



REF – ISSN 1808-0804 Vol. X (2), 42 - 52, 2013.

MODELAGEM MOLECULAR POR HOMOLOGIA E VALIDAÇÃO ESTRUTURAL DA CRK3 DE LEISHMANIA MEXICANA

HOMOLOGY MODELING AND STRUCTURAL VALIDATION OF CRK3 LEISHMANIA MEXICANA

MODELIZACIÓN MOLECULAR POR HOMOLOGIA E VALIDACIÓN ESTRUCTURAL DA CRK3 DE LEISHMANIA MEXICANA

¹*Felipe Siconha Souza Pereira; ¹Lucas Andrade Saraiva; ¹Nelson José Freitas da Silveira; ¹Marcia Paranho Veloso

¹Universidade Federal de Alfenas – MG. Laboratório de Modelagem Computacional - LaModel, UNIFAL/MG

*Autor para correspondência: felipesiconha@gmail.com

Recebido em 30/03/2013, Aceito em 02/07/2013

RESUMO

Tendo em vista a existência de um alvo molecular promissor na espécie *Leishmania mexicana*, uma proteína quinase ciclina dependente relatada previamente em estudos relacionados, o trabalho em pauta objetivou a elucidação de uma estrutura molecular cristalográfica do alvo citado, a qual não é existente atualmente nos bancos de dados de proteínas disponíveis. O protozoário em pauta consiste em um dos agentes etiológicos da leishmaniose cutânea, doença negligenciada mundialmente nos dias de hoje, e devido a tal faz-se de grande valia estudos relacionados à terapêutica dessa patologia. A partir de

técnicas de modelagem molecular comparativa foi realizada a construção de um modelo da quinase CRK3 com base em um molde similar, obtendo-se um modelo satisfatório e realizados processos de validação e otimização do mesmo, a fim de comprovar a confiabilidade quanto a estrutura gerada, obtendo assim um modelo cristalográfico antes inexistente, para posteriores estudos voltados ao planejamento racional de novos fármacos para o combate a leishmaniose.

Unitermos: modelos moleculares, *Leishmania mexicana*, quinases ciclina-dependentes.

ABSTRACT

Considering the existence of a promising molecular target in *Leishmania mexicana*, a cyclin-dependent protein kinase previously reported in studies, the aim of this study was to elucidate a crystallographic molecular structure of the target referred, which is not currently existing in protein data banks available. The parasite in question is one of the etiologic agents of cutaneous leishmaniasis, a neglected disease worldwide nowadays, due to this, studies related to the treatment of this disease are important. From comparative molecular modeling techniques, a satisfactory model of the kinase CRK3 was made based on a similar mold. Validation and optimization processes of the model were performed, in order to verify the reliability regarding the structure created, and then obtaining a previously nonexistent crystallographic model for future studies aimed for the rational design of new drugs to combat leishmaniasis.

Keywords: models, molecular, *Leishmania mexicana*, cyclin-dependent kinases.

RESUMEN

Dada la existencia de un blanco molecular prometedor en la especie *Leishmania mexicana*, una proteína quinasa ciclina dependiente previamente reportada en otros estudios relacionados, el estudio en cuestión fue dirigido a elucidar la estructura cristalográfica molecular del modelo mencionado, que no está presente en las bases de datos existentes de proteínas disponibles. El parásito en cuestión es uno de los agentes etiológicos de la leishmaniasis cutánea, una enfermedad descuidada hoy en día en todo el mundo, y debido a esto, son muy importantes los estudios relacionados con el tratamiento de esta patología. Con las técnicas de modelización molecular se pudo llevar a cabo la construcción de un modelo de quinasa CRK3 basado en un molde similar, la obtención de un modelo satisfactorio y realizar procesos de validación y la optimización de la misma, con el fin de verificar la fiabilidad con respecto a la estructura generada, obteniendo así un modelo cristalográfico antes inexistente para estudios posteriores dirigidos hacia el diseño racional de drogas que combatirán la leishmaniasis.

Palabras clave: modelos moleculares, *Leishmania mexicana*, quinases ciclina-dependientes.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são antroponoses consideradas um grande problema de saúde pública⁽¹⁾ e consistem em doenças infecto-parasitárias, não contagiosas, que compreendem um vasto número de patologias que podem apresentar diversas manifestações clínicas, as quais variam de acordo com a espécie de protozoário do gênero *Leishmania* responsável pela infecção e da relação entre parasita e hospedeiro^(2,3). Aproximadamente 350 milhões de pessoas são consideradas em risco de contrair alguma leishmaniose, e é estimado que 12 milhões encontram-se infectadas ao redor do mundo⁽⁴⁾.

A espécie *Leishmania mexicana* consiste em um flagelado da Família Trypanosomatidae, ocorrente nas Américas Central e do Sul. O complexo mexicana é o causador da leishmaniose cutânea, que é uma doença localizada apresentando infecções crônicas⁽³⁾. Verifica-se no organismo citado, a presença de uma CRK, que consiste em um proteína quinase relacionada (*cdc2-related protein kinase*), essencial no ciclo celular do parasita. A CRK3 presente no parasita é encontrada como homóloga funcional a CDK2 visualizada em mamíferos, apresentando níveis consideráveis de identidade em suas sequências de aminoácidos⁽⁵⁾.

A partir de evidências obtidas em literatura⁽⁶⁾, realizados testes *in vitro* e *in vivo* visando uma possível inibição química ocasionada por inibidores de CDK, pôde-se concluir que há uma redução ou inibição da atividade leishmanial exercida pelo parasita quando infectante. Linhas de pesquisa focadas no estudo de espécies de quinetoplastídeos, afirmam que a CRK3 é um potencial alvo para drogas, desde que tal proteína é ativa na fase G2/M do ciclo celular da *Leishmania*, e responsável pelo desenvolvimento e sobrevivência do parasita^(4,7).

Os inibidores da proteína quinase agrupam-se em quatro grupos principais: inibidores substrato-específico, inibidores ATP-competidores, inibidores de ativação e inibidores irreversíveis⁽⁸⁾. O inibidor ATP-competidor pode ser considerado como ideal, desde que o ATP é o cofator legítimo de uma CDK, logo a utilização desses inibidores tem sido uma estratégia considerada muito favorável e vantajosa⁽⁹⁾. Alguns inibidores químicos competidores de ATP já foram identificados apresentando diversos graus de seletividade para CDK⁽⁶⁾, logo a formação de complexos desses inibidores junto a modelos de CRK3 da *Leishmania mexicana* foram realizadas visando inibir o crescimento do organismo. A CRK3 está ativa nas duas fases da vida de ciclo proliferativas do parasita (a fase promastigota de insetos e o estágio

amastigota de mamífero) e parece regular a progressão para a mitose⁽⁷⁾.

Devido a ausência de uma estrutura tridimensional cristalográfica da CRK3 disponível, e levando em consideração a identidade das sequências dessa junto a da CDK2 humana, foi realizada a construção da estrutura molecular da CRK3 de *Leishmania mexicana*, a partir do emprego de técnicas de modelagem molecular por homologia, visando a elucidação de um modelo para aplicação em estudos relacionados ao desenho racional de fármacos.

MÉTODOS

Seleção do Molde

Foi realizada uma busca no *Protein Data Bank* (PDB) com aplicação do BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), utilizando como sequência alvo correspondente a proteína *Cdc2-related kinase 3* de *Leishmania mexicana* [*Swissprot sequence* O15851_LEIME (O15851)]. A partir, foi selecionada a estrutura disponível gratuitamente no PDB, denominada "*Crystal Structure of Cyclin-Dependent Kinase 2 with inhibitor*" (PDB ID: 2r3i), devido a melhor resolução exibida, equivalente a 1.28 Å.

Modelagem Molecular por Homologia

Para realização da modelagem comparativa ("*comparative protein modeling*") visando a construção do modelo da CRK3 foi utilizado o software MODELLER 9.7⁽¹⁰⁾, um programa de modelagem estrutural comparativa por satisfação de restrições espaciais. Foi realizado o alinhamento da sequência-alvo com a sequência-molde, tendo como objetivo alinhar os resíduos estruturalmente equivalentes. Após, foram elucidados 100 modelos, dentre os quais foram reservados a procedimentos de validação e otimização, visando a obtenção de um estrutura passível de futuros estudos de ancoramento.

Validação e Otimização do Modelo

Para fins de avaliação do modelo selecionado dentre os 100 gerados, foi realizada uma avaliação estereoquímica com aplicação do software PROCHECK⁽¹¹⁾. A estrutura que exibiu melhor qualidade estereoquímica, foi avaliada com aplicação do Verify3D⁽¹²⁾, visando analisar a compatibilidade do modelo atômico tridimensional quando comparada a sua própria sequência de aminoácidos. Realizado tal procedimento, foi submetida ao alinhamento de seu modelo tridimensional junto a da estrutura utilizada como molde, visando obter valores de RMSD e TM-Score para validação do modelo construído. Validados tais valores, foi então submetido a processos de preparação,

minimização utilizando campo de força OPLS2005, com aplicação do software MacroModel, da suite Schrödinger, LLC⁽¹³⁾.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do BLAST aplicado foram visualizadas cerca de 216 estruturas de raios-X de cristais de complexos inibidores de CDK2 depositadas no PDB, sendo assim uma das melhores proteínas

quinases caracterizadas em termos estruturais.

Obteve-se os respectivos resíduos estruturalmente equivalentes, resultantes do alinhamento da sequência-alvo com a sequência-molde (Figura 1). Foram obtidos resultados equivalentes a 58% de identidade com a CDK2 de *Homo sapiens*, logo levando em consideração que valores acima de 50% de identidade tendem a gerar bons modelos por homologia, foi construído um modelo comparativo a CDK2 humana satisfatório.

```
_aln.pos      10      20      30      40      50      60
2R3I      MENFQKVEKIGEGTYGVVYKARNKLTGEVVALKKIR-----VPSTAIREISLLKELNHPNIVKLLD
CRK3      LDRYNRLDVLGEGTYGVVYRAVDKITGQYVALKKVRLDRTEEGIPQTALREVSILQEFDHPNIVNLLD
_consrvd      ***** * ** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

_aln.p      70      80      90      100     110     120     130
2R3I      VIHTENKLYLVFEFLHQDLKKFMDASALTGIPLPLIKSYLFQLLQGLAFCHSHRVLHRDLKQPQNLLIN
CRK3      VICSDGKLYLVFEYVEADLKKAIEKQEGGYSGMDL-KRLIYQLLDGLYFCHRHRRIHRDLKPANILLT
_consrvd      ** ***** **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

_aln.pos     140     150     160     170     180     190     200
2R3I      TEGAIKLADDFGLARAFGVVPRVRYTHEVVTLWYRAPEILLG-KYYSTAVDIWSLGCIFAEMVTRRALFP
CRK3      SGNVLKLABDFGLARAFQVPMHTYTHEVVTLWYRAPEILLGEKHYTPAVDMWSVGCIFAELARRKVLFR
_consrvd      ***** ** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

_aln.pos     210     220     230     240     250     260     270
2R3I      GDSEIDQLFRIFRTLGTDP--EVVWPGVTSMPDYKPSFPKWARQDFSKVVPPLDEDGRSLLSQMLHYD
CRK3      GDSEIGQLFEIFQVLTPTDTEGSWPGVSRLPDYRDVFPKWTAKRLGQVLPVLPDAIDLKSKMLKYD
_consrvd      ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

_aln.pos     280     290     300
2R3I      PNKRISAKAALAHPPFQDVTKPVPHLRL
CRK3      PRERISAKEALQHPWFSDLRW-----
_consrvd      * ***** ** * * * *
```

Figura 1. Alinhamento realizado pelo software MODELLER⁽¹⁰⁾, entre as sequências de CDK2 humana (PDB ID: 2R3I) e CRK3 *Leishmania mexicana*.

O modelo número 86, dentre os 100 construídos, apresentou melhor qualidade estereoquímica após avaliação por meio do software PROCHECK⁽¹¹⁾. Apresentou, de acordo com o gráfico de

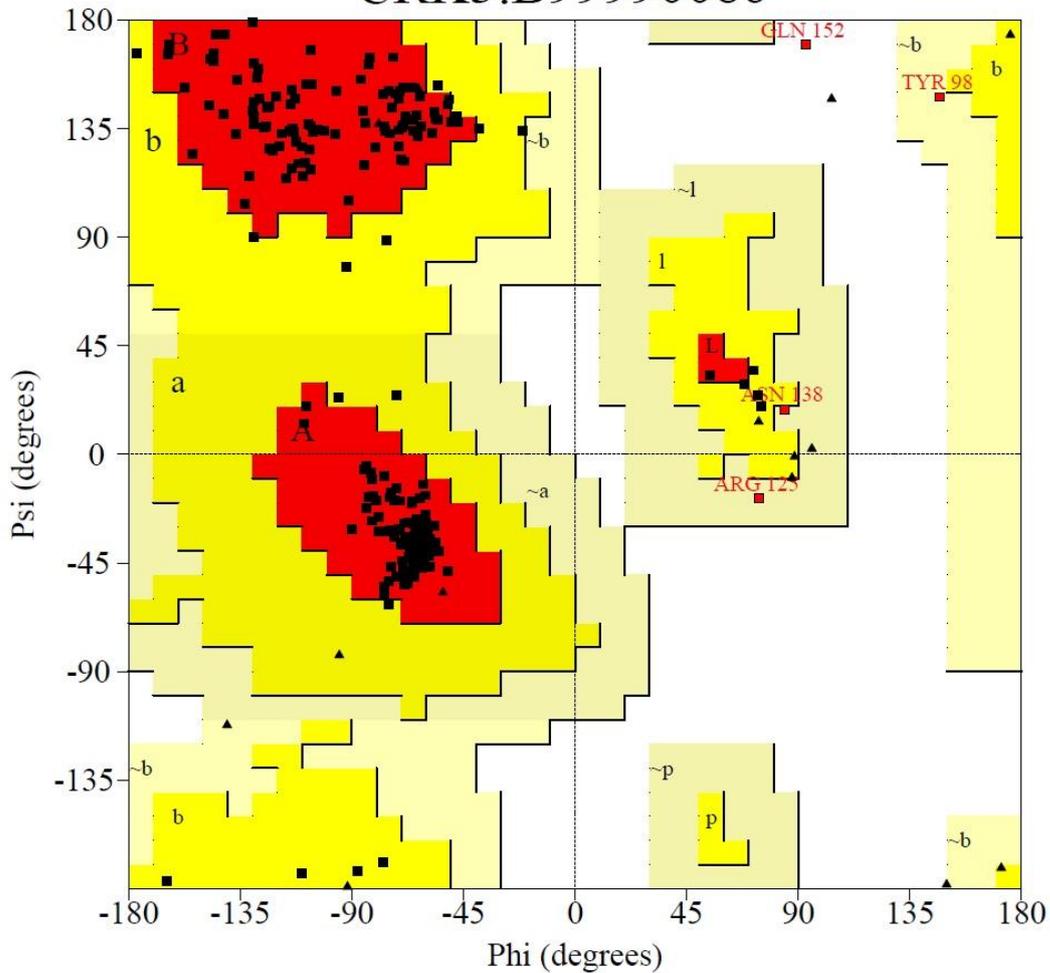
Ramachandran, 91,4% de seus resíduos nas regiões favoráveis, 7% em regiões permitidas, 1,2% em regiões generosamente permitidas e 0,4% em regiões desfavoráveis (Figura 2).

Avaliando as propriedades estereoquímicas da cadeia principal (Figura 3), visualiza-se a obtenção de uma estrutura bem refinada. O G-factor

indica que as propriedades estereoquímicas obtidas são consideradas normais.

PROCHECK

Ramachandran Plot CRK3.B99990086



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	234	91.4%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	18	7.0%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	3	1.2%
Residues in disallowed regions	1	0.4%

Number of non-glycine and non-proline residues	256	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	20	
Number of proline residues	14	

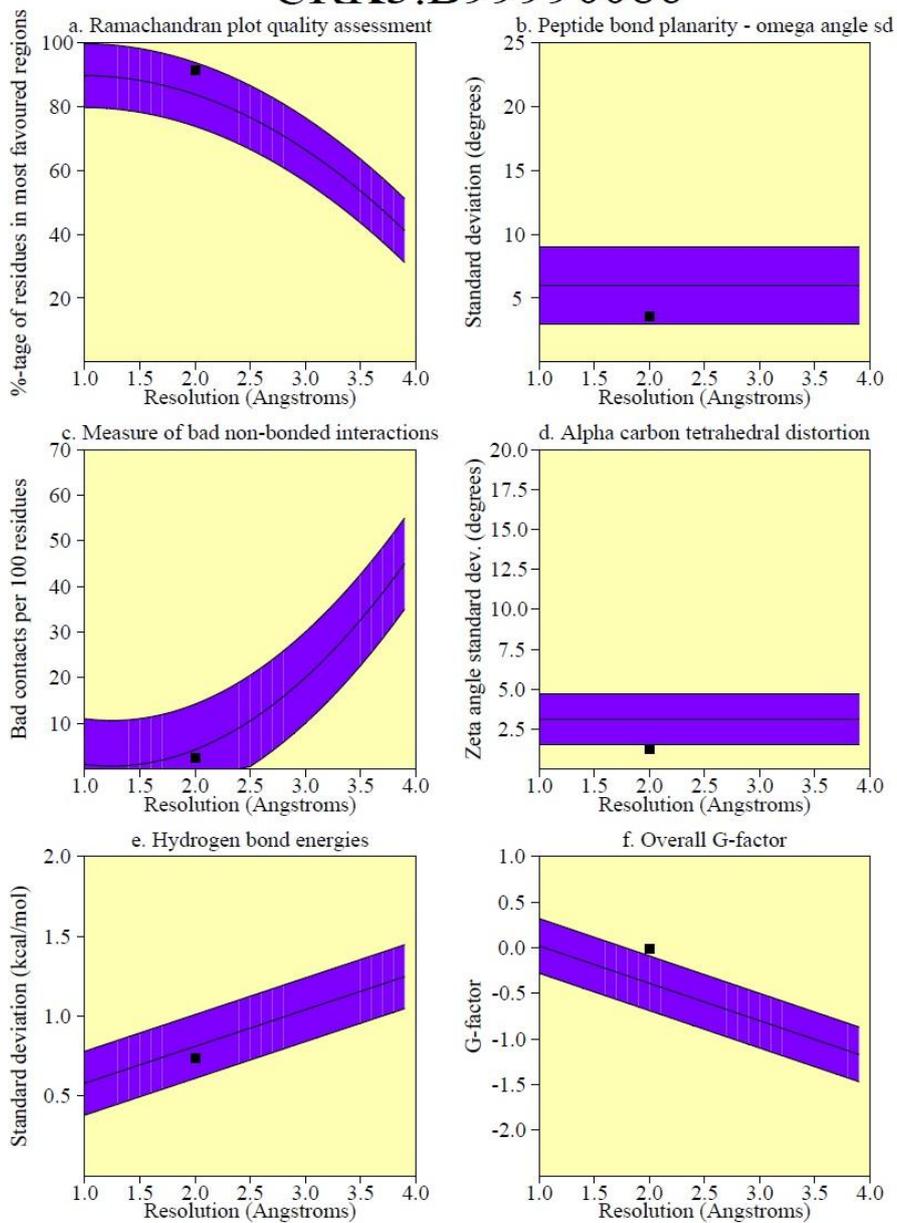
Total number of residues	292	

Figura 2. Gráfico de Ramachandran gerado pelo software PROCHECK⁽¹¹⁾, do alvo da proteína CRK3 elucidado através da modelagem comparativa.

PROCHECK

Main-chain parameters

CRK3.B99990086



Plot statistics

Stereochemical parameter	No. of data pts	Parameter value	Comparison values		No. of band widths from mean
			Typical value	Band width	
a. %-tage residues in A, B, L	256	91.4	83.8	10.0	0.8 Inside
b. Omega angle st dev	289	3.6	6.0	3.0	-0.8 Inside
c. Bad contacts / 100 residues	7	2.4	4.2	10.0	-0.2 Inside
d. Zeta angle st dev	272	1.2	3.1	1.6	-1.2 BETTER
e. H-bond energy st dev	158	0.7	0.8	0.2	-0.4 Inside
f. Overall G-factor	292	0.0	-0.4	0.3	1.3 BETTER

Figura 3. Propriedades estereoquímicas do alvo CRK3 obtidas através do PROCHECK⁽¹¹⁾. As propriedades verificadas pelo software são (a) Avaliação do gráfico de Ramachandran, (b) Planaridade de ligação peptídica, (c) Maus contatos atômicos, (d) Distorção do carbono e (e) Energia das ligações de hidrogênio. Nos gráficos apresentados, o ponto preto presente na faixa roxa representa um valor dentro da média.

Levando em consideração o gráfico (Figura 4) e os resultados provenientes do Verify3D⁽¹²⁾, os valores obtidos encontram-se dentro da faixa aceitável (0,16 e 0,8) e 97,95% dos resíduos possuem uma pontuação média 3D-1D maior que 0,2, um valor ao qual

pode se adotar que o enovelamento estrutural do modelo construído é confiável. A sequência do modelo alinhada a sequência do molde, apresentou RMSD=0,255606 e TM-score=0,8334, indicando um modelo de topologia correto.

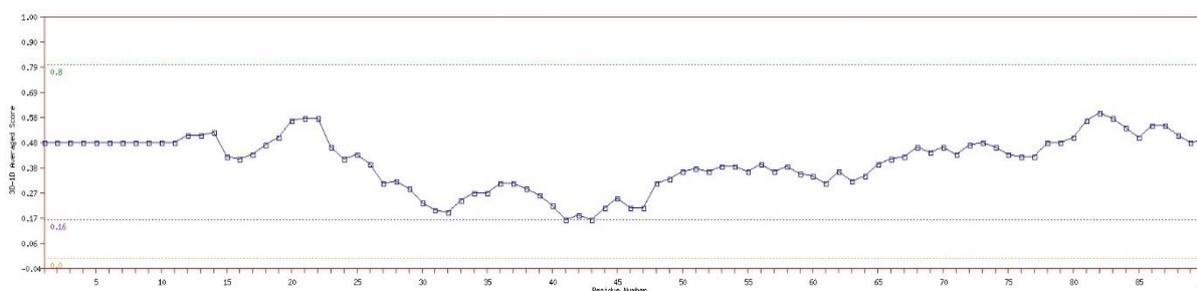


Figura 4. Perfil 3D de parte da sequência do modelo que contém os aminoácidos do sítio de interesse: Leucina, Lisina, Valina e Ácido Aspártico, correspondendo aos resíduos 10, 33, 83 e 86, respectivamente. Gráfico obtido através do Verify3D⁽¹²⁾.

Realizada uma comparação envolvendo os aminoácidos dos sítios ativos (Figura 5) onde se ligam ciclinas necessárias para a desfosforilação e consequente atividade da célula, nota-se que apesar de dois dos aminoácidos existentes não serem iguais em ambas as estruturas, os mesmos possuem classificação quanto ao substituinte

(polaridade) e carga em pH 7,4, equivalentes (Tabela 1), apresentando assim similaridade em suas respectivas estruturas tridimensionais (Figura 6), o que é relevante ao se tratar de posteriores estudos de interações do modelo junto a ligantes e a formação de complexos.

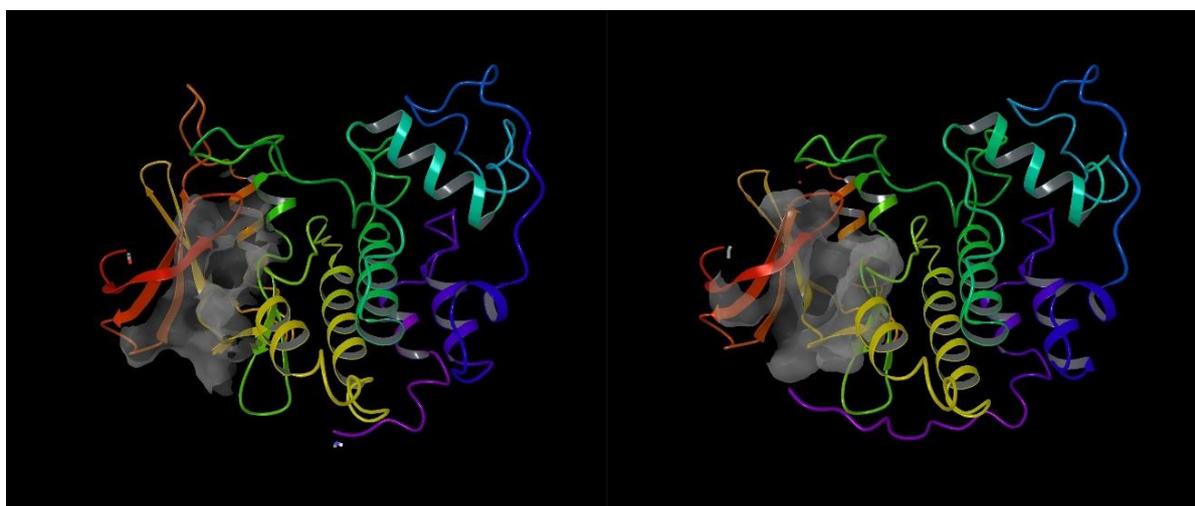


Figura 5. Imagem obtida através do Maestro⁽¹⁴⁾ da suite Schrödinger, representando em cinza a superfície correspondente aos sítios ativos das respectivas estruturas, CRK3 a esquerda (modelo) e CDK2 a direita (molde).

Tabela 1. Classificação dos aminoácidos dos sítios ativos das estruturas das moléculas de CDK2 e de CRK3.

Sítio Ativo CDK2	Polaridade	Carga	Sítio Ativo CRK3	Polaridade	Carga
10-Isoleucina	Apolar	Neutra	10-Leucina	Apolar	Neutra
33-Lisina	Polar Básico	Positiva	33-Lysine	Polar Básico	Positiva
83-Leucina	Apolar	Neutra	83-Valina	Apolar	Neutra
86-Ácido Aspártico	Polar Ácido	Negativa	86-Ácido Aspártico	Polar Ácido	Negativa

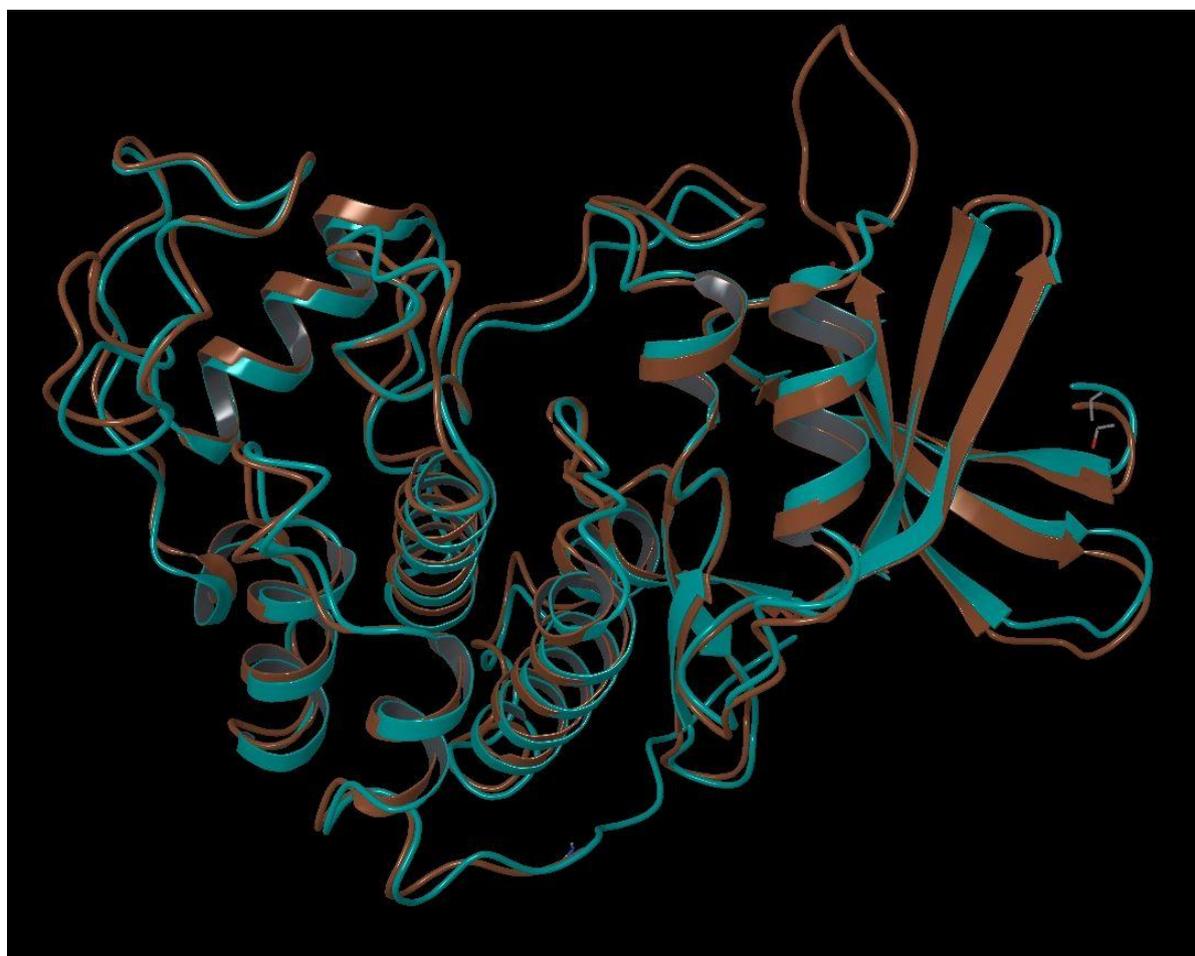


Figura 6. Representação tridimensional das estruturas moleculares alinhadas, obtida pelo Maestro⁽¹⁴⁾. O molde CDK2 humana (PDB ID: 2r3i) encontra-se de azul e o modelo CRK3 construído por homologia, de marrom.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos a partir das avaliações realizadas sobre o molde elucidado através da aplicação dos princípios da modelagem molecular por homologia, pode-se validar a similaridade e a preservação da estrutura, desde que os resíduos que compõem o sítio catalítico de interesse da proteína do parasita apresentaram

integridade no modelo gerado quando comparados ao molde, logo o mesmo é considerado válido para posteriores trabalhos de *docking* molecular e afins, visando estudos mais aprofundados referentes a interação molecular junto a ligantes descritos em literatura, possibilitando assim um planejamento racional de fármacos leishmanicidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana – 2ª ed. atual. Brasília (Brasil): Editora do Ministério da Saúde, 2007. p 13-20.
2. Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 36(1):71-80, jan-fev, 2003.
3. Satoskar A, Bluethmann H, Alexander J. Disruption of the murine interleukin-4 gene inhibits disease progression during *Leishmania mexicana* infection but does not increase control of *Leishmania donovani* infection. *Infect. Immun.*, 63(12):4894, 1995.
4. Wyatt PG, Cleghorn LAT, Woodland A, Collie IT, Torrie LS, Norcross N, et al. Identification of inhibitors of the *Leishmania* cdc-related protein kinase CRK3. *ChemMedChem*, 6, 2214 – 2224, 2011.
5. Walker RG, Thomson G, Malone K, Nowicki MW, Brown E, Blake DG et al. High Throughput Screens Yield Small Molecule Inhibitors of *Leishmania* CRK3:CYC6 Cyclin-Dependent Kinase. *PLoS Negl Trop Dis* 5(4): e1033, 2011.
6. Grant KM, Dunion MH, Yardley V, Skaltsounis A, Marko D, Eisenbrand G et al. Inhibitors of *Leishmania mexicana* CRK3 Cyclin-Dependent Kinase: Chemical Library Screen and Antileishmanial Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 3033–3042 Vol. 48, No. 8, Aug. 2004.

7. Ali NO, Ibrahim ME, Aradaib IE, Grant KM, Mottram JC. An investigation of CRK protein kinases of Leishmania and the assessment of their potential as drug targets. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, Vol. 8. No. 2A. 2003.
8. Walker, RG. Leishmania CRK3:CYC6 cyclin-dependent kinase as a drug target [thesis]. University of Glasgow; 2008.
9. Saraiva LA, Veloso MP, Camps I, Silveira NJF. Structural Bioinformatics Approach of Cyclin-Dependent Kinases 1 and 3 Complexed with Inhibitors. *Mol. Inf.*, 30, 219 – 231, 2011.
10. Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234, 779-815, 1993.
11. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, 26, 283-291, 1993.
12. Luthy R, Bowie JU, Eisenberg D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature.* v.356, p. 83-85, 1992.
13. MacroModel, Version 9.6, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2008.
14. Maestro, Version 9.2, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2008.