



# Caracterização Estrutural e Conformacional da Protrombina Humana



Chioldi, C. G.<sup>1</sup>; Fernandes, C. L.<sup>1</sup> e Verli, H.<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Centro de Biotecnologia – UFRGS, Porto Alegre, RS; <sup>2</sup>Faculdade de Farmácia – UFRGS, Porto Alegre, RS

## 1) Introdução

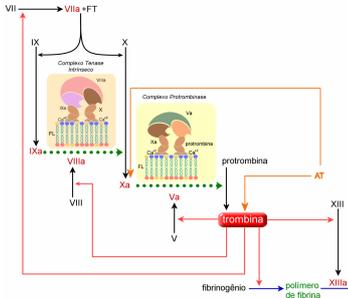


Figura 1. Resumo da cascata de coagulação, adaptado de: Verli, H. *Tese de Doutorado*, 2005.

A protrombina é um importante zimogênio da cascata de coagulação, sendo produzida no fígado e liberada na circulação após a clivagem do segmento N-terminal.

Para ser ativada, a protrombina é clivada entre os aminoácidos Arg<sup>271</sup>-Thr<sup>272</sup> e Arg<sup>320</sup>-Ile<sup>321</sup> pela ação do complexo protrombinase (composto pelo fator Xa, fator Va, cálcio e membrana de fosfolípidos aniônicos), formando a  $\alpha$ -trombina e o fragmento 1·2'. A  $\alpha$ -trombina irá converter o fibrinogênio solúvel em monômeros de fibrina insolúveis, as quais formarão o coágulo.

## 2) Objetivos

Tendo em vista que a estrutura tridimensional da protrombina é desconhecida, o presente trabalho tem por objetivo caracterizar e validar sua estrutura e conformação através de técnicas de modelagem comparativa, *docking* e dinâmica molecular.

## 3) Metodologia

**3.1) Modelagem Comparativa:** Os alinhamentos com os moldes (2PF2<sup>2</sup>, 1A0H<sup>3</sup> e 1HAG<sup>4</sup>) foram submetidos separadamente à modelagem comparativa do servidor Swiss-MODEL<sup>5</sup> enquanto a montagem da proteína foi realizada no Swiss PDB Viewer<sup>6</sup>.

### 3.2) Docking

**3.2.1) Protease Ativadora:** O *docking* do fator Xa (1EZQ<sup>7</sup>) na protrombina foi feito com o programa Zdock 3.0.1<sup>8</sup>, dessa forma pode-se avaliar a confiabilidade dos modelos, uma vez que essa proteína sofre 2 clivagens para ter sua forma ativada.

**3.2.2) N-terminal:** Para a ligação do N-terminal ao modelo de protrombina, foram feitos estudos de *docking* com os programas Autodock 3.0<sup>9</sup>, ZDock 3.0.1 e HEX 5.0<sup>10</sup> a fim obter as orientações mais prevalentes.

**3.3) Dinâmica Molecular:** Para observar a flexibilidade do N-terminal, os 4 modelos obtidos pelo *docking* foram submetidos à simulação de dinâmica molecular com o pacote do GROMACS 3.3<sup>11</sup> e campo de força MARTINI<sup>12</sup>.

## 4) Resultados e Discussão

### 4.1) Modelagem Comparativa

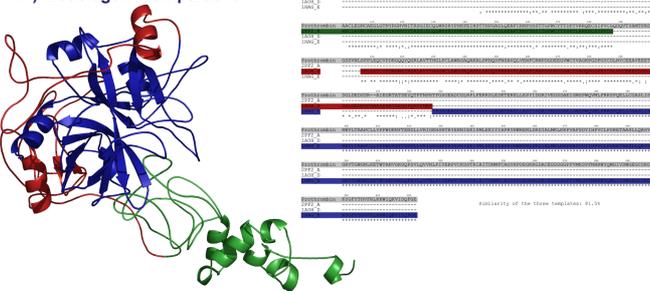
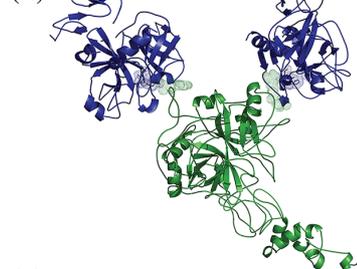


Figura 2. Alinhamento dos 3 moldes escolhidos (verde, vermelho e azul), representando partes distintas da protrombina. O GAP entre o 1º e 2º moldes foi construído e modelado como alça.

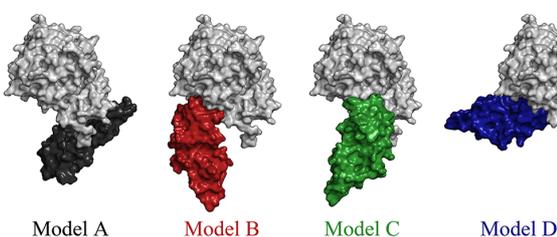
### (A)



### 4.2) Docking

Figura 3. (A) Docking do FXa (azul) com o modelo obtido da protormbina (verde). Os sítios catalíticos (pontos azuis) vão de encontro aos sítios de clivagem (pontos verdes), validando o modelo. (B) Os 4 modelos obtidos do docking do segmento N-terminal.

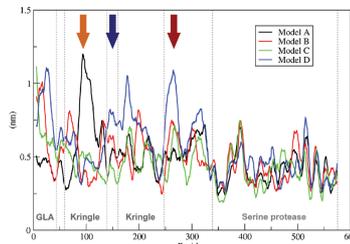
### (B)



### 4.3) Dinâmica Molecular

Os modelos foram submetidos à dinâmica de coarse-grained, onde pode ser vista a alta flexibilidade da região N-terminal, em relação ao C-terminal.

### (A)



### (B)

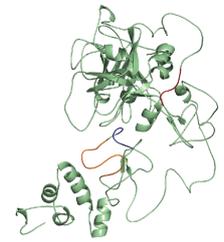
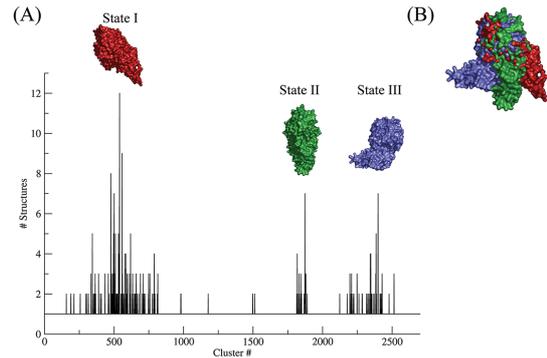


Figura 5. Regiões da protrombina com maior flexibilidade. (A) O RMSF mostra que a flutuação do domínio serino protease é muito menos, ou seja, é mais rígido que a região N-terminal. (B) Alguns picos do gráfico (marcados pelas setas) foram analisados na estrutura tridimensional da protrombina, e, como esperado, as 3 regiões eram alças.

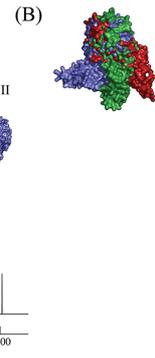
Após a dinâmica por 1  $\mu$ s, foi realizada a análise de clusters a fim de analisar se há interconversão dos modelos, fato que ocorreu originando 3 estados conformacionais distintos: cluster 540 (estado I), cluster 1873 (estado II) e cluster 2399 (estado III), indicando que essa proteína está sempre se rearranjando em solução, mas possui 3 conformações principais.

Com a finalidade de observar diferenças pontuais entre esses estados, foram feitos mapas de contato. Esses mapas mostram diferentes interações entre os resíduos, principalmente no domínio serino protease, o qual interage com o kringle 1 no estado II, com o kringle 2 no estado I, e com os aminoácidos entre o GLA e o kringle 1 e entre os kringles no estado III. Além disso, o estado III é o único que possui o GLA em contato com o kringle 2.

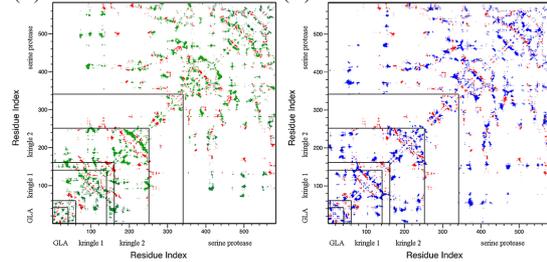
### (A)



### (B)



### (C)



### (D)

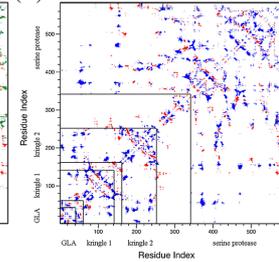


Figura 6. (A) Gráfico contendo a quantidade de estruturas em cada cluster. Em cima dos clusters principais estão as estruturas de referência a eles. (B) Sobreposição desses 3 estados conformacionais para realçar o movimento de dobradiça entre eles. (C e D) Mapas de contato entre estado I (vermelho), II (verde) e III (azul).

## 5) Conclusões

> Os modelos obtidos mostraram-se adequados na descrição da estrutura da protrombina, descrevendo-a como uma proteína altamente flexível;

> Os resultados de docking indicavam a presença de movimentos de dobradiça, que foi observada por dinâmica molecular, assim como a interconversão dos modelos em 3 estados conformacionais;

## 6) Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - CNPq Universal (472174/2007-0) e IM-INOVAR (420015/05-1) - e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) do Governo Brasileiro.

## 7) Referências

- Loscalzo & Schafer, *Thrombosis and Hemorrhage*, 1998, 2ª ed, pp 3-27.
- Soriano-Garcia et al., *Biochemistry*, 1992, 31, 2554-2566.
- Martin et al., *Structure*, 1997, 5, 1681-1693.
- Vijayalakshmi et al., *Protein Sci*, 1994, 3, 2254-2271.
- Schwede et al., *Nucleic Acids Res*, 2003, 31, 3381-3385.
- Guex e Peitsch, *Electrophoresis*, 1997, 18, 2714-2723.
- Maignan et al., *J. Med. Chem.*, 2000, 43, 3226-3232.
- Mintseris et al., *Proteins*, 2007, 69, 511-520.
- Morris et al., *J. Computational Chemistry*, 1998, 19, 639-1662.
- Mustard e Ritchie, *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.*, 2005, 60, 269-274.
- van der Spoel et al., *GROMACS user manual version 3.0*, Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands, 2001.
- Monticelli et al., *JCTC*, 2008, 4, 819-834.