

ESTUDO *IN SILICO* DE REAÇÕES BIOCATALÍTICAS POR TRANSAMINASES

Palavras-Chave: [Biocatálise], [Transaminases], [*Docking* Molecular]

Autores/as:

Maria Clara dos Santos Oliveira (aluno) [UNICAMP]

Prof.^a Dr.^a Anita Jocelyne Marsaioli (orientador) [UNICAMP]

MSc. Katherine Romero Orejón (co-orientador) [UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

A biocatálise pode ser definida como o uso de substâncias naturais, como células íntegras ou enzimas para catalisar reações químicas.¹ Esta vem se mostrando como uma ferramenta atrativa para síntese orgânica já que permite transformações com altas conversões e alta regio-, quimio- e estereosseletividade² tendo destaque em aplicações como a síntese de compostos quirais para produtos farmacêuticos, aromas, fragrâncias e outros produtos químicos. Além dessas vantagens, a biocatálise está alinhada a diversos princípios da “Química Verde”.^{3,4}

Por outro lado, o uso de ferramentas computacionais como a triagem virtual por *docking* molecular vem sendo considerada um ponto chave para a biologia molecular estrutural no design de novas moléculas a fim de conduzir a otimização de compostos na busca por novas moléculas biologicamente ativas.⁵ Nesse contexto, a técnica de *docking* molecular pode ser utilizada, estrategicamente, como uma forma de auxiliar no entendimento e otimização das reações biocatalíticas, que visto sua importância na atualidade, tem sido uma necessidade crescente.

Os métodos de *docking* proteína-ligante pode ser definido como a previsão da estrutura dos complexos receptor-ligante, no qual o receptor é uma proteína e o ligante é uma molécula pequena ou outra proteína. Este tratamento computacional tem como objetivo prever os modos de ligação predominantes, interações moleculares e a afinidade entre este ligante e uma proteína de estrutura tridimensional conhecida.^{6,7}

Este trabalho é focado no estudo *in silico* de reações biocatalíticas por Transaminases (TAs) através da metodologia de *docking* molecular. As TAs apresentam alto potencial para biocatálise e são responsáveis pela síntese enantiosseletiva de aminas quirais a partir de cetonas pró-quirais, ou vice-versa.⁸ Atualmente, estas apresentam grande interesse farmacêutico visto que 40% dos produtos farmacêuticos atuais contêm uma função amina.⁹

Uma visão geral da atividade catalítica da enzima é fundamental para os estudos de *docking* molecular. As transaminases são enzimas que dependem de um cofator chamado piridoxal-5'-fosfato (PLP) **1** que é responsável por receber um grupo amina de um doador de amino primário para formar a piridoxamina-5'-fosfato (PMP) **2** que por fim, doa o grupo amina para uma carbonila, gerando a amina quiral de interesse e regenerando o cofator PLP. As reações envolvidas são resumidas na Figura 1.¹⁰

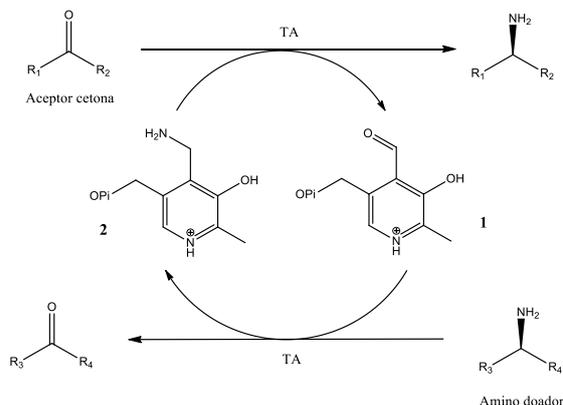


Figura 1. Mecanismo de reação catalisada por TA.⁹

Este trabalho apresenta o estudo *in silico* de *docking* molecular de três TAs sendo duas *S*-seletivas, uma de *Vibrio Fluvialis* (Vfl) (código PDB: 4E3Q) e outra de *Chromobacterium violaceum* (Cvi) (código PDB: 4A6T), além de uma *R*-seletiva de *Aspergillus terreus* (AspTer) (código PDB: 4CE5). Também foram escolhidos seis ligantes, incluindo cetonas e cetoésteres **3-8** (Figura 2), a fim de avaliar a interação entre estes e as enzimas selecionadas.

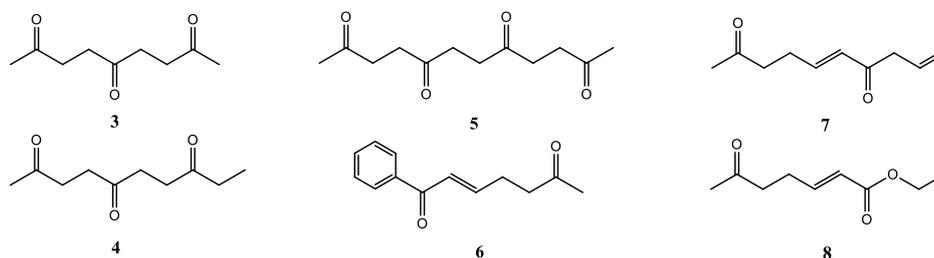


Figura 2. Substratos usados para simulações de *docking* molecular com Transaminases.

METODOLOGIA:

As simulações de *docking* molecular envolveram a preparação prévia da proteína, ligantes e cofatores de interesse através do programa Discovery Studio Visualizer 2021 (DSV). As estruturas cristalográficas das enzimas foram obtidas no formato .pdb do banco de dados Protein Data Bank através de seus respectivos códigos. Já as estruturas tridimensionais dos ligantes escolhidos (Figura 2) foram obtidas na plataforma “CORINA online”, e todas as estruturas citadas foram tratadas, com adição aromaticidade e hidrogênio, através do programa DSV. Para este projeto, a preparação das enzimas foi realizada usando estruturas derivadas das cadeias A e B (ou seja, um dímero) das estruturas cristalinas.^{11,12,10}

Por fim, os experimentos de *docking* foram realizados através do programa DockThor (versão 2.0). Este programa utiliza a abordagem de *docking* com ligantes flexíveis/receptor rígido, onde todos os graus de liberdade do ligante (translacionais, rotacionais e conformacionais) são explorados e a proteína é considerada rígida.¹³ O programa emprega como algoritmo de amostragem o chamado algoritmo genético. Os parâmetros adotados para a execução do programa consistiram nas dimensões da grade de 24Å para as enzimas de Vfl e AspTer e 22Å para de Cvi, sendo essas dimensões usadas para cada coordenada (x, y, z). Todos os demais parâmetros utilizados foram os padrões atuais do programa. Dessa forma, a predição do modo de ligação dos ligantes selecionados foi realizada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

As informações presentes na literatura mostram que as três TAs são biologicamente ativas na forma de um dímero, com o cofator e sítio ativo localizados na interface deste, como mostrado na representação gerada da Figura 3.^{11,12,10}

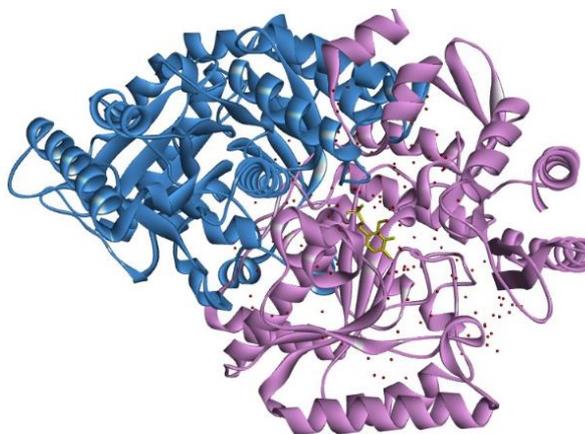


Figura 3. Estrutura dimérica da Transaminase de *Vibrio Fluvialis*. As subunidades A e B aparecem em rosa e em azul, respectivamente. O cofator foi destacado em amarelo indicando a região do sítio ativo na interface das subunidades do dímero.

Os sítios ativos das TAs são compostos por um sítio de ligação do cofator PLP e duas regiões chamadas de bolsos de ligação onde ocorre a ligação do substrato. Esses bolsos são formados por resíduos de ambas as subunidades e por isso, a enzima só apresenta atividade catalítica na forma dimérica (Figura 4).¹⁴ Os bolsos de ligação por sua vez têm tamanhos distintos, um é o bolso grande de ligação e outro o pequeno, sendo este um fator controlador da enantiosseletividade dessas enzimas, tanto por fatores estéricos quanto por interações intermoleculares que ocorrem nessas regiões.¹⁵

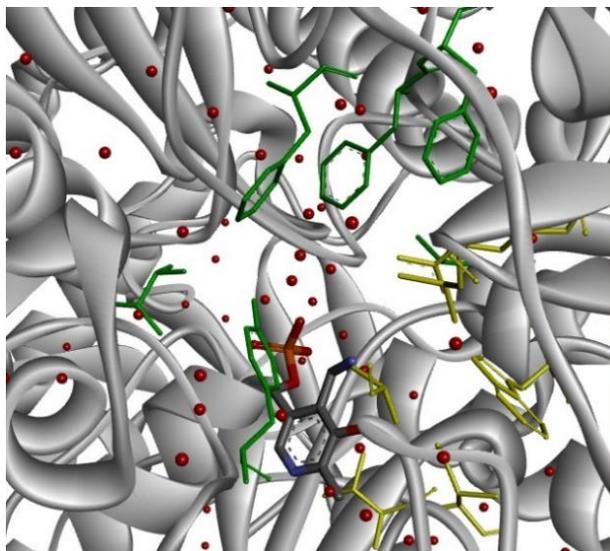


Figura 4. Representação em close-up do sítio ativo do dímero de *Vibrio fluvialis* esquematizando os resíduos que formam a grande (em amarelo) e pequena bolsa de ligação (em verde) em torno do cofator PLP (átomos de carbono em cinza escuro).

De posse dessas informações, o *docking* molecular foi realizado através do programa DockThor. Por meio de um algoritmo de busca, os experimentos de *docking* resultaram na obtenção da pose (conformação) de menor valor de energia para cada ligante, ou seja, o modo de ligação predito do ligante no sítio ativo da respectiva proteína-alvo que tende a ser o encontrado na natureza.¹³ Assim, foi possível encontrar os modos de ligação mais favoráveis para cada ligante bem como a visualização da melhor pose de docagem no sítio ativo e interações intermoleculares, como exemplificado nas Figura 5 e 6.

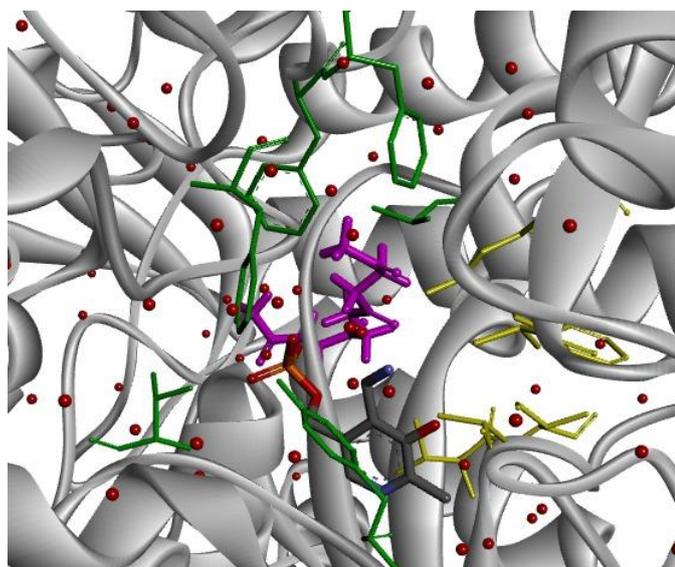


Figura 5. Representação em close-up do sítio ativo da TA de *Vfl* com a representação da conformação de menor energia para o ligante 5 (em rosa). Em verde e amarelo estão destacados os resíduos do sítio ativo, e o cofator em cinza escuro.

A partir da obtenção das melhores poses de docagem para os ligantes no complexo proteína-ligante, o programa gerou a previsão dos valores de afinidade de ligação utilizando a função de score DockTScore. Essa função busca prever a energia livre de ligação a partir de uma soma ponderada de termos baseados em

propriedades físicas, onde os coeficientes associados aos termos são obtidos através de regressão linear, usando como referência dados de afinidade previamente elucidados experimentalmente.¹³

Sabendo que quanto menor a energia livre da ligação ligante-proteína, maior será a afinidade destes, foi possível ranquear os ligantes de acordo com a afinidade predita como mostrado na tabela 1, servindo assim como um guia para avaliar quais ligantes interagem melhor com cada enzima que estamos estudando.

A Tabela 1 mostra que os ligantes de maior afinidade para a transaminase de Vfl foram as cetonas **5** e **7**, enquanto para as transaminases de Cvi e AspTer foi a cetona **6**. Assim, no geral temos que esse ligantes tiveram uma melhor interação com as respectivas transaminases estudadas, ou seja, a ligação entre estes e as enzimas é mais favorável termodinamicamente do que os demais ligantes. Além disso, foi possível notar uma preferência da transaminase de Cvi para ligantes que apresentam insaturações, visto que as ligações entre estes e as TA tiveram menores valores de energia livre.

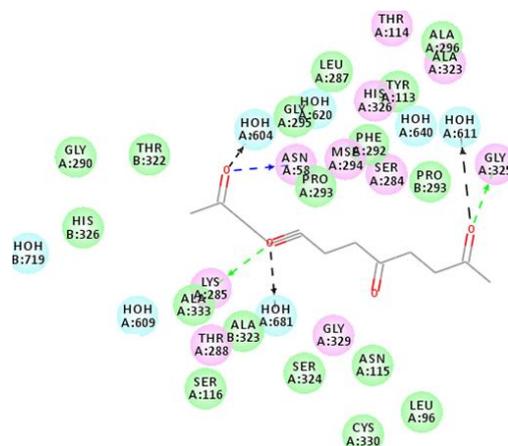
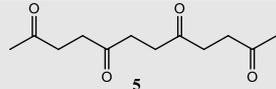
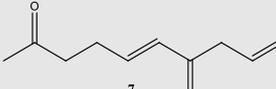
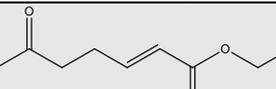
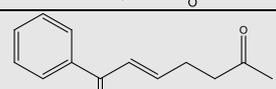
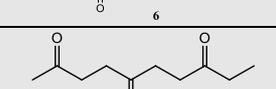
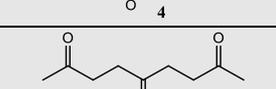


Figura 6. Diagrama 2D de interações intermoleculares para o ligante 5 na TA de Vfl. São apresentadas as interações de van der Waals, interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio em verde, rosa e azul respectivamente.

Tabela 1. Resultados do docking molecular das TAs de *Vibrio fluvialis*, *Chromobacterium violaceum* e *Aspergillus terreus* respectivamente, com a posição no ranking de melhor afinidade e seu valor em kcal/mol para cada substrato.

Ligante	Posição no Ranking / Afinidade (kcal/mol)		
	<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Aspergillus terreus</i>
	1° / -8.002	4° / -6.983	4° / -6.873
	2° / -7.929	3° / -7.032	2° / -6.957
	3° / -7.744	2° / -7.224	6° / -6.810
	4° / -6.877	1° / -7.905	1° / -7.184
	5° / -6.148	5° / -6.905	3° / -6.926
	6° / -6.077	6° / -6.775	5° / -6.849

CONCLUSÕES:

Os estudos *in silico* realizados nesse trabalho envolveram inicialmente uma revisão da literatura acerca das reações catalisadas por transaminases. Estas enzimas enantiosseletivas são capazes de converter cetonas em aminas quirais e vice-versa, sendo esta última função de grande interesse farmacêutico para substituição de rotas químicas convencionais na obtenção destas.

Sabendo disso, é importante estudar esses tipos de reações por meio de ferramentas computacionais. Uma dessas ferramentas, o *docking* molecular, foi discutido nesse trabalho e pode ser usado para fazer previsões e entender o processo catalítico entre uma enzima e seu ligante. Os experimentos de *docking* geraram tanto previsões das posições de menor energia de uma série de ligantes nas enzimas, quanto o valor da energia livre dessa ligação. Com isso, podemos avaliar quais ligantes apresentam melhor interação com as enzimas, sendo essa uma informação resultante do estudo *in silico* de *docking* molecular que pode ser usada para comparar e compreender resultados experimentais das reações de transaminação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Daniel Fábio Kawano e Ana Thereza Fiori Duarte pelo suporte na realização dos estudos e experimentos aqui citados. Ao laboratório LaBioChem e toda sua equipe e à CNPq pelo financiamento.

BIBLIOGRAFIA

1. Truppo, M. D. **2017**.
2. Torrelo, G.; Hanefeld, U.; Hollmann, F. ;*Catal. Lett.* **2014**, *145*, 309.
3. Sheldon, R. A. *Biocatalysis and Green Chemistry*; 2016.
4. Wu, S.; Snajdrova, R.; Moore, J. C.; Baldenius, K.; Bornscheuer, U. T. ;*Angew. Chemie Int. Ed.* **2021**, *60*, 88.
5. Guedes, I. A.; De Magalhães, C. S.; Dardenne, L. E. .
6. Morris, G. M.; Lim-Wilby, M. ;*Methods Mol. Biol.* **2008**, *443*, 365.
7. Brooijmans, N.; Kuntz, I. D. ;<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.142532> **2003**, *32*, 335.
8. Ruggieri, F.; Campillo-Brocal, J. C.; Chen, S.; Humble, M. S.; Walse, B.; Logan, D. T.; Berglund, P. ;*Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1.
9. Kelly, S. A.; Pohle, S.; Wharry, S.; Mix, S.; Allen, C. C. R.; Moody, T. S.; Gilmore, B. F. ;*Chem. Rev.* **2017**, *118*, 349.
10. Łyskowski, A.; Gruber, C.; Steinkellner, G.; Schürmann, M.; Schwab, H.; Gruber, K.; Steiner, K. ;*PLoS One* **2014**, *9*, e87350.
11. Midelfort, K. S.; Kumar, R.; Han, S.; Karmilowicz, M. J.; McConnell, K.; Gehlhaar, D. K.; Mistry, A.; Chang, J. S.; Anderson, M.; Villalobos, A.; Minshull, J.; Govindarajan, S.; Wong, J. W. ;*Protein Eng. Des. Sel.* **2013**, *26*, 25.
12. Humble, M. S.; Cassimjee, K. E.; Håkansson, M.; Kimbung, Y. R.; Walse, B.; Abedi, V.; rgen Federsel, H.-J.; Berglund, P.; Logan, D. T.; Logan, D. T.; Berglund, P. .
13. Pereira, F. S. S.; Guedes, I. A.; Dardenne, L. E. .
14. Nobili, A.; Steffen-Munserg, F.; Kohls, H.; Trentin, I.; Schulzke, C.; Höhne, M.; Bornscheuer, U. T. ;*ChemCatChem* **2015**, *7*, 757.
15. Park, E.-S.; Kim, M.; Shin, J.-S. ;*Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *93*, 2425.