

USO DA PREDIÇÃO COMPUTACIONAL DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS EM VIROLOGIA VETERINÁRIA

SPIILKI, F.R.¹

INTRODUÇÃO

O método de modelagem por homologia fundamenta-se na hipótese de que uma seqüência de aminoácidos similar implica em estrutura e função similar entre diferentes proteínas, mesmo que estas sejam isoladas de diferentes organismos (Ginalski, Grishin *et al.*, 2005; Reeves, Thornton *et al.*, 2006). Deste modo, havendo a informação disponível a respeito da estrutura terciária de uma proteína, é possível prever a estrutura terciária de outra proteína homóloga cuja estrutura é desconhecida. De posse desses modelos estruturais gerados *in silico*, é possível inferir sobre diferentes características funcionais da proteína alvo (Ginalski, Grishin *et al.*, 2005; Reeves, Thornton *et al.*, 2006), ou mesmo sobre a presença de epitopos conformacionais na referida estrutura, através de análises de predição de epitopos descontínuos de células B, dentre outras possíveis aplicações em imunoinformática (Brusic e Petrovsky, 2003; Lundegaard, Lund *et al.*, 2007). Esses esforços podem no futuro albergar as bases para um desenho racional de vacinas aplicadas ao controle de enfermidades virais em medicina veterinária. No presente estudo, tomamos como exemplo a predição da estrutura molecular de uma proteína do envelope do Vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) (Valarcher e Taylor, 2007).

O BRSV, membro da família *Paramyxoviridae*, gênero *Pneumovirus*, é uma importante causa de pneumonia em bovinos jovens, podendo também causar infecções respiratórias com sinais clínicos em animais adultos (Valarcher e Taylor, 2007). O vírus apresenta um envelope derivado da membrana plasmática da célula hospedeira onde três glicoproteínas estão inseridas: a proteína G, responsável pela adsorção do vírus à célula, a proteína F, responsável pela fusão do envelope viral à membrana celular e a proteína SH cuja função ainda não é bem conhecida (Valarcher e Taylor, 2007). Além da fusão do envelope à membrana plasmática da célula a proteína F é considerada como responsável pela especificidade das infecções por estes pneumovírus (Schlender, Zimmer *et al.*, 2003) e constitui importante alvo da resposta imune do hospedeiro, especialmente quanto à formação de anticorpos neutralizantes e fenômenos derivados da ativação de respostas imunes do tipo Th2 (Bembridge, Rodriguez *et al.*, 2000; Fogg, Parsons *et al.*, 2001).

A proteína F é extremamente conservada dentre os membros da família *Paramyxoviridae*, sendo sintetizada como um precursor inativo (F₀) o qual ganha a estrutura de um homo-oligômero, provavelmente um trímero, no retículo endoplasmático rugoso. Durante o seu acúmulo e passagem no complexo trans-Golgi a proteína é clivada em duas subunidades denominadas F₁ e F₂, as quais permanecem ligadas por pontes dissulfeto (Zimmer, Conzelmann *et al.*, 2002). O dímero F₁-F₂ constitui a forma ativa da proteína. O maior número de variações nessa proteína, em amostras de BRSV, é encontrado no fragmento F1, enquanto o ectodomínio (F2) é bastante conservado (Zimmer, Conzelmann *et al.*, 2002).

Nos últimos anos, a estrutura da proteína F de vários paramixovírus foi elucidada e para outros a mesma foi determinada por modelagem computacional, a exemplo da proteína F do Vírus respiratório sincicial humano (HRSV) (Smith, Lawrence *et al.*,

¹ Médico Veterinário, Mestre em Virologia Animal, Doutor em Genética e Biologia Molecular; Professor Adjunto e Orientador pelo Programa de Pós-Graduação Mestrado em Qualidade Ambiental, Centro Universitário Feevale, Estrada RS-239 n 2755, Vila Nova, CEP 93352-000, Novo Hamburgo, RS. Email: fernandors@feevale.br

2002). Todavia, até o presente momento, não existem modelos confeccionados para a provável estrutura da proteína de fusão em BRSV. O presente trabalho teve como objetivo gerar, como um exemplo para a aplicação de modelagem por homologia em virologia veterinária, através de ferramentas de modelagem molecular computacional, um modelo estrutural da proteína F do BRSV em sua forma não-clivada.

MATERIAL E MÉTODOS

As seqüências deduzidas de aminoácidos da proteína F disponíveis no Genbank para diferentes amostras do BRSV foram alinhadas no programa ClustalW 1.83 e uma seqüência consenso completa da proteína foi determinada. O modelo tridimensional proposto foi construído por homologia baseado na estrutura determinada para o vírus Parainfluenza humano tipo 3 (hPI3V, PDB ID=1ZTM. Para a busca de seqüência versus estruturas molde compatíveis e confecção do modelo, a ferramenta Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/>) foi utilizada e o modelo resultante foi avaliado através dos programas PROCHEK e WHAT_IF. A ferramenta TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) foi utilizada na predição de domínios da proteína quanto à sua posição em relação à membrana. As representações gráficas foram geradas pela leitura dos arquivos pdb com auxílio do software Pymol (<http://pymol.sourceforge.net/>).

RESULTADOS

A estrutura obtida por modelagem computacional, apresentada na Figura 1, é condizente com os relatos anteriores disponíveis na literatura para as proteínas de fusão dos paramyxovírus. O gráfico de Ramachandran (Figura 2) indica a boa qualidade do modelo proposto, uma vez que 98,33 % dos resíduos de aminoácidos modelados apresentam ângulos espacialmente possíveis, em regiões favorecidas do gráfico.

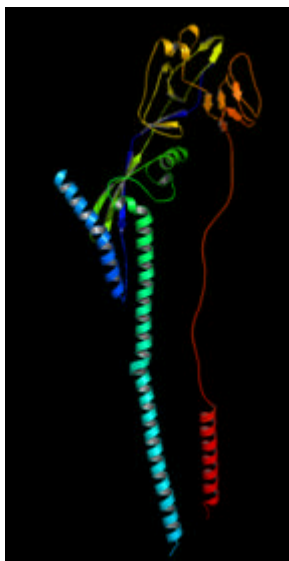
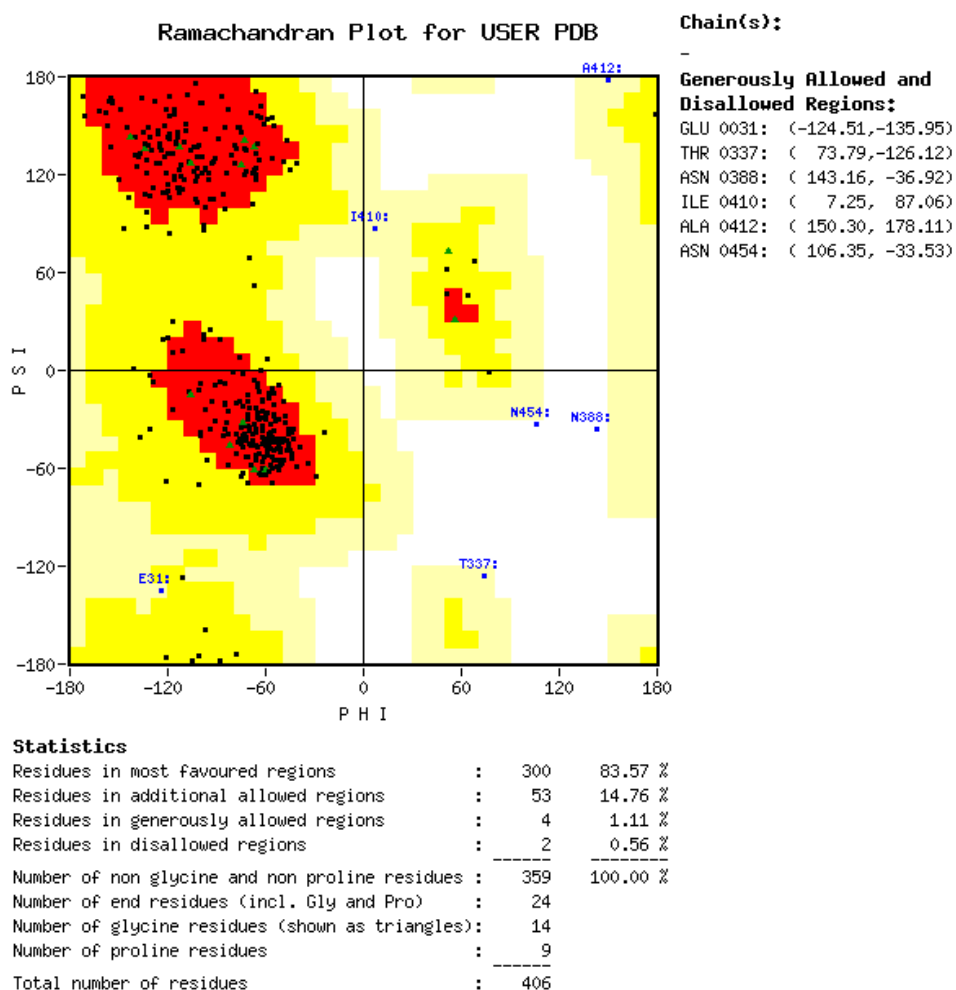


Figura 1. Modelo estrutural da proteína de fusão do BRSV, obtido através de modelagem por homologia. O modelo foi baseado na estrutura disponível para a proteína de fusão do hPI3V (PDB ID=1ZTM)



Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

Figura 2. Gráfico de Ramachandran obtido através da análise com o programa Procheck para análise das validade do modelo estrutural da proteína de fusão do BRSV, obtido através de modelagem por homologia.

DISCUSSÃO

O conhecimento da estrutura tridimensional é essencial para compreender os aspectos relativos à função e evolução das proteínas. Essas informações por si não permitem uma previsão de toda a complexidade das funções de uma determinada proteína durante uma infecção viral ou mesmo da resposta imune do hospedeiro contra a mesma (Ginalski, Grishin *et al.*, 2005). No entanto, o modelo computacional pode ser um importante guia para a realização de novos projetos em estudos sobre mutação induzida, antivirais, evolução, vacinologia ou em outras aplicações biotecnológicas ligadas à pesquisa e desenvolvimento em virologia veterinária (Korber, Labute *et al.*, 2006; Spilki, Almeida *et al.*, 2006; Stiasny e Heinz, 2006; Roy, 2008). Uma alternativa para a determinação direta

estrutura por difração de raios X ou de ressonância magnética nuclear (RMN), métodos extremamente onerosos é a de criar um modelo estrutural de três dimensões de uma seqüência alvo baseado em um homólogo de proteínas conhecido (Smith, Lawrence *et al.*, 2002; Ginalski, Grishin *et al.*, 2005).

O modelo tridimensional gerado no presente estudo, para o precursor inativo da proteína F, pode auxiliar no desenho de experimentos futuros visando, por exemplo, a mutação direcionada de sítios específicos nessa proteína e identificação de sítios antigênicos nesta proteína. Tal protocolo poderia ser útil na construção de peptídeos recombinantes bem como análise de novos isolados com variações na proteína F. Além disso, o modelo teórico de estrutura aqui obtido para a proteína F do BRSV confirma o elevado índice de conservação esperado para tal proteína entre os paramixovírus (Schlender, Zimmer *et al.*, 2003).

A modelagem molecular por homologia permite a geração de um enorme número de modelos e pode ser utilizada para virtualmente qualquer proteína alvo (Ginalski, Grishin *et al.*, 2005). Os modelos gerados são usualmente plausíveis e revelam-se condizentes com a realidade experimental sobre as funções de diferentes proteínas analisadas. Todavia, é preciso ter em mente que os modelos gerados não devem ser considerados como equivalentes perfeitos a estruturas determinadas experimentalmente. Enquanto a estrutura do esqueleto central da proteína usualmente está correta, por fatores intrínsecos ao processo, cadeias laterais e “loops” da proteína usualmente tem validade mais baixa quanto à predição conformacional (Ginalski, Grishin *et al.*, 2005). Outras alterações da estrutura protéica possíveis durante o processo de replicação viral, tais como glicosilação e processamento pós-tradução (como é caso da proteína que utilizamos como exemplo no presente estudo) podem não ser também avaliados em toda sua extensão quanto à alterações estruturais induzidas na proteína alvo (Zimmer, Conzelmann *et al.*, 2002; König, Giesow *et al.*, 2004; Ginalski, Grishin *et al.*, 2005).

Não obstante, os modelos gerados no computador podem ser um bom ponto de partida para experimentos que visem uma compreensão mais profunda da estrutura de uma determinada proteína viral e de possíveis modificações presentes em um determinado isolado ou induzidas experimentalmente neste peptídeo (Smith, Lawrence *et al.*, 2002; Stiasny e Heinz, 2006; Roy, 2008). Modelos estruturais também têm potencial na identificação de sítios antigênicos, planejamento de mutagênese, entre outras aplicações no estudo de enfermidades virais (Ginalski, Grishin *et al.*, 2005; Flower, 2007).

BIBLIOGRAFIA

- Bembridge, G. P., N. Rodriguez, *et al.* DNA encoding the attachment (G) or fusion (F) protein of respiratory syncytial virus induces protection in the absence of pulmonary inflammation. J. Gen. Virol., v.81, n.10, October 1, 2000, p.2519-2523. 2000.
- Brusic, V. e N. Petrovsky. Immunoinformatics--the new kid in town. Novartis Found Symp, v.254, January 1, 2003, p.3-13; discussion 13-22, 98-101, 250-2. 2003.

- Flower, D. R. Immunoinformatics and the in silico prediction of immunogenicity. An introduction. Methods Mol Biol, v.409, January 1, 2007, p.1-15. 2007.
- Fogg, M. H., K. R. Parsons, *et al.* Identification of CD4+ T cell epitopes on the fusion (F) and attachment (G) proteins of bovine respiratory syncytial virus (BRSV). Vaccine, v.19, n.23-24, April 30, 2001, p.3226-40. 2001.
- Ginalski, K., N. V. Grishin, *et al.* Practical lessons from protein structure prediction. Nucleic Acids Res., v.33, n.6, April 1, 2005, p.1874-1891. 2005.
- Konig, P., K. Giesow, *et al.* A novel protein expression strategy using recombinant bovine respiratory syncytial virus (BRSV): modifications of the peptide sequence between the two furin cleavage sites of the BRSV fusion protein yield secreted proteins, but affect processing and function of the BRSV fusion protein. J. Gen. Virol., v.85, n.7, July 1, 2004, p.1815-1824. 2004.
- Korber, B., M. Labute, *et al.* Immunoinformatics comes of age. PLoS Comput Biol, v.2, n.6, June 30, 2006, p.e71. 2006.
- Lundegaard, C., O. Lund, *et al.* Modeling the adaptive immune system: predictions and simulations. Bioinformatics, v.23, n.24, December 15, 2007, p.3265-3275. 2007.
- Reeves, G. A., J. M. Thornton, *et al.* Integrating biological data through the genome. Hum. Mol. Genet., v.15, n.suppl_1, April 15, 2006, p.R81-87. 2006.
- Roy, P. Bluetongue virus: dissection of the polymerase complex. J. Gen. Virol., v.89, n.8, August 1, 2008, p.1789-1804. 2008.
- Schlender, J., G. Zimmer, *et al.* Respiratory Syncytial Virus (RSV) Fusion Protein Subunit F2, Not Attachment Protein G, Determines the Specificity of RSV Infection. J. Virol., v.77, n.8, April 15, 2003, p.4609-4616. 2003.
- Smith, B. J., M. C. Lawrence, *et al.* Modelling the structure of the fusion protein from human respiratory syncytial virus. Protein Eng., v.15, n.5, May 1, 2002, p.365-371. 2002.
- Spilki, F. R., R. S. Almeida, *et al.* Phylogenetic relationships of Brazilian bovine respiratory syncytial virus isolates and molecular homology modeling of attachment glycoprotein. Virus Res, v.116, n.1-2, March 1, 2006, p.30-7. 2006.
- Stiasny, K. e F. X. Heinz. Flavivirus membrane fusion. J. Gen. Virol., v.87, n.10, October 1, 2006, p.2755-2766. 2006.
- Valarcher, J. F. e G. Taylor. Bovine respiratory syncytial virus infection. Vet Res, v.38, n.2, March 1, 2007, p.153-80. 2007.
- Zimmer, G., K.-K. Conzelmann, *et al.* Cleavage at the Furin Consensus Sequence RAR/KR109 and Presence of the Intervening Peptide of the Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Are Dispensable for Virus Replication in Cell Culture. J. Virol., v.76, n.18, September 15, 2002, p.9218-9224. 2002.