

ANÁLISE COMPUTACIONAL DE DOIS NOVOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS BIOINSPIRADOS EM UM INIBIDOR DE PEPTIDASE DE SEMENTE DE *Inga laurina*.

Suellen R. Ramalho¹, Luís H. de O. Almeida², Maria Lígia R. Macedo³

1. Estudante de Doutorado em Saúde (PPGSD-UFMS)
2. Estudante de Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade (FACFAN-UFMS)
3. Professora Doutora Titular/Orientadora (FACFAN-UFMS)

Resumo

A descoberta de novos agentes com atividade biológica a partir de plantas conduziu ao isolamento de muitas substâncias. Diante das perspectivas negativas, devido ao surgimento da multirresistência, novas estratégias a essa multirresistência tem recebido maior atenção, e os peptídeos antibacterianos (PAMs) surgem como promissores combatentes a esses microrganismos. Foi selecionada a proteína de *Inga laurina* (ILTI) para a obtenção de PAMs por meio de análises *in silico*. O ILTI é uma proteína bem caracterizada na literatura, o ILTI recombinante proteína (reILTI) foi purificado e expresso, tanto o ILTI nativo quanto o reILTI exibiram um forte efeito inibitório semelhante e propriedades multifuncionais. Os PAMs obtidos foram estudados em diferentes *softwares* computacionais visando a predição de efeitos antimicrobianos, sendo futuramente testados *in vitro*, com perspectiva de que os PAMs atuem como novas drogas e/ou fármacos contra a resistência de microrganismos.

Autorização legal: SISGEN A297FAA.

Palavras-chave: predição; PAMs; *in silico*.

Apoio financeiro: FUNDECT, CNPQ, CAPES

Introdução

Durante várias décadas, a resistência antimicrobiana tem sido uma ameaça crescente para o tratamento de uma gama cada vez maior de infecções causadas por bactérias, parasitas, vírus e fungos. A resistência desses patógenos causam a redução efetiva de medicamentos antibacterianos, antiparasitários, antivirais e antifúngicos, tornando o tratamento mais difícil.

A resistência é um desafio complexo da saúde pública mundial, e nenhuma estratégia única ou simples pode conter totalmente o surgimento e propagação de microrganismos infecciosos que se tornam resistentes aos antimicrobianos disponíveis. O desenvolvimento contínuo é um fenômeno natural em microrganismos, acelerado pela pressão seletiva exercida pelo uso abusivo de agentes antimicrobianos em seres humanos e animais (WHO, 2014). Devido ao surgimento de muitos microrganismos patogênicos, a capacidade quase que imediata de replicação e sua resistência aos antibióticos disponíveis, houve um grande interesse no isolamento de moléculas com potencial antimicrobiano.

Embora o estudo seja relativamente recente, milhares destas moléculas já foram isoladas e tiveram sua ação comprovada. Destas, a grande maioria apresenta atividade antimicrobiana de grande importância no sistema de defesa do organismo (JENSSEN *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2008).

Além de peptídeos antimicrobianos (PAMs) de origem animal, muitos de origem vegetal foram descritos e tem sido constantemente estudado. Embora por um mecanismo mais complexo, porém semelhante, os PAMs codificados por genes de plantas mostram um padrão de expressão que é também consistente com uma função de resposta ao ataque de patógenos (GARCÍA-OLMEDO *et al.*, 2001).

Diante das necessidades estabelecidas, buscamos desenvolver PAMs com potente atividade biológica frente microrganismosa partir da projeção *in silico* utilizando ferramentas de bioinformática para caracterização, e, com o intuito de tentar minimizar os impactos financeiros da síntese de peptídeos, objetivamos estabelecer critérios teóricos os quais consideramos importantes para que uma sequência predita tenha atividade *in vitro*. Dentro desse contexto, utilizamos como modelo para obtenção das sequências de peptídeos a proteína de *Inga laurina* (ILTI).

Metodologia

A análise *in silico* consiste em um procedimento baseado em ferramentas computacionais utilizado para testar uma hipótese (STEVENS *et al.*, 2003). A fim de desenvolver PAMs com atividade antimicrobiana potencializada, foi realizado o estudo de peptídeos com dezoito resíduos de aminoácidos.

Para obtenção dos peptídeos e predição da atividade antimicrobiana, a sequência de ILIT com 178 resíduos de aminoácidos foi submetida a clivagem *in silico* através do *software Collection of Antimicrobial Peptides* (CAMPR3) o qual é dividido em quatro algoritmos que buscam através de base de dados como UniProt e PubMed PAMs já identificados e também peptídeos que podem apresentar atividade antimicrobiana com base em cálculos de probabilidade (WAGHU *et al.*, 2016). As sequências com a melhor confiança de predição para PAMs foram analisadas no *The Antimicrobial Peptide Database* (APD3), um banco de dados abrangente para

PAMs (WANG *et al.*, 2004, 2009 e 2016).

Os peptídeos que apresentaram as melhores probabilidades de PAMs foram então selecionados e analisados as suas sequências, onde foi feita a projeção de roda helicoidal, para verificar os resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos do peptídeo, utilizando o software Helical Wheel Projections (RICHARDSON *et al.*, 1986) e feito o estudo do peptídeo, onde foram feitas mudanças de posicionamento dos resíduos de aminoácidos e então, quando houve a necessidade, a substituição dos resíduos presentes na estrutura por outros que impunham a molécula em questão características mais favoráveis para que a atividade antimicrobiana fosse potencializada, deixando a molécula com caráter anfipático, tanto para interação com o meio quanto para interação com a membrana da bactéria.

Após a estruturação linear dos PAMs, foram realizadas análises com relação a sua disposição espacial, ou seja, um estudo a respeito das estruturas tridimensionais através da modelagem *Ab initio* utilizando o programa I-TASSER, o qual faz previsões estruturais e funcionais muito precisas usando algoritmos de ponta, onde modelos atômicos completos são construídos por simulações interativas (ZHANG, 2008).

O valor da hidrofobicidade média foi calculado para cada sequência deste estudo de acordo com a escala de Eisenberg, através da ferramenta computacional de análise de sequência peptídica ExPASy – ProtScale, desenvolvida por GASTEIGER *et al.* (2005).

Os modelos teóricos de energia livre mais baixos para os peptídeos foram então selecionados e usados para procedimentos de validação. O software PROCHECK avaliou a geometria do peptídeo, a estereoquímica e a distribuição de energia.

Resultados e Discussão

O uso indiscriminado de antibióticos pela população tornou-se uma preocupação pública e social, levando ao fenômeno de resistência a múltiplos fármacos (CAO *et al.*, 2017), especialmente em hospitais e comunidades onde as classes de antibióticos já não podem ser eficazes para combater infecções causadas por bactérias resistentes (XIE *et al.*, 2017). Neste contexto, vários esforços estão sendo realizados pela comunidade científica, com o objetivo de desenvolver alternativas favoráveis para combater infecções causadas por esses microrganismos patógenos.

O primeiro passo deste trabalho consistiu na utilização do banco de dados, *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), o qual foi necessário para se obter a sequência de resíduos de aminoácidos do inibidor de peptidase de *Inga laurina* (ILTI), uma proteína composta por 178 aminoácidos que está disposta na seguinte sequência em código: EVVVDSDGEMLRNGGKYYLSPANPIGGGAIISAAIRHGDHLCSLAVVSA RYTNWAVTISSPYKAAFIKTSWPLNLRFAYLAPNVCTNSPNWVVVKSRSLGEAVMLGDKQEFGNFVSGSFSI ETHDTEKHHYKLVFRQQGQESANIGVKLDSERRRLVVTDKALIFKFDKVKDN.

Da clivagem de ILIT obteve-se um total de 161 peptídeos, com 18 resíduos de aminoácidos cada. Desse total de peptídeos, apenas dois peptídeos foram selecionados para estudos e para posterior síntese. Essas sequências com maiores previsões a ser PAMs foram inseridas no programa APD3, onde foram analisadas características físico-químicas como Carga Total, Índice de Bowman, Massa Molar e Hidrofobicidade.

Com base na sequência do peptídeo inicial inspirado de ILTI foram realizadas modificações pontuais, sendo que para o peptídeo KW11 houve substituições de 11 resíduos de aminoácidos. Adicionalmente para o peptídeo IKR2, houve substituição de 12 resíduos. As modificações resultaram na redução das taxas de hidrofobicidade e aumento do momento hidrofóbico de ambos os modelos projetados em relação ao peptídeo modelo.

Dentre os peptídeos obtidos a sequência KW11 apresentou massa molar de 2471.08, probabilidade de 89% de ser PAM, +2 de carga líquida total, 44% de hidrofobicidade, 9,7 de pl e índice de Boman 0,05 Kcal/mol. As modificações na sequência original resultaram no peptídeo, com tendência a formar uma α -hélice de caráter anfipático contendo 50% de hidrofobicidade, +6 de carga, 11,12 de pl e índice de Boman 2,21 Kcal/mol, apresentando características com melhor potencial de um PAM e aumento da probabilidade para 97%. A sequência IKR2 apresentou massa molar 2505.14, probabilidade de 78% de ser PAM, +2 de carga líquida total, 44% de hidrofobicidade, 9,7 de pl e índice de Boman 0,11 Kcal/mol. Após as modificações estruturais a probabilidade aumentou para 99% de ser PAM, +8 de carga líquida total, 44% de hidrofobicidade, 11.30 de pl e índice de Boman 2,21 Kcal/mol.

Os modelos escolhidos foram validados pelo ProSA-web (WIEDERSTEIN & SIPPL, 2007), apresentando valor de Z-score de -1.3 para a sequência KW11 e -1.19 para sequência IKR2, mostrando que as estruturas de entrada estavam dentro do intervalo de pontuações encontradas para peptídeos de tamanho similar depositados no PDB e resolvidas por RMN. O servidor PROCHECK (LASKOWSKI *et al.*, 1993) mostrou uma pontuação média para os ângulos diedros juntamente com forças covalentes da cadeia principal dentro do intervalo esperado para uma estrutura confiável (> -0,05). O mapa de Ramachandran mostrou que 100% dos resíduos de aminoácidos estão localizados nas regiões mais favoráveis.

Os PAMs escolhidos e projetados foram aqueles que possuíam carga total positiva, foram descartados todos que possuísem carga total negativa ou neutra. Os fatores determinantes dos mecanismos microbicidas dos PAMs estão relacionados às características das membranas celulares das células microbianas e a natureza físico-química do peptídeo (Liang & Kim, 1999). A presença de resíduos com carga positiva é uma propriedade importante para a ação lítica da maioria dos PAMs, pois o ajuda a alcançar seu alvo, incluindo especialmente moléculas aniônicas, como a membrana plasmática (HANCOCK, ROZEK, 2002). A atividade e a seletividade dos peptídeos catiônicos são determinadas pelo modo de interação com as membranas celulares dos microrganismos, pois facilita a ligação e inserção a membrana das células microbianas.

Foi realizada a análise dos pontos isoelétricos, sendo selecionados apenas os peptídeos que apresentassem ponto isoelétrico elevado (acima de 8,0), todos os outros peptídeos foram desconsiderados. O valor de pH no qual o aminoácido, peptídeo ou proteína ficam eletricamente neutros (número de cargas positivas igual ao de cargas negativas) corresponde ao ponto isoelétrico (pI). O valor de pI é uma constante de uma molécula, em particular, em condições específicas de força iônica e temperatura. Desta forma, em pH fisiológico (pH = 7) espera-se peptídeos com pI acima de 7,0, o que proveria uma carga elétrica líquida positiva, tone-se um peptídeo viável para ação antibacteriana, uma vez que a membrana plasmática bacteriana tem carga negativa, possibilitando sua ação (PIHLASALO *et al.*, 2012).

O índice Boman é um parâmetro capaz de prever o potencial de interação de um determinado peptídeo ou proteína com outras proteínas. A ligação das proteínas à membrana é baseada tanto em interações hidrofóbicas quanto em interações de cargas entre a membrana e as proteínas (BOMAN, 2003). Contudo, pode-se afirmar que esse cálculo consiste em um modo simples e eficiente de distinguir a atividade antimicrobiana de uma possível ação hormonal de um peptídeo (BOMAN, 2003). Assim, dentre os peptídeos que obtidos da clivagem, foram selecionados aqueles que apresentaram índice Boman em torno de 2,00 kcal/mol.

Para avaliar se a sequência do peptídeo de origem apresentava uma conformação anfipática, foi analisada a roda helicoidal gerada pelo *software Helical Wheel Projections*, onde foi constatado que seriam necessárias alterações nas estruturas dos peptídeos para que os mesmos atingissem a conformação desejada. Para isso foi feita uma reordenação dos resíduos de aminoácidos e também substituições de resíduos, afim de corroborar com o aumento atividade antimicrobiana teórica. Onde verificou-se que os peptídeos obtidos a partir do desenho com auxílio computacional possuem uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica, garantindo assim o caráter anfipático. A adesão celular é um processo complexo afetado por vários fatores como o comportamento celular, propriedades de superfície do material, e fatores do meio. Dentre as propriedades de superfície do material encontram-se a hidrofobicidade, carga, rugosidade e composição química. Por sua vez, a hidrofobicidade é um conhecido fator chave no controle da adesão celular, e estudos prévios indicam que quanto mais hidrofílica a superfície de materiais, maior a adesão celular. Em superfícies hidrofílicas, células geralmente mostram bom espalhamento, proliferação e diferenciação (CHANG & WANG, 2011).

Então, neste trabalho, através da alteração dos parâmetros físico-químicos foi possível fazer alterações em dois peptídeos escolhidos de acordo a predição da atividade antimicrobiana informada pelos algoritmos do programa CAMPR3 e características físico-químicas e estruturais obtidas *in silico*, onde essas alterações levaram ao melhoramento da estrutura e das características físico-químicas de modo que houvesse, teoricamente, um aumento na atividade antimicrobiana

Conclusões

Portanto, com este trabalho podemos gerar uma rota teórica para o desenvolvimento de um método eficiente que condicionasse ao desenvolvimento de PAMs *in silico*. E para isso, testamos alguns parâmetros que consideramos importantes e tivemos possibilidade de acesso, onde foram selecionados dois fragmentos, identificados por KW11 e IKR2, que passaram por análises de características físico-químicas, modelagem molecular, validação dos modelos e estabilidade das moléculas. Esses dois peptídeos escolhidos apresentam elevada probabilidade de serem antimicrobianos e alta estabilidade estereoquímica, onde em estudos posteriores serão sintetizados e avaliados frente cepas bacterianas e fúngicas *in vitro*.

Referências bibliográficas

BOMAN H.G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. **Journal of Internal Medicine**, v. 254, 2003.

CAO, H. et al. Prevalence and risk factors for antimicrobial resistance on US dairy operations. **Journal of Animal Science**, v. 95, 2017.

CHANG, H. et al. Cell responses to surface and architecture of tissue engineering scaffolds. **Regenerative medicine and tissue engineering: cells and biomaterials**, v.1, 2011.

GARCÍA-OLMEDO, F. et al. Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxyxynitrite in plant defense. **FEBS Letters**, v.498, 2001.

GASTEIGER, E. et al. **The Proteomics Protocols Handbook**, p. 571-607, Humana Press, 2005.

GIULIANI, A. et al. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. **Open Life Sciences**, v. 2, 2007.

LASKOWSKI, R.A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of applied crystallography**, v. 26, 1993.

HANCOCK, R.E.W. et al. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.97, 2000.

JENSSEN, H. et al. Peptide antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v.19, 2006.

- PIHLASALO, S. et al. Method for Estimation of Protein Isoelectric Point. **Analytical Chemistry**, v. 84, 2012.
- RICHARDSON, J.S. et al. Amino acid preferences for specific locations at the ends of α helices. **Science**, v. 240, 1988.
- ROZEK A. et al. Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. **Biochemistry**, v. 39, 2000.
- STEVENS, R. A. et al. Ontology-based knowledge representation for Bioinformatics. **Briefs in Bioinformatics**, v.1, 2000.
- WAGHU, F. H. et al. CAMPR3: a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 44, 2016.
- WANG, G. et al. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. **Nucleic Acids Research**, v.37, 2008.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance**, v. 194, 2014.
- XIE, J. et al. Clinical features and antimicrobial resistance profiles of important Enterobacteriaceae pathogens in Guangzhou representative of Southern China, 2001 – 2015. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, 2017.
- ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**. v. 9, 2008.
- WANG, G. et al. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Research**, v. 44, 2016.
- WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. **Nucleic Acids Research** v. 37, 2009.
- WANG, Z. et al. APD: the antimicrobial peptide database. **Nucleic Acids Research**, v. 32, 2004.
- WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic acids research**, v. 35, 2007.