

Simulação de males amiloidogênicos com software PHAST

Simulation of amyloidogenic diseases with software PHAST

RESUMO

Letícia Scussel Farias

leticiafarias@alunos.utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Rafael Bertolini Frigori

frigori@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Os peptídeos beta amiloides $A\beta_{1-40}$ (PDB: 2lfm) induzem doenças neurodegenerativas, como o Mal de Alzheimer (AD), pela formação de agregados amilóides depositados no cérebro de pacientes. Acredita-se também que a amilina humana (hIAPP), hormônio produzido com a insulina pelas células β -pancreáticas, agrega-se no pâncreas e assim contribui para o surgimento da Diabetes Tipo 2 (T2D). Dessa forma, drogas análogas à hIAPP, como Pramlintide (PM), foram biotecnologicamente desenvolvidas sob inspiração de mamíferos resistentes à T2D, como roedores (rIAPP) e porcos (pIAPP). Dados clínicos revelam uma inter-relação entre o aumento de T2D em portadores de AD, deste modo, visamos estudar a interação molecular que leva à agregação de isoformas da proteína hIAPP (sIAPP, rIAPP e pIAPP) com $A\beta_{1-40}$ por meio do software PHAST. O software PHAST simula paralelamente cadeias heteropoliméricas com o método de Monte Carlo multicanônico empregando um modelo (AB) coarse-grained de proteínas, descrevendo-as de acordo com a hidrofobicidade dos aminoácidos (A: hidrofóbico e B hidrofílico). Os resultados são analisados com o módulo PHAST-ANALYST, descrevendo termostaticamente os sistemas à la Boltzmann

PALAVRAS-CHAVE: Monte Carlo. Agregação. Diabetes. Mal de Alzheimer.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



ABSTRACT

The Beta amyloid peptides $A\beta_{1-40}$ (PDB: 2lfm) induce neurodegenerative diseases like Alzheimer's disease (AD) by formation of amyloid aggregates deposited in the brain of patients. Believed that human amylin (hIAPP), hormone produced with insulin by β -pancreatic cells, aggregates in the pancreas and contributes to the emergence of Diabetes type 2. Analogous drugs of hIAPP, like Pramlintide (PM), were biotechnologically developed under the inspiration of mammals T2D-resistant, as rodents (rIAPP) and pigs (pIAPP). Clinical data reveal an interrelationship between T2D increment in AD patients, so we study the molecular interaction that leads to the aggregation of hIAPP (sIAPP, rIAPP and pIAPP) isoforms with $A\beta_{1-40}$ through PHAST software. The PHAST software simulates in parallel heteropolymer chains with the multichannel Monte Carlo method employing a coarse-grained (AB) protein model, describing them according to aminoacid hydrophobicity (A: hydrophobic and B: hydrophilic). The results were analyzed with the PHAST-ANALYST module using Boltzmann-style systems.

KEYWORDS: Monte Carlo. Aggregation. Alzheimer's disease.

INTRODUÇÃO

Diabetes é uma doença crônica, cuja taxa de incidência cresceu 61,8% nos últimos 10 anos, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS). Atualmente o tratamento de diabetes baseia-se na utilização de insulina para a regulação das taxas de glicose no sangue, porém no organismo saudável este mecanismo de absorção possui a ação de outro hormônio simultaneamente, designado como amilina humana (hIAPP) e tendo como função suprimir a secreção de glucagon pós-prandial promovendo assim a saciedade.

Contudo, estudos revelam que a coadministração de hIAPP e insulina é propensa a agregação, podendo formar depósitos amilóides no pâncreas endócrino, acarretando à redução da massa de células β . Sabe-se que os peptídeos beta amiloides $A\beta_{1-40}$ (PDB: 2lfm) induzem doenças neurodegenerativas, como o Mal de Alzheimer (AD), pela formação de agregados amilóides depositados no cérebro de pacientes (BARAM, 2016; SILVA, S. C.; LIMA, L. M. T. R., 2017).

Desta forma, acredita-se também que a amilina humana (hIAPP), hormônio produzido com a insulina pelas células β -pancreáticas, agrega-se no pâncreas e assim contribui para o surgimento da Diabetes Tipo 2 (T2D) (BARM, 2016).

Vários estudos apresentam semelhanças de mecanismos e manifestações entre T2D e AD, tendo como principal característica a formação de agregados amilóides, além de dados clínicos apresentarem uma inter-relação entre o aumento de T2D em pacientes com AD, sugerindo uma origem molecular e sinérgica entre esses males, supostamente ocasionada pela agregação-cruzada (cross-seeding) de hIAPP e $A\beta$'s (BARAM, 2016; FRIGORI, 2017).

Sendo assim, baseando-se em mamíferos resistentes a T2D, como roedores (rIAPP) e porcos (pIAPP), desenvolveu-se peptídeos não-amiloidogênicos análogos à hIAPP, como Pramlintide (sIAPP) (SILVA, S. C.; LIMA, L. M. T. R., 2017). Deste modo, visamos estudar a interação molecular que leva à agregação de isoformas da proteína hIAPP (sIAPP, rIAPP e pIAPP) com $A\beta_{1-40}$ por meio do software PHAST.

O software PHAST foi desenvolvido utilizando a linguagem Fortran, com extensões MPI e CUDA, constitui um código aberto e gratuito, podendo ser utilizado livremente por outros usuários, além de permitir adaptações para atingir propósitos requisitados. O PHAST possui como capacidade a realização de simulações paralelas de cadeias heteropoliméricas simples ou múltiplas com o método de Monte Carlo multicanônico, empregando um modelo (AB) coarse-grained de proteínas. Este modelo descreve proteínas considerando o caráter hidrofóbico dos aminoácidos, representando-os como A: hidrofóbico e B hidrofílico. Assim, o PHAST simula a interação de heteropolímeros lineares flexíveis, como proteínas, com um reduzido custo computacional (FRIGORI, 2017).

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização das simulações microcanônicas, utilizou-se a o peptídeo beta amilóide $A\beta_{1-40}$, designado como 2lfm e disponibilizado pelo banco de dados de proteínas PDB. Além da utilização das proteína hIAPP e suas isoformas sIAPP, rIAPP e pIAPP previamente sequenciados em sua forma primária, em código de uma letra.

Por meio da sequência primária das proteínas, utilizou-se o conversor One to Three para a transformação do código de uma letra para três ("AKC" para AlaLysCys), obtendo uma sequência legível pelo módulo PHAST-SET_INPUT.

Desta forma, com a obtenção da sequência primária em código de três letras, prepararam-se as proteínas isomorfas da amilina juntamente com o peptídeo *2Ifm* no módulo PHAST-SET_INPUT para a conversão dos aminoácidos no modelo AB proposto. O modelo *Coarse-graining* possui como objetivo reduzir os graus de liberdade macromoleculares, desta forma, o PHAST utiliza um campo de força simplificado para descrever heteropolímeros pela hidrofobicidade (AB), citada anteriormente. Sendo assim, as forças hidrofóbicas são dadas pelo potencial de Lennard-Jones (LJ), cuja interação entre os resíduos dos aminoácidos tem os coeficientes dados na Eq. (1) (FRIGORI, 2017):

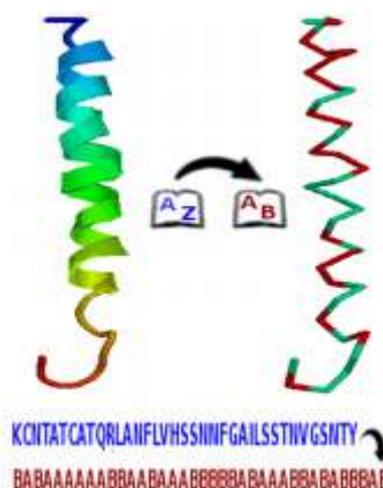
$$C_{LJ}(\sigma_i, \sigma_j) = \begin{cases} +1 & \sigma_i = \sigma_j = A \\ +1/2 & \sigma_i = \sigma_j = B \\ -1/2 & \sigma_i \neq \sigma_j \end{cases} \quad (1)$$

Sabendo-se que a estrutura proteica possui certa rigidez, utiliza-se ainda uma modelagem do heteropolímero do tipo mola-grânulo, descrita pela Eq. (2) (FRIGORI, 2017):

$$H_{single} = k_F R^2 \sum_{l=1}^{N-1} C_F(\sigma_l, \sigma_{l+1}) \ln(1 - [(\eta_{l+1} - r_o) / R]^2) + k_c \sum_{k=1}^{N-2} (1 - \cos \theta_k) + k_{LJ_{INTRA}} \sum_{i=1}^{N-2} \sum_{j=i+1}^N [r_{ij}^{12} - C_{LJ}(\sigma_i, \sigma_j) r_{ij}^{-6}] \quad (2)$$

Por meio destas, obtém-se a proteína de interesse modelada como um heteropolímero, como pode ser observada na Figura 1.

Figura 1 – Escala de hidrofobicidade mapeada de A-Z pelo FASTA e sequência AB utilizando modelo *Coarse-graining*



Fonte: FRIGORI, 2017.

Com a modelagem realizada, teve-se o material de estudo preparado, desta forma iniciou-se a simulação com o método de Monte Carlo e por conseguinte os resultados foram analisados no próprio software utilizando o módulo PHAST-ANALYST, que permite avaliar a entropia, curva calórica, calor específico e energias livres, obtendo portanto a termodinâmica microcanônica dos sistemas à la Boltzmann.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

As simulações realizadas, utilizaram as isoformas hIAPP, rIAPP, pIAPP e s20R, cuja sequência FASTA pode ser observada na Figura 2.

Figura 2 - Sequência FASTA de isoformas da amilina

Isoform	Sequence
Human	KCNTATCATQ.RLANFLVHSS.NNFGAILSST.NVGSNTY
Cat	KCNTATCATQ.RLANFLIRSS.NNLGAILSPT.NVGSNTY
Rat	KCNTATCATQ.RLANFLVRSS.NNLGPVLPPT.NVGSNTY
Porcine	KCNMATCATQ.HLANFLDRSR.NNLGTIFSPT.KVGSNTY
Pramlintide	KCNTATCATQ.RLANFLVHSS.NNFGPILPPT.NVGSNTY
S20R-pramlintide	KCNTATCATQ.RLANFLVHS <u>R</u> .NNFGPILPPT.NVGSNTY

Fonte: FRIGORI, 2017.

Como dito anteriormente, utilizou-se o modelo AB coarse-grained para descrever as proteínas, sendo portanto considerado o carácter hidrofóbico dos aminoácidos, representando-os como A: hidrofóbico e B hidrofílico. Desta forma obteve-se que, de acordo com a escala de hidrofobicidade de Roseman, as proteínas rIAPP e s20R apresentam a mesma sequência polimérica no modelo AB, sendo portanto consonantes perante o estudo. Suas sequências mapeadas no modelo AB seguem na Tabela 1 abaixo:

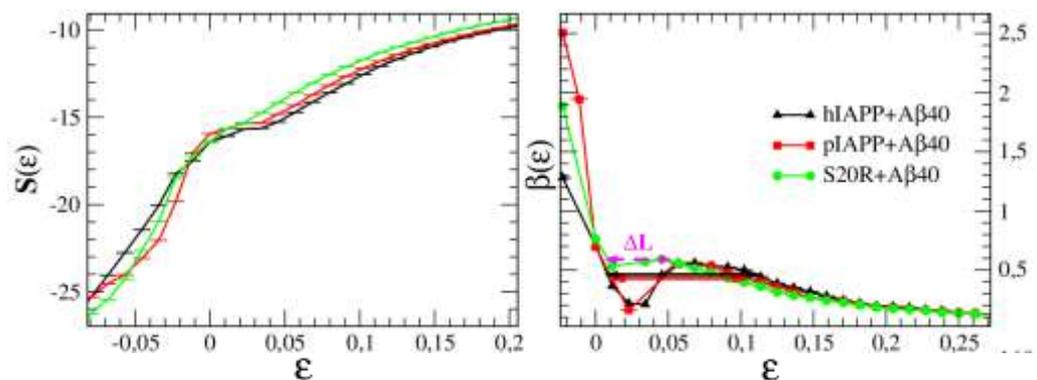
Tabela 1 – Sequências mapeadas no modelo AB

Isoforma	Sequência
hIAPP	BABAAAAAABBAABAAABBBBBABAAABBABBBBBAB
rIAPP	BABAAAAAABBAABAAABBBBBABAAA AA ABBBBBAB
pIAPP	BABAAAAAABBAABAAABBBBBBABAAB AA ABBBBBAB
S20R	BABAAAAAABBAABAAABBBBBBABAAB AA ABBBBBAB
Aβ ₁₋₄₀	BABBBBBBBBBBBBBAAAAABBABBBBBBAAAABAAABBA

Fonte: Autoria própria (2019).

Através do módulo PHAST-ANALYST, obteve-se a termodinâmica microcanônica dos sistemas à la Boltzmann das proteínas hIAPP, pIAPP e S20R, podendo ser observadas na Figura 3 as curvas da entropia (S) e da temperatura inversa (β) como função da energia por monômero (ε).

Figura 3 - Análise termodinâmica proteínas hIAPP, pIAPP e S20R



Fonte: Autoria própria (2019).

Por meio dos gráficos de entropia e curva calórica apresentados avaliou-se a mudança no estado de agregação das proteínas, calculando o calor latente (ΔL) com o critério de Maxwell que lineariza o Loop de Van der Waals nas curvas $\beta \times \epsilon$.

Como observado, tem-se que a curva calórica da proteína S20R não apresenta mudança de fase expressiva, tendo como consequência uma menor, ou nenhuma, agregação em interação com a beta amiloides A β 40. No entanto a proteína hIAPP e pIAPP apresentaram mudança de seu estado de agregação significativa, sendo aproximadamente de 0,3113 e 0,2660 respectivamente. Desta forma, tem-se que em interação com a beta amiloides a proteína hIAPP possui maior caráter amiloidogênico quando comparada às demais. Este resultado concorda com observações clínicas.

Desta forma, tem-se a S20R como uma opção aceitável no tratamento de Diabetes, pois, como característica típica tem menor propensão de agregação amilóide. Consequentemente, S20R exibirá menor propensão de induzir, colateralmente, doenças neurodegenerativas relacionadas com agregados formados conjuntamente com A β ₁₋₄₀, como é o Mal de Alzheimer.

CONCLUSÃO

Diante do exposto, vê-se que as simulações microcanônicas realizadas obtiveram resultados satisfatórios, tendo como maior intuito simular possíveis drogas análogas para o tratamento de doenças amiloidogênicas, possibilitando uma prévia ideia de seu comportamento no organismo. Sendo assim, determinou-se que a isoforma S20R possui potencial para utilização no tratamento de Diabetes sem que haja a formação de agregados amiloides que poderiam acarretar na indução de doenças neurodegenerativas, como o Mal de Alzheimer. Desta forma, ressalta-se a importância da investigação de análogos de amilina como terapias adjuvantes à DM2, cuja conformação e função proteica seja conversada. Para tal, a substituição de certos aminoácidos-chave deve ser eficaz, acarretando no aumento da solubilidade e em uma menor propensão de agregação proteica, assim como demonstrado com a mutante S20R.

REFERÊNCIAS

BARAM, M. et al. **Amylin-A β oligomers at atomic resolution using molecular dynamics simulations: a link between Type 2 diabetes and Alzheimer's disease.** In: Physical Chemistry Chemical Physics, 2016.

FRIGORI, R. B. **PHAST: Protein-like heteropolymer analysis by statistical.** Computer Physics Communications, Elsevier B.V., 2017

FRIGORI, R. B. **Be positive: optimizing Pramlintide from microcanonical analysis of Amylin isoforms.** In: Physical Chemistry Chemical Physics, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/319398831_Be_Positive_optimizing_Pramlintide_from_microcanonical_analysis_of_Amylin_isoforms . Acesso em: 18 ag. 2019.

FRIGORI, R. B. **Simulações microcanônicas de Proteínas.** 2010. Tese (Ciências: Física Aplicada à Medicina e Biologia.) - Universidade de São Paulo: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Departamento de Física e Matemática, Ribeirão Preto, 2010. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59135/tde-27012011-185248/pt-br.php>. Acesso em: 18 ag. 2019.

SILVA, S. C.; LIMA, L. M. T. R. **Physico-chemical properties of co-formulation of insulin with pramlintide.** In: bioRxiv, 2017. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/227363v1>. Acesso em: 18 ag. 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Universidade Tecnológica Federal do Paraná que forneceu seu espaço e infraestrutura para desenvolvimento da pesquisa. Assim como ao meu orientador Rafael B. Frigori, que me auxiliou em todas as etapas e procedimentos requeridos. Além de agradecer a todos envolvidos de forma indireta, porém apoiante como minha família e colegas.