

## Introdução a ferramentas de simulação e modelagem computacional de proteínas de interesse biotecnológico

### Introduction to simulation and computational modelling tools of proteins of biotechnological interest

Marlon Roberto Varela Texeira<sup>1</sup>, Rafael Bertolini Frigori<sup>2</sup>

#### RESUMO

A doença de Alzheimer é uma das principais causas de demência, causada pela formação de fibrilas insolúveis de agregados peptídicos, cujo componente crucial é o amilóide-beta 42. Mutações nos sítios 22 ou 23 de sua estrutura primária agravam a doença. O presente estudo simulou a propensão à agregação de três desses mutantes ("Iowa", "Dutch" e "Italian"). Este estudo *in silico* empregou os *softwares* Aggrescan, que determina de forma heurística a propensão a agregação de cada mutante; o I-TASSER, capaz de modelar por homologia a estrutura terciária do peptídeo a partir de modelos do PDB utilizando a sequência primária e, a partir dos resultados deste, o PBEQ Solver, utilizado para resolver numericamente a equação de Poisson-Boltzmann e, assim, determinar a energia livre de solvatação do peptídeo. Os resultados desses *softwares* revelaram a seguinte ordem crescente de propensão à agregação: Italian, Iowa e Dutch. Confrontamos então nossos resultados com outros, obtidos *in vitro* e *in silico*, relatados na literatura. Constatamos que a compreensão do mecanismo de agregação da amilóide-beta 42 ainda é desafiadora, particularmente porque sua preparação e sensibilidade às condições do meio impactam sobremaneira os resultados *in vitro*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Agregação, Alzheimer, modelagem.

#### ABSTRACT

Alzheimer's disease is one of the main causes of dementia, caused by the formation of insoluble fibrils of peptide aggregates, whose crucial component is amyloid-beta 42. Mutations in sites 22 or 23 of its primary structure worsen the disease. The present study simulated the aggregation propensity of three such mutants ("Iowa", "Dutch", and "Italian"). This *in silico* study used Aggrescan software, which heuristically determines the aggregation propensity of each mutant; the I-TASSER, capable of modeling by homology the tertiary structure of the peptide from PDB models using the primary sequence and, based on its results, the PBEQ Solver, used to numerically solve the Poisson-Boltzmann equation and, thus, determine the free energy of solvation of the peptide. The results of these software revealed the following ascending order of aggregation propensity: Italian, Iowa and Dutch. We then compared our results with others, obtained *in vitro* and *in silico*, reported in the literature. We found that understanding the mechanism of amyloid-beta 42 aggregation is still challenging, particularly because its preparation and sensitivity to environmental conditions greatly impact *in vitro* results.

**KEYWORDS:** Aggregation, Alzheimer, modelling.

## INTRODUÇÃO

Proteínas, enquanto heteropolímeros compostos por aminoácidos (AAs), adquirem estrutura tridimensional a partir das interações entre seus monômeros constituintes (sequência primária) e a partir destes com o meio circundante (Nelson e Cox, 2019). O enovelamento protéico ocorre com a progressiva formação de estruturas com menor energia, afunilando as possibilidades de organização (Nelson e Cox, 2019).

<sup>1</sup> Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Universidade Tecnológica do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: marlontexeira@gmail.com. ID Lattes: 1686062650100463.

<sup>2</sup> Docente no Curso de Engenharia Eletrônica/COELE-TD/PPGQB-TD. Universidade Tecnológica do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: frigori@utfpr.edu.br. ID Lattes: 5836878566801544.

Durante esse processo, é possível a ocorrência de estados tridimensionais com mínimo local de energia livre, chamados de semiestáveis ou metaestáveis (Nelson e Cox, 2019). Um caso em que estes ocasionam efeitos deletérios é o Mal de Alzheimer (AD), doença neurodegenerativa que acarreta demência e perda de memória (Nelson e Cox, 2019; Murakami *et al*, 2003). O AD pode ser causado pela deposição de fibrilas protéicas insolúveis no meio intra e extracelular, causando a morte das células (Chen *et al*, 2017).

Estas fibrilas possuem como componente crítico o peptídeo amiloide-beta de 42 AAs (A $\beta$  42), o qual possui variantes especialmente tóxicas com mutações nos sítios 22 e 23 de sua sequência primária (Chen *et al*, 2017; Mitternacht *et al*, 2010). Uma vez que essas mutações ocorrem dentro do aglomerado central hidrofóbico (*central hydrophobic cluster*, CHC), local importante para a interação entre os monômeros, tornam os mutantes mais neurotóxicos e amiloidogênicos do que a proteína nativa (Murakami *et al*, 2003; Chong, Yim e Ham, 2013).

A compreensão do mecanismo de agregação destes mutantes, até o momento limitada, dificulta o desenvolvimento de terapias que inibam o processo (Sureshbabu *et al*, 2010). Assim, o estudo deste torna-se fundamental. Uma das formas de fazê-lo é através de modelagem computacional (*in silico*). Três ferramentas que podem ser utilizadas são os *softwares* I-TASSER, PBEQ Solver e Aggrescan. O I-TASSER modela uma estrutura protéica desconhecida, tendo como base sua sequência primária, usando homologia, ou seja, a partir de uma base de dados de proteínas com estrutura conhecida (Danzer e Frigori, 2023). O PBEQ Solver parte dos dados gerados em formato .PDB pelo I-TASSER para resolver numericamente a equação de Poisson-Boltzmann (Eq. 1).

$$\nabla^2 V = \frac{-\rho v}{\epsilon} = \rho v = c_0 e \left[ e^{-\frac{eV(x,y,z)}{k_B T}} - e^{\frac{eV(x,y,z)}{k_B T}} \right] \quad (1)$$

Esta considera o meio um *continuum* dielétrico, o que facilita a modelagem (Jo *et al*, 2008; Lu *et al*, 2008), incluindo na identidade a distribuição estatística de cargas (terceiro termo). O resultado é a energia livre de solvatação da proteína modelada. O Aggrescan prediz a ocorrência de *hot spots* (HS) para a agregação em uma cadeia polipeptídica, partir de sua sequência primária, fornecida pelo usuário em formato FASTA (Conchillo-Solé *et al*, 2007). Ele faz isso atribuindo valores de agregação para os AAs por comparação com bases de dados.

Assim, o objetivo deste estudo foi o de modelar, utilizando as ferramentas computacionais supracitadas, a propensão a agregação de algumas dos mutantes da proteína A $\beta$  42, a saber: Nativa (WT), “Arctic”, “Dutch”, “Iowa” e “Italian”, e comparar os resultados obtidos com os da literatura, de forma a validar o que foi obtido neste trabalho por meio do método *in silico*, e também lançar luz sobre o mecanismo de agregação que melhor os explica.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Primeiramente foram definidas as sequências primárias das mutantes “Arctic”, “Arctic-like”, “Dutch”, “Iowa” e “Italian”, para serem modeladas (Quadro 1):

Quadro 1: sequência primária de algumas das mutantes da proteína A $\beta$  42.

| Mutante | Sequência primária                         |
|---------|--|
| WT      | DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA |

|         |   |
|---------|---|
| Arctic  | DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFA <b>G</b> DVGSNKGAIIGLMVGGVVIA |
| Dutch   | DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFA <b>Q</b> DVGSNKGAIIGLMVGGVVIA |
| Iowa    | DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFA <b>E</b> NVGSNKGAIIGNLVGGVVIA |
| Italian | DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFA <b>K</b> DVGSNKGAIIGNLVGGVVIA |

Fonte: Adaptado de Chong, Yim e Ham (2013).

O resíduo mutante está destacado em vermelho, para indicar qual a mutação ocorrida. Daqui por diante cada uma será chamada pelo código de mutação, no qual a primeira letra corresponde ao AA nativo, em WT, o número é a posição do AA na cadeia e a letra que segue este último é o AA mutante. E22Q, por exemplo, se refere à variante “Dutch”, já que nela ocorre a substituição do ácido glutâmico (E), por glutamina (Q), na posição 22.

Em seguida, as sequências primárias de cada mutante foram colocadas em formato .FASTA no input do *software* I-TASSER, para que estas fossem modeladas e assim obtidas suas estruturas terciárias. O arquivo .PDB da estrutura 1 que o I-TASSER gerou para cada variante foi então carregado no PBEQ Solver, de forma que este resolvesse a EPB para cada uma e assim obtivesse a energia livre de solvatação correspondente. Por fim, as sequências primárias de WT e mutantes E22G, E22Q, E22K e D23N foram modeladas quanto à propensão a agregar no Aggrescan.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pelo PBEQ Solver para a energia livre de solvatação das proteínas pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 – energia livre de solvatação da forma nativa WT e dos mutantes E22G, E22Q, E22K e D23N da A $\beta$  42.

| Variante | Energia livre de solvatação (kcal/mol) |
|----------|--|
| WT       | -701,26                                |
| E22G     | -588,1                                 |
| E22K     | -574,15                                |
| E22Q     | -566,32                                |
| D23N     | -571,18                                |

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Os resultados obtidos no Aggrescan estão apresentados na Tabela 2. O número Na4vSS (média da propensão à agregação dos AAs) foi utilizado para comparação dos resultados.



**Tabela 2 – Na4vSS de WT e mutantes E22G, E22Q, E22K e D23N.**

| Variante | Na4vSS |
|----------|--------|
| WT       | 6,4    |
| E22G     | 8,5    |
| E22K     | 1,3    |
| E22Q     | 6,8    |
| D23N     | 1,4    |

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Chong, Yim e Ham (2013) afirmam que a energia livre de solvatação é a força termodinâmica determinante para a agregação protéica. Quanto maior este valor, menos solúvel é a proteína e assim, mais propensa a agregar. Assim, da Tabela 1, tem-se a seguinte ordem crescente de energia livre de solvatação, e, portanto, de agregação: WT, E22G, E22K, D23N, E22Q. Para a Tabela 2, Na4vSS maior acarreta maior agregação e, assim, a ordem de agregação crescente, com base nisso, é: E22K, D23N, WT, E22Q, E22G. A diferença entre ambas se deve às distintas condições de partida da modelagem. Apesar disso, um padrão pode ser notado, a saber, a ordem crescente de agregação para E22K, D23N e E22Q.

Os estudos de Nordling *et al* (2008), Juszczuk, Kołodziejczyk e Grzonka (2008) e Sureshbabu *et al* (2010) corroboram este padrão, ao menos de forma genérica, enquanto que Yang *et al* (2018), Murakami *et al* (2003) e Illes-Toth *et al* (2021) discordam.

Nordling *et al* (2008) relacionam este padrão com a estabilidade de estruturas em alfa-hélice nas mutantes, a qual é oposta à formação de folhas-beta, e assim à propensão à agregação. Juszczuk, Kołodziejczyk e Grzonka (2008) observou a mesma ordem relacionada com a presença de alfa-hélices intermediárias durante o processo de fibrilação, bem como com o teor de folhas-beta em cada mutante. Sureshbabu *et al* (2010) não avaliaram D23N, mas encontraram padrão semelhante aos anteriores para E22K e E22Q, com base na diminuição do módulo da carga do peptídeo causada pela mutação, o que causa diminuição da estabilidade em solução e provoca a agregação.

Yang *et al* (2018) detectaram ordem diferente dos anteriores, e propôs o impedimento estérico como fator determinante para a propensão a agregar dos mutantes. Murakami *et al* (2003), da mesma forma que Nordling *et al* (2008) e Juszczuk, Kołodziejczyk e Grzonka (2008), relacionaram a agregação ao teor de folhas-beta presente na proteína, mas obteve ordem de agregação diferente para os mutantes. Por fim, Illes-Toth *et al* (2021) monitoraram a agregação das variantes A $\beta$  42 por espectrometria de massas e chegaram à ordem decrescente de agregação: D23N, E22K e E22Q.

## CONCLUSÃO

A importância do estudo e compreensão dos mecanismos de agregação das mutantes A $\beta$  42 para o desenvolvimento de terapias que inibam sua ocorrência, e assim o Mal de Alzheimer, justifica o emprego de métodos *in silico*, ferramentas versáteis de modelagem protéica, para simular o processo. A comparação entre os resultados obtidos

neste estudo com o I-TASSER, PBEQ Solver e Aggrescan com os obtidos por outros métodos na literatura demonstram que estes *softwares* são viáveis para isso.

Embora a diversidade de condições experimentais influencie nos resultados obtidos, foi possível observar padrões para a agregação das mutantes A $\beta$  42. As mutações alteram a carga total da proteína, diminuindo sua solvatação em água e assim promovendo a agregação entre peptídeos. Estes também apresentam maior teor de folhas-beta como estrutura secundária, o que favorece a formação da fibrila amilóide quando dois deles entram em contato. É possível, inclusive, que estruturas helicoidais possam participar como intermediárias durante o processo.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que forneceu bolsa de iniciação científica.

## CONFLITO DE INTERESSE

Não há conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

CHEN, Guo-fang *et al.* Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. **Acta Pharmacologica Sinica**. (2017) 38: 1205-1235. DOI: 10.1038/aps.2017.28. Disponível em: Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development - PubMed (nih.gov). Acesso em: 07 ago. 2023.

CHONG, Song-Ho; YIM, Janghyun; HAM, Sihyun. Structural heterogeneity in familial Alzheimer's disease mutants of amyloid-beta peptides. **Mol. BioSyst.**, 2013, 9, 997-1003. DOI: 10.1039/c2mb25457c. Disponível em: Structural heterogeneity in familial Alzheimer's disease mutants of amyloid-beta peptides - Molecular BioSystems (RSC Publishing). Acesso em: 08 ago. 2023.

CONCHILLO-SOLÉ, Oscar *et al.* AGGRESKAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides. **BMC Bioinformatics**, 2007, 8:65. DOI: 10.1186/1471-2105-8-65. Disponível em: AGGRESKAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides | BMC Bioinformatics | Full Text (biomedcentral.com). Acesso em: 21 ago. 2023.

ILLES-TOOTH, Eva *et al.* Pulsed hydrogen–deuterium exchange reveals altered structures and mechanisms in the aggregation of familial Alzheimer's disease mutants. **ACS Chem. Neurosci.** 2021, 12, 1972–1982. DOI: 10.1021/acchemneuro.1c00072. Disponível em: Pulsed Hydrogen–Deuterium Exchange Reveals Altered Structures and Mechanisms in the Aggregation of Familial Alzheimer's Disease Mutants | ACS Chemical Neuroscience. Acesso em: 16 ago. 2023.

JUSZCZYK, Paulina; KOŁODZIEJCZYK, Aleksandra S.; GRZONKA, Zbigniew. FTIR spectroscopic studies on aggregation process of the  $\beta$ -amyloid 11–28 fragment and its

variants. **J. Pept. Sci.** 2009; 15: 23–29. DOI: 10.1002/psc.1085. Disponível em: FTIR spectroscopic studies on aggregation process of the  $\beta$ -amyloid 11–28 fragment and its variants - Juszczak - 2009 - Journal of Peptide Science - Wiley Online Library. Acesso em: 13 ago. 2023.

JO, Sunhwan *et al.* PBEQ-Solver for online visualization of electrostatic potential of biomolecules. **Nucleic Acids Research**, 2008, Vol. 36. DOI: 10.1093/nar/gkn314. Disponível em: PBEQ-Solver for online visualizat... preview & related info | Mendeley. Acesso em: 21 ago. 2023.

LU, B. Z. *et al.* Recent progress in numerical methods for the Poisson-Boltzmann equation in biophysical applications. **Commun Comput Phys**, v. 3, n. 5, p. 973-1009, 2008. Disponível em: 973.dvi (psu.edu). Acesso em: 23 ago. 2023.

MITTERNACHT, Simon *et al.* Comparing the folding free-energy landscapes of A $\beta$  42 variants with different aggregation properties. **Proteins: structure, function, bioinformatics**. (2010) 78, 12: 2600-2608. DOI: 10.1002/prot.22775. Disponível em: PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics | Protein Science Journal | Wiley Online Journal. Acesso em: 07 ago. 2023.

MURAKAMI, Kazuma *et al.* Neurotoxicity and Physicochemical properties of A $\beta$  mutant peptides from cerebral amyloid angiopathy. **The Journal of Biological Chemistry**. (2003) 278, 46: 46179-46186. DOI: 10.1074/jbc.M301874200. Disponível em: Neurotoxicity and Physicochemical Properties of A $\beta$  Mutant Peptides from Cerebral Amyloid Angiopathy (jbc.org). Acesso em: 11 ago. 2023.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre, RS: Grupo A, 2019. E-book. ISBN 9788582715345. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582715345/>. Acesso em: 20 ago. 2023.

NORDLING, Erik *et al.* Molecular dynamics studies of  $\alpha$ -helix stability in fibril-forming peptides. **J Comput Aided Mol Des** (2008) 22:53–58. DOI: 10.1007/s10822-007-9155-6. Disponível em: Molecular dynamics studies of  $\alpha$ -helix stability in fibril-forming peptides | SpringerLink. Acesso em: 13 ago. 2023.

SURESHBABU, Nagarajan *et al.* Lipid-induced conformational transition of amyloid  $\beta$  peptide fragments. **J Mol Neurosci**. (2010) 41:368–382 DOI: 10.1007/s12031-010-9380-7. Disponível em: Lipid-Induced Conformational Transition of Amyloid  $\beta$  Peptide Fragments | SpringerLink. Acesso em: 15 ago. 2023.

YANG, Xiaoting *et al.* On the role of sidechain size and charge in the aggregation of A $\beta$ 42 with familial mutations. **Biophysics and Computational Biology**. (2018) 115 (26). DOI: 10.1073/pnas.1803539115. Disponível em: On the role of sidechain size and charge in the aggregation of A $\beta$ 42 with familial mutations | PNAS. Acesso em: 22 ago. 2023.