

ELUCIDANDO O PAPEL DO TAT-pQYP NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DA DOR

Heloisa Espreafico Guelerman Ramos

Allan Pradelli Roldão e Alexandre Martins do Nascimento

Deborah Schechtman

Instituto de Química – Universidade de São Paulo

heloisaramos139@usp.br

Objetivos

O objetivo geral do projeto é determinar se o peptídeo TAT-pQYP modula outras vias de sinalização além daquela envolvendo o receptor tropomiosina kinase A (TrkA) e a fosfolipase C gamma (PLC γ), considerando a possibilidade de existência de outras proteínas parceiras que possuam o domínio SH2. Para alcançar esse objetivo, foram definidos os seguintes objetivos específicos: realização de ensaios de interação com o peptídeo TAT-pQYP biotinilado para detectar proteínas ligantes; identificação das proteínas parceiras do peptídeo por meio de espectrometria de massas; e análise de estruturas para identificar as proteínas que potencialmente podem se ligar ao TAT-pQYP *in silico* para posterior validação experimental.

Métodos e Procedimentos

O primeiro passo deste projeto foi a biotinylation do peptídeo TATpQYP e dos controles, TAT-QYP e TAT. Em seguida, foi realizado o ensaio de *binding*, em que os peptídeos biotinilados foram imobilizados em *beads* de avidina (*Monomeric Avidin Agarose, PierceTM*) e incubados com o lisado celular de Neuro2A (*Mus musculus*). Após a eluição das proteínas retidas, as amostras foram processadas e analisadas por espectrometria de massas (nanoLC-MS/MS). As proteínas obtidas foram filtradas, excluindo as mais abundantes e aquelas que se ligaram ao peptídeo controle

TAT (consideradas interações inespecíficas). Em seguida, investigamos as interações físicas entre as proteínas usando StringApp (Cytoscape) com *cut-off* de 0,4. Além disso, identificou-se proteínas com domínio SH2, e se simulou computacionalmente a interação entre o TAT-pQYP e os domínios SH2 usando PyMol e estruturas depositadas no PDB.

Resultados

A partir do ensaio de interação e espectrometria de massas obtivemos 2000 proteínas, dentre as quais 205 não interagiram com TAT e foram mantidas para as análises subsequentes. O mapeamento das interações físicas permitiu a identificação de 24 clusters, o que sugere que algumas das proteínas identificadas interagem indiretamente com o peptídeo. O cluster de maior destaque compreende a PLC γ , CBL e SHC1, proteínas que contêm domínio SH2 e, portanto, provavelmente são interactores diretos do peptídeo e possivelmente também interagem entre si (Figura 1). Assim, simulou-se a interação entre TAT-pQYP e os domínios SH2 de SHC1 (Figura 2) e CBL (Figura 3). A partir do mapeamento da hidrofobicidade dos resíduos do domínio SH2 da SHC1, observa-se o caráter hidrofílico do bolsão, importante para interação com a tirosina fosforilada do peptídeo, e uma porção de resíduos hidrofóbicos capazes de interagir com os resíduos de leucina e valina do TAT-pQYP. Já para a CBL, se utilizou uma estrutura do PDB com um peptídeo com tirosina

fosforilada (APS) e esta foi sobreposta com a estrutura da PLC γ com o TAT-pQYP, o que evidenciou a semelhança na interação entre o peptídeo e o domínio SH2 das duas proteínas.

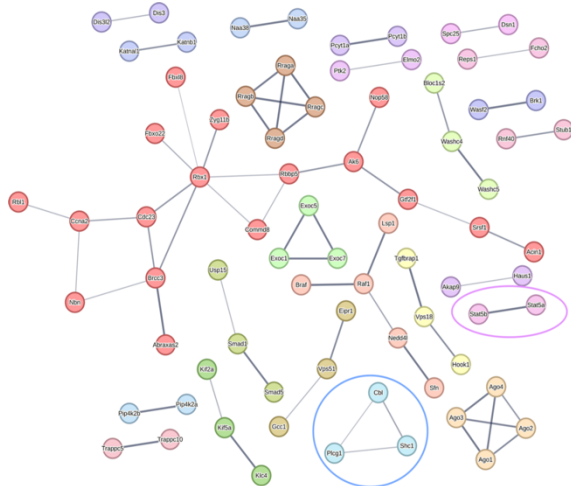


Figura 1: Rede de interação física das proteínas da lista filtrada com *software* StringApp, do Cytoscape (V.3.10.2). Em azul, destacamos o cluster formado por PLC γ , CBL e SHC 1 e, em rosa, o cluster formado por STAT5a e STAT5b, todas com domínio SH2.

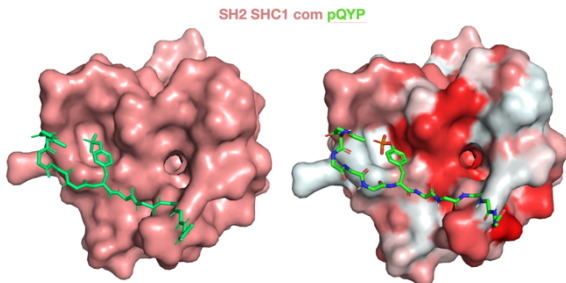


Figura 2: Análises computacionais do domínio SH2 da SHC 1, em que se simulou a interação entre o TAT-pQYP (verde) e o domínio SH2 da SHC1 (salmão) e o mapeamento da hidrofobicidade do domínio SH2 da SHC1 em presença do peptídeo.

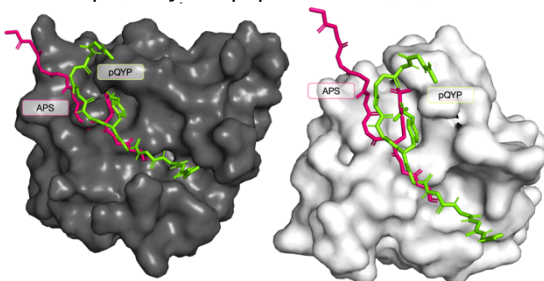


Figura 3: Análises computacionais do domínio SH2 da CBL, observando-se a simulação da interação entre

os peptídeos fosforilados TAT-pQYP (verde) e APS (rosa) com o domínio SH2 da PLC γ (cinza) e o domínio SH2 da CBL (branco).

Conclusões

Foi possível detectar, a partir dos resultados obtidos, pelo menos duas novas proteínas que contêm domínio SH2 e que interagem com o TATpQYP, CBL e SHC1. Dessas, a proteína que mais se destacou foi a CBL, uma ubiquitina E3 ligase que sabidamente é capaz de se ligar a TrkA através de seu domínio SH2 e regular negativamente a expressão do receptor em nociceptores por ubiquitinação. Esses resultados parecem contraditórios aos nossos, que mostram que inibir a ligação de CBL a TrkA/ubiquitinação levaria à analgesia. No entanto, propomos que, embora a interação do TAT-pQYP com a CBL interrompa a ubiquitinação de TrkA, ela também inibe a ativação de PLC γ . Concluímos que a inibição de interações proteicas chave, ao invés da inibição funcional da TrkA ou CBL, pode ser uma abordagem melhor para o tratamento da dor inflamatória, uma vez que, ao usar essa estratégia, não interrompemos outras vias mediadas pela TrkA, como o crescimento neuronal, fundamental para a remodelação óssea na artrite.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

CHEN, H.-K. et al. Cbl-b modulated TrkA ubiquitination and function in the dorsal root ganglion of mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 921, p. 174876, 15 abr. 2022.
 MORAES, B. C. et al. Structural analysis of TrkA mutations in patients with congenital insensitivity to pain reveals PLC γ as an analgesic drug target. *Science Signaling*, v. 15, n. 731, 2022.