

Modelagem por homologia da Enzima Conjugadora de Ubiquitina E2 Tipo 1 de *Homo sapiens*

Homology modelling of Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 Like 1 from *Homo sapiens*

RESUMO

Dentre as principais vias proteolíticas, a via da ubiquitina-proteassoma pode ser caracterizada por ser dependente de ATP. Cerca de 80% das proteínas intracelulares são degradadas via proteassoma. Grandes famílias de enzimas realizam as etapas por meio da qual a ubiquitina é endereçada a uma proteína. Cada integrante da família de enzimas E1, E2 e E3 possui diferentes especificidades de substrato, portanto, regulam processos celulares diferentes. A UBE2QL1 possui um resíduo cisteína de sítio-ativo e fornece reconhecimento para o complexo SCF E3 ubiquitina ligase facilitando a degradação para substratos da proteína. A maioria dos alvos de FBXW7 são produtos proto-oncogênicos, dando suporte a função de FBXW7 como gene supressor de tumor, assim como UBE2QL1, também sendo candidato a gene supressor de tumor, uma vez que interage com esse complexo específico de E3s. Este trabalho objetiva a elucidação da estrutura teórica por homologia e a elaboração de um protocolo de expressão heteróloga do gene UBE2QL1. A enzima UBE2QL1 possui um total de 161 aminoácidos distribuídos de forma monomérica. Na topologia da macromolécula é possível observar um total de 66,4% de estruturas α -hélices e 36,6% de estruturas fitas- β . As regiões de looping tipicamente formam parte do sítio de ligação com E3s.

PALAVRAS-CHAVE: Modelagem, Homologia, UBE2QL1.

ABSTRACT

Among the main proteolytic pathways, the ubiquitin-proteasome pathway can be characterized by being ATP dependent. About 80% of intracellular proteins are degraded via proteasome. Large families of enzymes perform the steps whereby ubiquitin is addressed to a protein. Each member of the E1, E2, and E3 family of enzymes has different substrate specificities, thus regulating different cellular processes. UBE2QL1 has an active-site cysteine residue that provides recognition for the SCF E3 ubiquitin ligase complex facilitating degradation to protein substrates. Most FBXW7 targets are proto-oncogenic products, supporting the function of FBXW7 as a tumor suppressor gene, as well as UBE2QL1, also being a candidate tumor suppressor gene as it interacts with this specific E3s complex. This work aims at elucidating the theoretical structure by homology and the elaboration of a heterologous expression protocol of the UBE2QL1 gene. The UBE2QL1 enzyme has a total of 161 amino acids monomerically distributed. In the macromolecule topology it is possible to observe a total of 66.4% of α -helix structures and 36.6% of β -tape structures. Looping regions typically form part of the E3s binding site.

Gabriel Salvador Miranda
mirandag@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Marcio Silva
marcios@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Robson Rodrigo Miranda
robsonrm18@hotmail.com
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

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



KEYWORDS: Modelling, Homology, UBE2QL1.

INTRODUÇÃO

Proteínas sintetizadas pela célula tem um prazo de vida útil e eventualmente precisam ser eliminadas por sistemas de proteólise. Dentre as principais vias proteolíticas, a via da ubiquitina-proteassoma pode ser caracterizada por ser dependente de ATP. Estima-se que cerca de 80% das proteínas intracelulares são degradadas via proteassoma. Devido então a sua relevância bioquímica, são grandes famílias de enzimas que realizam as etapas por meio da qual a ubiquitina é endereçada a uma proteína. Cada integrante da família de enzimas E1, E2 e E3 possui diferentes especificidades de substrato, portanto, regulam processos celulares diferentes. A ubiquitinação é uma via de três etapas envolvendo as enzimas ativadoras E1, enzimas conjugadoras E2 e ubiquitina ligases E3 para transferir a ubiquitina (Ub) ao seu substrato. Nesse processo, o grupo da extremidade carboxil da Ub liga-se a uma enzima ativadora E1 numa reação dependente de ATP para formar uma ligação de tioéster entre Ub e E1. Posteriormente a Ub é transferida para uma enzima conjugadora E2 pela troca da ligação de tioéster (transtiolação). Finalmente uma enzima ubiquitina ligase E3 catalisa a transferência final da Ub para a proteína alvo por meio de uma ligação isopeptídica, geralmente, em um resíduo cisteína ou lisina da proteína alvo. Ciclos repetidos desse processo levam a poli-ubiquitinação até que a corrente de Ub seja reconhecida e degradada via proteassoma. Enzimas E3s podem ser classificadas em 3 subfamílias: RING, HECT e RING *between* RINGS (RBR). A especificidade do substrato é reforçada por enzimas E3, mas recentemente há estudos que mostram que E2s podem ter atividade intrínseca, principalmente em situações independentes de E3s, onde a especificidade do substrato pode ser determinada pela E2 (STEWART. et. al., 2016). Os autores ainda afirmam que humanos tem cerca de 40 E2s e mais de 32 já tiveram suas estruturas tridimensionais elucidadas por completo ou parcialmente.

É evidente que falhas no processo de ubiquitinação como a incapacidade de degradar proteínas, a degradação não-eficiente ou muito rápida pode ter implicações numa variedade de estados patológicos e o acúmulo de proteínas indesejadas pode tornar-se tóxico para célula, levando a morte celular (NELSON, et al., 2014, p. 1148).

A proteína que é codificada pelo gene UBE2QL1, depositado no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *Genebank* de código NM_001145161.3 demonstra homologia à classe de enzimas Conjugadoras de Ubiquitina (E2) e está diretamente envolvida com a transferência de ubiquitina

e/ou UBLs (*ubiquitin like proteins*). Segundo WAKE, Naomi. et al. (2013), a UBE2QL1 possui um resíduo cisteína de sítio-ativo (Cys88) e fornece reconhecimento para o complexo SCF E3 ubiquitina ligase, facilitando a degradação para substratos da proteína FBXW7 (proteína F box) como *Notch1*, *c-Myc*, *Cyclin E*, *Mcl-1*, *mTOR* e *Jun*. A maioria dos alvos de FBXW7 são produtos proto-oncogênicos, dando suporte a função de FBXW7 como gene supressor de tumor, assim como UBE2QL1, também sendo candidato a gene supressor de tumor, uma vez que interage com esse complexo específico de E3s.

A capacidade de realizar reações de transtioação é um requerimento de ativação pela E1 e todas as E2s interagem com uma enzima E1 e uma ou mais E3s. Primariamente E2s podem encarregar-se de dois tipos de ligações: transtioação e aminólise. A transtioação consiste na transferência de um tioéster para um grupo tiol, enquanto a aminólise consiste na transferência de um tioéster para um grupo amino.

As E2s podem ser divididas em 3 categorias de acordo com suas propensões ativas: (1) E2s que transferem Ub/UBLs para um resíduo específico (mono-ubiquitinação), (2) E2s que transferem Ub/UBLs para outras Ub/UBLs (poli-ubiquitinação) e (3) E2s que são hábeis aos dois tipos de transferência (STEWART, et al., 2016, p. 429). WAKE, Naomi. et al. (2013, p. 1655) afirmam que UBE2QL1 é responsável pela mono-ubiquitinação *in vivo*, ou seja, a UBE2QL1 transfere Ub/UBLs para um resíduo específico. O núcleo catalítico das E2s (domínio UBC) tipicamente adota estruturas secundárias de 4 α -hélices e 4 fitas- β .

Devido a importância clínica e a carência de estudos da proteína UBE2QL1 de *Homo sapiens* em nível molecular, este trabalho objetiva a elucidação da estrutura teórica por homologia e a elaboração de um protocolo de expressão heteróloga do gene UBE2QL1 em cultura de bactérias *Escherichia coli* DE3 BL21.

MATERIAL E MÉTODOS

O vetor selecionado para transformação bacteriana é o plasmídeo pET-16b, contendo o gene de interesse UBE2QL1 (495 bp) construído pela empresa Synbio Technologies®. A digestão do plasmídeo foi avaliada por métodos de alinhamento de sequência, espectrofotometria UV e inspeção visual em banda de eletroforese em gel de agarose. O plasmídeo contém resistência ao antibiótico ampicilina. O vetor foi aprovado durante as avaliações e encontra-se pronto para uso.

Utilizando a sequência de aminoácidos da UBE2QL1 depositada no NCBI, buscou-se por estruturas proteicas moldes depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) que foram avaliadas através do programa *Blast Automatic Targeting for Structures* (BATS) da ferramenta MHOLLINE utilizando o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Todas as estruturas selecionadas são de proteínas da vasta família de enzimas, as E2s.

Foram selecionadas 4 estruturas moldes de código PDB igual a: 2QGX, 1ZUO, 1Z2U e 2OXQ. O molde 2QGX de *Homo sapiens* tem seu percentual de identidade de 55,90%. 1ZUO de *Homo sapiens* possui 50,00% de identidade. 1Z2U de *Caenorhabditis elegans* e 2OXQ de *Danio rerio* ambas com 25,44% de identidade.

Os critérios para a escolha de moldes foram de acordo com os grupos classificados como G2 no BATS: *E-value* $\leq 10e-5$ e identidade ≥ 0.25 .

A normalidade do ambiente local de aminoácidos foi verificada pela ferramenta *Coarse Packing Quality Control* no site WHATIF que utiliza do método DACA descrito em: *Quality control of protein models: Directional atomic contact analysis*. G. Vriend, C. Sander. *J.Appl.Cryst.* (1993).

A análise estrutural da topologia do modelo teórico foi gerada pela ferramenta PDBsum Generate.

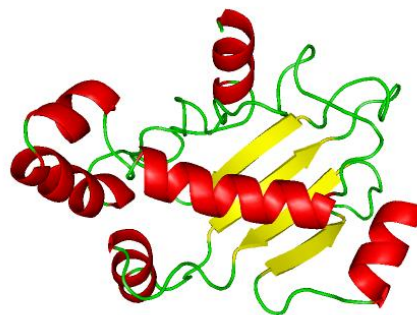
O programa Pymol foi usado para a construção de imagens para visualização do modelo utilizado.

O modelo teve a angulação de ligação peptídica entre o aminoácido leucina 91 modificada pelo *software* SwissPDB Viewer.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A enzima UBE2QL1 de *Homo sapiens* possui um total de 161 aminoácidos distribuídos de forma monomérica. É possível observar um total de 4 fitas- β , formando um folha- β antiparalela. A enzima possui um total 6 α -hélices. As regiões de looping tipicamente formam parte do sítio de ligação com E3s (figura 1).

Figura 1 – Modelo teórico da enzima UBE2QL1 de *Homo sapiens*. α -hélices estão representadas em vermelho, fitas- β em amarelo e regiões desordenadas em verde. Imagem construída utilizando o programa Pymol.

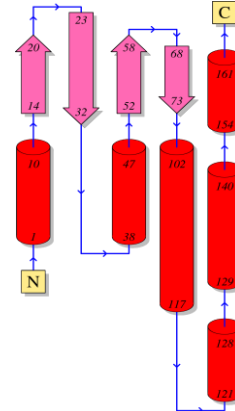


Fonte: O autor.

As regiões N-terminal e C-terminal são caracterizadas por domínio da estrutura secundária de α -hélice. O domínio UBC – caracterizado por 4 fitas- β e 4 α -hélices – estende-se do resíduo 14 ao 140 (figura 2). Na topologia da macromolécula é possível observar um total de 66,4% de estruturas α -hélices e 36,6% de estruturas fitas- β .

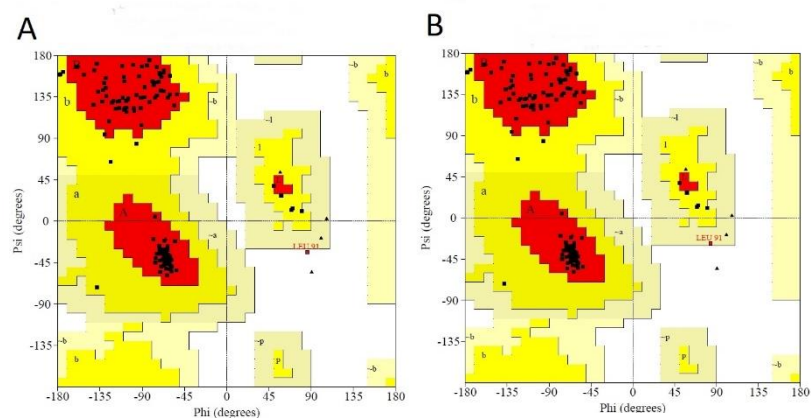
Um dos parâmetros utilizados para verificar a qualidade da estrutura tridimensional de proteínas se dá através da análise do diagrama de Ramachandran que permite observar os ângulos *Phi* (ϕ) e *Psi* (ψ) entre as ligações peptídicas da cadeia principal. No modelo obtido inicialmente, a leucina 95 encontrava-se em região desfavorável do diagrama de Ramachandran (figura 3-A). Foi realizada uma correção do ângulo *Psi* de modo a realocá-lo para o mais próximo possível da região considerada como região generosamente permitida, utilizando o *software* SwissPDB Viewer (figura 3-B).

Figura 2 – Topologia do modelo teórico de UBE2QL1 de Homo sapiens. Faixas em vermelho indicam a presença de estrutura secundária de α -hélice, setas em rosa indicam fitas- β e linhas em azul representam regiões desordenadas (looping).



Fonte: PDBsum.

Figura 3 – Dispersão dos resíduos da UBE2QL1 segundo o gráfico de Ramachandran. As regiões em vermelho (A, B, L) representam as regiões mais favorecidas, em amarelo (a, b, l, p) as regiões adicionalmente permitidas e em marrom claro (~a, ~b, ~l, ~p) regiões generosamente permitidas. Resíduos de glicina estão representados como triângulos.



Fonte: Procheck (2019).

Espera-se que por meio da transformação por eletroporação e posteriormente a realização de eletroforese, a UBE2QL1 possa ser obtida em meio solúvel para trabalhos futuros visando a obtenção da estrutura por cristalografia de raio-X.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente o professor e orientador Marcio Silva da UTFPR por toda a ajuda e suporte dedicado ao longo do projeto, ao professor Jorge Iulek da UEPG por ceder o uso do laboratório para a realização das etapas experimentais deste trabalho e pela obtenção do vetor, realizada por ambos. Ao coorientador do projeto Robson Rodrigo Miranda que conjuntamente com Sheila Boreiko Sánchez orientam e dão suporte aos procedimentos experimentais.

REFERENCIAS

BLAST: **Basic Local Alignment Search Tool**. Disponível em:

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Acesso em: 30 de março, 2019.

HERSHKO, A. CIECHANOVER, A. e ROSE, I. **Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP**, Philadelphia: Biochemistry, v.76. 1979.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. **PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures**. Journal of Applied Crystallography, v. 26, 1993.

MHOLLINE: **Automatic 3D Comparative Modelling**. Disponível em

<http://www.mholline.lncc.br/>. Acesso em: 9 de maio, 2019.

NCBI (Org.) Homo sapiens ubiquitin conjugating enzyme E2 Q family like 1 (UBE2QL1), mRNA. Disponível em:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001145161.3?report=genbank&to=5895. Acesso em: 7 de novembro, 2018.

PDBsum Database. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=index.html>. Acesso em: 12 de julho. 2019.

STEWART, Mikaela D. et. al. **E2 enzymes: more than just middle men**, Washingtton: Cell Research, 2016.

WAKE, Naomi C. et al. **UBE2QL1 is Disrupted by a Constitutional Translocation Associated with Renal Tumor Predisposition and is a Novel Candidate Renal Tumor Suppressor Gene**, Birmingham: Human Mutation, v. 34, p1650–1661, 2013.

WHATIF Database. Disponível em:

<https://swift.cmbi.umcn.nl/servers/html/index.html>. Acesso em: 12 de junho, 2019.

YEH, Chien-Hung, BELLON, Marcia, NICOT, Christophe. **FBXW7: a critical tumor supressor of human cancers**. Kansas: Molecular Cancer, 2018.