 4,80 (**Figura 3**). Além do composto citado acima, os resultados obtidos para a ambiguine L Isonitrile e para o hapalindole U também foram interessantes – mostraram uma esfera de coordenação semelhante, distâncias C-Cl menores que as obtidas na estrutura cristalográfica e energias favoráveis na ordem de -68 a -73 kcal/mol (**Tabela 1**). Este resultado é especialmente interessante no caso da ambiguine L Isonitrile, substrato da AmbO5. Além desse amb derivado, outro composto que mostrou resultados promissores foi o ambiguine H Isonitrile (**Figura 3**). Adicionalmente, sabe-se que os resíduos mais importantes para a ocorrência da halogenação (que interagem com o possível ligante e cofatores) são a H164, S189, F169 e R270 (MITCHELL, 2016), resíduos esses presentes e contribuintes para a estabilização do complexo no sítio catalítico. Dentre os quais, a H164 e a F169 são os mais frequente no mapa de interações, demonstrando sua importância e consonância ao mecanismo proposto (MITCHELL, 2016) e ainda que apenas a H164 (dos resíduos citados) apresenta interação com o substrato natural da halogenase WelO5 (estrutura cristalográfica).

Por meio de uma análise das energias envolvidas dos principais resíduos para a estabilização do substrato (**Figura 4**), é visível que, de maneira geral, existem determinados resíduos comuns à todos os compostos que contribuem de maneira significativa para a estabilização destes complexos, dos quais destacam-se a H164 e I161 (**Figura 4**), fato esse que é concordante às análises realizadas tomando como base os mapas de interação (**Figura 2**) e a literatura como já comentado, visto que a H164 está presente, e em destaque nas três observações.

Com relação aos ensaios de cinética com a técnica de ressonância magnética nuclear presente na **Figura 5**, embora não seja possível realizar uma comparação direta entre os decaimentos observados, pois foram utilizadas diferentes concentrações de substrato e enzima, é possível observar que a velocidade reacional é constante para os carbapenêmicos, devido à alta afinidade enzima-substrato (Km na escala de nM). Já o antibiótico ceftazidima, não é observado o consumo mesmo após 17 horas de reação usando alta concentração de enzima (22 µM)

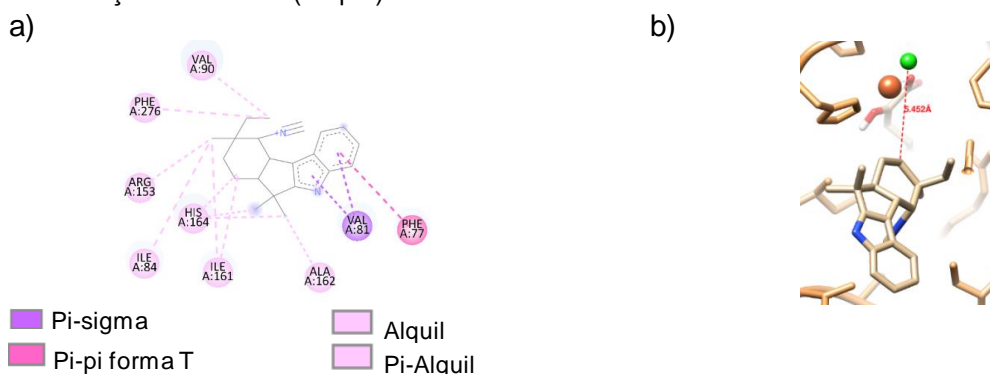


Figura 1. a) Mapa de interação da estrutura cristalográfica do substrato nativo da enzima WelO5
b) Ampliação do sítio catalítico (PDB: 5IQT) com o substrato nativo.

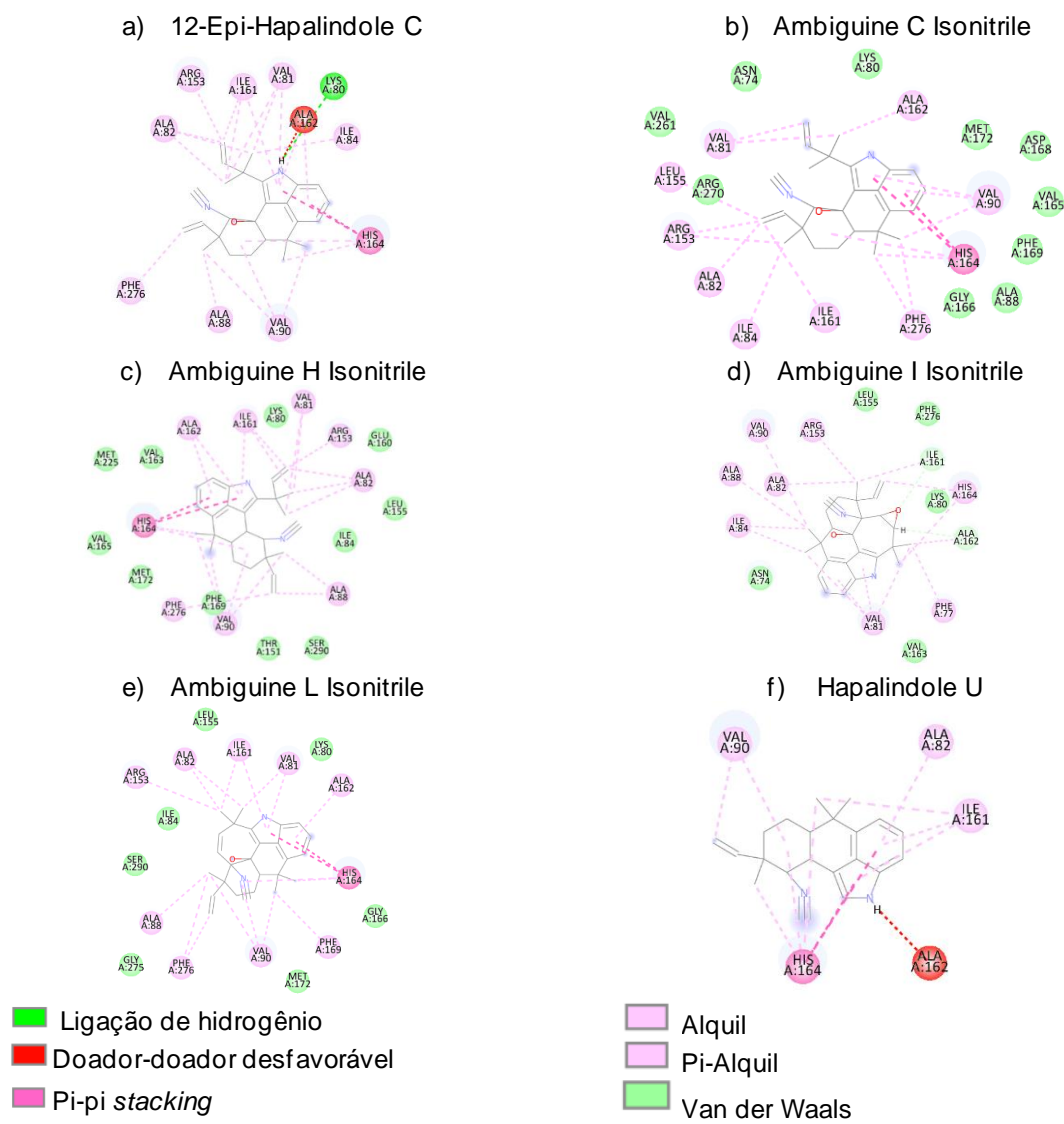
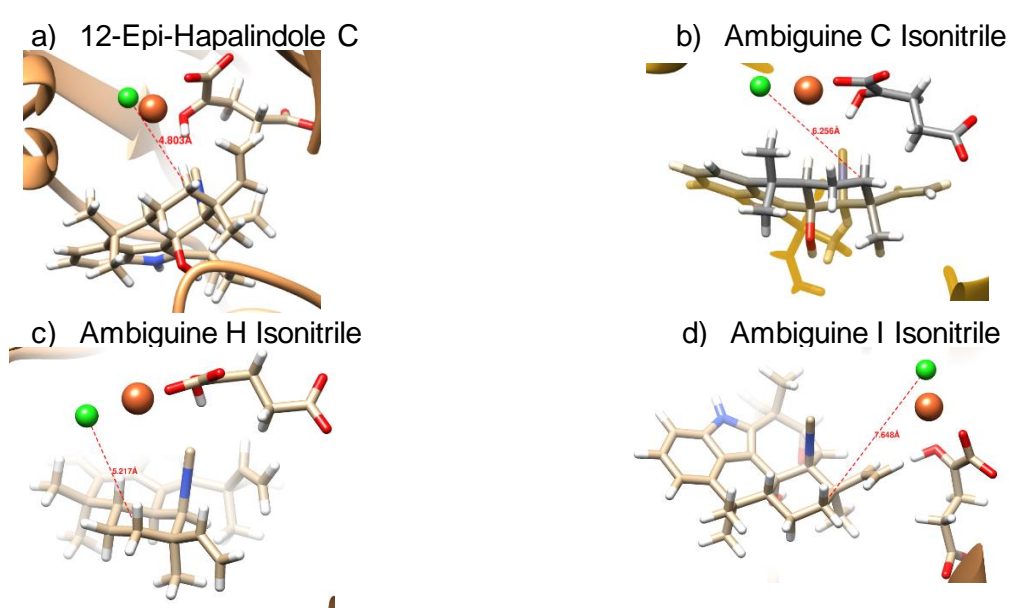


Figura 2. Mapa 2D de interação dos ligantes com a proteína WelO5



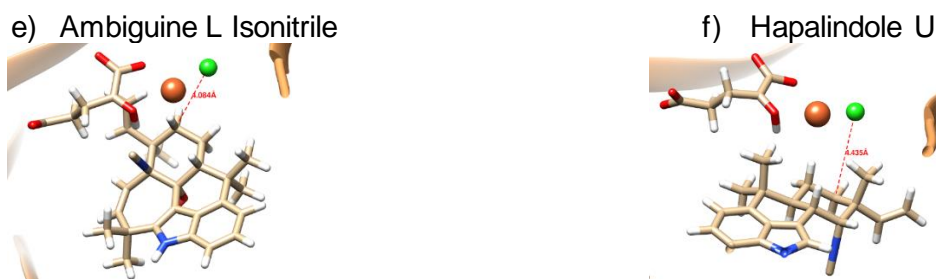


Figura 3. a-f) Ampliação do sítio catalítico (PDB: 5IQT) com as poses dos possíveis substratos.

Tabela 1. Distâncias e energias obtidas pelo procedimento de Docking Molecular.

	12-Epi-Hapalindole C	Ambiguine C Isonitrile	Ambiguine H Isonitrile	Ambiguine I Isonitrile	Ambiguine L Isonitrile	Hapalindole U
Distância (Å)	4,80	6,27	5,22	7,65	4,08	4,44
Energia (u.a)	-72,975	-60,603	-72,909	-90,145	-76,724	-68,978

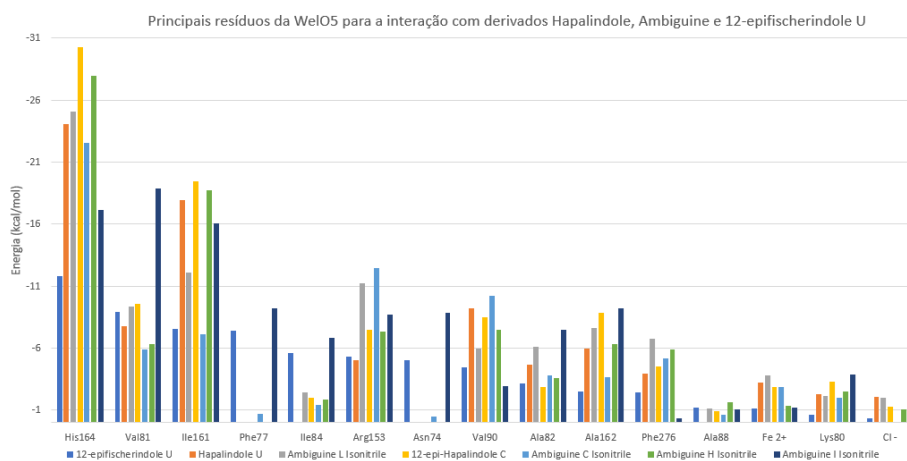


Figura 4. Gráfico dos principais resíduos da WelO5 em interação com os substratos analisados e suas contribuições energéticas.

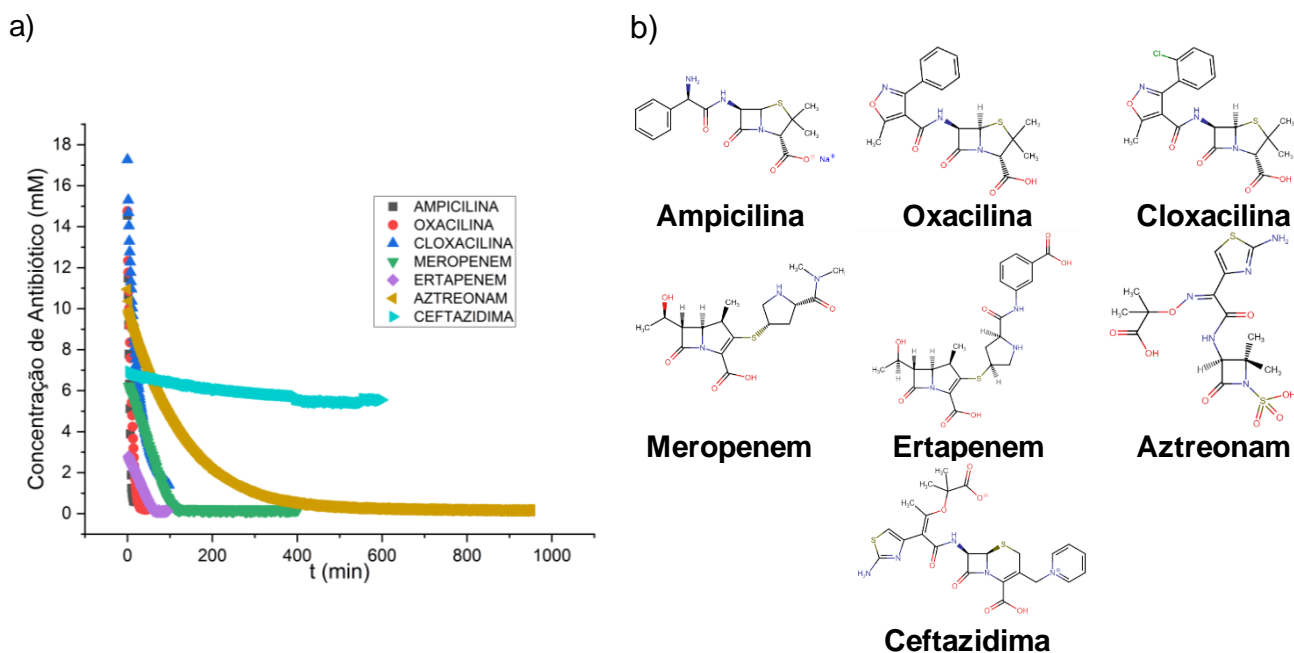


Figura 5. a) Comparativo da hidrólise de diferentes substratos frente a enzima β -lactamase OXA-499. Cinza – Ampicilina (10 mM) e 7 nM da OXA-499. Vermelho – Oxacilina (10 mM) e 100 nM da OXA-499. Azul – Cloxacilina (10 mM) e 100 nM da OXA-499. Verde – Meropenem (2 mM) e 5 μ M da OXA-499. Roxo – Ertapenem (2 mM) e 5 μ M da OXA-499. Amarelo – Aztreonam (5 mM) e 5 μ M da OXA-499. Ciano – Ceftazidima (2 mM) e 20 μ M da OXA-499. b) Estrutura dos antibióticos utilizados nas cinéticas de RMN.

CONCLUSÕES:

Através dos cálculos de *docking* molecular, foi possível identificar os principais resíduos para a interação, que são congruentes tanto com o mecanismo de reação quanto com as contribuições relacionados à halogenação proporcionada pela enzima WelO5 (que são relatados pela literatura).

Além disso, essa análise inicial contribui para os próximos passos desse possível projeto, que envolve a análise de possíveis mutantes para a halogenase WelO5 e a aquisição de parâmetros cinéticos por meio de experimentos de RMN e ITC, visto que com esses resultados iniciais por experimentos de bioinformática, têm-se um maior entendimento do sistema que está sendo trabalhado.

BIBLIOGRAFIA:

- ARZANLOU, M.; CHAI, W. C.; VENTER, H. **Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in gram-negative bacteria.** Essays in biochemistry, Portland Press Limited, v. 61, n. 1, p.49–59, 2017.
- ASSIS, S. A. d. et al. **Estabilização de enzimas: uma abordagem.** Sitientibus. Série Ciências Biológicas, p. 195–200, 2010.
- CONTI, R. D.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. **Biocatálise: avanços recentes.** Química Nova, SciELO Brasil, v. 24, p. 672–674, 2001.
- HILLWIG, M. L.; LIU, X. **A new family of iron-dependent halogenases acts on freestanding substrates.** Nature chemical biology, Nature Publishing Group, v. 10, n. 11, p. 921–923, 2014.
- KON, K.; RAI, M. **Antibiotic resistance: mechanisms and new antimicrobial approaches.** [S.l.]: Academic press, 2016.
- LATHAM, J. et al. **Development of halogenase enzymes for use in synthesis.** Chemical reviews, ACS Publications, v. 118, n. 1, p. 232–269, 2018.
- LI, C. et al. **Co-immobilization of enzymes and magnetic nanoparticles by metal-nucleotide hydrogel nanofibers for improving stability and recycling.** Molecules, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 22, n. 1, p. 179, 2017.
- LIMA, C. C.; BENJAMIM, S. C. C.; SANTOS, R. F. S. d. **Mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma revisão.** CuidArte, Enferm, p. 105–113, 2017.
- LIU, X. **In vitro analysis of cyanobacterial nonheme iron-dependent aliphatic halogenases welo5 and ambo5.** Methods in enzymology, Elsevier, v. 604, p. 389–404, 2018.
- LIU, X. et al. **Unified biogenesis of ambiguine, fischerindole, hapalindole and welwitindolinone: identification of a monogeranylated indolenine as a cryptic common biosynthetic intermediate by an unusual magnesium-dependent aromatic prenyltransferase.** Chemical Communications, Royal Society of Chemistry, v. 52, n. 8, p. 1737–1740, 2016.
- MITCHELL, A. J. et al. **Structural basis for halogenation by iron- and 2-oxo-glutarate-dependent enzyme welo5.** Nature chemical biology, Nature Publishing Group, v. 12, n. 8, p. 636–640, 2016.
- NETTO, C. G.; ANDRADE, L. H.; TOMA, H. E. **Enantioselective transesterification catalysis by candida antarctica lipase immobilized on superparamagnetic nanoparticles.** Tetrahedron: Asymmetry, Elsevier, v. 20, n. 19, p. 2299–2304, 2009.
- PRADO, A. G. **Química verde, os desafios da química do novo milênio.** Química Nova, SciELO Brasil, v. 26, n. 5, p. 738–744, 2003.
- SILVA, F. M. d.; LACERDA, P. S. B. d.; JUNIOR, J. J. **Desenvolvimento sustentável e química verde.** Química Nova, SciELO Brasil, v. 28, p. 103–110, 2005.
- SILVA, L. S. d. **Estudos computacionais de esfingomielinases d: docking, dinâmica molecular em métodos híbridos qm/mm.** Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2015.
- STÖBER, W.; FINK, A.; BOHN, E. **Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range.** Journal of colloid and interface science, Elsevier, v. 26, n. 1, p. 62–69, 1968.
- TOOKE, C. L. et al. **β -lactamases and β -lactamase inhibitors in the 21st century.** Journal of molecular biology, Elsevier, v. 431, n. 18, p. 3472–3500, 2019.
- VERLI, H. **Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular.** [S.l.]: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014.