

## Estudos de modelagem da proteína Leucemia/Linfoma de células T 1b de *Homo sapiens*.

### Modeling studies of the *Homo sapiens* T-cell Leukemia Lymphoma protein 1B.

#### RESUMO

O oncogene TCL1b situado no cromossomo 14 é responsável pela proteína TCL1b que em superexpressão causa leucemia em células T. Funciona como um coativador da proteína quinase AKT onde aumenta a sua atividade quinase. O objetivo do trabalho é produzir um modelo teórico estrutural da TCL1b utilizando a metodologia de modelagem por homologia com múltiplas proteínas. Foram produzidos 125 modelos da estrutura da proteína, sendo selecionados os dois melhores para serem comparados a um modelo criado a partir de uma proteína molde. Foi constatado que a estrutura da TCL1b é de barril  $\beta$ , onde possui uma grande folha  $\beta$  que se torce formando um tubo, podendo ser transmembrana ou citoplasmática. Todos os modelos construídos apresentaram bons resultados nas análises realizadas, podendo ser utilizados para representar a estrutura da TCL1b.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biologia molecular. Estrutura molecular. Carcinogênese.

#### ABSTRACT

The TCL1b oncogene located on chromosome 14 is responsible for the TCL1b protein, which in overexpression causes leukemia in T cells. It works as a coactivator of the AKT protein kinase where it increases its kinase activity. The objective of the work is to produce a structural theoretical model of TCL1b using the homology modeling methodology with multiple proteins. 125 models of protein structure were produced, the two best being selected to be compared to a model created from a single mold protein. It was found that the structure of TCL1b is  $\beta$  barrel, where it has a large  $\beta$  sheet that is twisted into a tube, which may be transmembrane or cytoplasmic. All the models built showed good results in the analyzes performed, and can be used to represent the structure of TCL1b.

**KEYWORDS:** Molecular biology. Molecular structure . Carcinogenesis.

Maria Laura Rudnik

[marialaurarudnick@gmail.com](mailto:marialaurarudnick@gmail.com)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Marcio Silva

[marcios@utfpr.edu.br](mailto:marcios@utfpr.edu.br)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

**Recebido:** 04 set. 2020.

**Aprovado:** 01 out. 2020.

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



## INTRODUÇÃO

A célula é a unidade básica da vida, que compõe desde os organismos mais básicos aos mais complexos. Toda a sua informação está depositada no DNA, que guarda a base de todas as suas organelas. As proteínas constituem a maior parte seca de uma célula, não apenas sendo as unidades fundamentais das células elas também executam a maior parte de suas funções (ALBERTS et al., 2017). Porém, algumas proteínas podem ser causadoras de diversas doenças, assim como a sua super expressão, inativação ou envelhecimento errôneo.

Situado no cromossomo 14q32, o gene TCL1b é expresso em níveis muito baixos na medula óssea normal e linfócitos periféricos, mas é ativado na leucemia de células T por rearranjos da região 14q32 que resultam em um processo de transformação nociva, também podendo estar relacionado a progressão de tumores (PEKARSKY et al., 1999). O gene está depositado no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) sob o código Gene ID: 9623 e é responsável pela proteína TCL1b.

Pouco se sabe sobre o exato funcionamento da TCL1b, foi constatado por Hashimoto et al. (2013) possui uma interação com a proteína quinase AKT, agindo como seu coativador, aumentando a sua atividade, exibindo assim uma oncogenicidade.

Em 2014, a TCL1b foi utilizada por Hirata et al. em um experimento para a inibição do vírus da influenza, onde a proteína AKT participa de várias etapas da replicação do vírus, por sua vez o estudo se utilizou de um inibidor de AKT baseado na TCL1b, esse inibidor suprimiu a atividade da Akt quinase, tendo resultado favoráveis.

A plasticidade estrutural e funcional das proteínas é consequência direta das interações entre os aminoácidos que as compõe e influencias físico químicas do meio. Portanto, elucidar a estrutura tridimensional de uma proteína, quer seja por métodos experimentais ou por modelagem computacional, agrega conhecimentos bioquímicos que podem ser utilizados em diversas áreas da ciência. O presente trabalho teve como objetivo principal elucidar a estrutura da proteína Leucemia/Linfoma de células T 1b de Homo sapiens, através de modelagem computacional. As informações obtidas poderão ajudar a compreender o funcionamento da TCL1b na célula, bem como contribuir na busca de inibidores para essa proteína por meio de docking molecular.

## MATERIAL E MÉTODOS

Através da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), foi utilizada a sequência de nucleotídeos da proteína TCL1b para encontrar proteínas homólogas que possuíssem estruturas depositadas no PDB (*Protein Data Bank*). Nesse passo ocorre o alinhamento de sequencias de nucleotídeos, onde se obtém a porcentagem de cobertura e identidade entre a TCL1b e a proteína homóloga.

Após analisadas e selecionadas, as proteínas moldes são utilizadas na produção de um modelo estrutural utilizando o programa MODELLER. O modelo pode ser produzido utilizando duas metodologias diferentes, com apenas uma proteína molde e utilizando múltiplas proteínas. A metodologia utilizada foi a de

múltiplas proteínas, com combinações de duas até cinco proteínas. A cada combinação diferente, foi gerado cinco modelos distintos da TCL1b.

Após a construção dos modelos, é necessária a avaliação dos melhores modelos construídos, para isso, foi utilizada a plataforma PROCHECK que mostra as angulações  $\phi$  (phi) e  $\psi$  (psi) através do Diagrama de Ramachandran, e também a plataforma WHATIF, por meio do DOPE (*Discrete optimized protein energy*).

Foram selecionados os dois melhores modelos produzido utilizando múltiplas proteínas para fazer a comparação com o modelo já produzido em 2019 utilizando a metodologia de 1 proteína molde.

Para a comparação dos três modelos, foram utilizadas as plataformas PROCHECK, através do gráfico de Ramachandran, SAVES, através dos escores, WHATIF, por meio do DOPE, PyMOL, para a visualização 3D dos modelos criados e PDBsum, através da topologia e para validação dos modelos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando o BLAST, foram encontradas cinco proteínas depositadas no PDB que possuem similaridade com a TCL1b, listadas na Tabela 1. Quatro dessas proteínas fazem parte da família TCL, apenas a 4HVM não faz parte de sua família, apresentando a pior porcentagem de cobertura.

Tabela 1 – Proteínas homólogas e seus respectivos níveis de cobertura e identidade com a TCL1B.

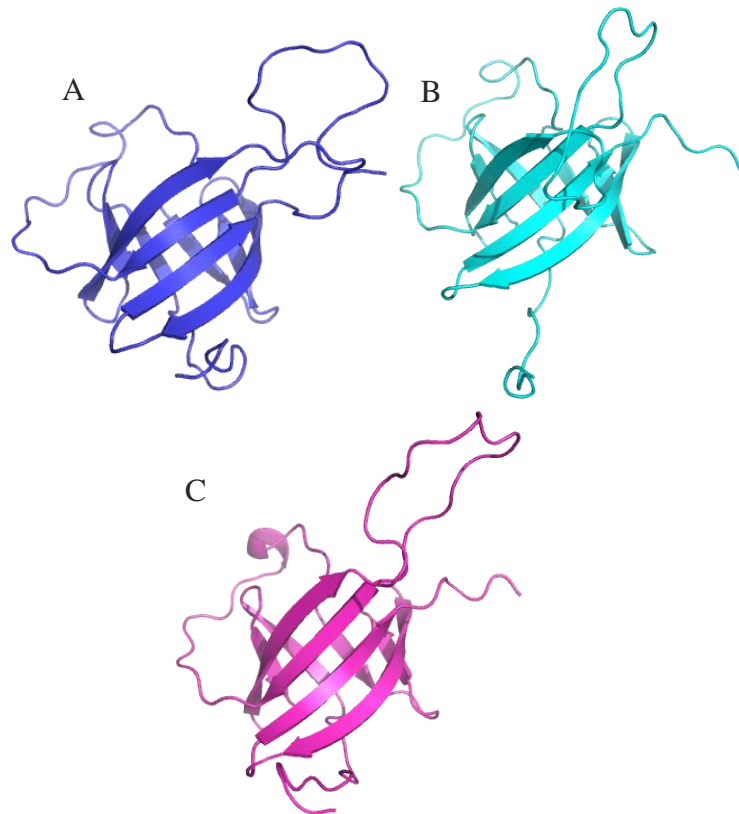
Código PDB	Nome (Sigla)	Organismo	Tamanho (kDa)	Cobertura (%)	Identidade (%)
1JNP	TCL1	<i>Mus musculus</i>	28,2	93	33,61
1QTT	P13MTCP1	<i>Homo sapiens</i>	13,68	97	32,81
1A1X	MTCP-1	<i>Homo sapiens</i>	12,63	94	33,06
1JSG	P14TCL1	<i>Homo sapiens</i>	13,48	88	27,47
4HVM	TlmlI	<i>Streptoalloteichus hindustanus</i>	216,85	45	29,23

Fonte: BLAST E PDB (2020).

Foram feitos 125 novos modelos, com 25 combinações diferentes entre as proteínas moldes. A cada combinação foram construídos cinco modelos, após a verificação de cada modelo, utilizando o gráfico de Ramachandran e DOPE, foram selecionados os dois melhores modelos obtidos.

O “Modelo 1” corresponde a proteína já construída em 2019 (RUDNIK; BOREIKO; SILVA) utilizando o molde 1JNP, o “Modelo 2” foi construído a partir dos moldes 1JNP e 1QTT e o “Modelo 3” foi construído a partir dos moldes 1JNP, 1QTT, 1A1X e 1JSG (Figura 1).

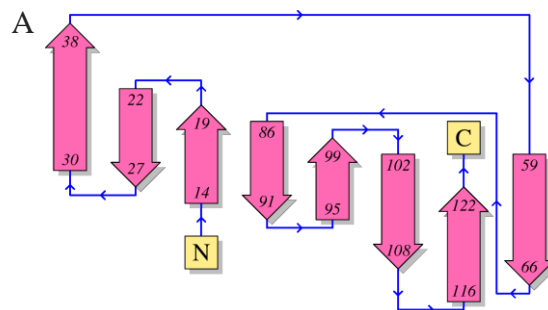
Figura 1 – (A) Estrutura TCL1b, construída a partir do molde 1JNP. “Modelo 1”. (B) Estrutura TCL1b, construída a partir dos moldes 1JNP e 1QTT. “Modelo 2”. (C) Estrutura TCL1b, construída a partir dos moldes 1JNP, 1QTT, 1A1X E 1JSG. “Modelo 3”.

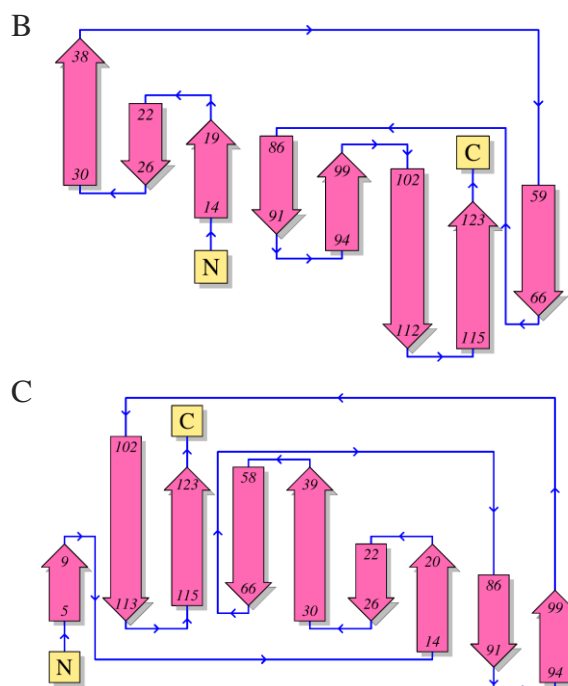


Fonte: Autoria própria (2020).

Os modelos apresentaram estruturas similares, formadas principalmente por fitas  $\beta$ , formando uma folha  $\beta$  que se torce criando uma espécie de tubo, e loopings, essa estrutura mostra uma proteína barril  $\beta$ , uma característica presente em sua família. Podendo ser uma proteína barril  $\beta$  transmembrana ou barril  $\beta$  citoplasmática. Essa estrutura pode ser confirmada ao observar o diagrama de topologia dos modelos, Figura 2.

Figura 2 – (A) Diagrama de topologia do Modelo 1. (B) Diagrama de topologia do Modelo 2. (C) Diagrama de topologia do Modelo 3.





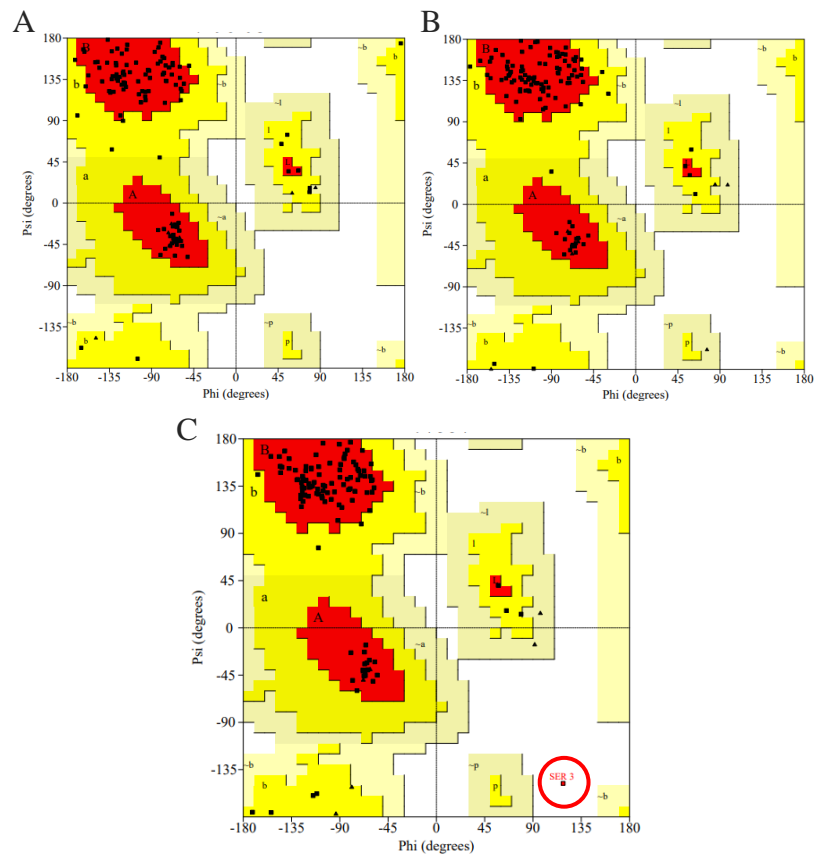
Fonte: PDBsum (2020).

Os modelos 1 e 2 mostram uma grande semelhança, apresentando oito fitas  $\beta$  antiparalelas, modificando apenas a quantidade de aminoácidos em quatro fitas, e sete loopings. Já o modelo 3 apresenta uma fita e um looping a mais, além da disposição diferenciada das fitas, porém ainda todas são antiparalelas. Segundo Thangappan, Wu e Lee (2018), essa conformação de fitas antiparalelas em proteínas barris  $\beta$ , são predominantemente encontradas em proteínas barris  $\beta$  transmembrana.

Além da topografia, para a comparação dos dois novos modelos e o antigo já construído, foi utilizado mais quatro avaliações diferentes. A primeira avaliação foi feita com base no gráfico de Ramachandran, que pode ser observado na Figura 3. As partes vermelhas dos gráficos correspondem as regiões mais favoráveis, as partes amarelas correspondem as regiões adicionalmente permitidas, as partes bege as regiões generosamente permitidas e a parte branca a área não permitida para os resíduos.

Figura 3 – (A) Gráfico de Ramachandran do Modelo 1, que apresenta 87,2% de seus resíduos na região favorável e 12,8% na região adicionalmente permitida. (B) Gráfico de Ramachandran do Modelo 2, que apresenta 91,7% de seus resíduos na região favorável e 8,3% na região adicionalmente permitida. (C) Gráfico de Ramachandran do Modelo 3, que apresenta 91,7% de seus resíduos na região favorável, 7,3% na região adicionalmente permitida e 0,9% na região não permitida. Foi destacado na imagem o aminoácido SER 3 que se encontra na região desfavorável.





Fonte: Procheck (2020).

A partir do gráfico de Ramachandran, pode se observar que os modelos construídos com múltiplas proteínas possuem mais aminoácidos na região favorável, porém o modelo 3 possui um aminoácido dentro da região não permitida, a Serina 3 está com a angulação errada.

A segunda avaliação realizada foi o número do DOPE, o modelo já construído continuou com o melhor DOPE de -1,304, seguido do modelo 3 com -1,477 e por último o modelo 2 com -1,677.

A terceira avaliação efetuada, foi a comparação de escores Z RMS, presentes na Tabela 2. Que devem ser próximos a 1.

Tabela 2 – Comparação de escores Z RMS, marcado em verde claro o melhor.

	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3
Comprimentos de Ligação	1,024	1,04	1,055
Ângulos de Ligação	1,322	1,243	1,341
Restrições de Ângulo Ômega	0,628	0,632	0,512
Planaridade da cadeia lateral	0,237	0,345	0,293

Fonte: SAVES (2020).

O modelo 2 apresenta os melhores escores Z RMS, tendo resultados mais próximos a 1, porém todos os modelos possuem similaridade entre os escores.

A quarta avaliação feita, foi a comparação de escores Z estruturais, presentes na Tabela 3. Que devem ser próximos a 0.

Tabela 3 – Comparação de escores Z estruturais, marcado em verde claro o melhor escore.

	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3
Qualidade de enovelamento de 1ª Geração	-2,018	-3,005	-2,503
Aparência da estrutura do Ramachandran	-2,994	-2,459	-0,939
Normalidade do rotâmero chi-1/chi-2	-1,552	-0,749	0,227
Conformação do suporte principal	-19,277	-19,891	-20,246

Fonte: SAVES (2020).

Segundo os escores Z, o Modelo 1 apresenta dois melhores escores, contudo, os escores dos outros modelos são semelhantes, não tendo uma diferença grande. Já os outros dois escores onde o modelo 3 se saiu melhor, tem uma diferença maior entre os escores dos outros modelos, apresentando um resultado positivo diante dos outros modelos.

Os modelos 1 e 2 apresentam uma maior similaridade estrutural, enquanto o modelo 3 apresenta uma pequena diferença. Os 3 modelos são considerados bons e demonstram a conformidade em barril  $\beta$ , podendo ser utilizados para representar a estrutura da proteína TCL1b.

## CONCLUSÃO

Com a estrutura elucidada computacionalmente, pode-se constatar a forma da proteína TCL1b em barril  $\beta$ . Isso pode ajudar nos experimentos laboratoriais, onde devido ao modelo por homologia, pode-se adotar diretamente um protocolo de resolução de estrutura para proteínas barris  $\beta$ , que segundo Tian et al. (2018) são estruturas complexas e complicadas de se elucidar experimentalmente.

Além disso, pode haver um grande interesse em utilizar a TCL1b para fins medicinais, já que a um avanço na engenharia de nanoporos utilizando proteínas barris  $\beta$  para a aplicação em drogas direcionadas para a terapia de câncer.

## REFERÊNCIAS

ALBERTS, Bruce et al. Proteínas. **Biologia molecular da célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. cap. 3, p. 109-172. ISBN 978-85-8271-423-2.

ANDREJ SALI. **Modeller**. 1989. Disponível em: <https://salilab.org/modeller/>. Acesso em: 6 mar. 2019.

EMBL-EBI. **PDBsum**. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=index.html>. Acesso em: 10 ago. 2020.

GERT VRIEND. **WHAT IF**. Disponível em: <https://swift.cmbi.umcn.nl/whatif/>. Acesso em: 15 jul 2020.

HASHIMOTO, M. et al. Protooncogene TCL1b functions as an Akt kinase co-activator that exhibits oncogenic potency in vivo. **Oncogenesis**, [S. l.], v. 2, n. 70, 16 set. 2013. DOI <https://doi.org/10.1038/oncsis.2013.30>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/oncsis201330#citeas> . Acesso em: 10 ago. 2020.

HIRATA, Noriyuki et al. Inhibition of Akt kinase activity suppresses entry and replication of influenza virus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 450, n. 1, p. 891-898, 2014. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.06.077>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X14011516> . Acesso em: 10 ago. 2020.

NATIONAL SCIENCE FOUNDATION. **Protein Data Bank**. EUA, 2004. Disponível em: <https://www.rcsb.org/> . Acesso em: 5 jul 2020.

NCBI (Org.). **Basic Local Alignment Search Tool**. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> . Acesso em: 7 jul 2020.

NCBI (Org.). TCL1B T cell leukemia/lymphoma 1B [Homo sapiens(human)]. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=nm\\_004918.3](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=nm_004918.3) . Acesso em: 08 set. 2018.

PEKARSKY, Y. et al. Abnormalities at 14q32.1 in T cell malignancies involve two oncogenes. **National Academy of Sciences**, EUA, v. 96, 16 mar. 1999. DOI 10.1073/pnas.96.6.2949. Disponível em: <https://www-pnas.ez48.periodicos.capes.gov.br/content/96/6/2949/tab-article-info> . Acesso em: 10 ago. 2020.

PEKARSKY, Y.; HALLAS, C.; CROCE, C. M. The role of TCL1 in human T-cell leukemia. **Oncogene**, [s. l.], v. 20, n. 40, p. 5638–5643, 2001. Disponível em: <http://search-ebcsohost-com.ez48.periodicos.capes.gov.br/login.aspx?direct=true&db=mdc&AN=11607815&lang=pt-br&site=ehost-live> . Acesso em: 10 ago. 2020

SCHRODINGER, L. L. C. **The PyMOL molecular graphics system**, versão 2.0; 2020.

THANGAPPAN, J.; WU, S.; LEE, S. Comparative Analysis of TM and Cytoplasmic  $\beta$ -barrel Conformations Using Joint Descriptor. **Nature**, [S. l.], 21 set. 2018. DOI <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32136-4>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-32136-4#citeas> . Acesso em: 8 jul. 2020.



TIAN, Wei et al. Structure prediction of  $\beta$ -barrel membrane proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], p. 1511-1516, fev. 2018. DOI 10.1073/pnas.1716817115. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/115/7/1511> . Acesso em: 9 ago. 2020.

UCLA- DOE INSTITUTE. **PROCHECK**. Disponível em: <https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/> . Acesso em: 10 jul 2020.

UCLA- DOE INSTITUTE. **SAVES**, versão 5.0.; 2020. Disponível em: <https://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES/> . Acesso em: 15 jul. 2020.