

Busca de moduladores da monoamina oxidase A (MAOA) por triagem de alto desempenho com ensaio enzimático

Palavras-Chave: NEUROCIÊNCIAS, HTS, MAOA

Autores(as):

BRUNO FERREIRA BRISCHI, Ilum – CNPEM

JOÃO VITOR PEREIRA DE GODOY, LNBio – CNPEM

JOSÉ CARLOS QUILLES JUNIOR, LNBio – CNPEM

ANGÉLICA JARDIM COSTA, LNBio – CNPEM

CELISA CALDANA COSTA TONOLI, LNBio – CNPEM

ÂNGELA SAITO, LNBio – CNPEM

ARTUR TORRES CORDEIRO, LNBio – CNPEM

JULIANA HELENA COSTA SMETANA, Ilum/LNBio – CNPEM

INTRODUÇÃO:

O projeto *Estudo de mutações no gene da agressividade MAOA em pacientes com Deficiência Intelectual*, financiado pelo Ministério da Saúde, busca estudar duas mutações *missense* na proteína monoamina oxidase A (MAOA), que estão ligadas a traços de agressividade e deficiência intelectual (DI) em uma condição conhecida como Síndrome de Brunner (Brunner et al., 1993a). O *warrior gene*, codificante da MAOA, é um dos genes responsáveis pelo aparecimento desses fenótipos, decorrentes da perda ou alteração da atividade enzimática da MAOA (Gibbons, 2004). Esse gene está localizado no cromossomo X, que abriga 4% dos genes identificados do genoma humano, sendo que 8-12% desses genes, quando mutados, são responsáveis por causar DI (Ropers, 2008). Devido ao padrão de herança ligada ao X, essa condição atinge preferencialmente indivíduos do sexo masculino. Dado essa problemática, o projeto desenvolvido no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), sediado no CNPEM, busca pequenas moléculas capazes de ativar as mutantes da MAOA, retomando parcial ou completamente a atividade.

As duas mutações *missense* estudadas neste projeto foram descritas na literatura em pacientes com a Síndrome de Brunner (Palmer et al., 2016; Piton et al., 2014). Essas duas mutações comprometem a função enzimática da MAOA, resultando em alterações neuronais que são a base desse transtorno. Este resumo relata os resultados do projeto durante dois períodos de férias em que o autor acompanhou e participou das atividades desenvolvidas pela equipe do LNBio. Durante esse período, foi feita uma triagem de alto desempenho na qual foi identificado um *hit* ("Composto X"), cujo nome ainda não pode ser revelado devido ao sigilo do projeto. Ensaios de atividade confirmatórios, incluindo curvas dose-resposta, mostraram que o Composto X é capaz de aumentar a atividade da proteína MAOA.

A monoamina oxidase (MAO) é uma enzima que possui como cofator uma molécula de dinucleótido de flavina-adenina (FAD) e é encontrada na membrana externa da mitocôndria em neurônios, glia e outras células. Sua principal função é catalisar a reação de desaminação oxidativa de amins biogênicas, como serotonina, norepinefrina e dopamina, que são neurotransmissores, β -feniletilamina, um neuromodulador, e tiramina, que é uma monoamina bioativa exógena. Além disso, a MAO possui duas isoformas, denotadas de MAO-A e MAO-B, sendo a primeira o foco desse estudo.

Como ilustrado na Figura 1A, a proteína MAOA possui uma α -hélice (em amarelo) que tem como função ancorar a enzima na membrana externa da mitocôndria. Já o FAD participa das reações que a MAOA promove, a qual consiste na desaminação de monoamina em aldeído e amônia, gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é formado quando o FAD é reoxidado pelo oxigênio.

Essa reação pode ser vista em detalhes na Figura 1B, que ilustra esse processo de desaminação. Nela, podemos ver a transferência de um hidreto presente no grupo metileno da serotonina para o nitrogênio da molécula de FAD, resultando em uma carga positiva no nitrogênio do neurotransmissor e uma carga negativa em outro átomo de nitrogênio do FAD.

Assim, para conseguir encontrar uma substância ativadora da MAOA, foi realizada uma campanha de triagem de alto desempenho (HTS), testando uma biblioteca de milhares de compostos em um ensaio enzimático acoplado, de origem comercial. Após essa etapa, foi feita a purificação das versões mutantes da MAOA e foi realizado um ensaio de atividade para confirmar a ausência de atividade enzimática desses mutantes, já observada anteriormente em resultados do nosso grupo de pesquisa. Futuramente, esse ensaio de atividade será utilizado para avaliar o possível impacto do Composto X nas versões mutadas da MAOA.

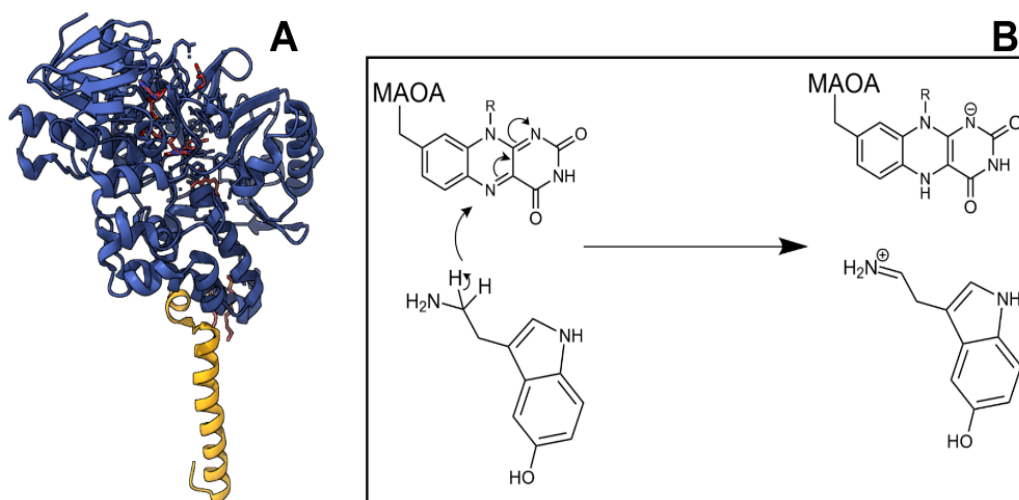


Figura 1: Estrutura da MAOA e mecanismo de reação do cofator. (A) Estrutura feita no ChimeraX, dividida em dois domínios: o extra membrana (em azul) e o ancorado à membrana, em amarelo (Son et al., 2008). (B) Reação de oxidação feita pelo FAD, convertendo amina em imínio.

METODOLOGIA:

Para a triagem dos compostos, foram usadas 25 placas de 384 poços para pipetar os compostos químicos juntamente com o ensaio enzimático do *kit* comercial MAO-Glo Assay (Promega) e a enzima WT, que foi produzida no LNBio seguindo um protocolo padronizado pelo próprio grupo. As colunas 1, 2, 23 e 24 da placa foram usadas para controle positivo e negativo, sendo que nos poços 2 e 23 foram depositados apenas a proteína e os componentes do ensaio, enquanto nos poços 1 e 24 foram depositados o solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO).

O ensaio enzimático do *kit* funciona em duas etapas e cinco reações, como mostrado na Figura 2. A primeira reação ocorre entre a enzima monoamina oxidase e o substrato advindo do *kit*, que é um análogo de aminopropiletéter de éster metílico (Zhou et al., 2006). Após a enzima oxidar o composto, o intermediário passa por uma reação com água e por uma β -eliminação, enfim, reage com

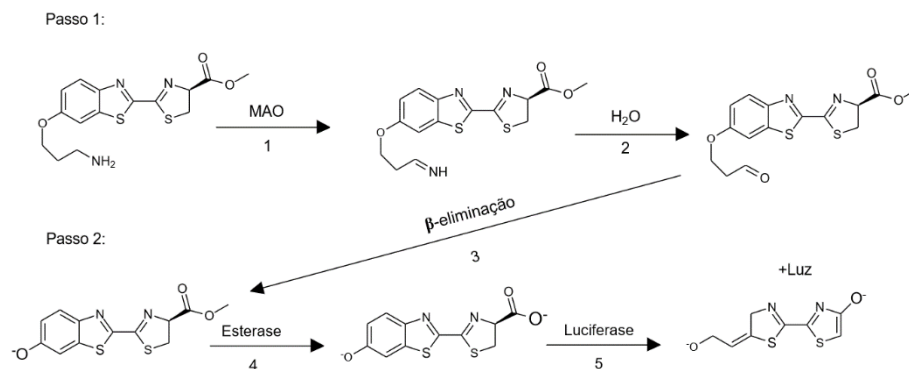


Figura 2: Mecanismo de reação do ensaio acoplado comercial (Promega) utilizado na campanha de HTS e nos ensaios enzimáticos confirmatórios (Zhou et al., 2006).

uma esterase, transformando um éster em carboxilato e, assim, esse intermediário reage com a luciferase presente no *kit* gerando o produto e luz que pode ser medida em um espectrofotômetro. No fim da campanha, os dados foram tratados usando o software *DataWarrior*, que permite tratar resultados de experimentos químicos, gerando gráficos e métricas importantes.

Com o HTS concluído, foram feitos ensaios confirmatórios e apenas um *hit* confirmou a capacidade de ativação da proteína MAOA selvagem. Então, passamos para etapa de purificação das mutantes, que foi inspirada no protocolo usado no artigo que resolveu a estrutura da MAOA mostrada na Figura 1 (Son et al., 2008). Um esquema geral desse processo pode ser visto na Figura 3.

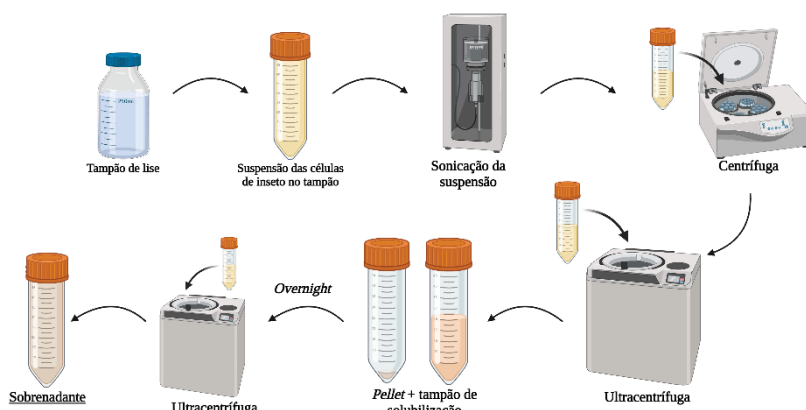


Figura 3: Fluxograma da purificação dos mutantes. Feito no BioRender.

As versões mutantes e WT da MAOA foram expressas usando células de inseto em fusão a uma cauda de polihistidina, que foi usada posteriormente na purificação por cromatografia de afinidade. A lise celular foi realizada por sonicação da amostra previamente ressuspendida em tampão de lise, seguida de ultracentrifugação. Após isso, solubilizamos o *pellet* obtido após uma ultracentrifugação e solubilizamos *overnight*. Após uma segunda ultracentrifugação, obtemos o sobrenadante, que já conta com um certo grau de pureza. Em seguida, utilizando um ÄKTA FPLC, realizamos sequencialmente duas cromatografias de afinidade em metal imobilizado para separar a proteína de contaminantes que podem ter continuado após o processo ilustrado na Figura 3.

A cromatografia de afinidade em metal imobilizado tira proveito da afinidade com metais como cobre e níquel dada pela cauda de histidina que foi expressa junto com as proteínas. Para separá-las de outras proteínas que não conseguem criar complexos de coordenação com esses metais. Os resultados da cromatografia foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) com amostras de frações representativas do cromatograma.

Para confirmar a presença da MAOA, realizamos um *Western blot*, técnica que consiste em usar anticorpos específicos que conseguem interagir com a proteína alvo e detectar sua presença usando um anticorpo conjugado a uma enzima (no caso, a peroxidase). Foram utilizados um anticorpo específico da cauda de polihistidina (anti-His-tag) e outro anticorpo específico para a MAOA (Figura 5B, C).

Após a purificação das versões mutantes da MAOA, utilizamos essas amostras no ensaio de atividade, juntamente com a enzima MAOA WT que havia sido purificada previamente e se encontrava congelada. Para o experimento, usamos o mesmo ensaio acoplado utilizado na triagem de alto desempenho.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Na campanha de HTS, um dos resultados obtidos foi um mapa de similaridade química dos compostos junto com a atividade da MAOA na presença de cada um. Como visto na Figura 4, existem grafos nesse mapa, que ocorrem quando existem compostos com semelhanças estruturais, assim, é traçado uma reta entre esses pontos. Na seção introdutória, foi mencionado que procuramos ativadores, então, os pontos verdes e cianos são os candidatos a *hits*, o que demonstra um sucesso na execução do HTS. Sendo assim, na próxima etapa, foram realizados ensaios confirmatórios desses candidatos, em que foi feita recompra dos possíveis *hits* e um novo teste de atividade. Como resultado, apenas uma substância conseguiu demonstrar um aumento na atividade da MAOA WT, o Composto X. Concluída a busca pelo ativador da MAOA, a fase seguinte consiste na purificação dos mutantes A e B e a validação do efeito ativador nelas.

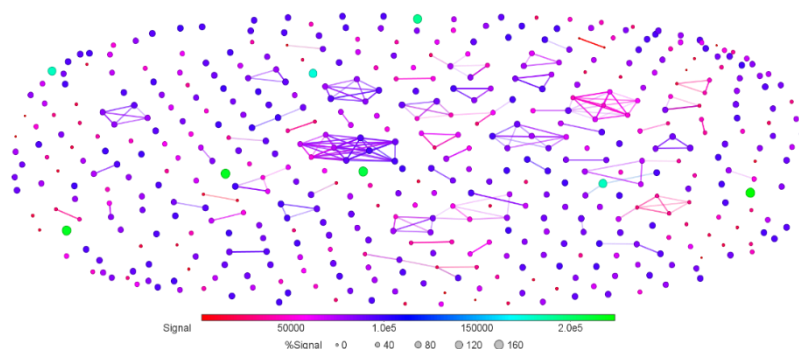


Figura 4: Mapa de similaridade química obtido no tratamento de dados do HTS. Cada ponto representa um composto testado, sendo que seu tamanho e cor representam a porcentagem de sinal e o sinal absoluto obtida na leitura do espectrofotômetro.

Os resultados das análises por SDS-PAGE e *Western blot* da purificação da MAOA e suas versões mutadas e o resultado do ensaio de atividade podem ser vistos na Figura 5. O ensaio de atividade enzimática confirma a falta de atividade das mutantes A e B da MAOA, enquanto a proteína selvagem demonstra estar ativa, como esperado (Figura 5D). Já os *blots* e o SDS-PAGE (Figura 5A, B e C) confirmam que as proteínas selvagens e mutantes estão presentes nas amostras, embora o rendimento da purificação da proteína selvagem tenha sido consideravelmente maior do que o das mutantes. Analisando os resultados dos *Western blots* Anti-MAOA (Figura 5B) e anti-His (Figura 5C), observa-se a presença de bandas de peso molecular abaixo do que seria esperado para a proteína intacta (MW: 59 kDa com base no UniProt ID: P21397), indicando degradação das mutantes. Em comparação com a proteína WT, é possível concluir que as mutantes A e B são mais instáveis, além de não apresentar atividade.

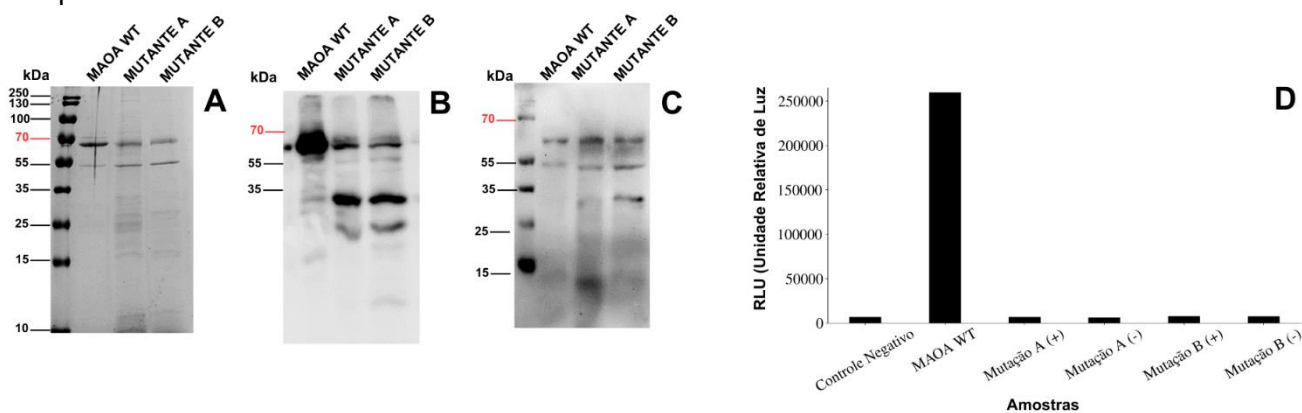


Figura 5: Análises confirmatórias para a presença das proteínas e o resultado do ensaio de atividade. (D) Ensaio de atividade da MAOA WT e as mutantes A e B, em que as variantes (+) e (-) são referentes à concentração inteira ou metade da proteína, respectivamente.

CONCLUSÕES:

Os resultados mostrados aqui relatam etapas importantes de um projeto de HTS, desde a triagem inicial dos compostos até a purificação da enzima e seus mutantes para a realização de ensaios confirmatórios. De um ponto de vista didático, a participação do aluno neste projeto foi muito relevante no aprendizado de técnicas importantes de biologia molecular e bioquímica, como *Western blot*, purificação de proteína por cromatografia de afinidade, triagem de alto desempenho (HTS), entre outros, permitindo que o aluno tivesse a vivência de um projeto científico real, com diversas etapas e desafios.

AGRADECIMENTOS:

Agradecemos ao Ministério da Saúde pela parceria firmada no âmbito do Pronas/PCD e a Ana A. S. Iacia pelo suporte técnico.

BIBLIOGRAFIA

- Brunner, H. G., Nelen, M., Breakefield, X. O., Ropers, H. H., & Van Oost, B. A. (1993). Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science*, 262(5133), 578-580.
- Gibbons, A. (2004). Tracking the evolutionary history of a "warrior" gene.
- Ropers, H. H. (2008). Genetics of intellectual disability. *Current opinion in genetics & development*, 18(3), 241-250.
- Palmer, E. E., Leffler, M., Rogers, C., Shaw, M., Carroll, R., Earl, J., ... & Field, M. (2016). New insights into Brunner syndrome and potential for targeted therapy. *Clinical genetics*, 89(1), 120-127.
- Piton, A., Poquet, H., Redin, C., Masurel, A., Lauer, J., Muller, J., ... & Mandel, J. L. (2014). 20 ans apres: a second mutation in MAOA identified by targeted high-throughput sequencing in a family with altered behavior and cognition. *European Journal of Human Genetics*, 22(6), 776-783.
- Son, S. Y., Ma, J., Kondou, Y., Yoshimura, M., Yamashita, E., & Tsukihara, T. (2008). Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-Å resolution: the control of opening the entry for substrates/inhibitors.
- Zhou, W., Valley, M. P., Shultz, J., Hawkins, E. M., Bernad, L., Good, T., ... & Wood, K. V. (2006). New bioluminogenic substrates for monoamine oxidase assays. *Journal of the American Chemical Society*, 128(10), 3122-3123.