

Mutagênese computacional da enzima depolimerase PhaZ7

RESUMO

Cynthia Christina de Oliveira
cynthiaoliveira@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Marcos Brown Gonçalves
brownngon@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

PhaZ7 de *Paucimonas lemoignei* caracteriza-se como uma depolimerase extracelular de atividade bastante incomum. Além de possuir elevada especificidade apenas por polihidróxialcanoatos em estado amorfo, a enzima também desperta atenção no meio científico devido ao seu mecanismo de ativação baseado em abertura e fechamento da tampa que bloqueia seu sítio ativo. Com o objetivo de investigar essas e outras características relacionadas à atividade da enzima, este projeto consiste na utilização de ferramentas de modelagem molecular para o estudo de PhaZ7 nativa e suas mutantes. Por meio de simulações de dinâmica molecular realizadas com o pacote de programas GROMACS, o comportamento da enzima nativa foi avaliado frente a solventes com distintas polaridades. Trajetórias de sua estrutura mostram concordância com dados experimentais e teóricos, apontando perda significativa de flexibilidade da tampa em solvente mais apolar (tolueno). A análise feita com o auxílio de ferramentas para identificação de cavidades em proteínas revelou a presença de túnel de dimensão relevante e natureza predominantemente polar como o provável canal de acesso que permite a entrada de moléculas de água na cavidade catalítica. O posicionamento de tais moléculas ocorre em pontos estratégicos, o que permite que regiões importantes para a atividade da enzima consigam manter boa flexibilidade.

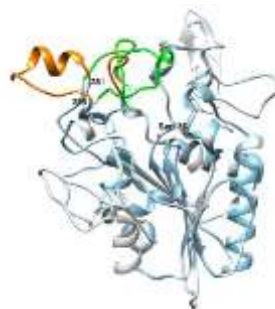
PALAVRAS-CHAVE: Depolimerase. Modelagem molecular. Mutagênese computacional.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A ENZIMA DEPOLIMERASE

PhaZ7 de *Paucimonas lemoignei* (Figura 1) é uma depolimerase extracelular que possui elevada especificidade por poli((R)-3-hidroxicanoatos) (PHAs) em estado amorfo. Com baixa similaridade de sequência de aminoácidos com outras enzimas, PhaZ7 também diferencia-se pelo reduzido tamanho de seu sítio de ligação em comparação com outras depolimerases. O reconhecimento do substrato ocorre a partir de resíduos aromáticos bastante específicos, compondo uma pequena cavidade na superfície globular da enzima. Após dessorção do mesmo em tal depressão, a abertura da tampa (*loop* 281-295), que bloqueia o sítio ativo, permite que a longa cadeia de poliéster amorfo tenha finalmente acesso à tríade catalítica (SER136, ASP242, HIS306). A reação de hidrólise ocorre, então, promovendo a quebra do biopolímero geralmente em unidades de pentâmeros, o que sugere que o substrato passe por considerável rearranjo durante todo o processo catalítico (KELLICI et al., 2017).

Figura 1 – Representação gráfica da sobreposição das estruturas cristalográficas da mutante Y105E de PhaZ7 nas conformações aberta (*lid* destacado em laranja) e fechada (*lid* destacado em verde)



Fonte: KELLICI (2017).

Apesar de bastante estudada, PhaZ7 ainda não possui seu mecanismo de ação totalmente elucidado, incentivando recentemente a realização de estudos de *docking* e dinâmica molecular para que aspectos estruturais e funcionais sejam melhor explicados (KELLICI, et al., 2017).

1.2 FUNDAMENTOS DA DINÂMICA MOLECULAR

Simulações de dinâmica molecular podem servir como uma importante ferramenta computacional no estudo de sistemas moleculares complexos como proteínas. Por envolverem grande número de partículas e processos cujas energias dependem fundamentalmente da temperatura, tais sistemas são considerados intrinsecamente termodinâmicos, sendo estudados, portanto, com base na Mecânica Estatística. A partir de um potencial de interação conhecido entre os átomos, a evolução configuracional do sistema é determinada, ao longo da simulação, pela aplicação simultânea das equações de movimento newtonianas: a cada nova etapa de tempo, o potencial de interação é recalculado, assim forças e acelerações são novamente computadas e, consequentemente, novas velocidades e posições podem ser determinadas. Esse processo é realizado de maneira recursiva até que a propriedade de interesse, medida como a média da propriedade do *ensemble*, consiga convergir estatisticamente a um patamar de valor adequado (MORGON; COUTINHO, 2007).

2 METODOLOGIA

2.1 SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR

Para o estudo da enzima em questão, tomou-se como referência a estrutura cristalográfica mais recente de PhaZ7 nativa, depositada no banco de dados Protein Data Bank sob o código 4BRS (cadeia A). O pacote de programas AmberTools foi utilizado para pré-processamento e correção de tal estrutura de acordo com o campo de forças Amber99SB-ILDN. A versão 4.6.7 do pacote de programas GROMACS foi utilizada para a realização das simulações de 4BRS em água e tolueno. Para construir a topologia da molécula em água, adotou-se o campo de forças supracitado, atribuindo-se cargas aos aminoácidos segundo um pH neutro. Caixas do solvente (modelo TIP3P) disponibilizadas pelo programa foram empregadas para preencher a caixa cúbica do sistema (volume de 658,48 nm³), contendo 4BRS centralizada. Ao todo, 85 íons foram adicionados para neutralizar o sistema e atribuir ao mesmo uma concentração de 0,1 mol/L de NaCl. Para construir o sistema em tolueno, o processo diferenciou-se pela utilização de caixa do solvente já pré-equilibrada de acordo com o campo de forças GAFF (General AMBER Force Field) e disponibilizada pelo portal Virtual Chemistry. Nesse caso, íons foram acrescentados apenas para neutralizar o sistema numa caixa de volume de 644,167 nm³.

Após a preparação dos arquivos, efetuou-se o procedimento de minimização de energia, em que, a partir do algoritmo Steepest Descent, reduziu-se a energia dos sistemas a patamares equivalentes a uma força máxima inferior a 1000 kJ/mol/nm. Os sistemas foram então equilibrados a uma temperatura de 300 K (acoplamento do termostato V-rescale) e pressão de 1 bar (acoplamento do barostato Parrinello-Rahman) por 200 a 250 ps para enfim seguirem para simulação final de 100 ns cada, utilizando-se uma etapa de tempo de 2 fs e integrador MD. Tanto na equilibração quanto nas simulações finais, o algoritmo LINCS foi usado para constranger todas as ligações. Para contabilizar interações iônicas de longo alcance, empregou-se o método Particle-Mesh Ewald.

2.2 ANÁLISE DE ESPAÇOS VAZIOS

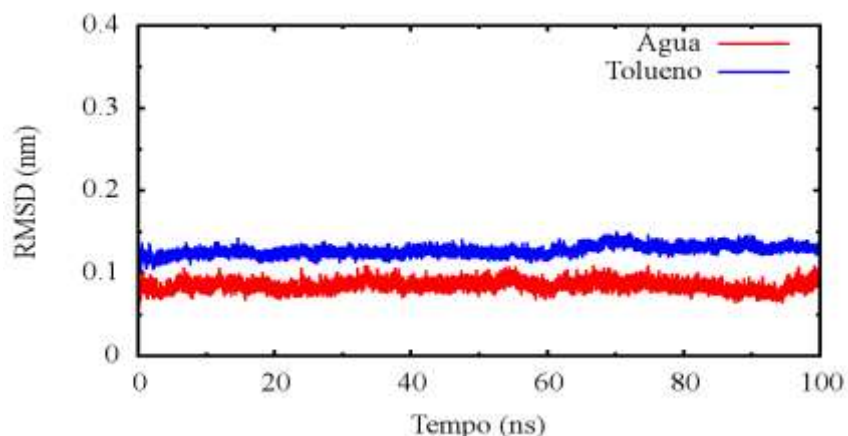
Os softwares Caver Analyst 1.0 e MOLE foram utilizados para identificar e analisar cavidades, túneis/canais, *pockets* e poros a partir da estrutura 4BRS e suas trajetórias. Todo o processo ocorreu de forma automática ou então pela simples variação dos parâmetros básicos disponíveis na interface de tais programas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CONVERGÊNCIA AO EQUILÍBRIO

Com base na diferença euclidiana das posições atômicas em relação à estrutura inicial, o cálculo do *root mean square deviation* (RMSD) foi realizado para mostrar a convergência das simulações em direção ao equilíbrio. Como mostra o gráfico da Figura 2, o relaxamento e a consequente estabilização do *backbone* proteico (átomos de N, C α e C) ocorreram já logo ao início das trajetórias.

Figura 2 – Variação do RMSD do *backbone* proteico ao longo das trajetórias realizadas

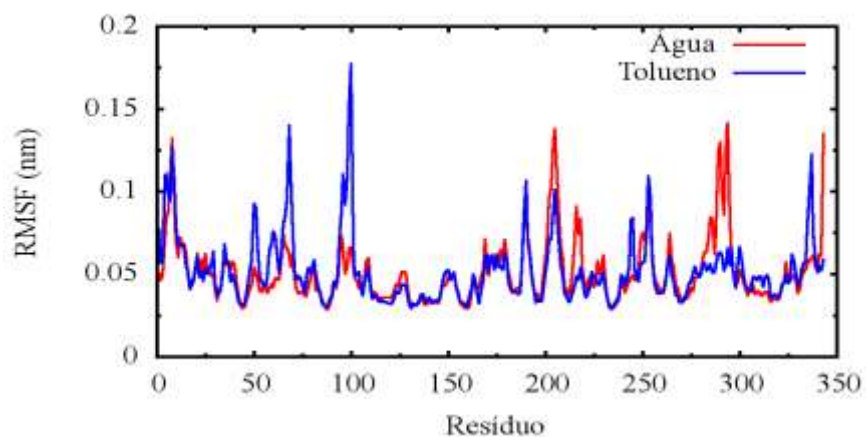


Fonte: Autor (2017).

3.2 ANÁLISE DA FLEXIBILIDADE

O *root mean square fluctuation* (RMSF), ou desvio-padrão das posições atômicas na trajetória em relação às respectivas posições médias, foi utilizado para avaliar como a flexibilidade da estrutura nativa de PhaZ7 varia em solventes de diferentes polaridades. O resultado (Figura 3) mostra que regiões fundamentais para a atividade da enzima (*loop* 202-208 e tampa) perdem significativa maleabilidade em um solvente menos polar (tolueno).

Figura 3 – Perfis de variação do RMSF para o *backbone* proteico em água e tolueno



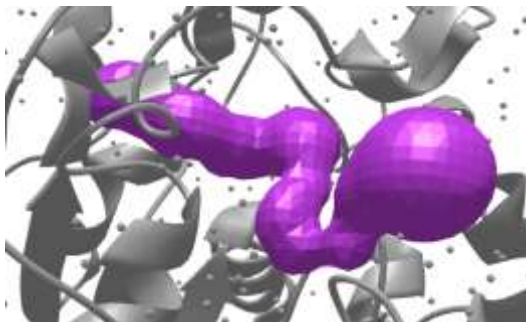
Fonte: Autor (2017).

Contrariamente a estudos teóricos que mostram a abertura de lipases em solventes apolares (LUTZ; BORNSCHEUER, 2013), PhaZ7 demonstra, dessa forma, uma menor susceptibilidade à abertura por ação do efeito solvente. Os valores médios dos raios de giro (R_g) das estruturas proteicas de 4BRS em água ($R_g = 1,835$ nm) e tolueno ($R_g = 1,815$ nm) também confirmam tal comportamento.

A explicação para a perda de flexibilidade provavelmente vem da incapacidade das moléculas de tolueno adentrarem e lubrificarem a cavidade catalítica da mesma forma como moléculas de água conseguem. A inspeção da estrutura e das trajetórias de 4BRS a partir dos *softwares* Caver Analyst e MOLE

permitiu identificar e caracterizar um túnel (Figura 4) de dimensão relevante como o provável e único meio de acesso da água ao interior da proteína. De natureza predominantemente polar, o canal possui pontos bastante estreitos, porém com dinâmica capaz de permitir a entrada de moléculas de água à principal cavidade de PhaZ7.

Figura 4 – Túnel/canal hidrofílico que dá acesso à cavidade catalítica



Fonte: Autor (2017).

4 CONCLUSÃO

As simulações mostram boa concordância com estudos experimentais e teóricos, o que comprova a confiabilidade dos parâmetros e procedimentos utilizados neste estudo. PhaZ7 de *Paucimonas lemoignei* demonstra-se como uma estrutura bastante dependente da flexibilidade e abertura de seu *lid* para manter boa atividade, o que o destaca como uma potencial região a sofrer futuras mutações.

Computational mutagenesis of depolymerase enzyme PhaZ7

ABSTRACT

PhaZ7 from *Paucimonas lemoignei* is characterized as an extracellular depolymerase of quite unusual activity. In addition to having high specificity only by amorphous polyhydroxyalkanoates, the enzyme also arouses attention in the scientific environment due to the activation mechanism based on the opening and closing of the lid that blocks its active site. In order to investigate these and other characteristics related to the activity of the enzyme, this project consists in the use of molecular modeling tools for the study of native PhaZ7 and its mutants. By means of molecular dynamics simulations performed with the GROMACS software package, the behavior of the native enzyme was evaluated against solvents with different polarities. Trajectories of its structure show agreement with experimental and theoretical data, indicating significant loss of flexibility of the lid in more apolar solvent (toluene). The analysis made with the aid of tools to identify cavities in proteins revealed the presence of a tunnel of significant size and predominantly polar nature as the probable access channel that allows the entry of water molecules into the catalytic cavity. The positioning of such molecules occurs at strategic points, which allows important regions for the activity of the enzyme to maintain good flexibility.

KEYWORDS: Depolymerase. Molecular modeling. Computational mutagenesis.

AGRADECIMENTOS

Este projeto desenvolve-se com o auxílio financeiro da Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná e com os recursos computacionais oferecidos pelo HPC-UTFPR (High Performance Computing - Universidade Tecnológica Federal do Paraná) e CENAPAD-SP (Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho em São Paulo).

REFERÊNCIAS

- KELICI, T. F.; MAVROMOUSTAKOS, T.; JENDROSSEK, D.; PAPAGEORGIOU, A. C. Crystal structure analysis, covalent docking and molecular dynamics calculations reveal a conformational switch in PhaZ7 PHB depolymerase. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 85, n. 7, p. 1351-1361, jul. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28370478>>. Acesso em: 15 jul. 2017.
- MORGON, N.H.; COUTINHO, K. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. 1. ed. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2007.
- LUTZ, S.; BORNSCHEUER, U. T. **Protein Engineering Handbook**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013.

Recebido: 31 ago. 2017.

Aprovado: 02 out, 2017.

Como citar:

OLIVEIRA, C. C. et al. Mutagênese computacional da enzima depolimerase PhaZ7. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 22., 2017, Londrina. **Anais eletrônicos...** Londrina: UTFPR, 2017. Disponível em: <<https://eventos.utfpr.edu.br/sicite/sicite2017/index>>. Acesso em: XXX.

Correspondência:

Cynthia Christina de Oliveira

Rua Deputado Heitor Alencar Furtado, 5000, Ecoville, Curitiba, Paraná, Brasil.

Direito autoral:

Este resumo expandido está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição-Não Comercial 4.0 Internacional.

