MODELAGEM E ESTUDOS ESTRUTURAIS COMPUTACIONAIS DA PROTEÍNA ADAM23 HUMANA

Renan Martins (PIBIC/Fundação Araucária/UEPG), Jorge Iulek, Michele Dietrich Moura Costa (Orientadora), e-mail: mi_dietrich@hotmail.com.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética.

Área e subárea do conhecimento conforme tabela do CNPq: Morfologia, Citologia e Biologia Celular.

Palavras-chave: homologia, biologia molecular, bioinformática.

Resumo

ADAM (**A** **D**isintegrin **a**nd **M**etalloprotease) é uma família de proteínas transmembrana, contendo membros que exercem importante atuação na migração, diferenciação, sobrevivência neuronais e na sinaptogênese. A proteína ADAM23 é expressa predominantemente no encéfalo. Camundongos nocautes para o gene *adam23* apresentam tremores e ataxia e, morrem em aproximadamente duas semanas após o nascimento. Esses dados sugerem um papel importante desta proteína no desenvolvimento do sistema nervoso. Ainda não existem estruturas tridimensionais da ADAM23 nos bancos de dados e, conhecer a estrutura tridimensional da proteína pode dizer muito sobre a sua função. Neste sentido, o trabalho teve como objetivo obter um modelo tridimensional de ADAM23 por modelagem computacional por homologia. Inicialmente, a sequência de aminoácidos da ADAM23 foi obtida. Em seguida foi feita a seleção do melhor molde a ser usado, sendo a proteína ADAM22, o molde selecionado. A partir da seleção do molde foi possível construir cinco modelos para ADAM23 através do *software* MODELLER. Os modelos ainda precisam passar por métodos de validação.

Introdução

As ADAMs (**A** **D**isintegrin **A**nd **M**etalloprotease) são proteínas transmembranas, as quais executam suas funções através da sua topografia única, contendo um domínio metaloprotease, um domínio desintegrina, uma região rica em cisteína, um domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal, uma região transmembrana e uma cauda citoplasmática (EDWARDS et al., 2008). No sistema nervoso, podem atuar na migração, diferenciação e sobrevivência neuronal, no crescimento axonal, na sinaptogênese e na mielinização (YANG et al., 2006). A proteína ADAM23 é um membro da família ADAM expresso predominantemente no sistema nervoso central, tanto durante o desenvolvimento embrionário quanto na fase adulta (SAGANE et al., 1998; LIN et al., 2010). Camundongos nocautes para *Adam23* desenvolvem tremores e ataxia e não sobrevivem mais que duas semanas após o nascimento, sugerindo que esta proteína possui um importante papel no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso central (MITCHELL et al., 2001). Entretanto, até o momento pouco se sabe sobre o papel biológico desta proteína.

Para entender como uma proteína está envolvida em interações biológicas, é de extrema importância o estudo da estrutura tridimensional da biomolécula

(NELSON E COX, 2014). A estrutura deste tipo de macromolécula pode ser determinada por cristalografia de raios-X e Ressonância Nuclear Magnética, por exemplo. Essas técnicas experimentais ainda são consideradas o melhor processo para a obtenção da estrutura. Entretanto, essas técnicas são muito custosas, podem levar anos e em alguns casos a estrutura pode não ser obtida (VERLI, 2014). Nesse sentido, se mostram relevantes os métodos computacionais para a predição de estrutura de proteínas. Os métodos computacionais, além de serem mais baratos e, em alguns casos, podem ser a única alternativa para estudar o enovelamento proteico da biomolécula (VERLI, 2014).

Como já descrito por Costa (2010), a purificação da proteína recombinante ADAM23 a partir de sistemas heterólogos (*Escherichia coli* e em linhagem de célula de mamífero HEK293T) apresenta um baixo rendimento e grau de pureza inadequado para ser utilizada em experimentos de cristalografia de raios X. Sendo assim, a modelagem computacional torna-se uma ferramenta de grande valia para preliminarmente se estudar a estrutura desta proteína. O objetivo geral deste projeto foi obter um modelo tridimensional para a proteína ADAM23 de *Homo sapiens,* o que possivelmente pode trazer sugestões sobre suas funções e papéis biológicos.

Materiais e Métodos

Técnica de Modelagem Molecular por Homologia.
Para a obtenção de um modelo de ADAM23 foi utilizado o método de modelagem por homologia, realizada por técnica computacional (*in silico*)**.** Esta técnica também é considerada template-based (baseada em molde).

Obtenção da sequência de ADAM23 e identificação de referências.
No banco de dados GenBank, NCBI (*National Center For Biotechnology Information*) foi feita a busca da sequência-alvo de aminoácidos a ser estudada, a qual foi usada em etapas posteriores do estudo. Em seguida foi realizado um alinhamento local da sequência-alvo contra sequências com estruturas resolvidas (modelo tridimensional conhecido) depositadas no PDB (*Protein Data Bank*), usando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), do NCBI.

Seleção dos moldes.
Foi realizada a seleção através do BLAST e também usando o *software* de Modelagem Molecular MODELLER (WEBB e SALI, 2014). Avaliando a qualidade das referências, identidade, similaridades, homologia, gaps e considerando a função biológica das sequências molde e alvo.

Alinhamento Global.
Nesta etapa, toda a extensão da sequência de aminoácidos de ADAM23 foi alinhada com a sequência molde obtida (*template*), através de *script* preparado e executado no programa MODELLER.

Construção do modelo.
A partir do alinhamento global, usando o programa MODELLER, o qual possui algoritmos específicos que utilizam informações da estrutura tridimensional molde para a formação de vários modelos da proteína-alvo, foram criados os modelos tridimensionais de ADAM23.

Resultados e Discussão

Em sistema operacional Windows iniciou-se as instalações do MODELLER, PyMOL, *softwares* de visualização de estruturas e outros *softwares* necessários para o desenvolvimento do projeto. Após as instalações dos *softwares* iniciou-se a primeira etapa da modelagem por homologia, na qual foi obtida a sequência-alvo de ADAM23 através de busca *online* no GenBank. A sequência da proteína ADAM23 foi observada no formato FASTA, que disponibiliza a sequência de aminoácidos completa para a proteína, tendo o seguinte código do GenBank: [AAI32766.1].

Depois de obtida a sequência-alvo (ADAM23) foi iniciada uma busca por referências tridimensionais para serem usadas como proteína molde (*template*) na modelagem por homologia. A ferramenta BLAST, após ser configurada para trabalhar com sequências de estruturas conhecidas e disponíveis no PDB (*Protein Data Bank*), gerou como resultado a indicação da ADAM22 como um molde de 57% de identidade em relação à homóloga ADAM23.

Em seguida foi iniciado o uso do MODELLER e após execução de *scripts* por este programa (WEBB e SALI, 2014), confirmou-se como sequência molde a ADAM22 com seu respectivo código do GenBank: [AAI25119.1]. Então foi realizado um alinhamento (ou pareamento) global da sequência-alvo ADAM23 com a sequência molde ADAM22 (WEBB e SALI, 2014).

A última etapa realizada pelo MODELLER foi a construção dos modelos tridimensionais, a partir dos arquivos de alinhamento gerados. O programa construiu cinco modelos de ADAM23 no formato PDB (.pdb), o mesmo formato usado para depositar as estruturas cristalográficas de referência no *Protein Data Bank*. As cinco estruturas obtidas pela ADAM23 foram satisfatoriamente geradas e analisadas em programa de visualização de moléculas (PyMol).

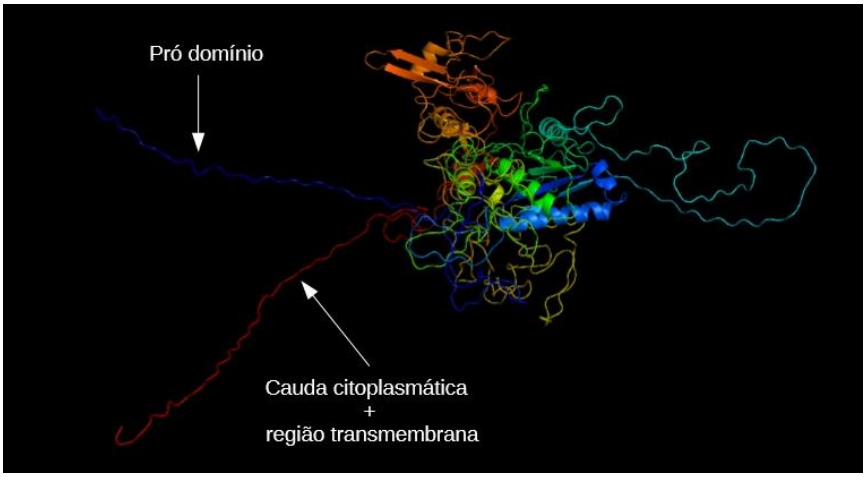


Figura 1 – Estrutura tridimensional de ADAM23 obtida por modelagem computacional por homologia. Figura representativa de um dos cinco modelos tridimensionais obtidos a partir do MODELLER e visualizada no PyMol.

Como a estrutura molde de ADAM22 depositada no PDB é composta apenas pelo seu ectodomínio (sem pró domínio, sem região transmembrana e cauda citoplasmática) entende-se porque a cauda citosólica e o pró domínio não foram modelados adequadamente. Essas regiões correspondem ao início e ao fim da

sequência de aminoácidos, e que nos modelos obtidos neste trabalho apresentaram-se lineares.

Conclusões

A sequência-alvo de aminoácidos de ADAM23 foi obtida no GenBank.
A proteína ADAM22 foi selecionada como sequência molde.
Cinco modelos de ADAM23 foram obtidos por homologia usando o programa Modeller.

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora Michele Dietrich Moura Costa e ao professor Jorge Iulek, que possibilitaram a realização deste trabalho.
A Fundação Araucária, pelo financiamento concedido, ao CNPq e todo seu fomento às atividades.
Agradeço à Universidade Estadual de Ponta Grossa, instituição pública e gratuita.

Referências

COSTA, M.D.M. **Caracterização da interação da proteína ADAM23 com a proteína príon celular e avaliação da função biológica desta interação**. 167 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

EDWARDS, D.R.; HANDSLEY, M.M.; PENNINGTON, C.J. The ADAM metalloproteinases. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 29, p. 258-289, 2008.

LIN, J.; YAN, X.; MARKUS, A.; REDIES, C.; ROLFS, A.; LUO, J. Expression of seven members of the ADAM family in developing chicken spinal cord. **Dev Dyn**. 2010. 239(4):1246-54.

LIU, S.; LIU, Z. Bioinformatics in Aquaculture: Principles and Methods. **John Wiley & Sons Ltd.** 2017.

MITCHELL, K.J.; PINSON, K.I.; KELLY, O.G.; BRENNAN, J.; ZUPICICH, J.; SCHERTZ, P.; LEIGHTON, P.A.; GOODRICH, L.V.; LU, X.; AVERY, B.J.; TATE, P.; DILL, K.; PANGILINAN, E.; WAKENIGHT, P.; TESSIER-LAVIGNE, M.; SKARNES, W.C. Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development. **Nature Genetics.** 2001.28: 241-249.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** 6. ed. Rio de Janeiro: ARTMED, 2014.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. Current Protocols in Bioinformatics, John Wiley & Sons, Inc., 5.6.1-5.6.32, 2014.

SAGANE, K.; OHYA, Y.; HASEGAWA, Y.; TANAKA, I. Metalloproteinase-like, desintegrin-like, cysteine-rich proteins MCD2 and MCD3: novel human cellular disintegrins higly expressed in the brain**. Biochemistry Journal.** 1998. 334: 93-98.

VERLI, H. **Bioinformática: da Biologia à flexibilidade molecular**. 1. ed**.** São Paulo: SBBq, 2014

YANG, P.; BAKER, K.A.; HAGG, T. The ADAMs family: Coordinators of nervous system development plasticity and repair. **Progress in Neurobiology**. 2006. 79:73-94.