

Avanços no Processo de Modelagem Molecular Comparativa por Homologia da Estrutura Tridimensional da Enzima Corismato Sintase de *Plasmodium falciparum*

Carla Carvalho de Aguiar, Osmar Norberto de Souza
 Laboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biosistemas - LABIO
 Faculdade de Informática – FACIN
 Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS
 carla.aguiar@acad.pucrs.br, osmar.norberto@pucrs.br
 XXII Salão de Iniciação Científica da UFRGS

Introdução

A malária é uma importante parasitose tropical transmitida ao homem pela picada de mosquitos *Anopheles* infectados com parasitos do gênero *Plasmodium* [1]. Existem quatro espécies de *Plasmodium* causadores da malária em humanos: *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* e *P. falciparum*, sendo, está última, a mais virulenta, responsável pela forma da doença conhecida como malária cerebral [1]. Ademais, *P. falciparum* (Pf) tem apresentado resistência aos fármacos antimaláricos [1,2], revelando a necessidade de novas terapias contra o parasito.

A Via do Ácido Chiquímico (VAC) é uma importante via de síntese de compostos essenciais à sobrevivência do parasito malárico, sintetizando compostos como ubiquinonas, folato e aminoácidos aromáticos [2]. A VAC mostra-se um alvo em potencial de novos fármacos contra a malária, uma vez que está ausente em mamíferos e presente, de forma essencial, no agente da doença [3,4].

A enzima corismato sintase (CS), das sete enzimas da VAC, mostra-se a mais promissora de estudos visando a via como alvo de fármacos antimaláricos, visto que é a única das enzimas da VAC identificada até o momento no agente da malária cerebral, o Pf [5].

A CS de Pf (CS_Pf) possui 527 aminoácidos (aa), dos quais 27,8% (147 aa) apresentam-se como grandes inserções nos alinhamentos desta enzima com a CS de outros organismos (Figura1), dificultando, assim, a predição da sua estrutura tridimensional (3D).

Um modelo 3D da enzima CS_Pf pode contribuir para a busca de compostos capazes de inibi-la e proporcionar novos tratamentos contra a malária.

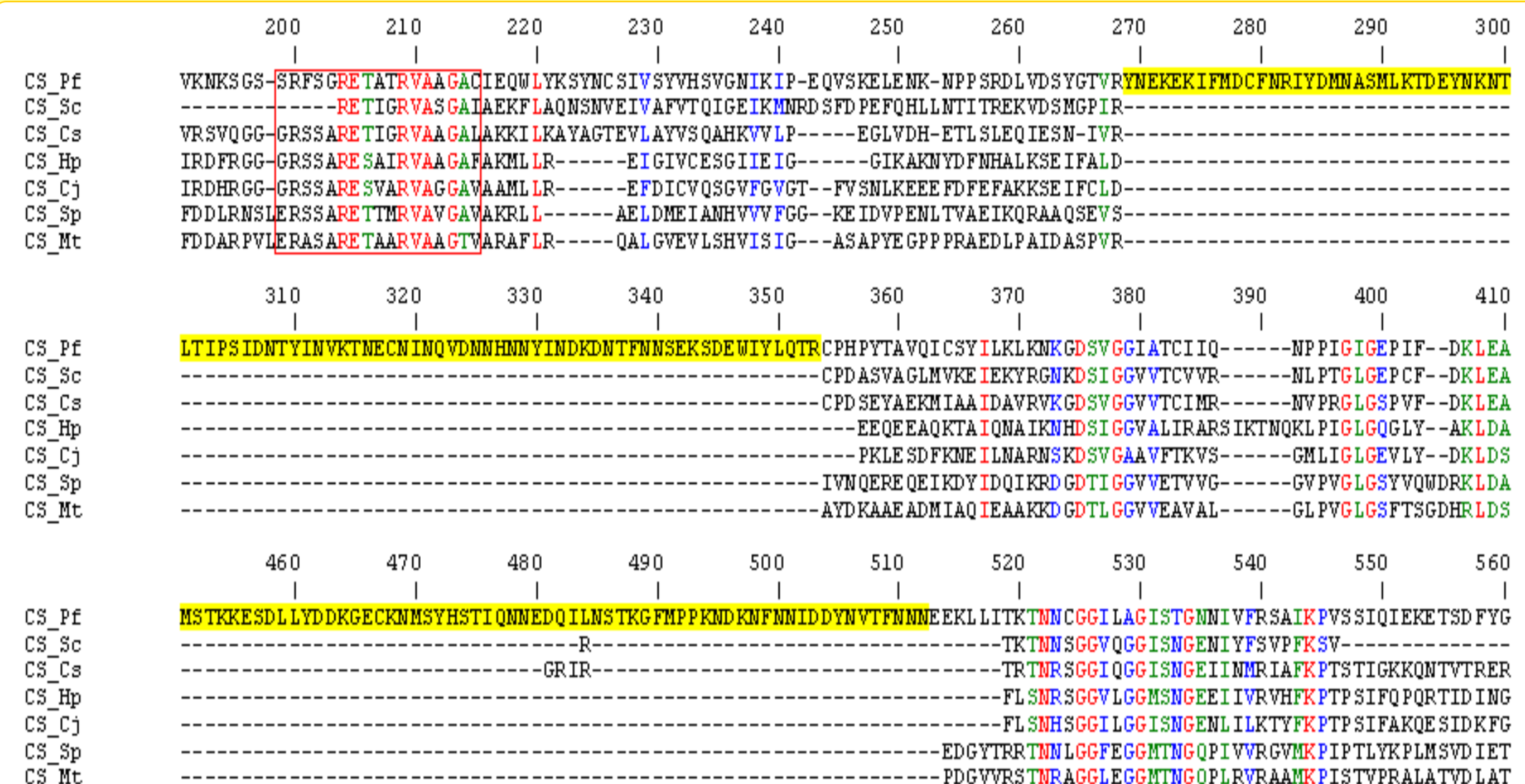
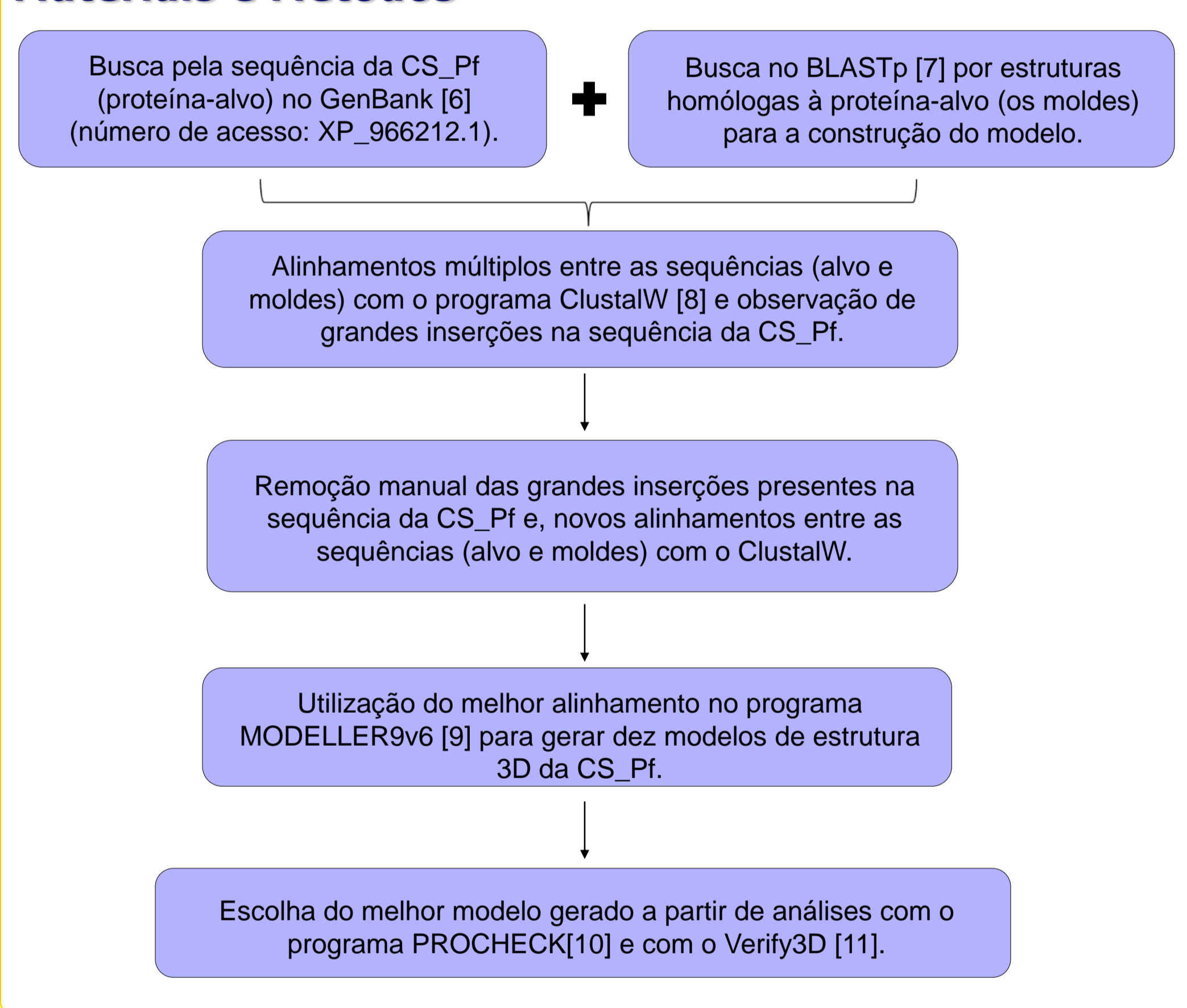


Figura 1. Parte do alinhamento múltiplo entre a corismato sintase de Pf (CS_Pf) e enzimas ortólogas, destacando, em amarelo, as longas inserções presentes na sequência de aminoácido da CS_Pf. CS_Sc: corismato sintase de *Saccharomyces cerevisiae*; CS_Cs: corismato sintase de *Corydalis sempervirens*; CS_Hp: corismato sintase de *Helicobacter pylori*; CS_Cj: corismato sintase de *Campylobacter jejuni*; CS_Sp: corismato sintase de *Streptococcus pneumoniae*; CS_Mt: corismato sintase de *Mycobacterium tuberculosis*. O retângulo destaca uma das assinaturas desta família de enzimas.

Objetivo

Construir um modelo tridimensional da enzima corismato sintase de *Plasmodium falciparum* pelo método da modelagem molecular comparativa por homologia.

Materiais e Métodos



Resultados e Discussão

Como moldes para a construção do modelo 3D da enzima CS_Pf obtivemos as estruturas da CS de *Saccharomyces cerevisiae* (CS_Sc, PDB ID: 1R53) [12], com 31% de identidade com a sequência-alvo; e a CS de *Streptococcus pneumoniae* (CS_Sp, PDB ID: 1QXO) [13], com 19% de identidade com a CS_Pf, mas com a interessante característica de conter o cofator e substrato.

Para a construção do modelo foram manualmente removidos 147 aminoácidos da sequência da proteína-alvo (CS_Pf), correspondentes a resíduos não-usuais às demais sequências desta família de enzimas (Figura 1). A otimização manual proporcionou um melhor alinhamento entre moldes e sequência-alvo (Figura 2).

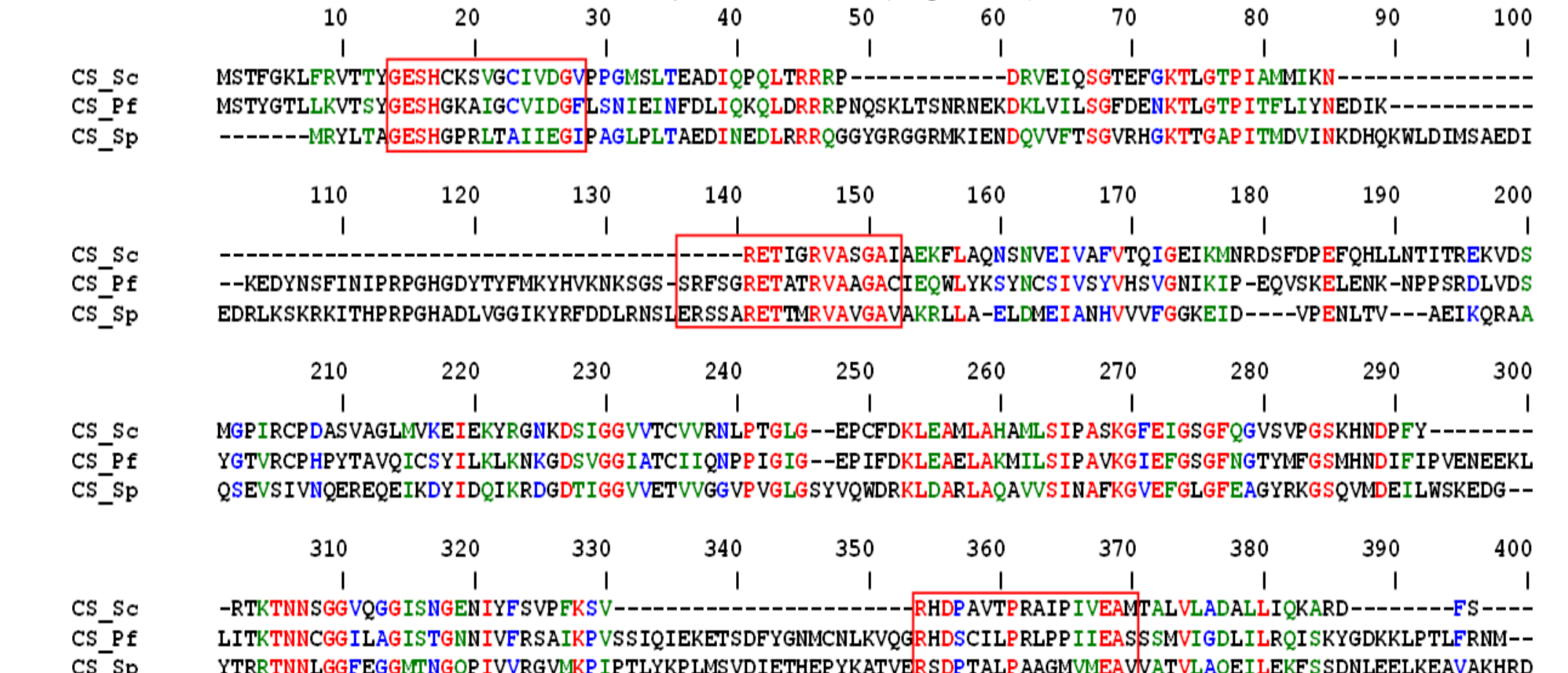


Figura 2. Alinhamento múltiplo entre as sequências das proteínas-molde, CS_Sc e CS_Sp, e a sequência-alvo CS_Pf. CS_Sc: corismato sintase de *Saccharomyces cerevisiae*; CS_Pf: corismato sintase de *Plasmodium falciparum*; CS_Sp: corismato sintase de *Streptococcus pneumoniae*. Os resíduos de aminoácidos de 190 a 274 e de 364 a 425 da sequência-alvo original (GenBank n°: XP_966212.1) foram manualmente removidos para otimizar este alinhamento múltiplo que foi utilizado para gerar os modelos 3D da enzima CS_Pf. As regiões destacadas pelos retângulos contêm as assinaturas da família das enzimas corismato sintase.

O alinhamento entre as sequências molde e a sequência-alvo, utilizado para a predição da estrutura 3D da proteína CS_Pf, preservou as três regiões de assinatura desta família de enzimas (Figura 2), conservando o chamado núcleo da enzima.

Análises com o programa PROCHECK [10] (Figura 3a) e com o Verify3D avaliaram as estruturas geradas e foi possível escolher um, dentre os dez modelos da enzima CS_Pf, como o mais representativo da estrutura da enzima (Figura 3b). Este modelo apresenta um dobramento em sanduíche α/β , com um par de quatro fitas β antiparalelas envolvendo cinco hélices α (Figura 3b).

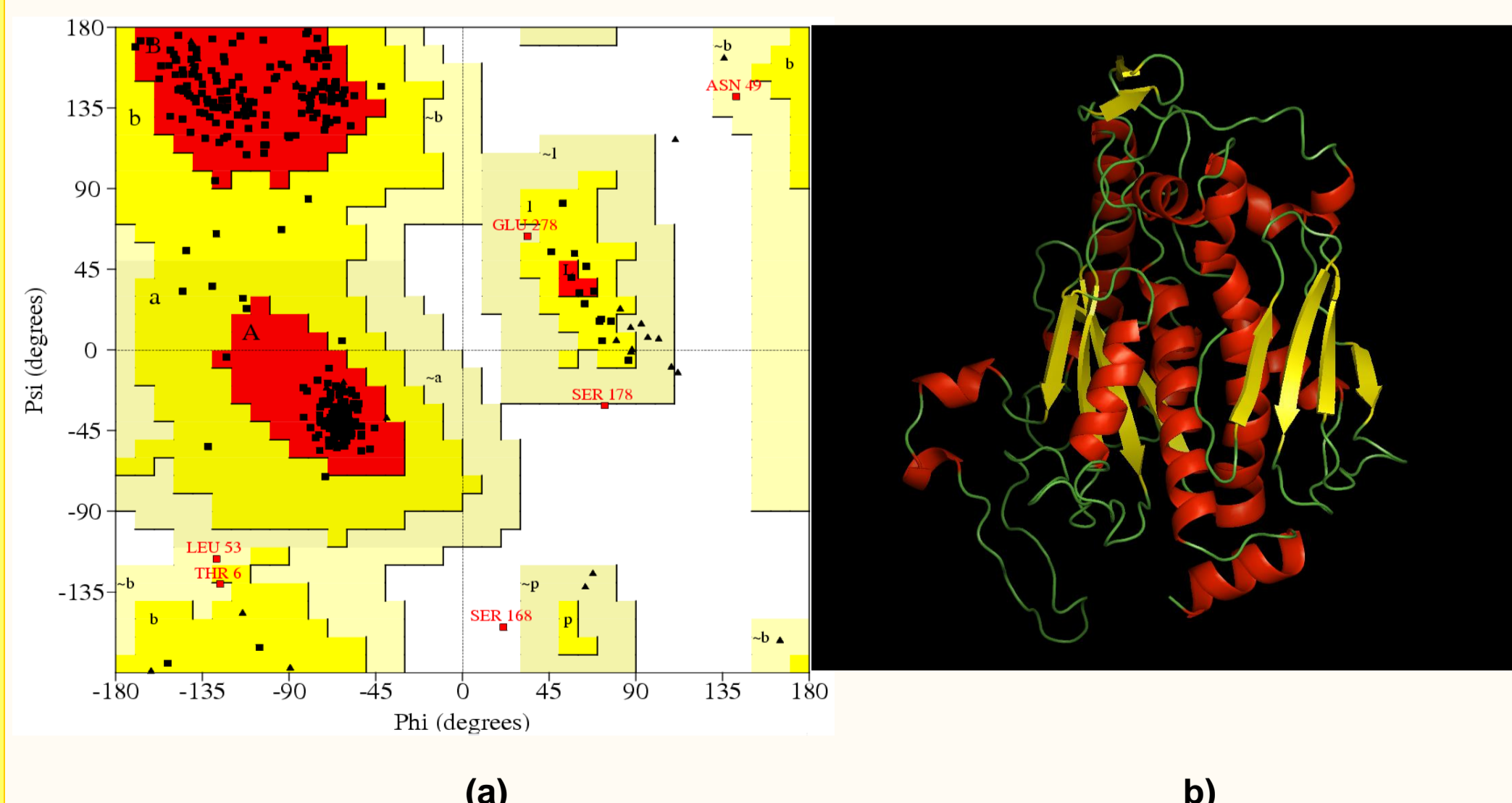


Figura 3. Modelo 3D da enzima corismato sintase de Pf. Em (a) está representado o gráfico de Ramachandran para o melhor modelo dentre os 10 gerados. O gráfico mostra a maioria dos resíduos de aminoácidos (90,8%) nas regiões mais favoráveis (A e B). Em (b) está uma representação tipo ribbons, pelo programa PyMol [14], do modelo 3D da enzima. As folhas β estão coloridas em amarelo, as hélices α em vermelho e as voltas e alças em verde.

Futuros estudos para investigar as implicações da remoção das inserções presentes na sequência da CS_Pf serão explorados por meio de outras técnicas, como dinâmica e docagem molecular. No entanto, não se espera que tais alterações afetem consideravelmente a docagem molecular da enzima com pequenas moléculas do tipo fármaco, visto que, as regiões do núcleo da enzima, onde se concentra a sua função, foram preservadas.

Referências

- [1] White N.J.: Antimalarial drug resistance. J. Clin. Invest. 113(8),1084-1092 (2004).
- [2] Roberts C.W., Roberts F., Lyons R.E., Kirisits M.J., Mui E.J., Finnerty J., Johnson J.J., Ferguson D.J.P., Coggins J.R., Krell T., Coombs G.H., Milhous W.K., Kyle D.E., Tzipori S., Barnwell J., Dame J.B., Carlton J., McLeod R.: The shikimate pathway and its branches in Apicomplexan parasites. J. Infect. Dis. 185(Suppl 1), S25-S36 (2002).
- [3] Herrmann K.M., Weaver L.M.: The shikimate pathway. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50, 473-503 (1999).
- [4] McConkey G.A.: Targeting the shikimate pathway in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Antimicrob. Agents Chemother. 43, 175-177 (1999).
- [5] Fitzpatrick T., Ricken S., Lanzer M., Amrhein N., Macheroux P., Kappes B.: Subcellular localization and characterization of chorismate synthase in the apicomplexan *Plasmodium falciparum*. Mol Microbiol. 40(1), 65-75 (2001).
- [6] Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Wheeler D.L.: GenBank. Nucl. Acids Res. 36(Database issue), D25-D30 (2008).
- [7] Johnson M., Zaretskaya I., Raytselis Y., Merezukh Y., McGinnis S., Madden T.L.: NCBI BLAST: a better web interface. Nucl. Acids Res. 36(Suppl 2), W5-W9 (2008).
- [8] Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl. Acids Res. 22(22), 4673-4680 (1994).
- [9] Sali A., Blundell T.L.: Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. J. Mol. Biol. 234(3), 779-815 (1993).
- [10] Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M.: PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. J. Appl. Crystallogr. 26, 283-291 (1993).
- [11] Lüthy R., Bowie J.U., Eisenberg D.: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. Nature 356, 83-85 (1992).
- [12] Quevillon-Cheruel S., Leulliot N., Meyer P., Graille M., Bremang M., Blondeau K., Sorel I., Poupon A., Janin J., van Tilbeurgh H.: Crystal structure of the bifunctional chorismate synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 279(1), 619-625 (2004).
- [13] Maclean J., Ali S.: The structure of chorismate synthase reveals a novel flavin binding site fundamental to a unique chemical reaction. Structure 11(12), 1499-1511 (2003).
- [14] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2.3pre, Schrödinger, LLC.