

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA**

LUCAS SOARES DE SOUZA

**USO DE ANCORAGEM MOLECULAR PARA O ENTENDIMENTO DE
INTERAÇÕES LIGANTE/RECEPTOR: INVESTIGANDO O COMPLEXO COI1-FB.**

**BRASÍLIA
2021**

LUCAS SOARES DE SOUZA

**USO DE ANCORAGEM MOLECULAR PARA O ENTENDIMENTO DE
INTERAÇÕES LIGANTE/RECEPTOR: INVESTIGANDO O COMPLEXO COI1-FB.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Química da
Universidade de Brasília, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Ângelo Henrique de
Lira Machado

Co-orientadora: MSc. Fernanda Favero

BRASÍLIA

2021

RESUMO

Por vezes, o desenvolvimento humano esteve associado à capacidade de se adaptar e evoluir, sendo o conhecimento, fator chave para esse progresso. Durante boa parte da história registrada, o conhecimento advinha da vivência que se transformava em experiência e era passada por gerações. Como a medicina tradicional.

Utilizada na medicina tradicional para o tratamento de febre, o chá da casca da planta *Hymenodictyon floribundum* é utilizado ainda hoje e o conhecimento acerca de sua utilização foi passado por gerações. Entre os compostos presentes nesta planta está o floribundano B, molécula composta por uma lactona de seis membros e duas cadeias laterais, uma alquenílica e outra alquílica contendo uma hidroxila.

O floribundano B possui similaridade estrutural com o ácido jasmônico, molécula responsável por ativar a degradação proteica pelo sistema ubiquitina-proteassomo. Esse sistema é responsável por marcar cerca de 80% das proteínas presentes no meio intracelular vegetal para degradação.

Essa marcação ocorre pelo transporte da ubiquitina e é mediada pelas enzimas E1, E2 e E3 até chegar na proteína-alvo. Uma vez marcada, essa proteína será degradada pelo proteassomo 26, que degradará a proteína em peptídeos e resíduos de aminoácidos que serão reutilizados em novos processos de síntese proteica.

Devido à similaridade estrutural, esse estudo buscou avaliar o potencial que floribundano B tem de agir como hormônio para ativação do processo de marcação proteica. Para tal, foi utilizado o *docking* molecular, ferramenta computacional que permite mapear interações entre proteínas e ligantes, tanto do ponto de vista energético como conformacional.

Para que fosse possível mensurar os resultados entre o floribundano B e a enzima COI1, foi utilizado como parâmetro o próprio *docking* entre o ácido jasmônico e a enzima COI1, a partir de uma estrutura cristalográfica. Esse estudo permitiu, não só avaliar a ação do floribundano B como ligante no domínio de ligação do ácido jasmônico em COI1, mas também averiguar outros possíveis sítios de interação que esta enzima possui.

ABSTRACT

For times, human development was associated with the ability to adapt and develop, with knowledge as a key factor for this role process. What is known today as knowledge, for a long time was obtained by experience. That's how traditional medicine got structured and became part of human history as a tool.

Used in traditional medicine in Angola to treat fever, the bark tea from *Hymenodictyon floribundum* is still used today and this knowledge has been passed down for generations. Floribundan B is one of its secondary metabolites and has in its structure a six membered lactone, with two side chains, one with an alkenyl group and other with an alkyl chain comprising a hydroxyl group

Floribundan B has quite structural similarity with jasmonic acid. The jasmonic acid is responsible for trigger the ubiquitin-proteasome system: a sequence of processes related to the plant defense response. This system is responsible for mark for degradation about 80% of the proteins present in the plant intracellular environment. This marking system occurs through the ubiquitin transport, which is intermediated by 3 enzymes: E1, E2 and E3. The end point is reached when ubiquitin is bonded to the target protein. Once the protein is tagged, it will be degraded by proteasome 26.

Through the reasoning similarity between floribundan B and jasmonic acid, this study investigates the potential ability of floribundane B to act as activator hormone in ubiquitin-proteasome system. Molecular docking was used as a computational tool, to investigate and understand interactions between proteins and ligands, in order to find energetic and conformational results of ligand stabilization.

To evaluate the results between floribundan B and COI1 enzyme, docking evolving COI1 and floribundan B, based on crystallographic structure, was used as a parameter. This study allowed not only to evaluate the action of floribundan B as a ligand in the jasmonic acid binding domain in COI1, but also to investigate other possible interaction sites that this enzyme has.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	5
2	OBJETIVOS	8
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	9
3.1	As cadeias laterais de α -aminoácidos e sua importância para a estrutura tridimensional (secundária, terciária e quaternária) de proteínas e enzimas.	11
3.2	Papel da ubiquitina, das ligases e do proteassoma na regulação enzimática.	15
3.3	Biossíntese do ácido jasmônico	18
3.4	Ácido jasmônico, hormônio ativador do sistema UPS	20
3.5	A Enzima COI1	22
3.6	O Floribundano B	25
4	METODOLOGIA.....	26
4.1	Preparação do arquivo extensão .pdb com coordenadas cristalográficas de uma unidade do complexo entre COI1-ASK1-JAZ1 e JA-Ile a partir do arquivo PDB ID: 3OGL	27
4.2	<i>Redocking</i> do complexo COI1-JA-Ile.	29
4.3	<i>Docking</i> do complexo entre COI1-ASK1-JAZ1 e as duas formas enantioméricas de floribundano B (FB)	33
4.4	<i>Docking</i> do complexo entre COI1-ASK1-JAZ1 e a Coronatina (CR)	34
4.5	Análise dos dados obtidos nos experimentos de <i>redocking</i> do complexo COI1-JA-Ile e <i>docking</i> dos complexos COI1-RFB, COI1-SFB e COI1-CR	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1	Analisando o <i>redocking</i>	36
5.2	Coronatina e sua energia de interação	38
5.3	Analisando o <i>docking</i> entre S-floribundano B e COI1	39
5.4	Analisando o <i>docking</i> entre R-floribundano B e COI1	43

**5.5 Análise comparativa entre os resultados obtidos para os complexos
COI1-SFB e COI1-RFB 45**

REFERÊNCIAS..... 51

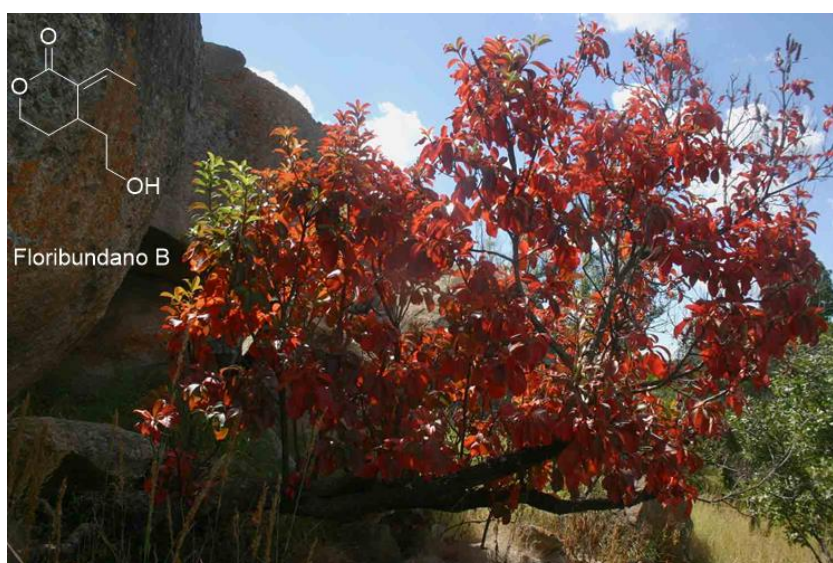
1 INTRODUÇÃO

De acordo com Darwin (1859), o ambiente pode proporcionar adaptações às espécies presentes no meio e às novas inseridas e, através da seleção natural, torná-las gradualmente mais aptas à sobrevivência. Sendo assim, o homem, como espécie evolutiva, utilizou-se do meio em si como ferramenta disponível para adaptação, sobrevivência e perpetuação de sua espécie.

A ambientação dos povos, no que tange à utilização de plantas e outros recursos aplicados às necessidades de sobrevivência, permitiu o desenvolvimento de instrumentos e o acúmulo de conhecimento. Nesse sentido, o uso do que havia na natureza para a manutenção da vida foi fator que impulsionou o desenvolvimento da medicina tradicional, que se baseia na utilização de recursos animais e vegetais no combate a enfermidades, tendo o conhecimento empírico como principal alicerce.

Nessa perspectiva, a utilização de plantas como forma subsidiária no processo de adaptação e no contorno de doenças e adversidades, o floribundano B (Figura 1), molécula extraída da casca da planta *Hymenodictyon floribundum*, de nome regional *NDambi Yov'olwi*, ganhou visibilidade devido à utilização do extrato aquoso da casca desta planta para o tratamento de febre, na medicina tradicional, em Angola. Essa planta é encontrada na África tropical, em montanhas da província de Huíla e caracteriza-se por seu pequeno tamanho (GVAZAVA; KIKOLADZE; CHEMISTRY, 2009).

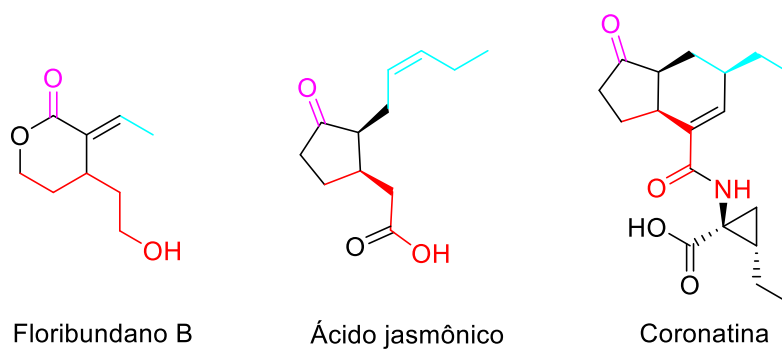
Figura 1 – *Hymenodictyon floribundum* e estrutura química do floribundano B



Fonte: Flora of Zimbabwe: species information, 2021 (adaptada).

Analisando a estrutura da molécula de floribundano B (FB), é notada a sua semelhança com outras moléculas, como ácido jasmônico (JA) e a coronatina (CR) (Figura 2). Tal fator sugere a possibilidade de floribundano B interagir com a E3 ligase, receptor enzimático de ácido jasmônico e coronatina, e interferir no mecanismo de ubiquitinação que leva à regulação de vias metabólicas envolvidas no crescimento de plantas.

Figura 2 – Estrutura química de floribundano B (FB), ácido jasmônico (JA) e coronatina (CR).



Fonte: Autor

O JA é um hormônio que está inserido na rota metabólica de defesa de plantas. Sua primeira identificação foi feita na década de 1960, na sua forma de éster metílico, através do isolamento de constituintes da flor de jasmim e, posteriormente, encontrado em outras plantas, como no feijão-fava. Sua atividade está associada à liberação de fatores transcricionais específicos que se encontram ligados às proteínas da classe dos jasmonatos, de forma a inibir a expressão gênica de defesa (SHEARD *et al.*, 2010).

Quando a planta emite um sinal de defesa, há a conversão de ácidos graxos em JA. Este é responsável por ativar a COI1 para a marcação molecular de proteínas da classe dos jasmonatos com ubiquitina, o que leva à degradação dessas pela unidade de degradação proteassoma 26.

A COI1 é uma das enzimas conhecidas como E3 ligase, que atuam aproximando a proteína que será degradada e o complexo enzimático E1:E2, o qual transfere as unidades de ubiquitina. Neste mecanismo, quando tratamos da COI1, o JA, em especial na sua forma agregada com isoleucina, JA-Ile, é o hormônio

responsável por ativar esse processo, preparando conformacionalmente a COI1 para interagir com as proteínas jasmonato (JAZ) e viabilizar a sua ubiquitinação.

Devido à similaridade estrutural entre o ácido jasmônico e a coronatina, ambos possuem atividade na marcação proteica através do mesmo processo de interação ligante-receptor. Sendo assim, o floribundano B, que também tem estrutura similar à de ácido jasmônico e da coronatina possui potencial para atuar como ligante neste processo de marcação, através da mesma enzima ligase. Para avaliar esta hipótese, demanda-se um método que seja capaz de avaliar energeticamente e estruturalmente o complexo formado entre a enzima ligase COI1 e os ligantes JA, CR e FB.

Com o avanço da tecnologia, a utilização de computadores capazes de trabalhar com cálculos complexos, mais rápidos que os executados à mão, possibilitou o estudo de assuntos de maiores dimensões, como o caso de modelagens moleculares de complexos entre ligantes e receptores biológicos (*molecular docking*), dentre outros. Hoje, o *docking* molecular é uma poderosa ferramenta para o estudo das interações ligante/receptor, pois permite explicar, com menor custo e tempo associados, estruturas moleculares, bem como seus prováveis estados de menores energias, predizer suas conformações, além de possibilitar o estudo de moléculas bioativas em sua vasta aplicação e seus sítios ativos (VERLI, 2014).

Baseado nessas informações, este trabalho de conclusão de curso teve por objetivo investigar estruturalmente e energeticamente, com auxílio do *docking* molecular, o complexo entre a enzima COI1 e o ligante FB, nas suas duas formas enantioméricas.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral elucidar as relações entre uma molécula orgânica pequena e uma enzima, através da utilização de modelagens matemáticas como ferramenta de trabalho. A enzima COI1, conhecida por seu processo de marcação de proteínas no sistema ubiquitina-proteassoma possui um sítio capaz de interagir com os hormônios ácido jasmônico-isoleucina (Jaz-Ile) e coronatina (CR). O floribundano B (FB) é uma molécula que possui semelhança estrutural com as mencionadas anteriormente. Sendo assim, como objeto de estudo para a elucidação de relações entre macromoléculas, foi averiguada a relação entre o FB e a enzima COI1.

O método utilizado foi o *docking* molecular, dado seu amplo uso no estudo de complexos ligante-receptor.

Os objetivos específicos foram:

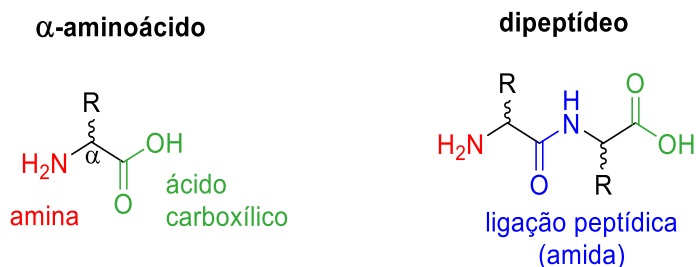
- 1) Validar o estudo de *docking* molecular do complexo COI-FB por meio do *redocking* do complexo COI-Jaz-Ile.
- 2) Realizar experimentos de *docking* molecular do sistema COI-FB.
- 3) Analisar comparativamente os dados energéticos e as interações entre os resíduos de aminoácidos da COI1 e os ligantes floribundano B e jasmonato-isoleucina para estabelecer se há ou não viabilidade para que o floribundano B interfira no sistema hormonal jasmonato/COI1.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A identificação do primeiro α -aminoácido aconteceu em 1806, quando dois químicos franceses, Louis Nicolas e Pierre Jean Robiquet, isolaram a asparagina a partir do aspargo. O segundo aminoácido identificado foi a cistina, que posteriormente foi categorizada como um dímero de cisteína. Porém, com o avanço da ciência, das técnicas espectroscópicas e sintéticas, novos aminoácidos naturais foram isolados e catalogados ao longo dos anos. (COSTA; RODRIGUES; GALEMBECK, 2016).

Os α -aminoácidos são, como o próprio nome sugere, moléculas compostas de um grupo amina e grupo ácido carboxílico ligados ao mesmo carbono, o carbono alfa, (Figura 3) (DENARDIN; SILVA, 2009). Além de caracterizar estruturalmente os α -aminoácidos, esses grupos funcionais viabilizam as ligações peptídicas, conexão entre resíduos de α -aminoácidos, por meio do grupo funcional amida, para formação de peptídeos, proteínas e enzimas. (NELSON; COX, 2014).

Figura 3 – Estrutura geral de um α -aminoácido e de um dipeptídeo, com ênfase nos grupos amina (vermelho), ácido carboxílico (verde) e amida (azul). R representa a cadeia lateral de α -aminoácidos.

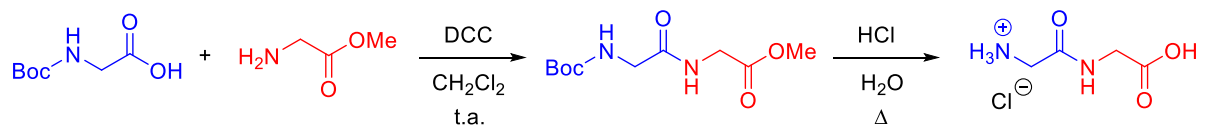


Fonte: Autor

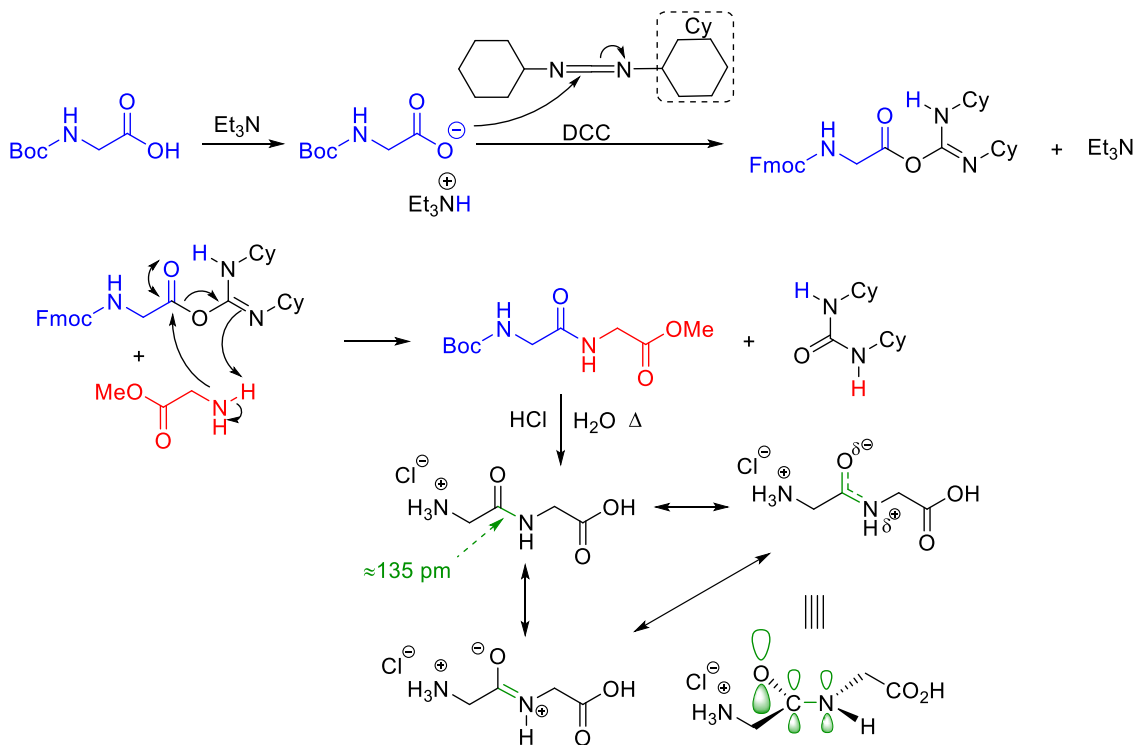
Ainda sobre a estrutura dos α -aminoácidos, duas características são evidenciadas, quando tratamos de reações químicas e a formação de ligações peptídicas: um sítio eletrofílico localizado no carbono carbonílico e um sítio nucleófilo, expressamente evidente no par de elétrons não ligantes do nitrogênio (Figura 4). Dentre as teorias que tratam de acidez e basicidade, a de Lewis se destaca por explicar como a formação de uma ligação peptídica decorre. De acordo com Lewis, base é toda estrutura que doa densidade eletrônica a um ácido no estabelecimento de uma ligação covalente ou de coordenação. Assim, a amina possui característica básica, enquanto o ácido carboxílico atua como ácido. A reação entre 2 aminoácidos produz uma unidade dipeptídica, composta de 2 resíduos de aminoácidos, com a

liberação de água (NELSON; COX, 2014). Quando pretendemos unir dois aminoácidos diferentes e formar um heterodipeptídeo, existe a possibilidade de que também sejam formados homodipeptídeos, pela união de duas unidades do mesmo aminoácido. Para evitar esta reação não desejada, foi desenvolvida uma estratégia baseada em grupos protetores. Nela, um dos aminoácidos tem o grupo amino transformado em um carbamato, aqui representado pelo grupo -HN-Fmoc, e o outro aminoácido com seu grupo ácido carboxílico protegido na forma de éster, aqui representado pelo éster benzílico ligado a um substrato polimérico conhecido como resina. Desta forma, só há uma possibilidade de unir estes resíduos de aminoácido.

Figura 4 - Representação da formação de ligação peptídica entre um aminoácido N-protetido (azul) e um C-protetido (vermelho). Nesse exemplo de mecanismo, são mostradas a etapa de ativação do grupo ácido carboxílico pelo grupo DCC e a etapa de formação da ligação peptídica. A estruturas de ressonância mostradas ao final (verde) explicitam o caráter de ligação dupla da ligação peptídica.



Mecanismo da reação de acopamento mediada por DCC/Et₃N



Fonte: Nelson; Cox (2014) adaptada.

Como representado na Figura 4, para que ocorra a formação de uma ligação peptídica é necessário, antes, que o ácido carboxílico livre seja ativado para a etapa de adição da amina livre. Reagentes utilizados para esta finalidade são conhecidos como reagentes de acoplamento, dentre eles, optamos por utilizar, neste exemplo, a DDC (dicicloexilcarbodiimida). A sua adição ao carboxilato, transforma o grupo hidroxila original do ácido carboxílico em um grupo de saída melhor, o que aumenta o caráter eletrofílico do carbono carbonílico da carboxila. No meio biológico, são enzimas as responsáveis pela seletividade e pelo direcionamento das reações de formação peptídica. Elas atuam de forma similar, protegendo ou ativando os grupos reativos dos aminoácidos. (NELSON; COX, 2014).

A ligação peptídica é mais estável do que a ligação equivalente presente em um éster (RO-C(O)-R'), uma vez que há a conjugação entre o par de elétrons do nitrogênio e a nuvem eletrônica π da carbonila, conforme evidenciado em verde na Figura 4. Esse fator estrutural sugere que a ordem desta ligação está entre 1 e 2, resultando em energia de ativação mais elevada para a quebra dessa ligação, quando comparada à de um éster. Outra consequência desta conjugação é o caráter planar da ligação peptídica, semelhante a uma ligação dupla C=C , que tem consequência para a estrutura tridimensional dos peptídeos proteínas e enzimas, determinada através do alinhamento dos orbitais que integram a ressonância.

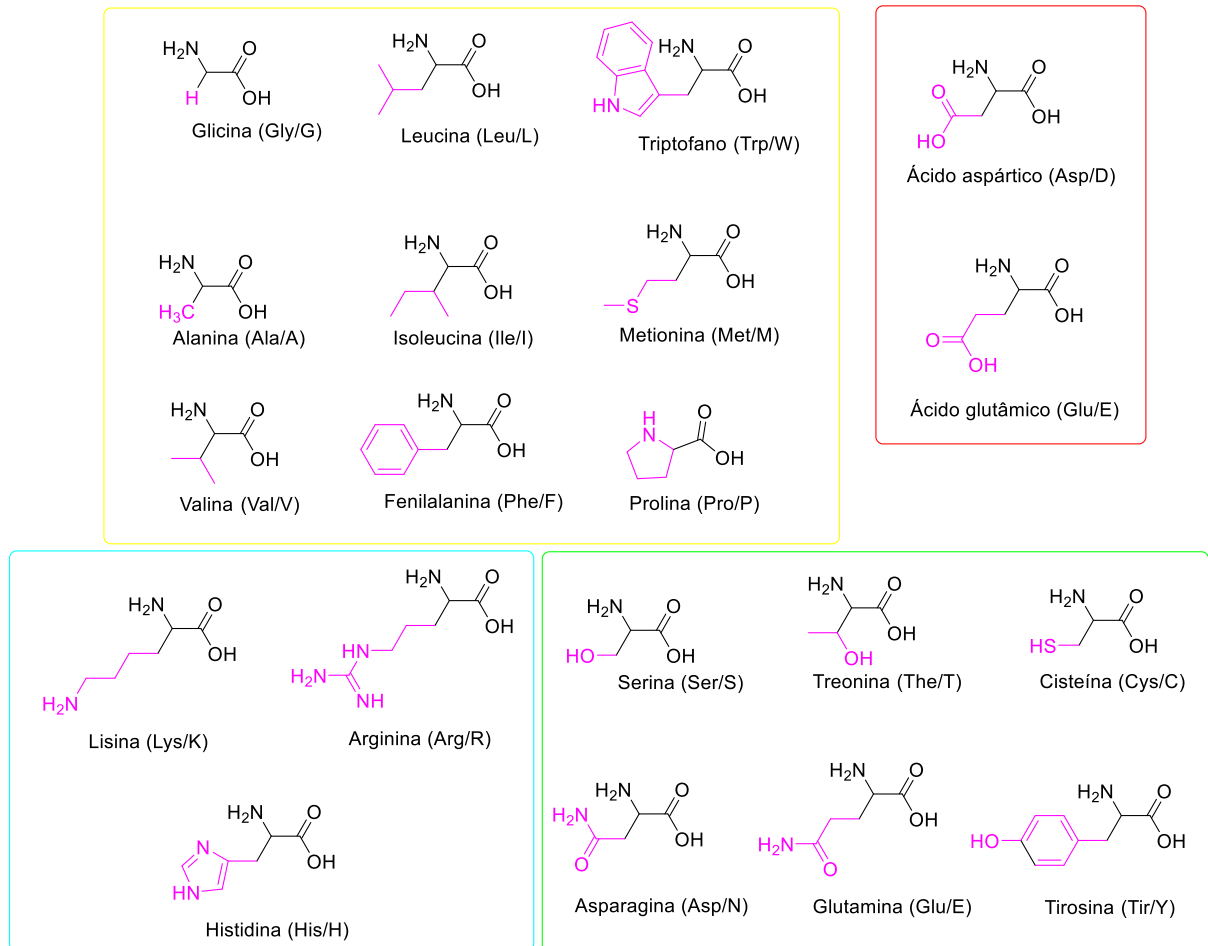
Ligações peptídicas marcam a presença de uma sequência de resíduos de aminoácidos. Sendo assim, polipeptídeos são caracterizados pela presença de mais de 4 aminoácidos, e desta forma, proteínas e enzimas são substâncias polipeptídicas que têm elevada estabilidade estrutural em meio biológico, como consequência das ligações peptídicas. A sequência de resíduos de aminoácidos que compõem um peptídeo, proteína ou enzima é denominada estrutura primária e é a primeira informação estrutural importante para a compreensão das funções dessas biomoléculas.

3.1 As cadeias laterais de α -aminoácidos e sua importância para a estrutura tridimensional (secundária, terciária e quaternária) de proteínas e enzimas.

Dentre todos os α -aminoácidos, destacam-se 20. Eles são α -aminoácidos, chamados comuns, derivados de proteínas e enzimas. Exceto no caso da glicina, que

possui como grupo *R* um hidrogênio, todos possuem carbono α tetraédrico assimétrico (Figura 5).

Figura 5 – Estrutura química dos α -Aminoácidos comuns organizados de acordo com a classe a que pertence em função da cadeia lateral em roxo (amarelo: hidrofóbicas; vermelho: polares carregadas negativamente; azul: polares carregadas positivamente; verde: polares neutras), seus códigos de uma e três letras.



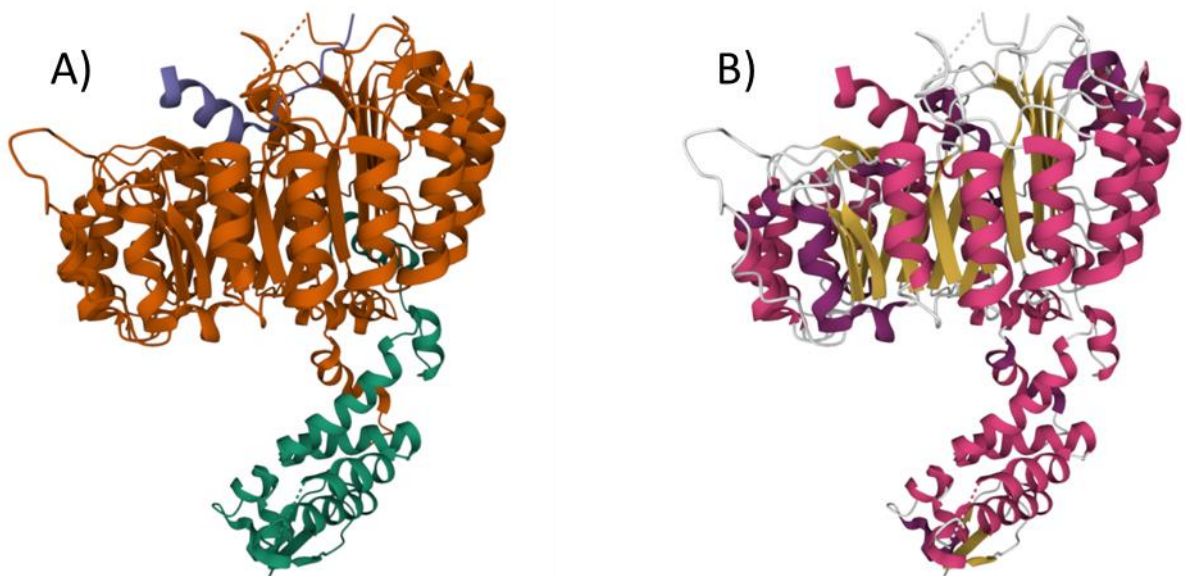
Fonte: Autor

O grupo *R*, ligado ao carbono alfa é um componente fundamental para a identificação do aminoácido. Este grupo é caracterizado pela vasta possibilidade de arranjos, não se restringindo apenas a hidrocarbonetos. Sendo assim, foram criadas quatro classes principais, conforme características presentes no grupo *R*. São elas: apolares (quadro amarelo), polares (quadro verde), básicos (quadro azul) e ácidos (quadro vermelho), conforme Figura 5 (NELSON; COX, 2014). Ainda há uma quinta classificação, quanto à presença de aromaticidade na cadeia lateral, agrupando os aminoácidos fenilalanina, triptofano, tirosina e histidina.

A natureza polar ou apolar de cada aminoácido, juntamente com a planaridade das ligações peptídicas, são o ponto de partida para a compreensão da estrutura

tridimensional de proteínas e enzimas. Estas estruturas tridimensionais são classificadas em três níveis de complexidade: secundária, terciária e quaternária. Para exemplificá-las, será discutida a estrutura química do complexo enzimático **COI1/ASK1/JAZdegron**, respectivamente a E2 e E3 ligases que serão estudadas neste trabalho de conclusão de curso (Figura 6).

Figura 6 – Estrutura química do complexo enzimático **COI1/ASK1/JAZdegron** com ênfase: A) COI1 (**marrom**), ASK1 (**verde**) e JAZdegron (**azul**); B) Folhas β (**dourado**) e Hélices α (**rosa**) e regiões não organizadas (**cinza**).



Fonte: Autor

A estrutura secundária é determinada, principalmente, pela característica planar das ligações peptídicas e pelas forças intermoleculares que ocorrem entre os resíduos de aminoácidos que se sucedem em uma determinada parte da estrutura primária. Esses arranjos supramoleculares estáveis originam principalmente dois padrões as **hélices α** e **folhas β** , como pode ser observado na estrutura do complexo COI1/ASK1/JAZdegron (Figura 6B).

A estrutura terciária, também conhecida como estrutura enovelada, é a disposição espacial de um polipeptídeo. Compostas de algumas unidades em que as cadeias laterais dos aminoácidos que compõem as estruturas secundárias do peptídeo começam a interagir entre si. Essas interações são diferentes para cada tipo de proteína, uma vez que o caráter da ligação depende dos elementos estruturais participantes da ligação. Este arranjo espacial possibilita alcançar a conformação de

mais baixa energia através do rompimento das interações com o solvente e das ligações intermoleculares (FERREIRA, 2019). Para a unidade enzimática **ASK1**, suas estruturas secundárias de **hélice α** estão organizadas de forma compacta. Já para **COI1**, é possível observar as **folhas β** organizadas lateralmente, formando uma região cilíndrica com sua parede externa rodeada de **hélices α** . O peptídeo **JAZdegron** tem significativa parte de sua estrutura organizada como **hélice α** .

Já a estrutura quaternária é a união supramolecular de pelo menos duas cadeias de polipeptídios. Essas subunidades possuem características distintas, que serão atribuídas à estrutura quaternária. Sendo assim, a estrutura quaternária explicita as interações não covalentes entre cadeias peptídicas distintas, além de, em alguns casos, contar com a presença de compostos não proteicos, como, por exemplo, metais e compostos inorgânicos. No complexo **COI1/ASK1/JAZdegron**, a **COI1** está localizada centralmente com a **ASK1** interagindo na parte inferior da região central do cilindro formado pelas **folhas β** da **COI1** (domínio de ligação da **ASK1**) e o peptídeo **JAZdegron** interagindo na parte superior da região central deste cilindro (domínio de ligação do **JAZdegron**).

Levando-se em consideração a livre rotação das ligações simples, em uma proteína composta de vários aminoácidos, a quantidade de conformações possíveis é quase incontável. Porém, são esperadas e, de fato, encontradas algumas conformações mais estáveis, com menor energia livre. Esta estabilidade molecular não é sinônimo de estrutura estática. A molécula, em seu estado de mais baixa energia, possui flexibilidade, com movimentos específicos que auxiliam na caracterização de algumas funções biológicas exclusivas. Este estado, de baixa energia, comumente encontrado na natureza é denominado estado nativo (VERLI, 2014).

A presença dos resíduos de aminoácidos como unidades de construção das enzimas e proteínas, bem como a repetição dos padrões de estrutura secundária, facilitaram abordar computacionalmente estas biomoléculas por meio de modelos semiempíricos parametrizados com base em propriedades experimentalmente medidas. Essa repetição de padrões, devido ao vasto estudo de proteínas, auxilia na redução da complexidade das estruturas envolvidas. Estes modelos simplificam a solução das equações de mecânica quântica e permitem obter informações sobre estes sistemas biomoleculares com exatidão aceitável com um baixo custo

computacional. Em meio a estas abordagens, encontra-se a ancoragem molecular (*molecular docking*) (SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003).

3.2 Papel da ubiquitina, das ligases e do proteassoma na regulação enzimática.

Devido à constante necessidade de adaptação das plantas em diferentes ambientes e a ação de predadores e outros fatores externos como intemperismo, tendo como consequência lesões de importantes estruturas celulares, tornou-se necessário, evolutivamente, o desenvolvimento de uma rápida e eficaz rede de comunicação biocelular capaz de controlar e coordenar processos enzimáticos e biológicos. Essa rede é controlada por grupos de hormônios e enzimas da planta, entre os quais destacam-se os jasmonatos e auxinas (PIETERSE et al., 2012).

Para tratar destes mecanismos hormonais, faz-se necessário entender um peptídeo fundamental na marcação pós-traducional de proteínas e enzimas: a ubiquitina (Figura 7). Após ser isolada pela primeira vez, em 1975, a partir do timo de bezerro, uma glândula cuja função principal é a maturação e liberação dos linfócitos na presença de patógenos não naturais, diversos estudos sobre o tema ganharam notoriedade. Dentre eles, estudos sobre sua presença nos processos de crescimento, desenvolvimento e adaptação das plantas (SHABEK; ZHENG, 2014). Tais estudos evidenciaram a importância da ubiquitina em organismos eucariontes, sendo ela responsável pela principal via proteolítica: o sistema ubiquitina proteassoma 26S (DREHER; CALLIS, 2007). Cerca de 80% de todas as proteínas intracelulares em organismos eucariontes são degradados via proteassoma.

Figura 7 - Estrutura primária da ubiquitina

MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDY
NIQKESTLHLVLRGG

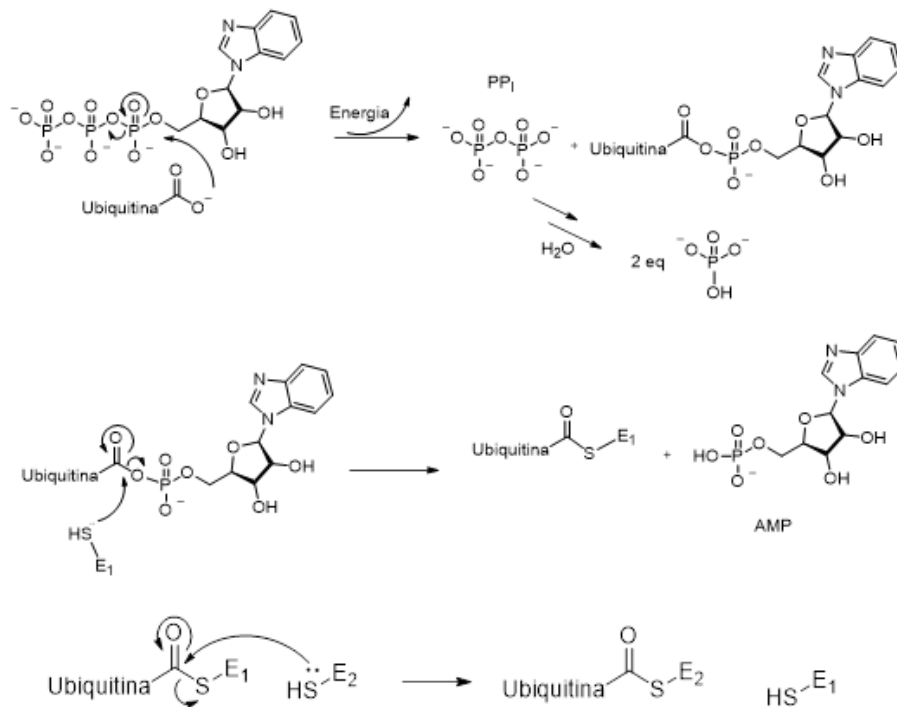
Fonte: Autor

O papel da ubiquitina nos processos biológicos é a marcação de proteínas-alvo que devem ser degradadas ou alteradas bioquimicamente (GLICKMAN; ADIR, 2004). O processo de marcação da proteína está associado ao sistema ubiquitina-proteassoma que envolve três grupos de enzimas: E1 (enzima ativadora de ubiquitina), E2 (enzima que conjuga a ubiquitina) e E3 (ligase ubiquitina). Vale

ressaltar que as proteínas degradadas resultarão em peptídeos que posteriormente serão reutilizados em diversos processos celulares.

As enzimas ativadoras de ubiquitina, E1, são conectadas covalentemente à ubiquitina através de um grupo tioéster, na maioria dos casos proveniente de cisteínas da E1, e o grupo carboxila C terminal da ubiquitina, presente na glicina (76), num processo dependente de energia, ATP, Figura 8 (HAAS; WARMS; ROSE, 1983) (MYUNG; KIM; CREWS, 2001).

Figura 8 – Mecanismo da transferência de ubiquitina para a proteína E2.



Fonte: Autor

As enzimas conjugadoras da ubiquitina, E2, tem como função a transferência da ubiquitina ativada, ligada à enzima E1, para um resíduo de cisteína na E2, através da reação de transacilação em um grupo tiol (MYUNG; KIM; CREWS, 2001).

A enzima ubiquitina-ligase, E3, tem como função final interagir supramolecularmente com a enzima que será ubiquitinada. De forma catalítica, a ubiquitina que se encontra ancorada na enzima E2 é transferida para a molécula-alvo, marcando-a definitivamente. O transporte da ubiquitina à molécula-alvo ocorre através da cooperação entre as enzimas E2 e E3, as quais viabilizarão a formação da ligação isopeptídica entre o grupo carbonílico da glicina (76) da ubiquitina e um grupo amina presente em um resíduo de lisina contido na molécula-alvo (MYUNG; KIM; CREWS, 2001).

A hidrólise do pirofosfato ocorre através da ação da enzima pirofosfatase e produz duas moléculas de fosfato e libera energia e água. Essa energia liberada é o fator determinante na determinação da direção da reação, de forma a tornar a adição da ubiquitina à molécula de mono fosfato de adenosina mais favorável, sob uma ótica macroestrutural.

O processo de marcação da proteína-alvo com ubiquitina não se restringe somente a uma unidade peptídica de ubiquitina. Há a possibilidade de serem utilizadas mais de 2 moléculas para a marcação de uma única estrutura a ser degradada, as quais são ligadas pela ubiquitina-ligase à molécula-alvo, que podem influenciar o sinal obtido a ser identificado pela unidade de proteassomo. Essa ligação entre ubiquitinas ocorre através do grupo amina da lisina (48) e a glicina (76), marcada em verde na Figura 7 (página 15), a qual permite a formação de uma nova ligação peptídica. Outro fator importante é a enzima ligase proporcionar a transferência da ubiquitina presente na enzima E2 para a proteína-alvo. Ressaltando que não há a ligação da E3 com ubiquitina, sendo esta responsável por agregar a enzima E2 e o substrato a ser marcado, permitindo que haja a aproximação entre elas (MYUNG; KIM; CREWS, 2001).

Uma vez marcadas com ubiquitina, as proteínas serão desenvolvidas e degradadas por um complexo chamado proteassomo 26, marcando o fim do processo de ubiquitinação, através da quebra das ligações peptídicas em um processo chamado proteólise, que terá como produto peptídeos com tamanhos que variam de 2 a 10 resíduos de peptídeos, em 80% dos casos (NELSON; COX, 2014, p. 1177).

Após alguns estudos acerca do sistema ubiquitina-proteassomo, ficou evidente que, no complexo E1/E2/E3, a maior concentração de peças fundamentais no processo de reconhecimento da enzima a ser degradada no meio biológico está relacionada a enzimas E3, o que exprime a seletividade dessas para diferentes proteínas-alvo a serem quebradas (NELSON; COX, 2014, p.1148)

Durante o processo de ubiquitinação, é evidenciado que as E3 ligases mantêm uma relação na qual é preservada parte de sua estrutura, para que ainda seja possível a complexação com enzimas E2, a fim de transportar a ubiquitina para às proteínas-alvo. Contudo, é necessária a adaptação de outra região da E3 para que as proteínas que serão marcadas para degradação sejam reconhecidas seletivamente pela E3 ligase. Sendo assim, existe um fragmento da estrutura das proteínas marcadas seletivamente por uma E3 para degradação que se assemelha, devido à necessidade

de sua degradação envolver o seu reconhecimento por esta mesma ligase. Essa região estruturalmente semelhante entre os membros deste grupo de proteínas reconhecidas por uma E3 é chamada de *degron*. Sendo ele o responsável por garantir a seletividade das proteínas a serem degradadas (VARSHAVSKY, 2019).

Dentre as mais variadas enzimas E3, responsáveis por fazer a ligação da ubiquitina à proteína-alvo, a coronatina insensitiva 1 (COI1) chama atenção devido sua atividade enzimática no controle do crescimento de plantas e na atuação em sistemas de defesa, tendo como hormônio ativador o ácido jasmônico (SHABEK; ZHENG, 2014).

3.3 Biossíntese do ácido jasmônico

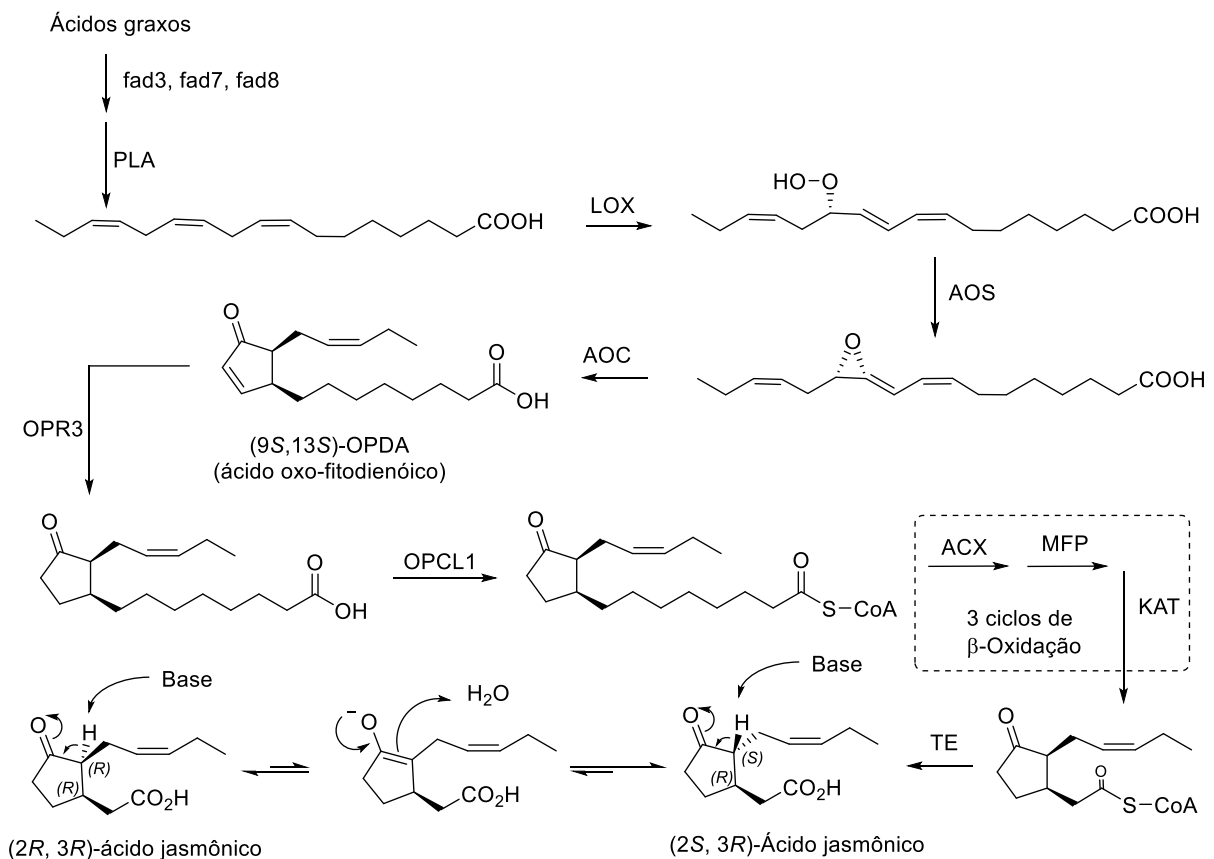
Glicolípídeos são substâncias químicas encontradas na membrana celular. Esses lipídeos possuem como função a estruturação celular, mantendo a estabilidade física da célula, a comunicação intercelular e a ancoragem de proteínas e de estruturas responsáveis pelo transporte de nutrientes. Dentre eles, o galactolípídeo é caracterizado pela presença do carboidrato galactose em sua estrutura e se encontra na camada externa da parede celular.

O hormônio ácido jasmônico é produzido em plantas a partir de respostas ambientais (Figura 9). Após a ação de um predador na planta, ocorre o rompimento da membrana celular com conseqüente liberação de moléculas de lipídeos no citoplasma, dentre eles, o galactolípídeo. Uma vez liberados no cloroplasto, os galactolípídeos entram em contato com algumas organelas, como por exemplo o plastídeo, que, através da ação da enzima fosfolipase 1 (PLA), o converte em ácido α -linolênico, substrato precursor do ácido jasmônico. O α -linolênico é convertido pela 13-lipoxigenase (LOX) em um composto peróxido que, por sua vez é convertido em OPDA, pelas enzimas aleno óxido sintase (AOS) e aleno óxido ciclase (AOC) (KOMBRINK, 2012).

Pesquisas recentes indicam que o OPDA pode possuir atividade hormonal de sinalização. Uma vez produzido o OPDA, este é transportado para o peroxissomo, que é responsável por realizar a redução da insaturação no anel da ciclopentenona pela OPDA reductase 3 (OPR3), seguido da ativação do éster pela OPC8:CoA ligase (OPCL1) que permitirá a ocorrência de 3 ciclos de beta-oxidação mediada, sequencialmente, pelas enzimas acil CoA oxidase (ACX), proteína multifuncional

(MFP) e L-3 cetoacil tiolase (KAT). A enzima tioesterase (TE) é responsável por fazer a clivagem do jasmonil-CoA em ácido jasmônico, que estará em equilíbrio entre suas 2 formas diastereoisoméricas, conforme mostrado na figura 9 (SECATTO, 2013).

Figura 9 - Biossíntese do ácido jasmônico a partir dos ácidos graxos oriundos de galactolipídeos.



Fonte: Kombrink, (2012); Wasternack; Hause, (2013), adaptada.

O ácido jasmônico encontrado na natureza é o (2S, 3R)-ácido jasmônico. Sua estrutura possui 2 centros estereogênicos, especificamente nos carbonos 2 e 3 da ciclopentanona. O carbono 2 é o centro que sofre isomerização naturalmente, por ser um carbono alfa carbonílico. O maior caráter ácido presente nesta ligação C-H, e que contribui efetivamente para a formação dos dois diastereoisômeros, permite o equilíbrio ceto-enol mostrado na figura 9. Vale ressaltar que a forma 2,3-*trans* é mais estável, devido à maior distância entre os substituintes e conseqüentemente menor tensão estérica, porém possui menor atividade hormonal, devido à topologia do sítio de interação da enzima COI1 (SHEARD et al., 2010). O ácido jasmônico também é encontrado na natureza em sua forma metilada, o jasmonato de metila, que também

possui atividade relacionada à processos de defesa (MIERSCH; SEMBDNER; SCHREIBER, 1989).

3.4 Ácido jasmônico, hormônio ativador do sistema UPS

Em condições ideais, isto é, condições em que não há a necessidade de defesa da planta contra fatores externos, as proteínas repressoras das vias de ácido jasmônico (JAZ) impedem a transcrição de DNA associados à defesa, impedindo, assim, o gasto energético desse processo, e direcionando a utilização da energia para processos de crescimento. Essa análise baseia-se na não liberação de ácido graxo no citoplasma, que por sua vez, não induz a produção de ácido jasmônico.

Uma vez que a planta entra em estado de defesa, esta produz ácido jasmônico através da rota de conversão descrita anteriormente, o qual se ligará supramolecularmente ao receptor hormonal COI1, de forma a ativar a via catalítica de marcação da proteína. Essa ligação proporciona a interação da COI1 aos fatores repressores de transcrição, as proteínas JAZ, que serão marcadas com ubiquitina e degradadas por proteassomo. A degradação desses repressores libera o fator de transcrição anteriormente ligados aos JAZ, que exercerá sua atividade biológica: transcrever genes de defesa (ZHENG et al., 2012).

A transcrição dos genes de defesa está associada aos diversos mecanismos que o as plantas possuem. Desde a produção de terpenos, como moléculas tóxicas à insetos; compostos fenólicos, como antocianina que dá a coloração roxa à frutos e folhas; até a produção de compostos voláteis que atraem predadores de insetos que estejam atacando a planta. Em todos os casos, o ácido jasmônico é o hormônio responsável pela ativação dos mecanismos de defesa (JUNIOR, 2002).

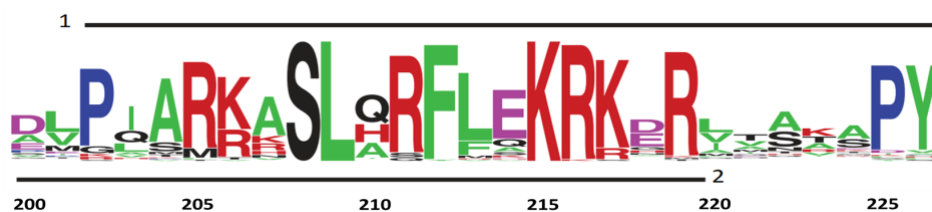
Uma característica associada à produção de jasmonato de metila é a percepção deste por plantas adjacentes, as quais terão a resposta de defesa induzida a partir da liberação de jasmonato por outras plantas, uma vez que o jasmonato de metila é uma substância volátil. Sendo assim, há a comunicação entre plantas a partir da resposta de um indivíduo, de forma a prevenir a ação de patógenos nas unidades próximas ao ataque (HUFFAKER; RYAN, 2007).

A forma ativa do ácido jasmônico como hormônio frente à COI1 é alcançada após conjugação específica com o aminoácido isoleucina, resultando em uma

estrutura com sinal bioativo de alta intensidade (3*R*, 7*S*) jasmonil – *L* – isoleucina (JA-Ile). Esse sinal desencadeia o conjunto de ações responsáveis pela degradação de fatores de repressão da transcrição de genes de defesa, as proteínas jasmonato (JAZ). Além disso, a estrutura responsável por atuar como receptor desses fatores de repressão e derivados é composta pela enzima ligase COI1, por ácido jasmônico que age como “adesivo molecular” e inositol pentacisfosfato, responsável por aumentar a sensibilidade do receptor ao detectar o hormônio. COI1, na ausência de JA-Ile, não possui alta afinidade com os repressores JAZ, indicando a dependência hormonal para a efetiva complexação receptor-substrato (SHEARD et al., 2010).

Vale destacar que há diferenças estruturais entre os repressores JAZ encontrados no citoplasma. Porém, há uma sequência de resíduos de aminoácidos, mais precisamente entre os resíduos 200-225, que se apresenta conservada e é chamada de motivo (*motif* em inglês) (Figura 10). A região entre os resíduos 203 e 219 apresenta o maior grau de conservação e se mostra essencial para que o complexo COI1-JA-Ile reconheça JAZ e, por este motivo é classificado como o *degron* desta classe de repressores (SHEARD et al., 2010).

Figura 10 - Conservação dos aminoácidos que integram o motivo e o *degron* das proteínas JAZ. Linha 1 indica a sequência de resíduos aminoácidos do motivo. Linha 2, a sequência de resíduos aminoácidos do *degron*. Maior tamanho da letra representa o seu grau de conservação entre os membros da classe JAZ.

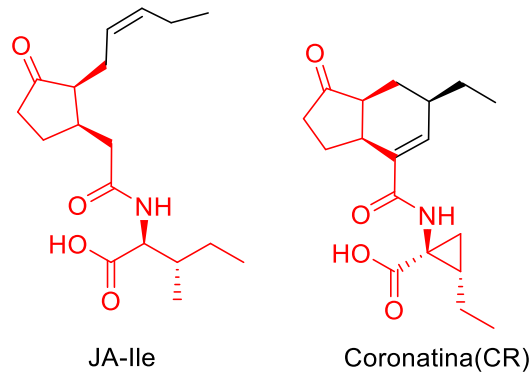


Fonte: Sheard (2010) adaptada.

A coronatina (CR) é uma substância natural que também atua como ligante de forma análoga ao JA-Ile, através do seu encaixe na cavidade da enzima COI1 (Figura 11). Atua como ativador do receptor responsável por se ligar ao substrato jasmonato a ser degradado, COI1, mimetizando a atividade do JA-Ile (PIETERSE et al., 2012). Ela possui maior vantagem bioativa devido à sua impossibilidade de sofrer isomerização. Isso graças à presença de uma estrutura bicíclica, composta pela ciclopentanona e pelo cicloexeno, os quais compartilham dois centros estereogênicos, de forma a manter a configuração. O que já não acontece no caso do JA-Ile, que

possui uma estrutura com menor restrição conformacional, o que facilita o equilíbrio ceto-enol responsável pela epimerização em C2.

Figura 11 – Estrutura química do jasmonato de isoleucina (JA-Ile) e da coronatina (CR).



Fonte: Autor

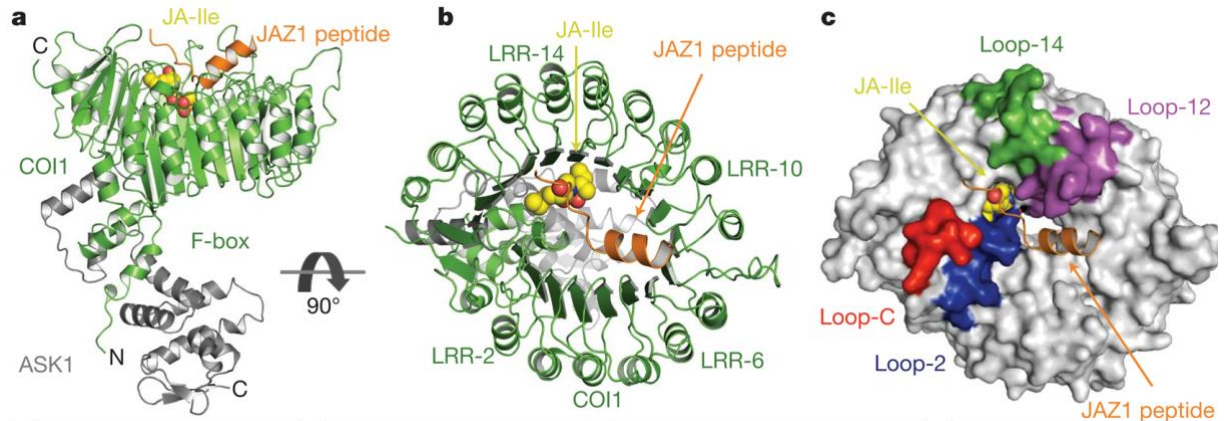
Nas estruturas mostradas na Figura 11, fica evidente que as duas moléculas compartilham bastante similaridade estrutural e mesma estereoquímica. Esses fatores - a ciclopentanona, a disposição espacial *cis* dos hidrogênios que estão ligados aos carbonos terciários, a similaridade entre o resíduo de isoleucina e o aminoácido ciclopropílico, ligado através da formação da amida com o nitrogênio desses resíduos de aminoácidos - trazem às duas moléculas semelhanças estruturais que permitem o encaixe na mesma unidade tridimensional e, conseqüentemente, atividade biológica (SHEARD et al., 2010). Tal observação sugere que outras moléculas que apresentam semelhança com JA-Ile e CR podem interagir com COI1, de forma a interferir na degradação proteica direcionada por esta ligase (BARCELOS DE SOUZA, 2014).

3.5 A Enzima COI1

A enzima COI1 apresenta estrutura tridimensional, em sua região C-terminal que se assemelha à uma ferradura, como evidenciado na Figura 12b, constituída de solenóides ricas em leucina. Em seu interior, possui uma cavidade na qual o hormônio JA-Ile se abriga, de forma a permitir que o substrato proteico seja reconhecido a partir do *degron*. A superfície é composta por 4 domínios em espirais, Loop-2, Loop-C, Loop-

12 e Loop-14, que auxiliam nas interações com o substrato JAZ (Figura 12c) (SHEARD et al., 2010).

Figura 12 - Enzima COI1 com hormônio JA-Ile ao centro.

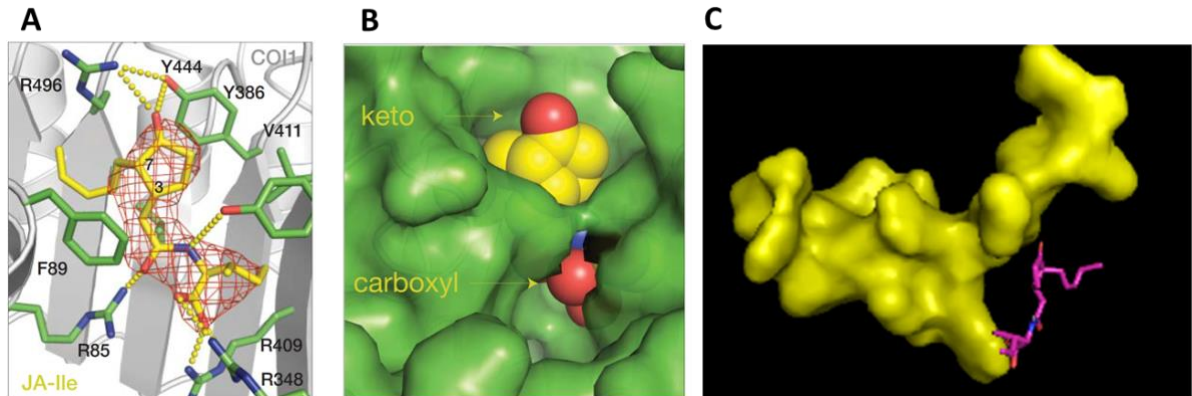


Fonte: Sheard (2010)

O sítio no qual se abriga o hormônio está entre o loop 2 e a estrutura interna do grupo de solenóides. Além disso, é rodeado de cadeias laterais de aminoácidos, configurando uma estrutura polar de interação. Conforme o JA-Ile é adicionado, a cetona se posiciona para estabelecer ligações de hidrogênio com a Arg 496 e Tyr 444 de COI1, enquanto o anel da ciclopentanona realiza interações dipolo induzido com os grupos aromáticos Phe 89 e Tyr 444 (Figura 13A).

Além disso, o grupo cetona será responsável por fazer a interação inicial com o *degron* da proteína Figura 13C. Tal arranjo possibilita a exposição desse grupo para receber o JAZ e, na ausência desse, pode realizar interações com o solvente. Já a cadeia lateral de JA-L-Ile, por ser mais flexível e longa, se posiciona em um sítio hidrofóbico, no interior da enzima (Figura 13B) (SHEARD et al., 2010). Os grupos amida e carboxila se ligam ao fundo do sítio, em contraste com a cetona, que está posiciona na superfície. Esses se ligam através de ligações de hidrogênio com Arg 85, Arg 348 e Arg 409, constituindo, assim um fundo com alta densidade de carga, figura 13A. Além disso, a amida do ligante também realiza outra ligação de hidrogênio com a Tyr 386 a qual se desloca em direção à ciclopentanona, de forma a criar uma cavidade de entrada hidrofóbica, expondo o grupo carboxílico que, posteriormente, interagirá com o *degron* (SHEARD et al., 2010).

Figura 13 - Disposição de JA-Ile no domínio de ligação na enzima COI1, evidenciando: A) resíduos de aminoácido de COI1 que fazem interações com JA-Ile; B) grupos cetona (keto) e ácido carboxílico (carboxyl) de JA-Ile expostos; C) Interações entre JA-Ile e peptídeo JAZ complexado com COI1-JA-Ile.



Fonte: Sheard (2010)

A cadeia lateral do hormônio JA-Ile e o etilcicloexano da CR possuem bastante similaridade. Esse fator permite que haja o encaixe de ambos os ligantes ao mesmo sítio ativo e, até mesmo, melhor afinidade com o domínio de ligação entre a CR, uma vez que ambos os hormônios interagem com os mesmos resíduos de aminoácidos.

De forma geral, a enzima COI1 possui um sítio tanto hidrofílico, no topo e no fundo, quanto um sítio hidrofóbico, no seu interior, abrigando as cadeias laterais do ligante. O hormônio se posiciona de maneira vertical, com o grupo ciclopentenona orientado para cima, com a nuvem eletrônica disposta para a superfície e os grupos carbonil e amida orientados para o fundo (Figura 13C). Desse modo, o *degron* de JAZ interage através de dois locais com o hormônio, conforme figura 13C. A primeira ocorre através do grupo ceto, com orientação voltada para cima, a segunda através do carboxílico, da cadeia lateral.

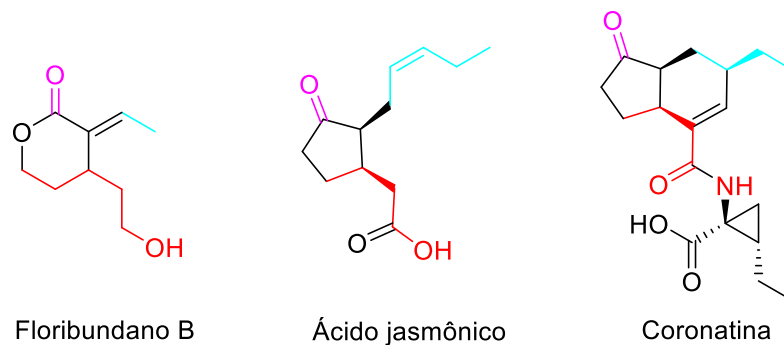
Com base nesse raciocínio, outras substâncias com estruturas similares à JA-Ile e CR podem interagir com o sítio ativo da enzima COI1 e possuir potencial para atividade enzimática, atuando como hormônios, em papel similar ao do ácido jasmônico. Dentre essas substâncias, será apresentado o floribundano B.

3.6 O Floribundano B (FB)

O floribundano B é um iridóide obtido por extração com metanol a partir da maceração da casca do tronco da planta *Hymenodictyon floribundum*. O chá dessa casca é utilizado em Angola na medicina tradicional para o tratamento de febre (GVAZAVA; KIKOLADZE; CHEMISTRY, 2009b).

Até onde nosso levantamento bibliográfico pode alcançar, nada se sabe sobre as funções que FB tem nos processos bioquímicos desta planta. Contudo, ao comparar a estrutura química de FB com a do JA, é possível identificar similaridade entre elas, Figura 14. Para ressaltar estas semelhanças, as regiões semelhantes das estruturas mostradas foram marcadas com mesma cor. Tais similaridades, quando trazidas para o campo do domínio de ligação de JA-Ile na COI1 nos suscitou o questionamento sobre a potencial ação de FB no sistema de ligases controlado por JA-Ile, o que justifica propor um estudo de *docking* molecular pra avaliar o potencial de ligação de FB no domínio de ligação de JA-Ile na COI1.

Figura 14 - Estruturas do floribundano B (FB) e ácido jasmônico (JA) e coronatina (CR).

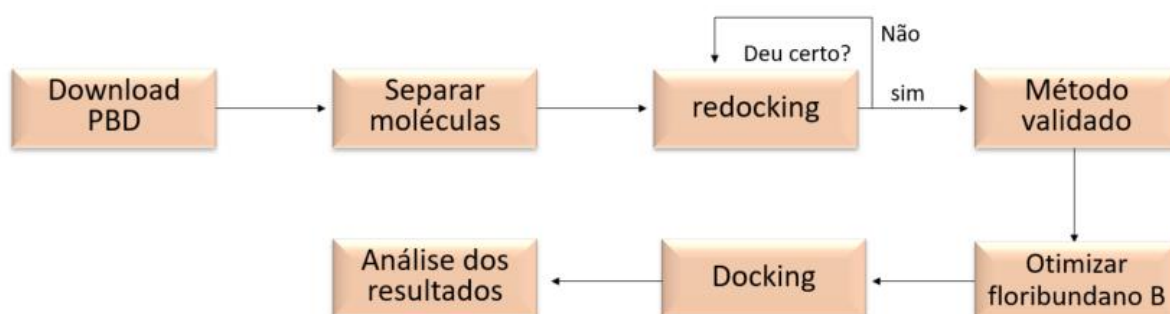


Fonte: Autor

4 METODOLOGIA

O diagrama de fluxo apresentado abaixo (Figura 14) traz uma visão geral das etapas que este trabalho de conclusão de curso seguiu para investigar comparativamente os complexos entre COI1 e JA-Ile e entre COI1 e floribundano (FB), sendo que este último foi investigado em suas duas formas enantioméricas, *R* e *S*.

Figura 15 - Diagrama de fluxo da investigação realizada neste trabalho de conclusão de curso.



Fonte: Autor

Programas utilizados:

PyMOL Molecular Graphics System	Versão 2.5.2	Interface gráfica, usada para visualização e manipulação de enzimas e moléculas
AutoDock Vina	Versão 1.1.2	Ferramenta de docking molecular. Prediz interações ligantes-enzimas, através do docking molecular
Avogadro	Versão 1.2.0	Ferramenta de edição e otimização de moléculas
Autodock Tools	Versão 4.2.6	Pré-processamento e padronização de estruturas

Todos os programas foram executados no sistema operacional Windows 10 pro.

O programa PyMOL é um programa open source criado por Warren Lyford, e foi utilizado para visualização molecular, separação das estruturas e análise dos resultados obtidos. Esse programa será utilizado para facilitar a compreensão da molécula, através de sua interface gráfica de fácil manipulação. Toda a exibição feita nesse trabalho foi realizada a partir do PyMOL. Esse possui uma função focada na exportação de imagens para apresentação.

Para a realização do docking molecular, o programa AutoDock Vina foi utilizado. Esse programa possui interface gráfica amigável, compatibilidade com outros programas, como PyMOL e Avogadro, além de ser preciso, quando se trata dos resultados encontrados, e possuir elevada velocidade de docking, quando comparado com outros programas com o mesmo fim. Seus resultados são aceitáveis quanto às poses de interação ligante-receptor, mas deve-se ter cuidado quando se pretende comparar as energias de ligação das soluções obtidas. Tal comparação é aceitável quando poses diferentes de um mesmo complexo são comparadas. Já, a comparação entre complexos diferentes, por exemplo COI1-JA-Ile e COI1-FB, deve ser feita com muita cautela, já que a energia de ligação é dependente do número de pontos de contato que permitem interações supramoleculares polares, como as ligações hidrogênio. (NGUYEN *et al*, 2020).

Diferentemente da enzima COI1 e do ligante JA-Ile, cujas coordenadas de estrutura foram obtidas no banco de dados pdb, as coordenadas das estruturas dos estereoisômeros de FB e da CR foram gerados a partir de um programa que permitisse a criação de arquivos compatíveis com o estudo de *docking*, Avogadro. O programa é de fonte aberta e foi desenhado com o intuito de ser utilizado por diversas plataformas, na química computacional, como modelamento.

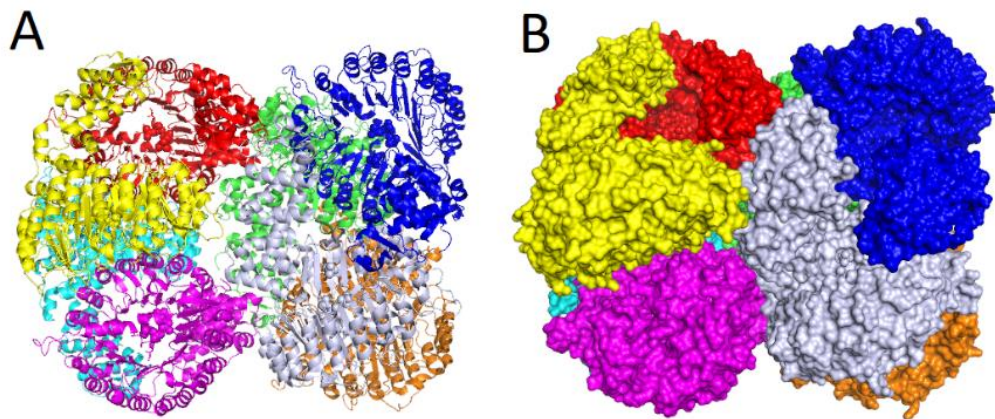
4.1 Preparação do arquivo extensão .pdb com coordenadas cristalográficas de uma unidade do complexo entre COI1-ASK1-JAZ1 e JA-Ile a partir do arquivo PDB ID: 3OGL

Inicialmente, o arquivo PDB ID: 3OGL, que contém as coordenadas cristalográficas do complexo entre as ligases COI1-ASK1, o ligante JA-Ile e o *degron* JAZ1, foi descarregado do repositório <https://www.rcsb.org>. Na etapa seguinte, foi realizada a preparação inicial do arquivo contendo todo este complexo, com o auxílio do software PyMOL, e consistiu em: consistiu em:

- 1) Retirar moléculas de água contidas nas coordenadas cristalográficas;
- 2) Adição de átomos de hidrogênio polares nos resíduos de aminoácidos das unidades proteicas;
- 3) Cálculo da carga formal molecular.

Ainda com o auxílio do programa mencionado, tornou-se possível identificar as unidades proteicas monoméricas que formavam a cela unitária, seja através de sua ênfase nas estruturas secundárias (Figura 16A), ou através da sua representação superficial (figura 16B). Dessa forma, através da coloração, identificou-se 8 unidades do complexo COI1-ASK1-(JA-Ile)-JAZ1, que, por questões de simplificação, será chamado de COI1-JA-Ile.

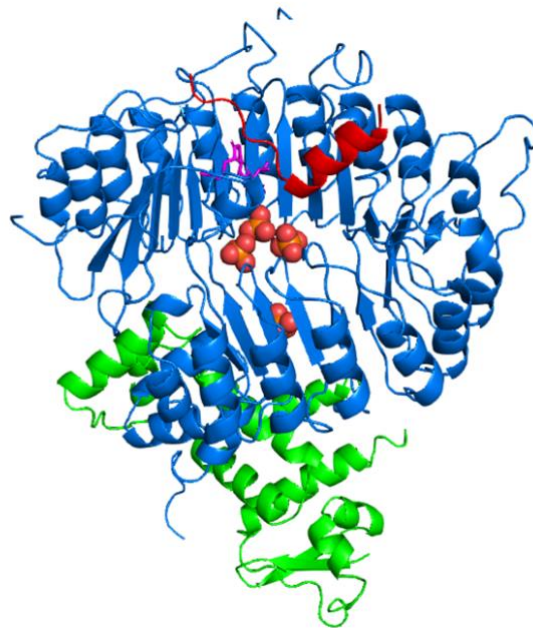
Figura 16 - Cela unitária obtida pela análise cristalográfica por difração de raios-x de um monocristal do complexo COI1-JA-Ile. a) em evidência estruturas secundárias. B) em evidência topologia de superfície, com unidades monoméricas apresentadas com cores distintas.



Fonte: Autor

Para a obtenção de um arquivo com extensão .pdb, contendo apenas uma unidade do complexo COI1-JA-Ile, foi necessário identificar isoladamente cada uma das moléculas que compõem este complexo. Com o comando “*split_chains*”, o programa PyMOL permitiu realizar a identificação desejada. Conforme Figura 17, o ligante JA-Ile, as enzimas COI1 e ASK1, o degron JAZ1 e a presença de fosfatos (estes relativos ao inositol pentacisfosfato), que integram cada uma das 8 unidades do complexo contidas na cela cristalina, puderam ser observadas separadamente, o que permitiu salvar o arquivo COI1.pdb, que contém apenas uma unidade do complexo COI1-JA-Ile.

Figura 17 - Unidade do complexo COI1-JA-Ile, em evidência estruturas secundárias. Em azul COI1, ASK1 em verde, *degron* JAZ1 em vermelho e JA-Ile em roxo.



Fonte: Autor

4.2 Redocking do complexo COI1-JA-Ile.

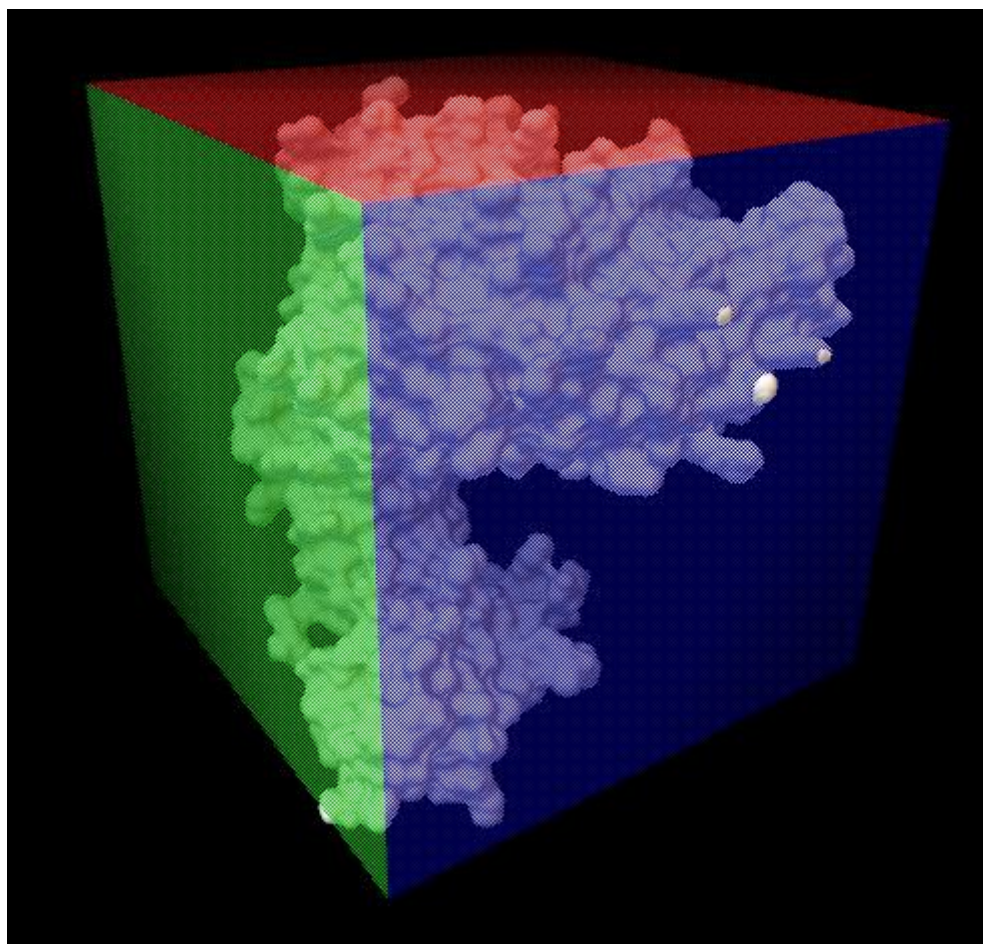
O procedimento *redocking* foi baseado em um *docking* molecular entre o complexo COI1-ASK1-JAZ1 e o ligante JA-Ile. Esse experimento possuiu como objetivo encontrar os valores para os parâmetros experimentais de *docking* que permitem reproduzir a mesma pose de interação observada na estrutura cristalográfica, entre o domínio de ligação e o ligante JA-Ile.

Para isso, foi necessária a otimização de alguns parâmetros. São eles:

- 1) *Grid box*: região espacial na qual foi realizada a busca por poses de complexação entre o ligante e a proteína em estudo, figura 18. Quando se utiliza uma *grid box* que contempla apenas uma região da proteína em estudo, refere-se a um experimento de *docking* direcionado. Em contrapartida, quando se fixa uma *grid box* que contém toda a estrutura da proteína em estudo, trata-se de um *docking* às cegas, que permite verificar múltiplos domínios na proteína que podem ocorrer interações com um determinado ligante. Nesse estudo, inicialmente foi realizado o *docking* às cegas. Quando se trata de grande escala de estudo, o *docking* às cegas apresenta elevado custo computacional e tempo requerido, pois demanda

elevado tempo, de forma proporcional à quantidade de estruturas analisadas.

Figura 18 - Definição da *grid box*, evidenciando COI1-JA-Ile em seu interior.



Fonte: Autor

A definição da *grid box* foi feita com o auxílio do programa AutoDock Tools, de forma interativa. O programa conta com uma interface na qual foi possível mover a *grid box* espacialmente e, também, alterar o seu tamanho de forma a contemplar a região de interesse. Nessa fase, também foram encontradas as coordenadas que centralizam a *grid box*, englobando a enzima que participou do experimento, bem como suas dimensões, medidas em Angstrom (Å).

- 2) *Energy range*: quando se trabalha com experimentos que buscam encontrar resultados que variam energeticamente, faz-se necessário adotar um intervalo para mensurar a diferença de afinidade entre as

conformações encontradas. *Energy range* é o intervalo no qual o programa foi instruído a exportar os resultados das conformações obtidas, sendo ele o limite energético para trabalho. Vale destacar que dependendo das conformações encontradas, o resultado obtido pode encontrar-se em um intervalo ainda menor. Uma vez que as conformações de mais baixa energia estavam relativamente próximas umas às outras, não foi necessário aumentar o número de resultados obtidos, pois esses já eram os de menor energia.

- 3) Número de modos ou *num_modes*: refere-se à quantidade de modos de ligação que o programa trabalhou por conformação. Conforme este foi aumentado, a quantidade de conformações analisadas pelo programa em um mesmo domínio de interação aumentou por tentativa.
- 4) *Exhaustiveness*: O tempo gasto durante a busca pelo resultado de menor energia global é diretamente proporcional à complexidade do cálculo realizado. Fatores como quantidade de átomos, flexibilidade e rotação de ligações são determinantes para o aumento do tempo. *Exhaustiveness* relaciona o tempo requerido na análise com a probabilidade de encontrar um resultado não distante do mínimo global, a partir da equação de probabilidade.

Antes de iniciar o experimento de *redocking*, o arquivo COI1.pdb foi separado em 2: um inicialmente contendo somente o ligante JA-Ile (arquivo nomeado de lig1.pdb) e outro contendo o complexo COI1-ASK1-JAZ (chamado de enz1.pdb). Durante o tratamento dos arquivos criados, seguiu-se a mesma regra de tratamento: retirada das moléculas de água, adição hidrogênios polares e calculadas as cargas formais.

Tendo em mãos os arquivos em .pdb, fez-se necessária a criação de um terceiro, config.txt (Figura 19). Este arquivo possui as instruções necessárias que foram lidas pelo programa AutoDock Vina, de acordo com os parâmetros encontrados no *redocking*. Fatores como a localização dos arquivos no disco rígido, suas respectivas identidades, os parâmetros para o *redocking*, referentes à *grid box*, dentre outros, foram estabelecidos com a intenção de possibilitar a execução de diversas conformações por sítio a fim de aumentar a precisão dos resultados, considerando a

limitação do software e hardware utilizados, além de fazerem parte da ordem-comando de execução do programa.

Figura 19 - Exemplo do conteúdo de um arquivo config.txt, utilizado como referência pelo AutoDock Vina, evidenciando alguns parâmetros que são executados durante o docking molecular.

```
receptor = lig.pdbqt
ligand = COI1.pdbqt

center_x = -42.648
center_y = 18.153
center_z = 57.472

size_x = 74
size_y = 40
size_z = 40

energy_range = 10000

Num_modes = 40000000
exhaustiveness = 600
```

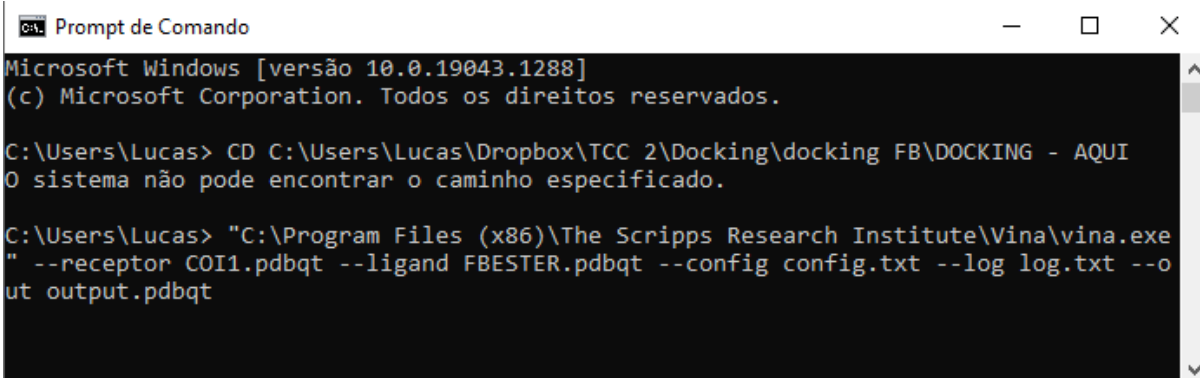
Fonte: Autor

Com os parâmetros já definidos e o arquivo config.txt criado, foi necessário executar os mesmos, utilizando o AutoDock Tools. Na interface do programa, selecionou-se como ligante o arquivo lig.pdb e como receptor o arquivo COI1.pdb. Uma vez selecionados, estes foram exportados, através do programa AutoDock Tools na mesma pasta de origem, no formato pdbqt, sendo lig.pdbqt e enz.bdbqt os arquivos lig.pdb e COI1.pdb, em formato pdbqt. Esses arquivos em pdbqt foram utilizados no *docking*.

Através do *prompt* de comando do Windows, o *redocking*, então, foi executado (Figura 20). Para isso, utilizou-se o comando “cd (diretório)” com o intuito de fazer o sistema operacional reconhecer o local no qual os arquivos do *redocking* estavam

localizados em disco. Feito isso, bastou executar o programa AutoDock Vina, listando os arquivos que foram executados e os arquivos de saída que foram criados.

Figura 20 - Exemplo de comando utilizado para a execução do redocking, através do prompt de comando do sistema operacional Windows 10 pro



```
ca. Prompt de Comando
Microsoft Windows [versão 10.0.19043.1288]
(c) Microsoft Corporation. Todos os direitos reservados.

C:\Users\Lucas> CD C:\Users\Lucas\Dropbox\TCC 2\Docking\docking FB\DOCKING - AQUI
O sistema não pode encontrar o caminho especificado.

C:\Users\Lucas> "C:\Program Files (x86)\The Scripps Research Institute\Vina\vina.exe
" --receptor COI1.pdbqt --ligand FBESTER.pdbqt --config config.txt --log log.txt --o
ut output.pdbqt
```

Fonte: Autor

Assim que o programa foi executado, 2 arquivos foram criados automaticamente a partir do comando inicialmente inserido: log.txt e output.pdbqt, possuindo as informações de energia e disposição espacial das 20 melhores conformações encontradas.

4.3 Docking do complexo entre COI1-ASK1-JAZ1 e as duas formas enantioméricas de floribundano B (FB)

O estudo do *docking* molecular do complexo entre COI1-ASK1-JAZ1 e FB, exigiu a criação de um arquivo de coordenadas pdb para cada um dos enantiômeros de FB. Com o auxílio do software Avogadro, as estruturas foram geradas e otimizadas, utilizando-se o campo de força GAFF (GENERAL Amber Force FIELD).

Esta rotina de otimização está baseada em mecânica molecular e, apesar da moderada exatidão no cálculo da energia, apresenta elevada exatidão na otimização de distâncias, ângulos de ligação e ângulos diedros - características necessárias para resultados de *docking* molecular confiáveis. Após a otimização, gerou-se para cada enantiômero o arquivo com extensão .pdb. Cada um desses arquivos foi utilizado em conjunto com o arquivo enz.pdb para a realização dos experimentos de *docking* para

avaliar, individualmente, os complexos entre COI1-ASK1-JAZ1 e os enantiômeros, que serão referidos a partir deste ponto como COI1-RFB e COI1-SFB.

Para o *docking* desses complexos, estabeleceu-se os mesmos parâmetros experimentais utilizados no *redocking* de COI1-JA-Ile, uma vez que se mostraram confiáveis para reproduzir a estrutura cristalográfica PDB ID: 3OGL:

- (1) *grid box* compreendendo todo complexo COI1-ASK1-JAZ1;
- (2) energy range = 10000;
- (3) número de modos = 40000000;
- (4) exhaustiveness = 600.

Vale ressaltar que, para todo experimento de *docking*, o arquivo de extensão pdb foi exportado para a extensão pdbqt com programa AutoDock Tools. Esse arquivo gerado assegura que o ligante exportado exercerá esse papel durante a execução do *docking*. Caso contrário, o programa não realiza o experimento de *docking*, devido à ausência da especificação apropriada para a um ligante e para um receptor.

4.4 Docking do complexo entre COI1-ASK1-JAZ1 e a Coronatina (CR)

Para elucidar o que foi proposto, realizou-se o *docking* molecular do complexo entre COI1 e a substância natural coronatina (CR). Essa substância, como discutido no referencial teórico deste trabalho, é um ativador da atividade hormonal do sistema COI1-JA-Ile, mais eficiente que o JA-Ile por conta da similaridade estrutural entre a CR e o JA-Ile. O aumento na afinidade ocorre devido à menor flexibilidade das ramificações e de melhores interações com o domínio de ligação. Os parâmetros de *docking* utilizados para o complexo COI-CR foram os mesmos utilizados nos estudos com COI-JA-Ile, COI1-RFB e COI1-SFB e o arquivo contendo a estrutura da CR foi gerado de maneira similar a dos enantiômeros de FB.

4.5 Análise dos dados obtidos nos experimentos de *redocking* do complexo COI1-JA-Ile e *docking* dos complexos COI1-RFB, COI1-SFB e COI1-CR

O software Autodock Vina permitiu-nos gerar, como resultado do experimento de *docking*, os arquivos log.txt e output.pdbqt. O arquivo log.txt trouxe uma tabela com

os 20 melhores resultados obtidos no experimento de docking, ordenados pelo valor de energia de *docking* de cada conformação do complexo mais estável para o menos estável. O arquivo output.pdbqt contém as coordenadas em pdb dos resultados dos experimentos de *docking*. As coordenadas pdb, obtidas como arquivos de saída do *docking* foram selecionadas com o auxílio do software PyMOL e verificou-se para estes resultados:

- (1) Em que região da enzima ou complexo enzimático - como é o caso aqui em estudo - ocorreu a interação com o ligante. Muitas vezes, dependendo do tamanho da *grid box*, especialmente quando se tratava do experimento de *docking* às cegas, o AutoDocking Vina apresentou soluções em que o ligante ocorreu em diferentes regiões do receptor enzimático. Por essa razão, fez-se necessário agrupar as soluções de *docking* em função das regiões do receptor em que se encontrava o ligante;
- (2) Resíduos de aminoácidos participantes na estabilização do ligante: somente os resíduos com distância de até 5 Å do ligante foram considerados como pontos de interação. Essa distância foi especificamente estabelecida, pois engloba possíveis ligações de hidrogênios e interações de Van der Waals/London, sendo elas, quando calculadas pelo software PyMOL, equivalentes aos intervalos 2,8 - 3,4 Å e 3,8 - 4,2 Å, respectivamente. O comando utilizado para encontrar os átomos a essa distância foi "*show sticks, byres all within 5 of jaile*", sendo '*jaile*' a seleção dada aos átomos que compõem o ligante.

Na sequência, após a identificação das unidades responsáveis por interagir através de ligações de hidrogênio com o JA-Ile a uma distância menor ou igual a 5 Å, adicionou-se manualmente os indicativos das ligações mais próximas e marcou-se, o domínio de ligação e os aminoácidos participantes da estabilização do ligante.

Os arquivos output contêm as 20 estruturas de menor energia, de forma decrescente, com sua representação gráfica visualizada pelo programa PyMOL. Os arquivos .log contêm informações como distâncias da conformação zero - aquela marcada pelo programa como a conformação mais estável encontrada e utilizada como parâmetro para localização espacial das conformações subsequentes. Sendo assim, as distâncias apresentadas nos arquivos de saída log.txt têm como referência a conformação zero, de menor energia.

Analisados em conjunto, os dois arquivos gerados para cada complexo estudados permitiram comparar as poses de interação entre COI1 e os ligantes JA-Ile, SFB, RFB e CR obtidas via *redocking* com a estrutura cristalográfica do complexo COI1-JA-Ile. A partir desses dados, os aspectos energéticos e estruturais dos complexos COI1-RFB, COI1-SFB, COI1-CR e complexo COI1-JA-Ile foram analisados comparativamente com o arquivo cristalográfico.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Analisando o *redocking*

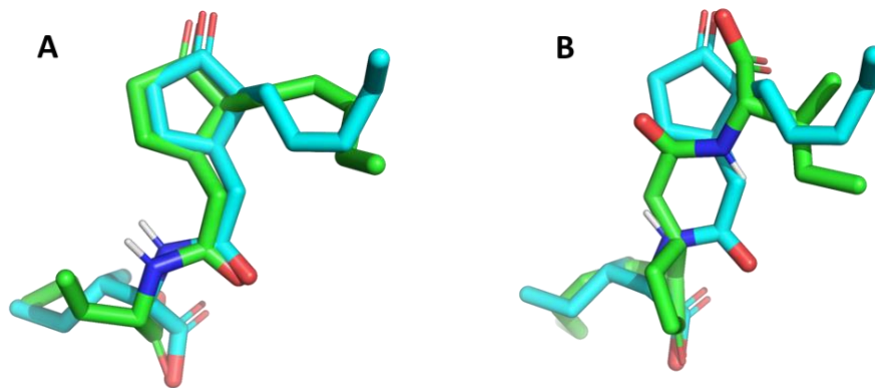
Os valores padrão (default) sugeridos pelo software AutoDocking Vina para os parâmetros experimentais do experimento de *docking* não foram suficientes para encontrar soluções de *redocking* que posicionassem JA-Ile no domínio de ligação identificado nas coordenadas cristalográficas - região esta que trataremos a partir de agora como domínio de ligação do JA-Ile (DLJ). Sendo assim, foi conduzida uma bateria de testes a fim de encontrar valores que validassem o *redocking*. Em meio aos possíveis valores que poderiam ser adotados para os parâmetros experimentais neste experimento de *docking* às cegas, os que conduziram a soluções com JA-Ile no DLJ foram *energy range* = 10000; *num_modes* = 40000000 e *exhaustiveness* = 600.

Dentre as soluções encontradas a partir do *redocking*, as 2 soluções de mais baixa energia apresentaram JA-Ile no DLJ (Figura 20), com energias iguais à -9,0 kcal/mol e -8,5 kcal/mol, respectivamente. Como pode ser observado na figura 20A, solução mais estável apresentou a estrutura de JA-Ile (azul) no DLJ e com excelente similaridade conformacional quando comparada com a pose desta mesma molécula na estrutura cristalográfica (verde). As diferenças consistem na rotação da cadeia alquênica lateral, porém permanece com mesma orientação, o que indica o seu posicionamento na cavidade hidrofóbica inicialmente observada para esta cadeia na estrutura cristalográfica e interagindo com mesmos resíduos de aminoácidos.

Além das soluções discutidas acima, pôde-se observar outras 13 soluções que colocaram JA-Ile em outra posição de interação com COI1 e com *degron*, e esta região será tratada neste trabalho como domínio de ligação alternativo 1 (DLA1) (Figura 22). Investigou-se também uma terceira pose de interação com COI1 (na lateral externa da COI1) em que não houve interação com o *degron*, DLA2. Os valores de energia de

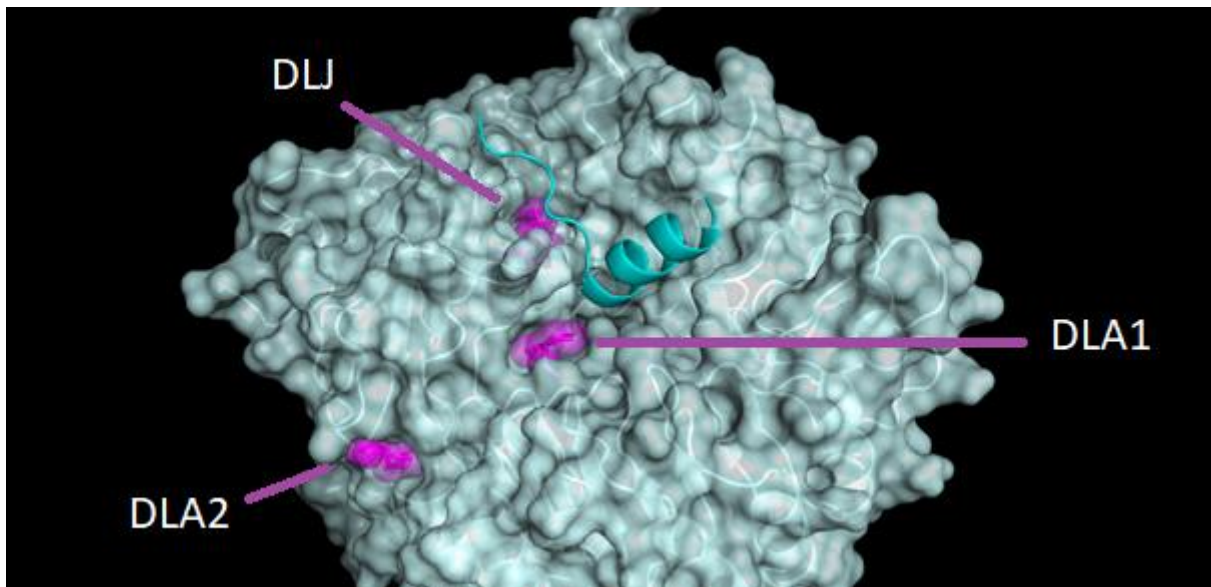
interação para as soluções no DLA1 variaram entre -7,3 kcal/mol e -6,8 kcal/mol, ao menos 1,2 kcal/mol menos estáveis do que as soluções que colocaram JA-Ile no DLJ. Já para DLA2, a energia encontrada de interação foi igual a -7,1 kcal/mol; cerca de 1,0 kcal/mol menos estável que DL.

Figura 21 – Sobreposição das estruturas de JA-Ile obtidas no *redocking* (verde) com aquela contida no arquivo PDB ID: 3OGL (azul). A) -9,0 kcal/mol B) -8,5 kcal/mol.



Fonte: Autor

Figura 22 – Domínios de ligações encontrados no experimento de redocking do complexo COI1-JA-Ile.



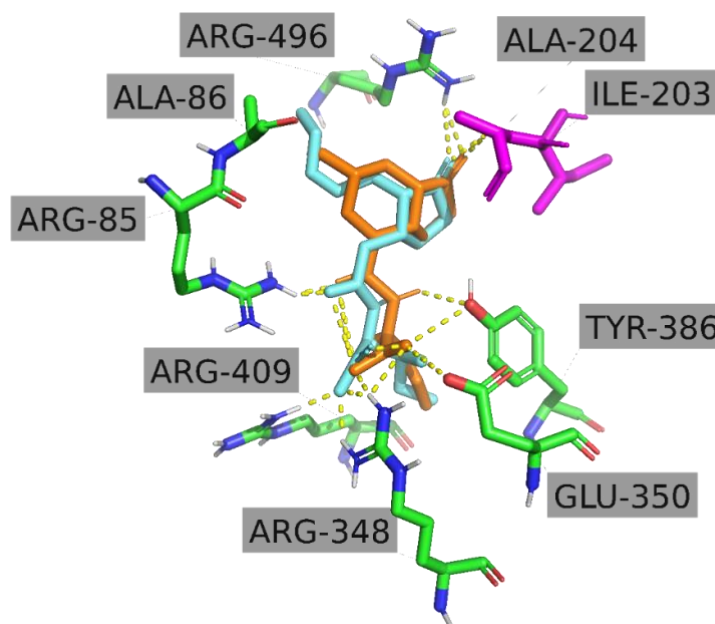
Fonte: Autor

Fica evidente que há similaridade entre ambas as conformações - a cristalográfica e a resultante do *redocking*. Tal similaridade indica a validação do *docking* através do *redocking* executado, garantindo confiança aos experimentos de *docking* subsequentes entre a enzima COI1, e os ligantes RFB, SFB e CR.

5.2 Coronatina e sua energia de interação

A sobreposição do resultado de *docking* do complexo COI1-CR e as coordenadas cristalográficas de COI1-JA-Ile permitem concluir que os mesmos resíduos de aminoácidos são os responsáveis por estabilizar ambos os hormônios (Figura 23). Os valores energéticos do estado de menor energia apresentado pelo *docking* da coronatina foi de -10,8 Kcal/mol, e um salto energético de -2,4 kcal/mol para o próximo resultado conformacional encontrado. Quando comparado ao JA-Ile, há uma diferença de 1,8 Kcal/mol entre eles, evidenciando a maior afinidade da CR com o DLJ, em linha com a maior atividade da CR, previamente discutida no referencial teórico.

Figura 23 – Sobreposição entre estruturas de JA-Ile (azul) e CR (laranja) encontradas como solução de *docking* no DLJ evidenciando ligações de hidrogênio com os mesmos resíduos de aminoácidos da COI1 (verde). Resíduos em roxo fazem parte do *degron* de JAZ.



Conforme pode ser observado na figura 23, há uma série de resíduos de aminoácidos responsáveis por estabilizar o ligante, através de ligações de hidrogênio, os quais estão posicionados à uma distância menor ou igual a 5 Å do JA-Ile e da CR. Alguns dos resíduos de aminoácidos do DLJ da COI1 interagem com o ligante através de ligações de hidrogênio. São eles Arg-496 e Tyr-444 interagindo com a cetona; Arg-409 e Arg-348 interagindo com o ácido carboxílico e Arg-85 interagindo com a amida. Ressaltando que a Arg-348 faz ligações de hidrogênio, através de seu grupo guanidina. Além disso, o *degron* de JAZ (em rosa) também tem participação na estabilização do ligante, através da ligação de hidrogênio entre grupo cetona do ligante e o grupo amida do resíduo de aminoácido Ala-204 de JAZ. Esses fatores mostram que o *degron* também é parte fundamental na estabilização do ligante, sendo responsável por interagir em dois momentos com o ligante.

5.3 Analisando o *docking* entre S-floribundano B (SFB) e COI1

Como resultado do *docking* às cegas envolvendo (SFB) e enzima COI1, foram identificadas 3 soluções no DLJ, 13 soluções no DLA1, 3 no DLA2 e uma última solução posicionou SFB em uma quarta e nova região que foi nomeada de DLA3. Esta localiza-se abaixo do DLJ, na cavidade interior da enzima COI1, muito próxima dos íons fosfato (estruturas representadas por modelo *space filling* em cinza) e da região de contato entre COI1 e a E2 ASK1 (Figura 24).

Figura 24 – Domínios de ligações encontrados no experimento de *docking* do complexo COI1-SFB.

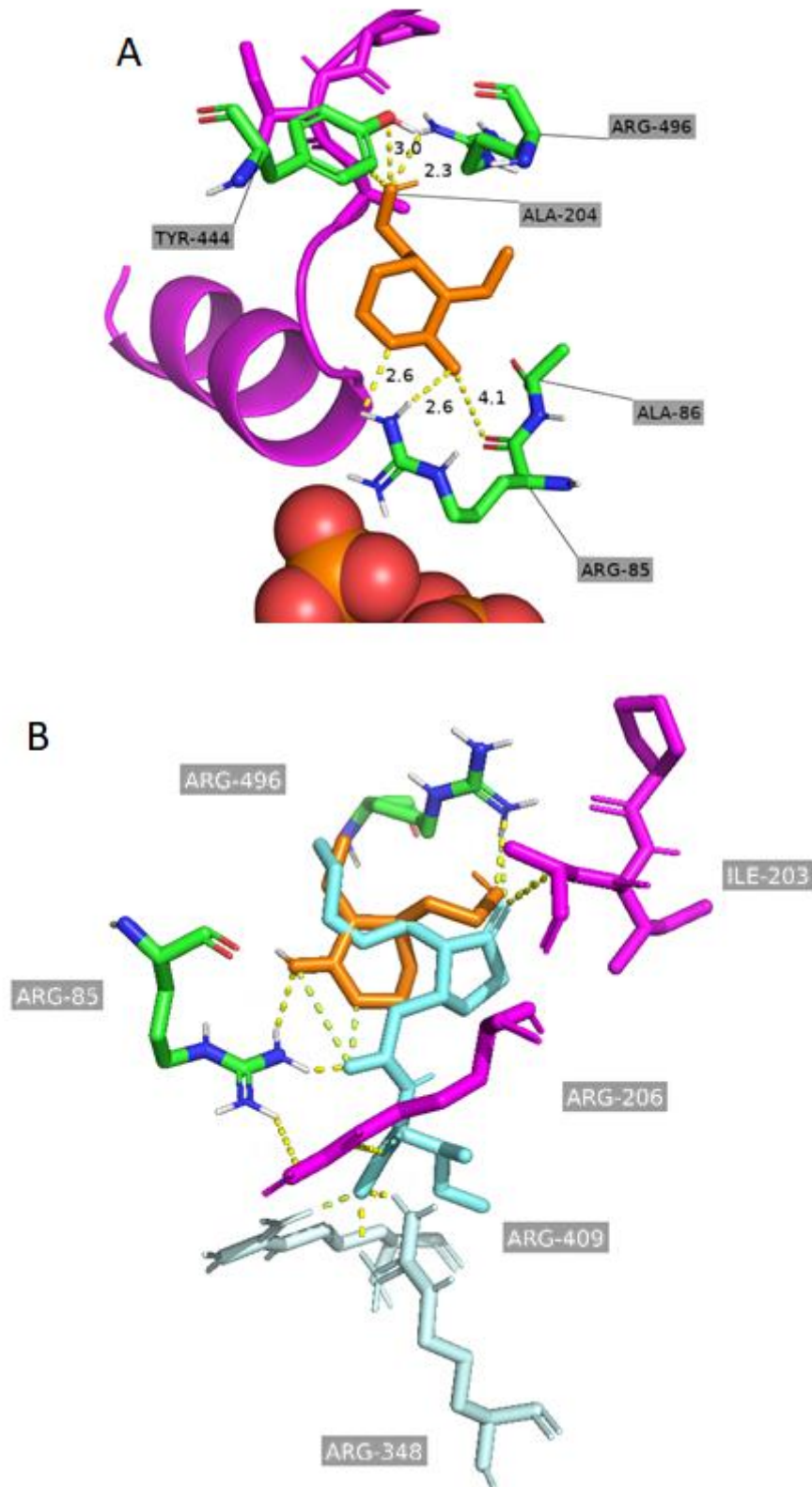


As duas soluções de menor energia global posicionaram SFB no DLJ, possuindo energias iguais a - 6,2 kcal/mol e - 6,1 kcal/mol. Já as 13 soluções com SFB posicionado no DLA1 apresentaram energia de *docking* que variou entre - 5,9 kcal/mol e -5,50 kcal/mol. O maior número soluções encontradas no sítio DLA1 pode ser explicado pelo tamanho da cavidade, que proporciona maior número de interações possíveis dentro de um intervalo pequeno de variação de energia.

A análise das interações entre SFB e os resíduos de aminoácido do DLJ de COI1 e aqueles do *degron* de JAZ permitiu verificar que estas interações coincidiram com aquelas observadas entre JA-Ile, COI1 e JAZ, com destaque para Ala-86, Ala-204, Arg-85, Arg-496, da enzima COI1 e Ile-203, integrante de JAZ. (Figura 25). Ao comparar o posicionamento de SFB no DLJ com o aquele de JA-Ile na estrutura cristalográfica, pode-se observar que as duas soluções apresentam SFB de forma diferente. Na solução de menor energia, SFB está posicionada no DLJ de forma invertida com relação à disposição do JA-Ile, tendo a carbonila da lactona orientada para a região mais interna do domínio de ligação (Figura 25 B). Em evidência, tem-se a cadeia lateral contendo a hidroxila orientada em direção ao *degron* de JAZ. A hidroxila interage no topo do domínio através de duas ligações de hidrogênio: uma com o resíduo de aminoácido Ala-204 do *degron*, a uma distância de 2,3 Å; e outra com grupo guanidina da Arg-496 da COI1, a uma distância de 3,4 Å. Tais disposições estão em linha com a característica anteriormente abordada sobre o DLJ: o topo e o fundo possuindo densidade de carga, de modo a interagir com a lactona e com o álcool.

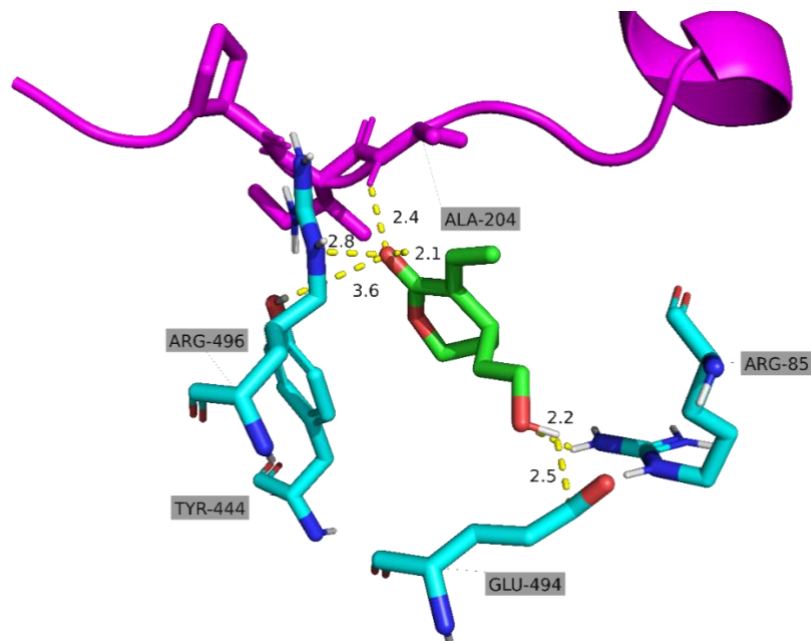
Na figura 25B é possível observar que os resíduos adicionais com os quais JA-Ile interage, quando comparado com o SFB, apresentam-se em verde. Essas interações adicionais proporcionam um acréscimo na energia de interação e estabilização do ligante no domínio de ligação. Tais interações são proporcionadas pela presença do resíduo de isoleucina que, através da carboxila, realiza 5 ligações de hidrogênio a mais.

Figura 25 – Solução de menor energia para o complexo COI1-SFB, quando interage no DLJ, (A) evidenciando interações realizadas com resíduos de aminoácidos; (B) sobreposição com JA-Ile, em azul (coordenada cristalográfica).



Já na segunda solução de menor energia, o posicionamento da lactona assemelha-se ao observado para a ciclopentanona de JA-Ile, com a maior concentração de carga, presente na lactona, orientada para a abertura da cavidade na qual está inserida, em direção ao *degron* de JAZ (Figura 26). Além disso, a cadeia lateral está orientada para o interior da molécula, como esperado inicialmente. Nessa conformação, a Ala-204 e Arg-496 interagem com a carbonila da lactona e a Arg-85, com a hidroxila da cadeia lateral.

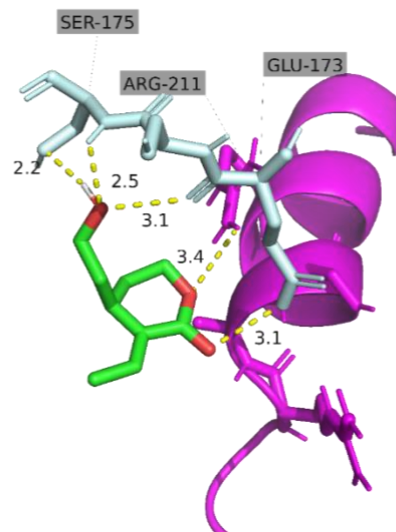
Figura 26 – Solução com segundo menor valor de energia para o complexo COI1-SFB, evidenciando interações realizadas com resíduos de aminoácidos. Interação ocorre no DLJ.



Fonte: Autor

Remetendo ainda às soluções de *docking* para o complexo COI1-SFB, foram observadas interações do SFB com o DLA1 (Figura 27). Observou-se a carbonila da lactona interagindo com um resíduo de Glu-173 da COI1 e com a Arg-211 do *degron*; enquanto a hidroxila da cadeia lateral interagia com a Ser-175 da COI1. Nessa conformação, o posicionamento horizontal de SFB fica evidente, indicando uma cavidade rasa de interação.

Figura 27 – Solução de menor de energia para o complexo COI1-SFB ocorrendo no DLA1, evidenciando interações realizadas com resíduos de aminoácidos.



Fonte: Autor

5.4 Analisando o *docking* entre *R*-floribundano B (RFB) e COI1

Como solução de *docking* para o complexo entre o RFB e a enzima COI1, foram observadas interações nos quatro domínios de ligação observados no experimento de *docking* com SFB: DLJ, DLA1, DLA2 e DLA3 (Figura 28).

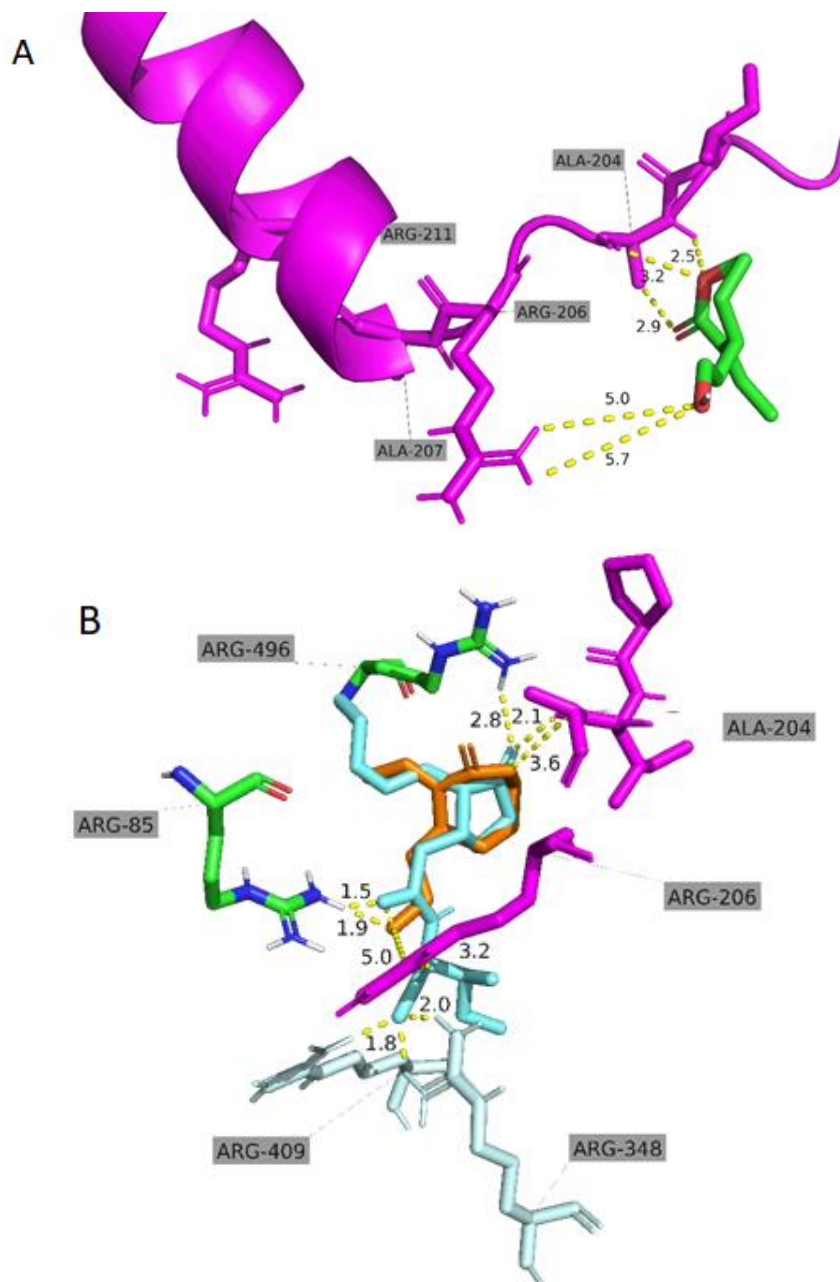
Figura 28 – Domínios de ligações encontrados no experimento de *docking* do complexo COI1-RFB.



Fonte: Autor

Para o experimento de *docking* do complexo entre COI1 e o RFB, o sítio de interação que melhor estabilizou o ligante foi o DLA1, com energia igual a -6.3 kcal/mol. A solução de *docking* de menor energia de ligação do RFB com o DLJ apresentou energia de *docking* igual a -6,0 kcal/mol. Ao todo, 2 soluções ocorreram no DLJ, 13 no DLA1, 4 no DLA2 e 1 no DLA3 (Figura 29).

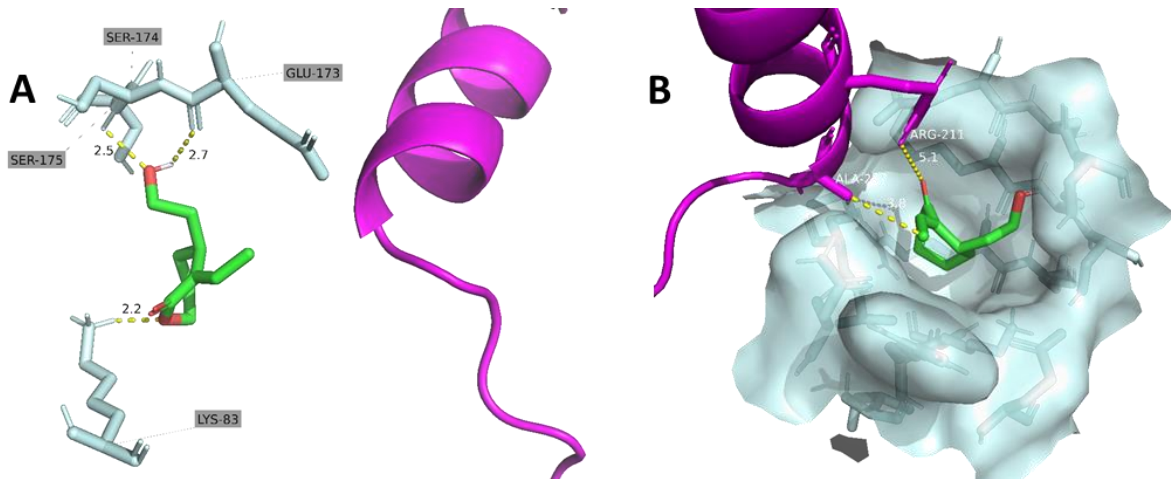
Figura 29 – Conformação de menor energia para o complexo COI1-RFB, quando a interação ocorre no DLJ, (A) evidenciando interações realizadas com resíduos de aminoácidos, (B) sobreposição com JA-Ile (coordenada cristalográfica).



Quando posicionado no DLJ, o RFB apresentou uma característica que o assemelha aos hormônios já conhecidos: interação com o *degron* de JAZ também através da cavidade polar formada a partir da interação da Phe 89 da enzima COI1 com a lactona (Figura 29). Como consequência, provoca a abertura de um canal no qual será realizada uma interação entre a Arg-206 de COI1 e a hidroxila de RFB, que se encontra orientada para o fundo do domínio de ligação.

Já a solução de menor energia em meio a todos os resultados deste experimento, que mostra a interação de RFB no DLA1, à primeira vista, não sugere interação entre o RFB e o *degron* de JAZ (Figura 30A). Porém, quando analisados os outros estados conformacionais obtidos como soluções de *docking* em que RFB está posicionado no DLA1 fica evidente que, mesmo neste domínio de ligação, o *degron* atua na estabilização do ligante, através da ligação com a Arg-211, (Figura 30B).

Figura 30 – Conformações para o complexo COI1-SFB, quando a interação ocorre no DLA1, (A) solução de menor energia, (B) solução que sugere interação com JAZ.



Fonte: Autor

5.5 Análise comparativa entre os resultados obtidos para os complexos COI1-SFB e COI1-RFB

Do ponto de vista da topologia das interações supramoleculares observadas nos resultados de *docking* dos complexos COI1-SFB e COI1-RFB, ambos apresentaram soluções que interagem em domínios semelhantes: DLJ, DLA1, DLA2

e DLA2. Em se tratando de um sistema dinâmico, não é correto adotar o valor global de menor energia em meio às soluções encontradas como o resultado absoluto deste estudo. A análise comparativa dos valores de energia das 40 soluções analisadas - 20 para cada complexo - revela que as energias de *docking* variaram entre -6,3 e -5,3 kcal/mol, um $\Delta E_{docking} = 1,0$ kcal/mol (Tabela 1).

Tabela 1: Valores de energia de *docking* das 20 soluções mais estáveis dadas como solução para o estudo de *docking* molecular dos complexos COI1-SFB e COI1-RFB.

	COI1-RFB (kcal/mol)	Domínio de ligação	COI1-SFB (kcal/mol)	Domínio de ligação
1	-6.3	DLA1	-6.2	DLJ
2	-6.0	DLA1	-6.1	DLJ
3	-6.0	DLJ	-5.9	DLA1
4	-6.0	DLA1	-5.9	DLA1
5	-6.0	DLA2	-5.8	DLA1
6	-5.9	DLA1	-5.8	DLA1
7	-5.8	DLA1	-5.8	DLA1
8	-5.6	DLA1	-5.8	DLA1
9	-5.5	DLA1	-5.7	DLA2
10	-5.5	DLA2	-5.7	DLA1
11	-5.5	DLA1	-5.7	DLJ
12	-5.5	DLA1	-5.7	DLA2
13	-5.5	DLA1	-5.7	DLA2
14	-5.5	DLA3	-5.6	DLA1
15	-5.5	DLA2	-5.6	DLA1
16	-5.5	DLJ	-5.6	DLA1
17	-5.4	DLA1	-5.6	DLA1
18	-5.4	DLA1	-5.6	DLA3
19	-5.3	DLA1	-5.5	DLA1
20	-5.3	DLA2	-5.5	DLA1

Fonte: Autor.

Esta diferença de energia se encontra muito próxima do erro quântico, 1,0 kcal/mol, faixa de ΔE , dada em kcal/mol, entre dois estados energéticos conectados por um equilíbrio conformacional, cuja barreira de energia permita a livre interconversão entre estes estados, e que não permite selecionar qual é o estado preferencial. Este valor tem origem na relação matemática entre energia livre (ΔG°) e constante de equilíbrio (K), $\Delta G^\circ = -RT \ln K$. Resolvendo esta equação à 298 K e diferentes proporções entre dois estados ligados por um equilíbrio conformacional,

revela que um $\Delta G^\circ = 1,00$ kcal/mol garante, no máximo 80 – 85% de prevalência do estado menos energético (Tabela 2) (CAREY, 2000).

Tabela 2: Relação entre Composição no equilíbrio (% estado mais estável), constante de equilíbrio (K) e diferença de Energia Livre entre os estados em equilíbrio (ΔG°).

Estado mais estável (%)	Constante de equilíbrio (K)	ΔG°_{298K} Energia livre (kcal/mol)
50	1,00	0,000
55	1,22	-0,119
60	1,50	-0,240
65	1,86	-0,367
70	2,33	-0,502
75	3,00	-0,651
80	4,00	-0,821
85	5,67	-1,028
90	9,00	-1,302
95	19,00	-1,744
98	49,00	-2,306
99	99,00	-2,722
99,9	999,00	-4,092

Fonte: Carey (2000), adaptada.

Isso indica que os resultados obtidos para os complexos em estudo mostram pouca variação energética, com diferenças entre os estados muito pequenas, próximas ao erro quântico, sugerindo que não há um estado energético conformacional preferencial e tão pouco uma seletividade para um dado domínio de ligação. Esta observação pode ter sua origem no fato de ambos enantiômeros do FB serem estruturas mais compactas do que JA-Ile e CR. Somada a isso, há também a redução do número de sítios capazes de realizar ligação hidrogênio. RFB e SFB têm apenas dois sítios capazes de realizar este tipo de interação, enquanto JA-Ile e CR apresentam três destes sítios, além de uma cadeia lateral hidrofóbica adicional, que permitem uma melhor seleção das poses conformacionais, como foi observado nos hormônios.

Apesar de o estudo sugerir uma menor seletividade para a interação de RFB e SFB no DLJ, é importante ressaltar novamente que o estudo foi realizado com a

estratégia de *docking* às cegas. Levando-se em consideração o tamanho do complexo COI1-ASK1-JAZ e que entre as 20 poses mais estáveis foram observadas majoritariamente interações na parte interna da COI1, os FB têm um grande potencial de interação produtiva com esta E3. Até porque, o posicionamento de moléculas no DLA1 aproxima estes ligantes do DLJ e podem ser um estágio intermediário no caminho da interação desejada.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

No decorrer do estudo, verificou-se que a estratégia de *docking* molecular viabilizou a análise comparativa dos complexos entre COI1 e os enantiômeros de FB, JA-Ile e CR.

O *redocking* do complexo COI1-JA-Ile permitiu validar o método utilizado a partir da similaridade apresentada entre o seu resultado de *docking* e a estrutura cristalográfica inicial. Também ajudou a fornecer os parâmetros experimentais necessários para obter resultados válidos acerca das interações entre os enantiômeros de FB e a COI1.

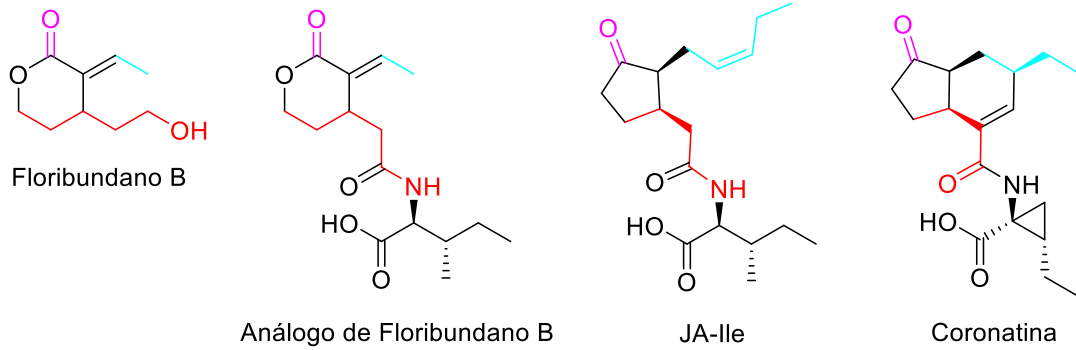
Durante o estudo de *redocking*, também foi possível identificar a existência de outros domínios de ligação presentes na enzima COI1. Esses domínios sugerem haver interações entre potenciais ligantes e o *degron* para a marcação via ubiquitinação, além dos já conhecidos. O DLA1 se destaca como novo domínio de ligação por estar próximo ao *degron*. Tal proximidade sugere a utilização de um ligante que possua afinidade com o domínio e proporcione a interação do *degron* de JAZ, de modo que seja realizada uma sobreposição efetiva com esse fragmento, que trará maior estabilização e, conseqüentemente, maior potencial de atividade bioativa.

Ambos enantiômeros apresentaram, entre os 20 resultados mais estáveis, poses de *docking* em três domínios da COI1, sendo um deles o DLJ, um na região interna da COI1 e próximo ao DLJ e outro em uma região externa da COI1. Além disso, ambas poses encontradas na parte interna da COI1 mostraram interações ligação de hidrogênio de SFB e RFB tanto com a enzima COI1 quanto com o *degron* da JAZ.

Pode-se verificar que os isômeros de FB possuem menor potencial de interação com COI1, quando comparados ao JA-Ile e CR, o que sugere menor potencial bioativo no processo de marcação do sistema ubiquitina-proteassomo para os isômeros de FB. Tal resultado foi atribuído à menor cadeia lateral de FB, que posiciona a hidroxila, grupo carregado eletrostaticamente, a uma maior distância da arginina 206 do *degron*, parte essa observada nas interações do JAZ com JA-Ile e CR. Como sugestão, fica a

possibilidade de um estudo de *docking* com um análogo de FB em que, ao invés do grupo hidroxila, há uma amida formada com a isoleucina (Figura 31).

Figura 31 – Proposta de um análogo de floribundano B contendo isoleucina, de forma a mimetizar as interações observadas entre COI1 e os ligantes JA-Ile e CR.



Fonte: Autor.

REFERÊNCIAS

ANFINSEN, C. B. et al. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 47, n. 9, p. 1309–1314, 1961.

BACON, F. **Novum Organum** - a interpretação da natureza. Disponível em: <http://br.egroups.com/group/acropolis/>.

BARCELOS DE SOUZA, G. **IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS QUE INTERAGEM COM O FATOR DE TRANSCRIÇÃO GmbZIP105 DE SOJA (Glycine max)**. 2014 Tese (Mestrado em Bioquímica Agrícola) - Faculdade de Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

BORGES, C. M. P.; DIAKANAWMA, C; MENDONÇA, D. I. M. D. Iridoids from *Hymenodictyon floribundum*. **Chem. Soc.**, v. 21, n. 6, p. 1121–1125, 2010.

CALLIS, J.; DREHER, K. Ubiquitin, Hormones and Biotic Stress in Plants. **Oxford journals**, Chicago, v. 99, p. 787-822, 2007.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. **Advanced Organic Chemistry: Part A Structure and mechanisms**. 4. ed. Springer-Verlag: New York, 2000, p 128.

CLAYDEN, J; GREEVES, N; WARREN, S. **Organic Chemistry**. 2 Ed. ed. New York: OXFORD, 2012.

COSTA, C.; RODRIGUES, É.; GALEMBECK, E. O vigésimo primeiro e o vigésimo segundo aminoácidos : o código genético expandido. **Genética na Escola**, v. 11, n. 2, p. 108–121, 2016.

DARWIN, C. **A Origem das Espécies**. Tradução de Joaquim da Mesquita Paul, Porto: Lello & Irmão, 2003.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. DA. Estrutura dos Grânulos de Amido e Sua Relação com Propriedades Físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 945–954, 2009.

DUPLAN, VINCENT; RIVAS, SUSANA. E3 Ubiquitin-ligases and their target proteins during the regulation of plant innate immunity. **Mini Review Article**, Castanet-Tolosan, v. 5, n. 42, 2014.

EINSTEIN, A. Fundamental ideas and problems of the theory of relativity. **Lecture delivered to the Nordic Assembly of Naturalists at Gothenburg**. Nobelprize. Lecture, 1923.

FAO. **State of food and agriculture - Rural Non-Farm income in developing countries**. v. 31, p. 389, 1998.

FERREIRA, D. C. **Enterramentos atômicos como possíveis intermediários informacionais no código do enovelamento proteico**. 2019. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Departamento de Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

GLICKMAN, M. H.; ADIR, N. The proteasome and the delicate balance between destruction and rescue. **PLoS Biology**, v. 2, n. 1, p. 25–28, 2004.

HAAS, A. L.; WARMS, J. V. B.; ROSE, I. A. Ubiquitin Adenylate: Structure and Role in Ubiquitin Activation. **Biochemistry**, v. 22, n. 19, p. 4388–4394, 1983.

HUFFAKER, ALISA; RYAN, CLARENCE A. Endogenous Peptide Defense Signals in *arabidopsis* Differentially Amplify Signaling For The Innate Immune Response. **PNAS**, Pullman, v. 104, n. 25, 2007.

JUNIOR, C. V. Terpenos com Atividade Herbicida: Uma Alternativa Para o Controle Químico de Insetos. **Química Nova**. v. 26, n 3, p 390-400, 2003.

KOMBRINK, ERICH. Chemical and genetic exploration of jasmonate biosynthesis and signaling paths. Springer-Verlag, v. 236, p. 1351-1366, 2012.

MACHADO, A. *et al.* Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 781–789, 2004.

MIERSCH, O.; SEMBDNER, G.; SCHREIBER, K. OCCURRENCE OF JASMONIC ACID ANALOGUES IN VICIA FABA. **Phytochemistry**, v. 28, n. 2, p. 339–340, 1989.

MYUNG, J.; KIM, K. B.; CREWS, C. M. The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. **Medicinal Research Reviews**, v. 21, n. 4, p. 245–273, 2001.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NGUYEN, N. T. *et al.* **Autodock Vina Adopts more Accurate Binding Poses but Autodock4 Forms better Binding Affinity**. Journal of Chemical Information and Modeling. v. 60, n. 1, p. 204-211, 2020.

PIETERSE, C. M. J. *et al.* Hormonal modulation of plant immunity. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 28, n. April, p. 489–521, 2012.

SANTOS FILHO, O. A.; ALENCASTRO, R. B. DE. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 253–259, 2003.

SECATTO, M. **Desenvolvimento da síntese total do (±)-ácido jasmônico visando aplicação em Escala Industrial**. 2013. Tese (mestrado em Química Tecnológica) - Instituto de Química, Universidade Federal de São Carlos. 2013.

SHABEK, N.; ZHENG, N. **Plant ubiquitin ligases as signaling hubs**. Nature Structural and Molecular Biology, v. 21, n. 4, p. 293–296, 2014.

SHEARD, L. B. *et al.* Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. **Nature**, v. 468, n. 7322, p. 400–407, 2010.

SILVA CARMINATI, Lara. **Predição *in silico*, da regulação pós-transcricional de genes envolvidos no sistema ubiquitina-proteassoma VIA microRNAs EM *Carica Papaya* na meleira.** 2018. Tese (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2018.

VARSHAVSKY, A. N-degron and C-degron pathways of protein degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 2, p. 358–366, 2019.

VERLI, H. **Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular.** 1 ed. Porto Alegre: São Paulo, 2014

WASTERACK, C.; HAUSE, B. Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007. review in *Annals of Botany*. **Annals of Botany**, v. 111, n. 6, p. 1021–1058, 2013.

ZHENG, X. Y. *et al.* Coronatine promotes pseudomonas syringae virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. **Cell Host and Microbe**, v. 11, n. 6, p. 587–596, 2012.