

## ACOPLAMENTO MOLECULAR DE EPSPS COM GLIFOSATO POR MEIO DO USO DO DOCKTHOR

### *MOLECULAR COUPLING OF EPSPS WITH GLYPHOSATE BY USING THE DOCKTHOR*

Ana Marina Pedrolo<sup>1</sup>, Railson Schreinert dos Santos<sup>2</sup>, Evandro Ehler Venske<sup>3</sup>, Antônio Costa de Oliveira<sup>4</sup>, Camila Pegoraro<sup>5</sup>

#### RESUMO

O acoplamento molecular é um método que prediz a melhor orientação de uma molécula com relação a um ligante para a formação de um complexo estável. Sendo um dos métodos mais utilizados no design de fármacos baseados em estrutura, é uma ferramenta poderosa com aplicações diversas, ainda pouco utilizada para entender polimorfismos úteis para o melhoramento genético de plantas e para estudos de alterações em populações naturais de plantas. O glifosato é um dos mais importantes herbicidas do mundo, possibilitando o controle efetivo de diversas espécies de plantas daninhas. A crescente adoção de culturas transgênicas resistentes ao glifosato nas Américas causou o aumento do uso deste químico, para o controle em grandes áreas. O entendimento do desenvolvimento da resistência a este herbicida por diferentes plantas é de grande interesse ecológico e agrícola, tendo sido foco de diferentes estudos que já demonstraram de que forma ocorre a ligação da molécula herbicida com a enzima por ela inibida. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo mensurar a capacidade de uso da técnica de acoplamento molecular para predição da orientação de acoplamento entre ligante e receptor para usá-lo posteriormente em estudos de estrutura genética de populações de plantas naturais. Realizou-se o acoplamento entre sequências disponíveis para enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintase e a estrutura do herbicida em questão, utilizando acoplamento cego através da ferramenta brasileira Dockthor. Os resultados do acoplamento comparados com o de estudo de cristalografia mostra que a técnica de predição pode ser bastante útil e eficiente para encontrar sítios de especial interesse de estudo para as áreas de genética e ecologia.

**PALAVRAS CHAVE:** docagem molecular, resistência, melhoramento genético.

<sup>1</sup> Engenheira Agrônoma - Mestranda em Fitomelhoramento da Universidade Federal de Pelotas.

<sup>2</sup> Doutor em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas.

<sup>3</sup> Estudante de Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas.

<sup>4</sup> Professor PhD da Universidade Federal de Pelotas.

<sup>5</sup> Professora da Universidade Federal de Pelotas.

## **ABSTRACT**

*Molecular docking is a method that predicts a best orientation in which a molecule binds to a ligand to form a stable complex. It is one of the most widely used methods for structurebased drug design and is a powerful tool with diverse applications, yet not extensively used to understand polymorphisms useful for plants breeding and for studies of changes in the genetic structure of natural plant populations. Glyphosate is one of the most important herbicides in the world, allowing the effective control of several weed species. The increasing adoption of transgenic crops resistant to glyphosate in the Americas has caused increase of its use for control in large areas. The understanding of the development of resistance to this herbicide by different plants is of great ecological and agricultural interest, reason why has been the focus of different studies that already demonstrate that it is a connection of the herbicide molecule with an enzyme inhibited by it. To measure the capability of the molecular docking technique in evaluating the correct docking between ligand and receptor to posteriorly use it in studies of genetic structure of natural plant populations, we carried out the docking between sequences available for 5enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase and the glyphosate through blind docking using the Brazilian tool DockThor. The results of the docking compared to the crystal study suggests that this technique can be useful for different studies in the field of plant genetics and ecology.*

**KEYWORDS:** *molecular docking, resistance, plant breeding.*

## **INTRODUÇÃO**

No campo da modelagem molecular, o acoplamento molecular (*molecular docking*) é um método que prediz a melhor orientação de uma molécula com relação a um ligante para a formação de um complexo estável (LENGAUER; RAREY, 1996). As associações entre moléculas biologicamente relevantes desempenham um papel importante na transdução de sinal, sendo que a orientação relativa das moléculas que interagem pode afetar o tipo de sinal produzido. Além disso o acoplamento molecular é um dos métodos mais utilizados no design de fármacos baseados em estrutura, devido à sua capacidade de prever a conformação de ligação com moléculas pequenas no local de ligação alvo apropriado. A caracterização deste comportamento desempenha um papel importante no desenho racional de drogas, bem como para elucidar os processos bioquímicos fundamentais (KITCHEN et al., 2004). Ainda que seja de grande importância para entendimento de processos biológicos e na elaboração de fármacos, poupando grandes quantias de dinheiro para o seu desenvolvimento, tais técnicas ainda são pouco utilizadas

para os estudos envolvendo plantas, tanto do ponto de vista de sucessões ecológicas, como para entendimento de processos envolvidos no melhoramento genético de plantas.

O glifosato (N-fosfometil glicina) é um dos mais importantes herbicidas do mundo, possibilitando o controle efetivo de diversas espécies de plantas daninhas. A crescente adoção de culturas transgênicas resistentes ao glifosato nas Américas, causou o aumento do uso deste químico, para o controle em grandes áreas. Na Argentina e no Brasil, existem agora populações resistentes ao glifosato de *Sorghum halepense* (L.) Pers e *Euphorbia heterophylla* L., respectivamente. Com a continuidade desta pressão de seleção causada pelas culturas transgênicas, prevê-se que biótipos resistentes de outras espécies evoluirão nos próximos anos, constituindo um risco importante para o sucesso contínuo desta forma de cultivo (POWLES, 2008).

Considerando-se que o uso de técnicas de acoplamento molecular ainda é baixo na área de biologia molecular vegetal e que esta ferramenta pode ser importante para o estudo de agroquímicos como o glifosato, buscou-se neste estudo verificar a eficiência do uso de acoplamento molecular para predição da interação da molécula de glifosato com sua enzima alvo, a 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS; EC 2.5.1.19).

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Estudo de referência*

Como referência para comparação do sucesso do acoplamento molecular foi utilizado um estudo de cristalografia com raios-x (SCHÖNBRUNN et al., 2001: 1376-1380).

Utilizou-se o modelo depositado com o número [1G6S](#) no PDB.

### *Obtenção do receptor e do ligante*

Como receptor foi utilizada a 2AAY 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetase (DOI: 10.2210/pdb2aay/pdb), obtida do RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Já para utilização como ligante se obteve a molécula de glifosato (ZINC03872713) do ZINC Database.

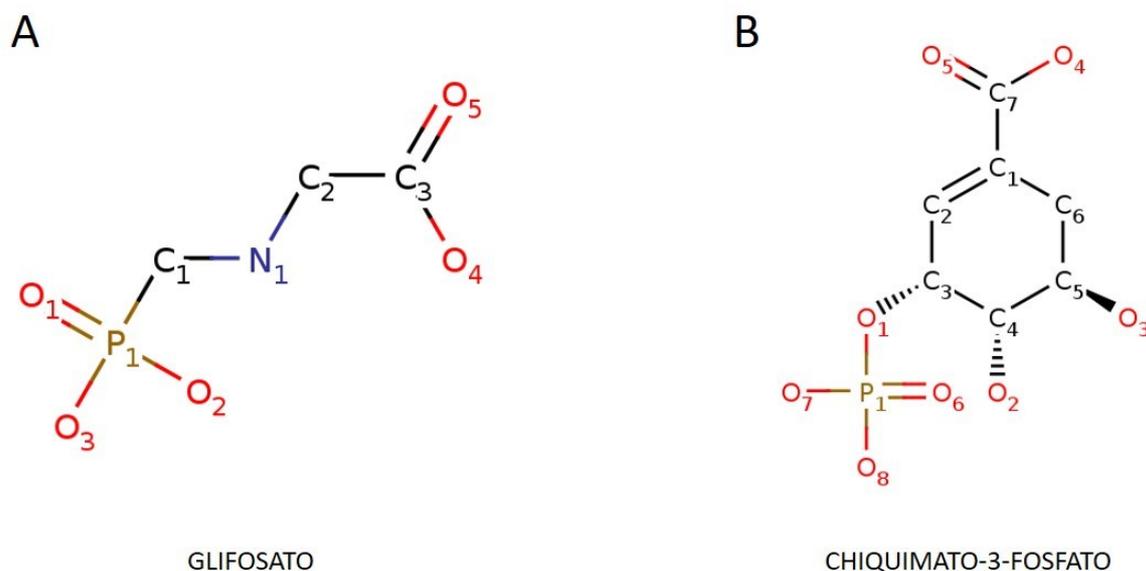
### *Corridas no Dockthor*

A análise de acoplamento molecular foi realizada na plataforma online Dockthor (<http://dockthor.Incc.br/>). Os parâmetros utilizados foram o padrão (Número de avaliações: 1.000.000; Tamanho da população: 1.000; Número de corridas: 30; Semente: -1985) disponibilizados pelo programa, fazendo-se um acoplamento cego (*blind dock*) considerando toda a proteína (Centro da caixa: Xc 60, Yc 15, Zc 30; Dimensões da caixa:  $\pm\Delta x$  6,  $\pm\Delta y$  6,  $\pm\Delta z$  6) com o objetivo de verificar se a identificação da região de ligação ocorreria corretamente nesta situação.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### *Resultado das corridas no Dockthor*

O glifosato, cuja estrutura é mostrada na Figura 1A, era potencial quelante industrial em 1964, sendo descrito como herbicida somente em 1971. Esta molécula é capaz de inibir a EPSP, enzima catalisadora da reação entre chiquimato-3-fosfato (Figura 1B) e fosfoenolpiruvato. Tal inibição evita a síntese de três aminoácidos, o triptofano, a fenilalanina e a tirosina, assim ocasionando a morte das plantas (JAWORSKI, 1972; ZABLOTOWICZ; REDDY, 2004).



**Figura 1** – Estrutura química das moléculas de: **A.** Glifosato; **B.** Chiquimato-3-fosfato.

Foi realizada a simulação do acoplamento entre as moléculas de glifosato com a proteína EPSPS. A partir das corridas realizadas com o programa Dockthor foram obtidos os resultados apresentados na tabela 1. O primeiro resultado, destacado em cinza, representa os melhores valores para os parâmetros demonstrados. Com uma energia total de -42.433 e uma energia intermolecular de -58.386, este se mostra o resultado aparentemente mais estável, como a molécula de glifosato deveria estar acoplada na enzima em questão. Outras corridas não diferiram muito desta (resultados não exibidos), demonstrando consistência no local de ligação com a enzima.

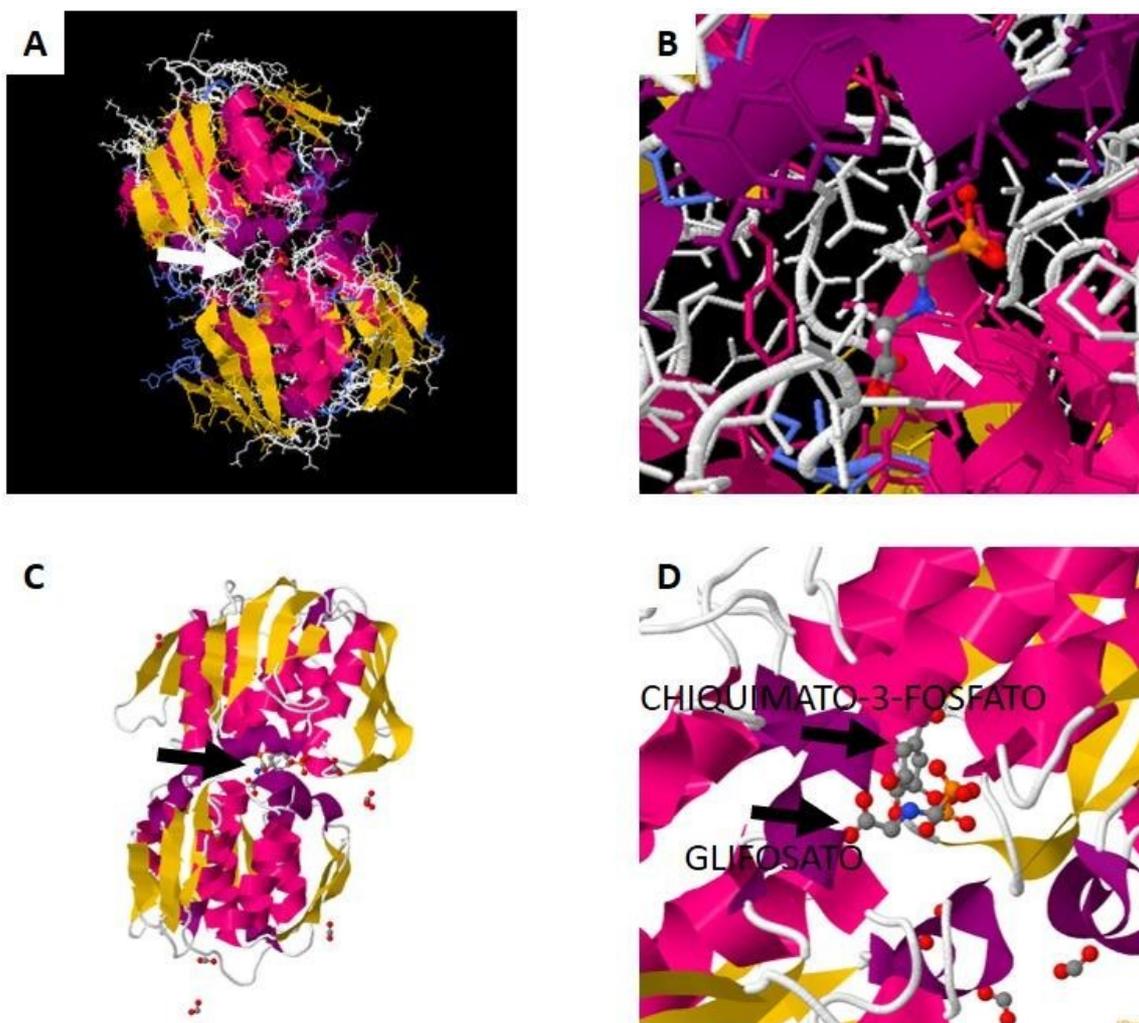
**Tabela 1** – Resultados obtidos a partir das diferentes corridas realizadas em computador. O melhor resultado está destacado com fundo cinza.

Model	T.Energia* (kcal mol <sup>-1</sup> )	I.Energia** (kcal mol <sup>-1</sup> )	RMSD*** (Å)	Pontuação (kcal mol <sup>-1</sup> )
1	-42.433	-58.386	0.000	-5.925
1	-35.639	-53.794	4.849	-6.633
1	-35.546	-55.885	2.858	-7.282
5	-35.046	-53.748	2.172	-7.393
4	-34.759	-50.540	5.112	-6.683
16	-30.693	-51.143	4.866	-6.865
13	-27.521	-48.265	2.848	-5.977
15	-23.837	-38.779	4.884	-4.121
15	-21.921	-40.356	5.128	-6.905
26	-21.321	-42.481	2.034	-5.330

\* Energia total (do inglês *total energy*), \*\* Energia Intermolecular (do inglês *intermolecular energy*) \*\*\* RMSD (desvio quadrático médio, do inglês *root mean square deviation*);

A melhor corrida foi selecionada para visualização por meio do JSmol, sendo possível fazer sua visualização na Figura 2A e 2B. A estrutura obtida do estudo de Schönbrunn et al. (2001) pode ser vista na Figura 2C e 2D.

Uma comparação entre Figura 2A e Figura 2C demonstra que o acoplamento cego foi capaz de fazer a identificação da cavidade com facilidade, já que as demais corridas (resultados não exibidos) tiveram resultados semelhantes.



**Figura 2 – Comparação do acoplamento molecular realizado em computador com resultados experimentais de cristalografia de raios-x. A.** melhor resultado obtido para o acoplamento; **B.** detalhe do acoplamento realizado em computador; **C.** enzima complexada com o chiquimato-3-fosfato e glifosato, obtida diretamente do PDB do estudo de Schönbrunn et al. (2001); **D.** detalhe do acoplamento de glifosato e de chiquimato-3fosfato no estudo de Schönbrunn et al. (2001).

A utilização de outras ferramentas para entendimento das ligações precisas entre subunidades do receptor com o ligante, bem como a busca por alterações da molécula ligante que podem gerar resultados semelhantes e contornar problemas de resistência ao herbicida podem ser bastante úteis para o manejo deste problema. Tais considerações servem não somente para a molécula aqui tratada, mas também para outras de uso agrícola.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foi possível perceber grande semelhança entre o acoplamento receptor/ligante realizado por método computacional (*in silico*) com as imagens obtidas a partir de cristalografia de raios X, indicando boa capacidade de predição por parte da ferramenta utilizada.

Outras análises buscando moléculas semelhantes ao glifosato e comparando sua forma de acoplamento com a EPSPS deverão ser realizadas.

A expansão do uso destes trabalhos para identificação de alvos de estudo no genoma é algo a ser testado, já que o entendimento de quais aminoácidos são determinantes na ligação entre proteínas e determinadas moléculas constitui informação de grande utilidade para o melhoramento genético.

## REFERÊNCIAS

JAWORSKI, E. G. Mode of action of N-phosphonomethylglycine: inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 20, n. 6, p. 1195-1198, 1972.

KITCHEN, D.B.; DECORNEZ, H.; FURR, J.R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935-949, 2004.

LENGAUER, T.; RAREY, M. Computational methods for biomolecular docking. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 6, n. 3, p. 402-406, 1996.

POWLES, S.B. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. **Pest Management Science**, v. 64, p. 360–365, 2008.

SCHÖNBRUNN, E.; ESCHENBURG, S.; SHUTTLEWORTH, W.A.; SCHLOSS, J.V.; AMRHEIN, N.; EVANS, J.N.; KABSCH, W. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 4, p. 1376-1380, 2001.

ZABLOTOWICZ, R. M.; REDDY, K. N. Impact of glyphosate on the *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview. **Journal of Environmental Quality**, v. 33, n. 3, p. 825-831, 2004.

#### CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não possuir nenhum tipo de conflito de interesses.

#### AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Fundação Estadual de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

#### CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

A.M.P. e E.E.V análises de bioinformática; A.M.P. e C.P. interpretação e escrita do trabalho; R.S.S. e A.C.O. conceberam o estudo e supervisionaram a pesquisa.