UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Luciane Sussuchi da Silva

Estudos Computacionais de Esfingomielinases D:

Docking, Dinâmica Molecular e Métodos Híbridos QM/MM

São José do Rio Preto
2015

Luciane Sussuchi da Silva

Estudos Computacionais de Esfingomielinases D:

Docking, Dinâmica Molecular e Métodos Híbridos QM/MM

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Chahine

São José do Rio Preto
2015

Silva, Luciane Sussuchi.
Estudos computacionais de esfingomielinases D : docking, dinâmica molecular e métodos híbridos QM/MM / Luciane Sussuchi Silva. -- São José do Rio Preto, 2015
92 f. : il., tabs.

Orientador: Jorge Chahine
Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biofísica. 2. Biologia molecular. 3. Bioinformática. 4. Fosfolipases. 5. Enzimas. 6. Dinâmica molecular. I. Chahine, Jorge. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.112

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Luciane Sussuchi da Silva

Estudos Computacionais de Esfingomielinases D:

Docking, Dinâmica Molecular e Métodos Híbridos QM/MM

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Jorge Chahine
Dep. Física – UNESP/São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Ronaldo Júnio De Oliveira
Dep. Física – UFTM/Uberaba

Dr. José Fernando Ruggiero Bachega
LABIO – PUCRS/Porto Alegre

Dr. Gabriel Gouvêa Slade
Dep. Física – UNESP/São José do Rio Preto

Dr. Fábio Rogério de Moraes
CMIB – UNESP/São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
29 de Setembro de 2015

Ao meu marido, Rodrigo,

por todo amor, carinho e incentivo!

Agradecimentos

Agradeço especialmente ao meu Professor e Orientador, Dr. Jorge Chahine, por todo incentivo à pesquisa e discussão de novas idéias. Pela total liberdade que me deu para desenvolver este trabalho computacional, por estar sempre presente e trabalhando junto comigo.

Aos recursos computacionais cedidos pelos Professores Dr. Alexandre Suman de Araújo e Dr. Vitor Barbanti Pereira Leite. Aos recursos cedidos pelo Jülich Supercomputing Centre (JSC) e pelo German Research School for Simulation Sciences (GRS), com o auxílio do Professor Dr. Paolo Carloni e do Pesquisador Dr. Emiliano Ipoliti, para estudos de dinâmica molecular ab initio.

Ao Prof. Dr. Raghuvir K. Arni, Dr. Anwar Ullah, Prof. Dr. Sílvio S. Veiga e Dra. Daniele C. Moreira pelo auxílio com dados experimentais e valorosas discussões sobre as esfingomielinases D. Ao Dr. José Fernando R. Bachega pelo auxílio com a interface GTKDynamo e métodos QM/MM. E a todos os professores e amigos que colaboraram direta ou indiretamente para enriquecer este trabalho.

Aos técnicos Bruno R. Fernandes e Tiago L. Parolin pelo suporte computacional e às secretárias Ilva C. Bernardes, que está conosco desde o curso de graduação e vai deixar saudades, e Valéria A. L. Sedenho, que já nos conquistou com sua simpatia.

Aos amigos "dragões" (primeira e segunda turma) do extinto curso de Física Biológica que mantiveram contato durante todos estes anos: Tamára, Marcelo, Gabriel, Natália, Daniel (Kuririn), Fernanda (agregada do curso de Letras), Éric, Rafael (Grillo), Nayara, Fernandinha, Marília e Adalberto (Pudim). E a todos os amigos conquistados ao longo dos 12 anos de IBILCE, em especial as queridas conselheiras e companheiras de café, Mirian e Hana.

Aos meus pais, Márcia e Edvaldo, minha irmã Natália, meu cunhado Caio e meus tios Regina e Ademir pela presença constante na minha vida a qual me sustenta e dá coragem para continuar em frente, assim como a todos os familiares que incentivaram e torceram por mim. Nada poderia fazer sem o apoio de vocês.

Fonte: QUINO, J. L. Toda Mafalda. São Paulo: Martins Fontes, 2003.

RESUMO

Esfingomielinase D (SMase D) é uma enzima conhecida por catalisar a clivagem de esfingomielina em ceramida-1-fosfato e colina, atividade presente apenas em aranhas do gênero *Loxosceles* (aranhas marrom) e em bactérias patogênicas do tipo *Corynebacterium*. A SMase D, também encontrada na literatura como fosfolipase D, é o principal componente do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*, capaz de induzir sozinha as lesões dermonecróticas características do loxoscelismo. Apesar da importância clínica, poucos detalhes sobre o mecanismo de ação destas enzimas são conhecidos. Neste trabalho, o mecanismo catalítico das SMases D de aranhas do gênero *Loxosceles* é estudado através de métodos computacionais como *docking*, dinâmica molecular clássica, simulações a pH constante e métodos híbridos QM/MM. Primeiramente são avaliadas as interações da SMase D com o íon sulfato, mio-inositol-1-fosfato, o substrato esfingomielina e o inibidor suramina, assim como os prováveis estados de protonação das histidinas 12 e 47 na presença e ausência de ligantes. A seguir, a barreira de energia livre experimental para liberação da colina é estimada em 21 kcal/mol através da teoria do estado de transição e da constante catalítica (k_{cat}) da SMase D de *Loxosceles laeta*. Este valor é comparado às energias de ativação calculadas em simulações QM/MM para as vias de catálise covalente (entre 18 e 24 kcal/mol) e não covalente (25 kcal/mol), os quais correlacionam bem com o valor de 21 Kcal/mol, estimado experimentalmente. Adicionalmente, é sugerido um papel crucial para o grupo hidroxila da esfingomielina no processo de catálise. Dependendo do modo de ligação da hidroxila, a catálise pode ser covalente ou não covalente, com produtos distintos nos dois tipos de catálise. Interessante notar que os dois processos possuem energias de ativação comparáveis, em torno de 25 Kcal/mol, o que poderia supor que os dois processos são similarmente prováveis, como sugerido em alguns resultados experimentais de diferentes fosfolipases D. Finalmente é discutida a afinidade das SMases por membranas miméticas.

Palavras chave: Esfingomielinase D. Fosfolipase D. Mecanismo catalítico. Dinâmica molecular. Simulação a pH constante. QM/MM.

ASTRACT

Sphingomyelinases D (SMase D) are enzymes that catalyze sphingomyelin in ceramida-1-fosfate and choline. This activity is only found in *Loxosceles* brown spiders and *Corynebacterium* pathogenic bacterias. SMase D, or phospholipase D, is the main component of spider venoms of the genus *Loxosceles*, being able to induce the characteristic dermonecrotic features of the whole venom. Despite of the clinical importance o these enzymes, their action mechanism is not completely described. In this work, the catalytic mechanism of SMases D against sphingomyelin is studied through computational methods like docking, classical molecular dynamics, constant pH simulations and hybrid methods QM/MM. First, molecular interactions of SMases D with sulfate ion, myo-inositol-1-phosphate, sphingomyelin (the substrate) and suramin inhibitor are evaluated, as well as the protonation states of the catalytic histidines, 12 and 47, in presence or absence of ligands in the active site. Then, the free energy barrier of 21 kcal/mol for choline release is estimated using the transition state theory and the catalytic constant of *Loxosceles laeta* activity (k_{cat}). This value is compared to the activation energies obtained through QM/MM simulations for covalent (between 18 and 24 kcal/mol) and non-covalent (25 kcal/mol) pathways. Additionally, the hydroxyl group of sphingomyelin is proposed to play a crucial role in the catalytic mechanism. Depending on the binding way of the hydroxyl group, the catalysis may be covalent or non-covalent, with different reaction products in each case. Interestingly, the two processes showed similar activation energies, suggesting that they may be equally probable, as discussed in some experimental studies for different phospholipase D. Finally, the affinity of SMases for mimetic membranes is discussed.

Palavras chave: Sphingomyelinase D. Phospholipase D. Catalytic mechanism. Molecular Dynamics. Constant pH simulation. QM/MM.

Índice de Ilustrações

Figura 1: Esquema da biosíntese de esfingolipídeos (figura retirada da referência [1]). As setas indicam o caminho de reação para as fórmulas estruturais químicas dos esfingolipídeos e as enzimas são indicadas em azul e itálico (com exceção da Esfingomielinase D, em preto itálico). 15
Figura 2: (A) *Loxosceles laeta* e (B) *Loxosceles intermedia*, figuras obtidas em http://www.arachnoserver.org/. 16
Figura 3: Divisão das Esfingomielinases D (SMases D) em classes (I e II) e estruturas representativas disponíveis no *Protein Data Banking*. 17
Figura 4: Alinhamento estrutural entre estruturas classe I (*L. laeta*, PDB IXX1) e classe II (LiRecDT1, PDB 3RLH) (figura modificada de [8]). *Loops* catalítico, flexível e variável em azul, vermelho e verde, respectivamente. Ligações entre cisteínas representadas em laranja e íon magnésio em verde. 18
Figura 5: Coordenação do íon magnésio (em verde) (A) na presença e (B) na ausência de ligante SO_4^{-2} no sítio ativo (figura obtida de [7]). 19
Figura 6: Mecanismo catalítico via formação de intermediário pentacoordenado das SMases D de aranhas do gênero *Loxosceles* (esquema modificado de [7]) 20
Figura 7: Princípios gerais de métodos QM/MM. Parte QM na qual é aplicada o método de estrutura eletrônica envolvendo os átomos quimicamente ativos e parte MM na qual é aplicada um campo de força clássico. 27
Figura 8: Classificação da superfamília das fosfolipases D por Selvy et al. [67]. 38
Figura 9: Emissão de fluorescência a 570nm em ensaios de atividade da SMase II (LiRecDT1) e SMases II mutantes contra esfingomielina e liso-PC (artigo submetido [44]) 39
Figura 10: Ensaios de atividade da SMase recombinante LiRecDT1 com esfingomielina (dados cedidos por Silvio Sanches Veiga e colaboradores – artigo a ser submetido). 43
Figura 11: Situação ideal para o mecanismo ácido-básico com o valor do pH entre os valores de pKa para os resíduos ácido e básico. 45
Figura 12: Diagrama indicando o pKa das histidinas 12 e 47 em diferentes condições de ocupação do sítio ativo e pH. A seta em azul indica o pH do meio e o traço em vermelho a faixa ideal de pH para o mecanismo catalítico. 46
Figura 13: Gráfico de distâncias relativas à simulação de dinâmica molecular clássica com o PDB 2F9R como estrutura de partida e o íon sulfato inicialmente a 15 Å do sítio ativo. Sendo MG (magnésio), S (enxofre do íon SO_4), HE12 (hidrogênio ligado ao NE2 da HIS12) e NE47 (nitrogênio NE2 da HIS47). 49
Figura 14: Número de moléculas de água em relação a distancia do íon magnésio em dinâmica molecular clássica com o íon sulfato inicialmente a 15 Å do sítio ativo. Em preto, no início da simulação e em vermelho, após 800 ps. 50
Figura 15: Mio-inositol-1fosfato localizado no sítio ativo no PDB 4RW3 (modificado de artigo aceito [49]). 52

Figura 16: (a) RMSD do mio-inositol-1-fosfato com relação à estrutura cristalográfica (b) Carbonos em verde indicam as posições na estrutura cristalográfica e carbonos em cinza, as posições após 25 ns de dinâmica molecular (figuras modificadas de [49]). 53
Figura 17: Forma química da suramina. 54
Figura 18: *Docking* da suramina na cavidade do sítio ativo. (a) Superfície de carga negativa e positiva, em vermelho e azul, respectivamente, calculadas pelo APBS Tools. Em roxo, o íon magnésio. (b) Detalhes da interação da suramina com resíduos do sítio ativo (HIS11 e TRP224 na estrutura 4RW3 correspondem à HIS12 e TRP230, respectivamente, na nomenclatura adotada em [9]). 55
Figura 19: (a) RMSD da estrutura com relação à estrutura inicial durante aproximadamente 100 ns (b) Distancias relativas entre átomos durante a simulação clássica. 56
Figura 20: Esquema do posicionamento da SMase na membrana via PPM Server [70] (http://opm.phar.umich.edu/server.php) 57
Figura 21: (a) Grupo sulfato no sítio ativo da estrutura cristalográfica 1XX1; (b) Posição do fósforo da esfingomielina em relação às histidinas catalíticas do sítio ativo após o *docking*. Esferas em verde, o íon magnésio, esferas em vermelho, a representação das moléculas de água de coordenação. 58
Figura 22: (a) Representação do *docking* da esfingomielina na cavidade do sítio ativo. (b) Interações da esfingomielina com HIS47, HIS12, LYS93 e TRP230. 59
Figura 23: Conformações extraídas de dinâmica molecular da SMase D de Loxosceles laeta com o substrato esfingomielina, representado os modos de ligação A (propício para formação de intermediário pentacoordenado) e modo de ligação B (propício para catálise não covalente) 60
Figura 24: (a) Formação de ligação N-P na estrutura 1V0Y (modificado de [72]). (b) Comprimento da ligação N-P entre a HIS170 e o fósforo na estrutura 1V0Y. 62
Figura 25: (a) Modelo enzimático (figura modificada de [11]) e (b) modelo reduzido do substrato utilizado por De Yonker e Webster [11] 63
Figura 26: Identificação de um pentacoordenado na região de 1,9 Å utilizando o método semi-empírico RM1 e *umbrella sampling* com passo de 0,1 Å e 300 ps por janela. Região QM sem magnésio. 65
Figura 27: Variação de Energia livre nos métodos PM6, PM3 e AM1D para a região QM com magnésio. Aplicamos *umbrella sampling* com passo de 0,1 Å e 300 ps por janela. 66
Figura 28: Caminho de reação para catálise covalente das SMases D sendo (a) estado inicial (b) formação do intermediário pentacoordenado (c) liberação da colina. 68
Figura 29: 2D *Potential energy scan* (PES) para o método semi-empírico PM3 com 168 átomos na parte quântica.r(N-P) e r(H-O) indicam os números do frame da distância N-P e H-O, respectivamente. 69
Figura 30: Produto com fosfato cíclico CC(1,3)P formado pela SMase D a partir de esfingomielina (figura modificada de [69]). 70

Figura 31: Transferência de um hidrogênio da esfingomielina para a HIS47 durante o processo de transfosfatidilação, sendo (a) o estado inicial e (b) o estado final. Método QM/MM na interface pDynamo/GTKDynamo com DFT/BLYP 6-31G, 46 átomos na parte QM e carga +2. 71
Figura 32: *Minimum Energy Pathway* para formação do produto com fosfato cíclico usando as distâncias O-P e H-O como coordenadas de reação. As estruturas representam os estados inicial e final do processo. Método AM1 e 168 átomos na parte QM foram aplicados na interface pDynamo/GTKDynamo. 72
Figura 33: Possíveis efeitos da ceramida em membranas biológicas (modificado do artigo de revisão de Goñi e Alonso [85]). 74
Figura 34: (a) Disposição da NPP7 e das moléculas de água e TFE no início da simulação e (b) após 20 ns. 75
Figura 35:a) Modo de ligação da esfingomielina à membrana na presença.água e TFE e b) otimização com relação a um modelo de bicamada lipídica calculada no servidor PPM [70] http://opm.phar.umich.edu/server.php 76
Figura 36: Intermediário pentacoordenado em simulações CP-QMMM-Metadynamics com 64 átomos na parte quântica. 78
Figura37: *Loxosceles spinulosa (ID:* C0JB44); *Loxosceles laeta* (ID: Q8I912); *Loxosceles laeta* (ID: Q8I914): *Loxosceles variegate* (ID: C0JAZ1); *Loxosceles gaucho* (ID: K9USW8); *Loxosceles amazonica* (ID: C0JAZ9); L*oxosceles rufescens* (ID: C0JB00); *Loxosceles arizonica* (ID: Q7Z1Y7); *Loxosceles boneti* (ID: Q5YD77); *Loxosceles apachea* (ID: C0JAV3); *Loxosceles deserta* (ID: C0JAW6); *Loxosceles sabina* (ID: C0JAY1); *Loxosceles similis* (ID: Q56JA9); *Loxosceles intermedia* (ID: P0CE81); *Loxosceles hirsute* (ID: C0JAQ5); *Loxosceles spadicea* (ID: C0JAS7). ... 92

Sumário

Índice de Ilustrações 9
Sumário 12
1. Objetivos 14
2. Introdução 15
2.1 Esfingomielinases D na Biosíntese de Esfingolipídios 15
2.2 Esfingomielinases D em Aranhas do Gênero Loxosceles 16
2.3 Características Estruturais e Mecanismo das SMases D 17
2.4 Métodos Computacionais em Catálise Enzimática 20
2.4.1 Docking 20
2.4.2 Dinâmica Molecular Clássica 22
2.4.3 Dinâmica Molecular a pH Constante 23
2.4.4 Métodos de Estrutura Eletrônica 25
2.4.5 Métodos Híbridos (QM/MM) 26
3. Detalhes Computacionais 30
3.1 Docking 30
3.1.1 Esfingomielina 30
3.1.2 Suramina 31
3.2 Parâmetros GAFF 31
3.2.1 Esfingomielina 31
3.2.2 Mio-inositol-1-fosfato 32
3.2.3 Suramina 32
3.3 Dinâmica Clássica 33
3.3.1 Íon Sulfato 33
3.3.2 Esfingomielina 33
3.3.3 Mio-inositol-1-fosfato 33
3.3.4 Suramina 34
3.4 Dinâmica Molecular a pH Constante (CpHMD) 35
3.5 QM/MM-AMBER Interface 35
3.6 QM/MM pDynamo/GTKDynamo Interface 36
4. Resultados e Discussões 38
4.1 Esfingomielinase D ou Fosfolipase D? 38

4.2 Os Estados de Protonação das Histidinas 40
4.2.1 Quem inicia o ataque nucleofílico? 40
4.2.2 Estados de protonação 40
4.2.3 Relação entre pH, atividade e estados de protonação das histidinas ... 42
4.2.4 Ampliação da faixa de pH ativo 44
4.3 Interações da SMase D com Ligantes 48
4.3.1 Íon Sulfato 48
4.3.2 Mio-inositol-1-fosfato 51
4.3.3 Suramina 54
4.4 Interações da SMase D com o Substrato 57
4.4.1 *Docking* da Esfingomielina 57
4.4.2 Dinâmica Molecular Clássica 60
4.5 Mecanismo Catalítico 62
4.5.1 Evidências do Mecanismo Associativo 62
4.5.2 Testes com QM/MM-AMBER Interface 64
4.5.3 QM/MM com pDynamo/GTKDynamo 67
4.5.4 Catálise Covalente x Catálise Não-Covalente 70
4.6 Interações da SMase D com Membranas 73
4.7 Dinâmica Molecular Ab initio (em andamento) 77
5. Conclusões 80
6. Referências 84
Apêndice 1 92

1. Objetivos

Neste trabalho, procuramos estudar o mecanismo catalítico das esfingomielinases D (SMases D) de aranhas do gênero *Loxosceles* através do ponto de vista computacional, sempre buscando suporte em dados experimentais. Temos como objetivo principal a apresentação do mecanismo de ação das SMases D através de métodos híbridos QM/MM. No entanto, no contexto atual, poucos detalhes do mecanismo catalítico destas enzimas são conhecidos para a aplicação direta dos métodos QM/MM.

Primeiramente, definimos o mecanismo ácido-básico como base para nossos estudos e passamos a avaliar suas particularidades. Diante da ausência de dados experimentais disponíveis na literatura, os estados de protonação de resíduos críticos são analisados através de simulações a pH constante (CpHMD) e *web servers* para cálculos de pKa. A seguir, avaliamos as principais interações com ligantes e inibidores partindo de informações disponíveis através de estruturas cristalográficas e ensaios experimentais e aplicando métodos computacionais como *docking* e dinâmica molecular clássica.

Finalmente, investigamos as interações com o substrato esfingomielina e os mais prováveis caminhos de reação, fazendo uso da dinâmica clássica e métodos híbridos QM/MM. Barreiras de energia livre obtidas por métodos híbridos são comparadas com a barreira experimental estimada pela taxa catalítica (k_{cat}) para SMases D de *Loxosceles laeta*. Dedicamos ainda uma seção para discussão das interações de esfingomielinases com membranas modelo e suas implicações.

2. Introdução

2.1 Esfingomielinases D na Biosíntese de Esfingolipídios

Esfingolipídeos são componentes essenciais de membranas celulares. A biosíntese de esfingolipídeos envolve uma variedade de enzimas e caminhos de reação, bem descritos no artigo de revisão de Taniguchi e Ozaki [1], como indicado na Figura 1. A ceramida ocupa a posição central do metabolismo de esfingolipídeos e é conhecida por, além do papel estrutural, ser um lipídeo mediador que induz morte celular, diferenciação, senescência, autofagia e migração.

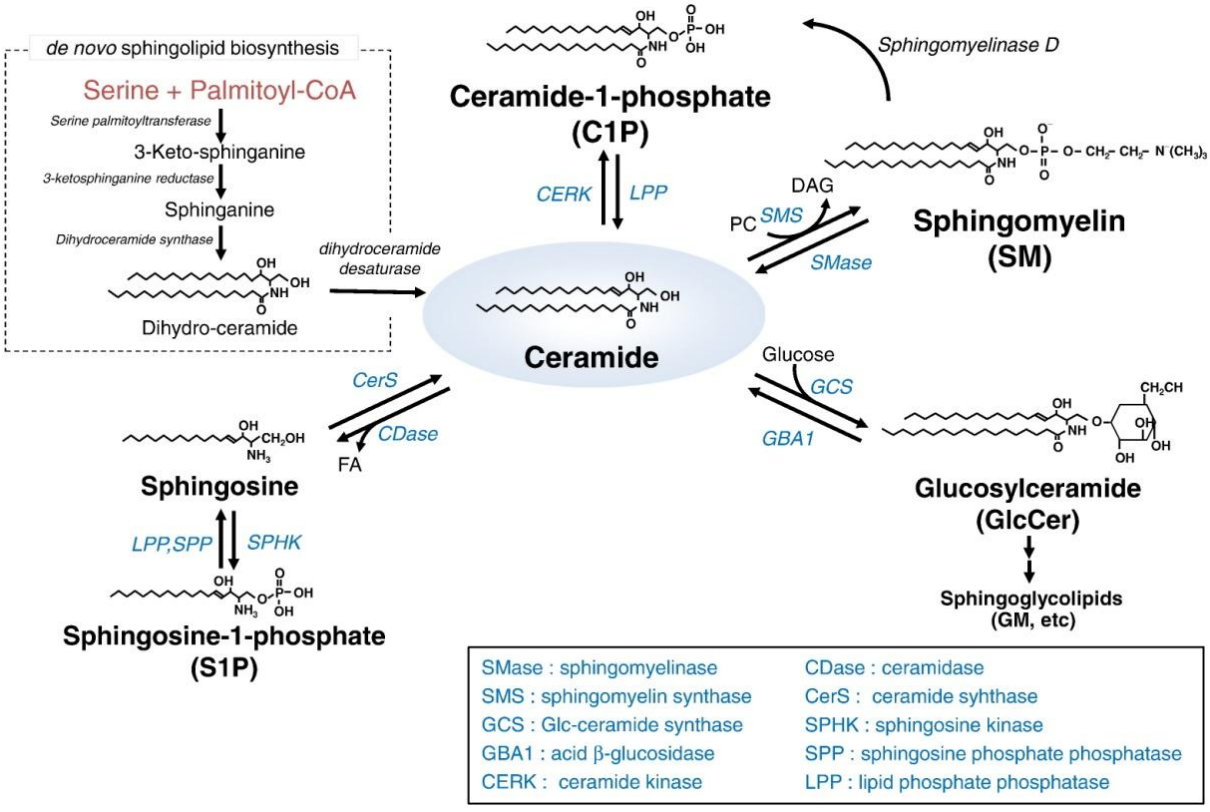


Figura 1: Esquema da biosíntese de esfingolipídeos (figura retirada da referência [1]). As setas indicam o caminho de reação para as fórmulas estruturais químicas dos esfingolipídeos e as enzimas são indicadas em azul e itálico (com exceção da Esfingomielinase D, em preto itálico).

Dentro deste esquema de biosíntese de esfingolipídios, as esfingomielinases são enzimas que catalisam a hidrólise de esfingomielina formando ceramida e

fosforilcolina, com um modo clivagem de similar às fosfolipases C. No entanto, as esfingomielinases do tipo D (SMases D), hidrolisam a esfingomielina liberando ceramida-1-fosfato (C1P) e colina (ver Figura 1). Acredita-se que C1P possa estar relacionada à estimulação de proliferação celular através da inibição de esfingomielinases ácidas e bloqueio da síntese de ceramida.

Atualmente, a atividade de esfingomielinase D é encontrada apenas em enzimas de algumas bactérias patogênicas do tipo *Corynebacterium* e aranhas do gênero *Loxosceles* [2]. Estas enzimas vêm sendo estudadas em colaboração com o Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular (CMIB) de São José do Rio Preto e o foco deste trabalho é voltado para o mecanismo catalítico das aranhas do gênero *Loxosceles* sob o ponto de vista computacional.

2.2 Esfingomielinases D em Aranhas do Gênero Loxosceles

As aranhas do gênero *Loxosceles*, também conhecidas como aranhas marrons, pertencem à família *Sicariidae* e diferentes espécies podem ser encontradas na América, África, Ásia, Europa e Oceania [3]. Atualmente três espécies de importância médica podem ser encontradas no Brasil (*Loxosceles laeta* (Figura 2a), *Loxosceles gaucho* e *Loxosceles intermedia* (Figura 2b)) e a maioria das notificações de acidentes ocorrem nas regiões Sul e Sudeste nos meses mais quentes do ano (outubro/março).

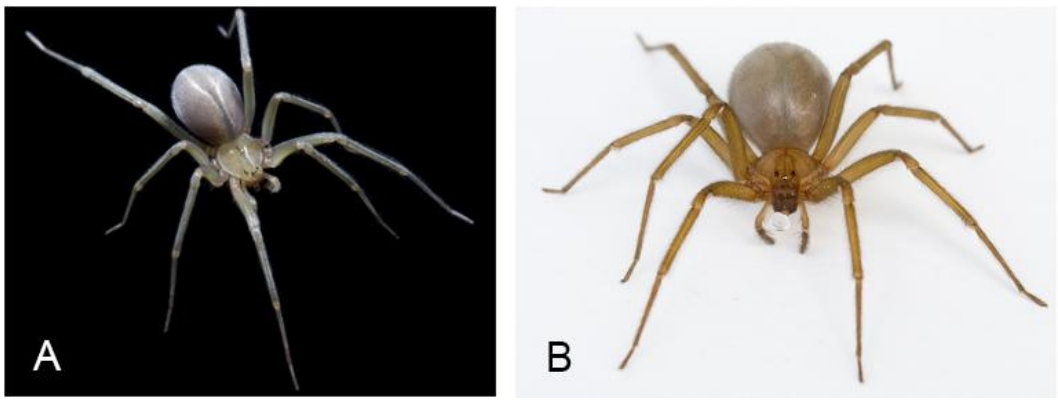


Figura 2: (A) *Loxosceles laeta* e (B) *Loxosceles intermedia*, figuras obtidas em http://www.arachnoserver.org/.

O loxoscelismo, quadro causado pelo envenenamento por aranha marrom, pode produzir dermonecrose severa, falha renal aguda, trombocitopenia, agregação plaquetária e hemólise intravascular sistêmica, a qual ocasionalmente pode levar a morte [4,3,5]. Apesar da importância clínica, o mecanismo de ação pelo qual o veneno causa estes efeitos não está bem caracterizado e, devido a isso, os protocolos para o tratamento não são bem estabelecidos.

Sabe-se que o veneno de aranhas Loxosceles é uma mistura complexa de proteínas e peptídeos com massa molecular de 1 a 40 kDa. Várias destas moléculas têm sido identificadas e descritas, como fosfatases alcalinas, 5'-ribonucleotídeo fosfohidrolases, hialuronidases e serino proteases (ver artigo de revisão em [3]). Entre estes componentes, tem sido demonstrado que a esfingomielinase D (SMase D), sozinha, é suficiente para induzir as lesões dermonecróticas características do loxoscelismo [6], fato que tem impulsionado o estudo das características estruturais e mecanismos de ação destas enzimas nos últimos anos.

2.3 Características Estruturais e Mecanismo das SMases D

Murakami e co-autores [7] classificaram as SMases D de *Loxosceles* em duas classes, I e II, baseando-se na sequência, dados estruturais e dados bioquímicos destas enzimas, como mostra a Figura 3. Na Figura 4 temos o alinhamento estrutural entre as classes I e II [8].

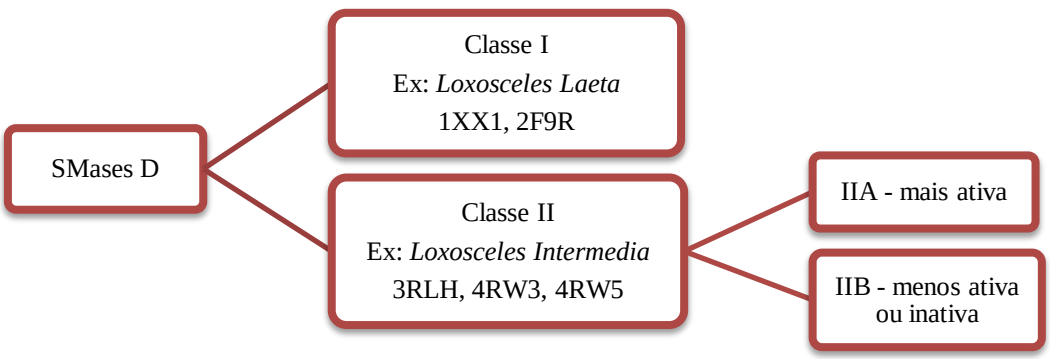


Figura 3: Divisão das Esfingomielinases D (SMases D) em classes (I e II) e estruturas representativas disponíveis no *Protein Data Banking*.

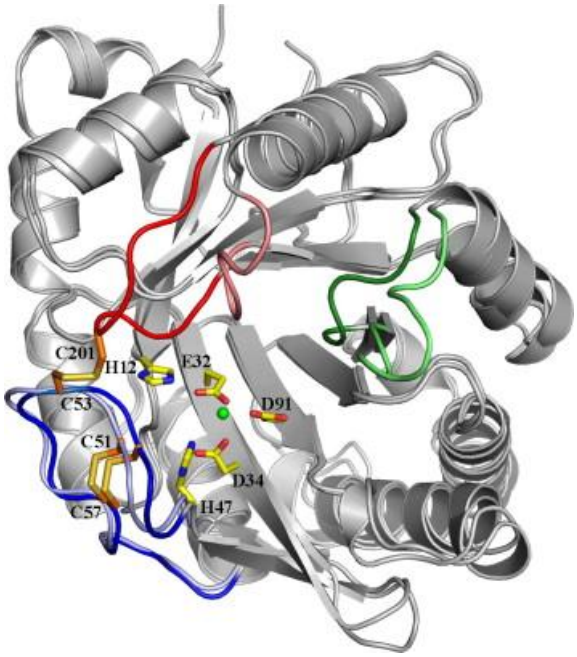


Figura 4: Alinhamento estrutural entre estruturas classe I (*L. laeta*, PDB lXX1) e classe II (LiRecDT1, PDB 3RLH) (figura modificada de [8]). *Loops* catalítico, flexível e variável em azul, vermelho e verde, respectivamente. Ligações entre cisteínas representadas em laranja e íon magnésio em verde.

A classe I é caracterizada estruturalmente pela presença de uma única ligação dissulfeto entre cisteínas (51 e 57) e pela presença de um *loop* hidrofóbico mais estendido chamado de *loop* variável. A classe II é caracterizada pela presença de uma ligação dissulfeto adicional entre as cisteínas (53 e 201), ligando os *loops* conhecidos como catalítico e flexível. As enzimas da classe II ainda podem ser subdivididas, de acordo com a atividade mais acentuada com relação à esfingomielina, em classes IIA e IIB. Entre os resíduos conservados nas duas classes de SMases D estão as histidinas catalíticas (HIS12 e HIS47), os resíduos de coordenação ao magnésio (GLU32, ASP34 e ASP91), ASP52, LYS93 e TRP230. Veja o alinhamento de sequência entre SMases de Classe I e II no Apêndice 1.

O mecanismo catalítico ácido-básico proposto para as esfingomielinases D (ver Figura 6) é baseado nas estruturas cristalográficas da esfingomielinase D de aranhas do gênero *Loxosceles laeta* na presença [9] ou ausência [7] de íon sulfato no sítio ativo, com códigos PDB 1XX1 e 2F9R, respectivamente. Uma diferença interessante nestas duas estruturas envolve a coordenação do íon magnésio conforme mostrado na Figura 5. Na estrutura 2F9R, sem ligante no sítio ativo, apenas uma molécula de água é encontrada na coordenação ao íon magnésio, e, na

estrutura 1XX1, com ligante, é possível observar três moléculas de água blindando o íon.

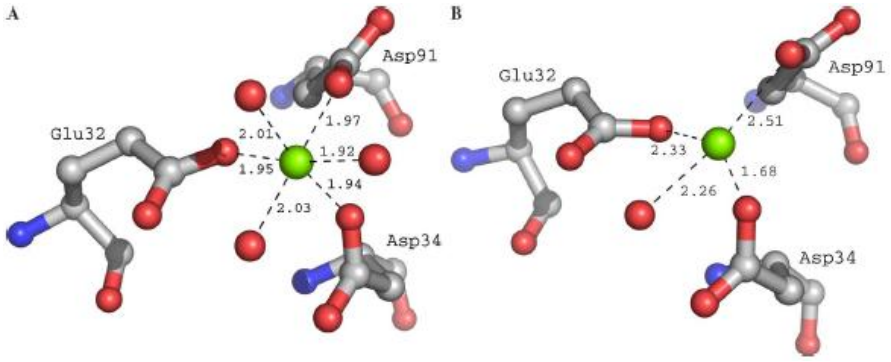


Figura 5: Coordenação do íon magnésio (em verde) (A) na presença e (B) na ausência de ligante SO_4^{-2} no sítio ativo (figura obtida de [7]).

A Figura 6 mostra um esquema do mecanismo proposto para clivagem da esfingomielina através de análise estrutural. Na primeira parte, o nitrogênio ε da histidina 47 ataca a ligação fosfodiéster formando uma ligação covalente P-N, resultando em um intermediário com um fósforo pentacoordenado. A seguir, a histidina 12 doa um próton para a liberação do radical R', que corresponde ao grupo colina da esfingomielina, formando um intermediário tetracoordenado instável. Uma molécula de água é então ativada pela histidina 12 retirando um próton da água e causando um ataque do grupo OH^- ao fósforo, formando novamente um intermediário fosfohistidina pentacoordenado, porém mais instável. No último passo, temos a liberação de ceramida-1-fosfato e o retorno das histidinas ao estado de protonação inicial.

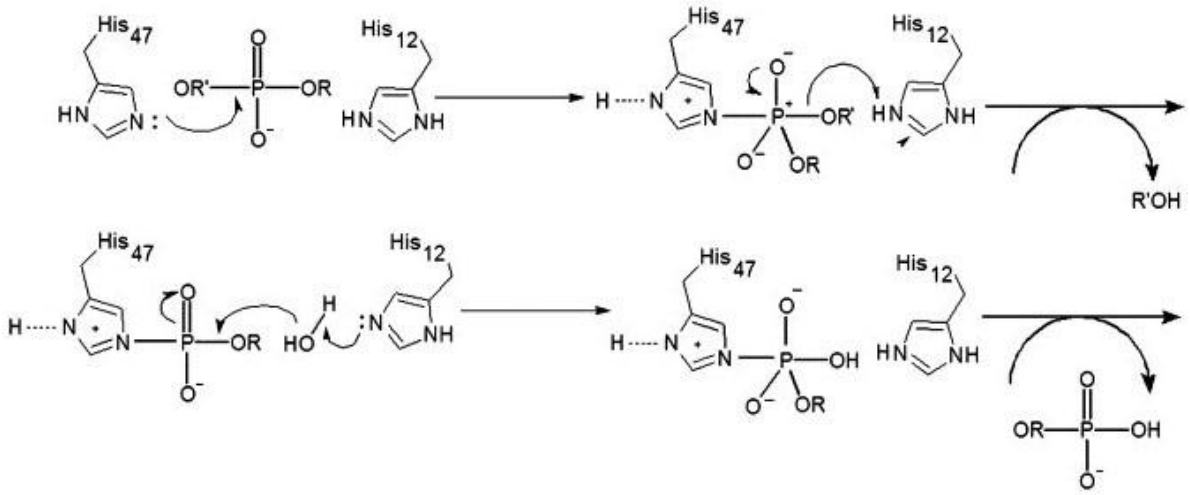


Figura 6: Mecanismo catalítico via formação de intermediário pentacoordenado das SMases D de aranhas do gênero *Loxosceles* (esquema modificado de [7])

Este mecanismo com a formação de um intermediário pentacoordenado seria semelhante ao proposto por Stuckey e Dixon [10] para as fosfodiesterases, baseado em uma estrutura cristalográfica de *Nuc* com um tungstato no sítio ativo. Mecanismos que envolvem transferências de grupos fosforil ainda tem sido alvo de debate nos últimos anos, envolvendo três categorias [11]: mecanismo dissociativo (tipo S_N1), no qual um intermediário metafosfatotricoordenado é formado, mecanismo associativo (tipo S_N2), com a formação de um intermediário fosforano pentacoordenado e mecanismo sem formação de intermediário. Nos próximos capítulos discutiremos a viabilidade destes mecanismos para as SMases D.

2.4 Métodos Computacionais em Catálise Enzimática

2.4.1 Docking

Métodos de *docking* molecular têm como principal objetivo prever o modo de ligação e a afinidade de pequenas moléculas dentro do sítio ativo de um receptor de interesse. Quando aplicado a uma grande biblioteca de compostos (*virtual screening*), o método deve ser capaz de distinguir entre moléculas que

provavelmente não se ligariam ao receptor e classificar os compostos com maior afinidade.

Entre as ferramentas básicas para os métodos de *docking* estão o algoritmo de busca conformacional e a função escore de energia [12]. Os algoritmos de busca exploram o perfil de energia livre para encontrar o melhor modo de ligação (posicionamento) do ligante dentro do sítio ativo do receptor, enquanto as funções de escore avaliam a qualidade do modo de ligação e selecionam as conformações mais relevantes.

Atualmente, há diversas metodologias e pacotes de *software* disponíveis para o *docking* automatizado que fornecem predições aliadas a bom desempenho e rapidez com baixo custo computacional [13]. O pacote AutoDock, utilizado neste trabalho, tem se mostrado uma ferramenta rápida e precisa na predição de energia e modos de ligação de pequenos ligantes em alvos macromoleculares [14,15,16].

O AutoDock utiliza um de método de rede (*grid)* para a busca no espaço conformacional disponível para o ligante próximo a uma proteína, o qual permite uma avaliação eficaz da energia de ligação entre conformações. Neste método, atribui-se uma rede com que contém a proteína alvo. A seguir, um átomo de teste é colocado em cada ponto da rede, a energia de interação entre o átomo e a rede é calculada, e o valor é estocado na rede. Essa rede de energias pode então ser utilizada como uma tabela de referência durante o processo de *docking*.

O principal método para busca conformacional neste pacote é o algoritmo genético Lamarckiano [17]. Neste método, uma população de conformações de teste é criada, e então em gerações sucessivas, estes indivíduos são mutados, trocam parâmetros conformacionais e competem de maneira análoga à evolução biológica, selecionando indivíduos com a energia de ligação mais baixa. O aspecto “lamarckiano” é um traço adicional que permite conformações individuais pesquisarem seu espaço conformacional local, encontrando mínimos, e então passam essa informação para gerações futuras.

Para predizer as energias livres de ligação de pequenas moléculas em alvos macromoleculares, o AutoDock4 utiliza um campo de força de energia livre semi-empírico, descrito e testado por Huey et al. [18]. O campo de força é baseado em

um modelo termodinâmico que permite incorporação de interações intramoleculares na energia livre de ligação. Isto é feito avaliando energias por ambos estados, ligado e não ligado. Este método também incorpora um conjunto próprio de tipos de átomos e cargas.

Estas metodologias representam grande impacto no planejamento e *design* de novas drogas. Torna-se também uma ferramenta essencial para o estudo de dinâmica molecular e catálise enzimática, especialmente quando estruturas cristalográficas ou outros dados experimentais que descrevem o modo de ligação de um substrato ou inibidor estão ausentes. Nestes casos, o *docking* molecular é ponto de partida para simulações computacionais de dinâmica molecular, métodos de estrutura eletrônica ou métodos híbridos como será apresentado a seguir.

2.4.2 Dinâmica Molecular Clássica

Reações enzimáticas são processos dinâmicos, portanto, a aplicação de um método teórico-computacional capaz de descrever o comportamento dependente do tempo se apresenta relevante para estudos de mecanismo catalíticos. A simulação através de dinâmica molecular é uma técnica bastante utilizada e que possui possibilidades de aplicação em sistemas biológicos, bem descrita em livros e artigos de revisão. Basicamente, a dinâmica molecular calcula a distribuição e o movimento de partículas de um sistema de muitos corpos e relaciona a propriedades observadas experimentalmente através da mecânica estatística.

Na dinâmica molecular clássica, o comportamento dinâmico de um arranjo inicial de átomos é determinado fazendo uso da mecânica newtoniana para calcular a trajetória de partículas que interagem em certo período de tempo. Neste caso, através da segunda lei de Newton, a força pode ser calculada como o negativo do gradiente da energia potencial, gerando um conjunto de equações de movimento para cada partícula de um sistema de interesse. A combinação entre o formato das funções de energia potencial e seus respectivos conjuntos de parâmetros geralmente é relacionada aos chamados campos de força. Uma forma básica de função de energia potencial aplicada a campos de força de proteínas tem a forma:

$$V(r) = \sum_{bonds} k_b(b - b_0)^2 + \sum_{angles} k_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{torsions} k_\phi[\cos(n\phi + \delta) + 1] + \sum_{\substack{nonbond \\ pairs}} \left[\frac{q_i q_j}{r_{ij}} + \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}}{r_{ij}^{6}}\right],$$

na qual os primeiros três termos são o somatório das interações entre ligações, ângulos e torções. No último termo, temos a interação eletrostática, calculada através da carga parcial (q_i) de cada átomo via lei de Coulomb, e o potencial de Lennard Jones (6-12). As constantes são parametrizadas com o auxilio de dados experimentais, escolhidos de forma a reproduzir determinado comportamento esperado do sistema biológico durante as simulações. Entre os conjuntos mais utilizados de campos de força estão CHARMM [19], GROMOS [20], AMBER [21] e OPLS [22].

A pré-parametrização destes campos de força impõe algumas limitações às simulações de dinâmica molecular. A primeira delas envolve a grande quantidade de tipos de átomos e possíveis interações atômicas. Diante, por exemplo, de um novo tipo de ligante, fármaco ou resíduo não padrão, novas interações precisam ser parametrizadas e integradas ao campo de força. Um segundo problema surge em situações em que efeitos quânticos devem ser levados em conta, que incluem casos de sistema biológicos em que a estrutura eletrônica e o padrão de ligação mudam com o tempo, um traço essencial da catálise enzimática.

2.4.3 Dinâmica Molecular a pH Constante

As simulações de dinâmica clássica geralmente empregam estados de protonação constantes para todos os resíduos tituláveis. No entanto, esta aproximação, como o caso da pré-parametrização discutido na seção anterior, apresenta algumas limitações. A principal delas envolve a necessidade de conhecer os valores de pKa de todos os resíduos tituláveis de uma proteína, uma vez que os valores de pKa podem ser diferentes dos valores tabelados para os resíduos dependendo do ambiente eletrostático.

Os métodos de dinâmica molecular a pH constante (*Constant pH Molecular Dynamics - CpHMD*) podem ser divididos em duas categorias: as de estado de protonação contínuo [23] e discreto [24]. Os modelos de protonação discretos empregam amostragem de Monte Carlo durante a dinâmica clássica para selecionar diferentes estados de protonação durante o curso da simulação. Neste trabalho utilizamos o método de protonação discreto para dinâmica a pH constante desenvolvida por John Morgan et al. [24] e implementado para o pacote de software AMBER 11 [25].

Este método emprega modelo de Born generalizado para a solvatação [26], com amostragem periódica dos estados de protonação. Ou seja, entre os passos de Monte Carlo, o sistema segue de acordo com a dinâmica molecular em solvente implícito. A cada passo de Monte Carlo, um sítio titulável e um novo estado de protonação para aquele sítio é escolhido aleatoriamente e a energia livre de transição para protonação e desprotonação é calculada como:

$$\Delta G = k_B T\left(pH - pK_{a,ref}\right)\ln 10 + \Delta G_e - \Delta G_{e,ref}\,,$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, pH é o pH especificado para o solvente, $pK_{a,ref}$ é o pKa de referência, ΔG_e é o componente da energia livre calculado para o grupo titulável na proteína e $\Delta G_{e,ref}$ é o componente eletrostático da energia livre de transição para o composto de referência. Os compostos de referência são aminoácidos com a seguinte sequência acetil-aminoácido-metilamina.

A energia livre de transição total ΔG é usada na aplicação do critério de Metrópolis para determinar se a transição será ou não aceita. Se a transição é aceita, a dinâmica molecular continua com o grupo titulável no novo estado de protonação, se não aceita, a dinâmica continua sem nenhuma mudança no estado de protonação. Quando um novo estado de protonação é aceito, as cargas parciais de todos os átomos da cadeia lateral do resíduo são alteradas para caracterizar o novo estado. Recentemente, Swails et al. [27] desenvolveu para o pacote AMBER 14 [28] um método para simulações a pH constante que permite o uso de solvente explicito, o qual vem sendo testado em nosso sistema.

2.4.4 Métodos de Estrutura Eletrônica

Os métodos de mecânica molecular, como a dinâmica clássica, avaliam apenas as interações entre os núcleos e não tratam explicitamente os elétrons do sistema. Nestes casos, os efeitos eletrônicos são incluídos implicitamente em campos de força através da parametrização. No entanto, quando estamos interessados em observar a quebra ou a formação de ligações, torna-se mandatório o uso de métodos de química quântica, os quais permitem observar a mudanças na estrutura eletrônica.

Os métodos de estrutura eletrônica, também chamados de métodos QM (*Quantum Mechanical*) ou QC (*Quantum Chemistry*), calculam as propriedades do sistema através soluções aproximadas para equação de Schroedinger:

$$H\Psi = E\Psi.$$

Estes métodos podem ser divididos em três classes principais: *ab initio*, semi-empíricos e híbridos.

Os métodos *ab initio* calculam as soluções para a equação de Schroedinger através de aproximações matemáticas que fazem uso apenas de um pequeno conjunto de constantes físicas, não inserindo parâmetros experimentais em seus cálculos. O método Hartree-Fock, que utiliza um procedimento de otimização através da aproximação SCF (Self-Consistent Field), apresenta bons resultados para propriedades geométricas de átomos leves e calcula baixas barreiras de energia com precisão. As principais limitações deste método *ab initio* são o custo computacional e o fato de negligenciar os efeitos de correlação eletrônica, o qual faz com o método seja menos preciso para determinados sistemas.

Métodos semi-empíricos introduzem algumas aproximações para calcular as integrais correspondentes em métodos *ab initio* e são parametrizados a fim de reproduzir dados experimentais. Neste caso, a solução da equação de Schroedinger depende dos parâmetros disponíveis para o sistema químico em questão e deve ser levada em conta a complexa relação entre precisão e custo computacional. Diversos métodos semi-empíricos que variam na precisão da propriedade a ser

observada e quantidade de átomos disponível podem ser encontrados, como AM1 [29], AM1/d [30], PM3 [31], PM6 [32] e o RM1 [33].

Finalmente, temos os métodos baseados na teoria do funcional densidade (DFT – *Density Funcional Theory*) para o qual implementações diversas vêm sendo realizadas desde o artigo inicial de Kohn e Sham [34]. Uma característica atrativa neste método envolve a adição dos efeitos de correlação eletrônica, nos quais o método Hartree-Fock falha em precisão. No entanto a forma do funcional de troca-correlação geralmente é desconhecida e uma aproximação deve ser feita a partir de dados experimentais ou sistemas modelo. Este fato faz com o método DFT seja considerado um método híbrido de estrutura eletrônica. O DFT têm se mostrado bastante popular por apresentar melhorias em algumas propriedades moleculares comparado ao Hartree-Fock e custo computacional similar.

Outra grande vantagem dos métodos de estrutura eletrônica com relação aos métodos de mecânica molecular para o estudo de catálise enzimática é que a parametrização do campo de força para novos ligantes não é mais necessária. No entanto, sistemas biológicos podem ser constituídos de centenas a milhares de átomos, impossibilitando a aplicação de métodos QM ao sistema como um todo devido ao alto custo computacional.

Uma aproximação para o tratamento de sistemas enzimáticos consiste em selecionar alguns poucos resíduos que participam diretamente na catálise (geralmente entre 30 e 200 átomos), juntamente com o substrato ou inibidor, e aplicar um método de estrutura eletrônica de alta precisão. O restante da enzima é então modelado através de métodos como COSMO Polarized Continuum Method (C-PCM). Embora os erros e adaptação do tamanho da região QM devam ser avaliados cuidadosamente para cada sistema, os resultados geralmente possuem precisão suficiente para distinguir entre mecanismos possíveis ou não e auxiliar na interpretação de dados experimentais.

2.4.5 Métodos Híbridos (QM/MM)

Conforme discutido na seção 2.4.2, a dinâmica molecular clássica não é capaz de levar em conta a quebra e formação de ligações para avaliação de mecanismos catalíticos. Além disso, a aplicação de métodos de estrutura eletrônica em sistemas complexos como enzimas pode se tornar inviável do ponto de vista computacional (seção2.4.4). Nos últimos anos, diversos métodos híbridos que associam as melhores características da dinâmica clássica e dos métodos de estrutura eletrônica têm sido desenvolvidos, impulsionando o avanço nos estudos de catálise enzimática.

Métodos híbridos (QM/MM) consistem basicamente na divisão de um sistema complexo em uma parte clássica (MM – *Molecular Mechanics*), tratada por um campo de força clássico, e uma parte quântica (QM – *Quantum Mechanics*), quimicamente ativa, na qual se aplica o método de estrutura eletrônica como mostra o esquema na Figura 7. O formalismo QM/MM, a princípio, permite combinar diversos métodos QM, como semi-empíricos, DFT e SCC-DFTB, e métodos MM como otimização, Monte Carlo ou dinâmica molecular (com campos de força como AMBER, CHARMM, GROMOS e OPLS).

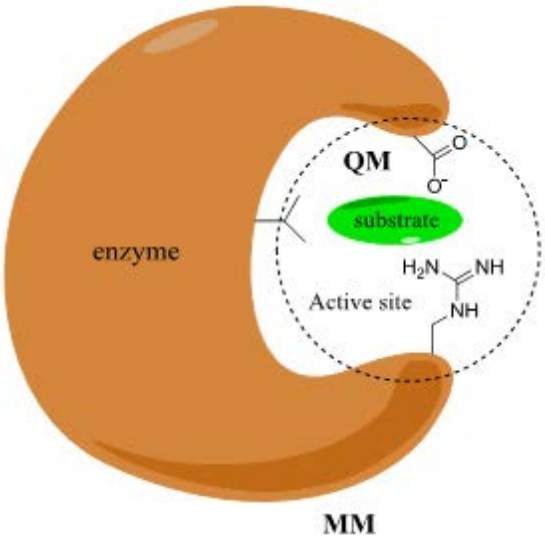


Figura 7: Princípios gerais de métodos QM/MM. Parte QM na qual é aplicada o método de estrutura eletrônica envolvendo os átomos quimicamente ativos e parte MM na qual é aplicada um campo de força clássico.

Embora, diversas implementações e interfaces que associam pacotes QM e MM possam ser encontradas, a Hamiltoniana do sistema geralmente é dada por:

$$H = H_{QM} + H_{QM/MM} + H_{MM}, \quad \text{(método aditivo)}$$

onde H_{QM} é a Hamiltoniana da parte QM, H_{MM} é a Hamiltoniana da parte MM e $H_{QM/MM}$ é Hamiltoniana que acopla as regiões QM e MM. O acoplamento entre as regiões não é trivial e diversos esquemas de acoplamento podem ser encontrados. Estes esquemas se dividem basicamente em mecânico, eletrostático e de polarização [35]. A interface QM/MM implementada a partir do pacote AMBER12, por exemplo, utiliza por padrão um acoplamento eletrostático, no qual as interações das cargas pontuais MM com os elétrons da parte QM, assim como as interações entre cargas pontuais MM e o núcleo da parte QM, são levadas em conta explicitamente.

Ligações covalentes que atravessam a fronteira entre as partes QM e MM também são um ponto chave em simulações QM/MM. Para contornar problemas, como ligações insaturadas na região QM, várias aproximações podem ser encontradas incluindo adição de *link atoms* [36], *capping potentials* [37] e orbitais híbridos [38] (ver [35] para artigo de revisão). Regiões de fronteira devem ser colocadas tão longe quanto possível dos átomos quimicamente ativos, sempre levando em conta o custo computacional. Preferencialmente, ligações alifáticas C-C são colocadas nesta região, evitando ligações com átomos polares ou grupos MM carregados.

A grande vantagem dos métodos QM/MM reside em conciliar a descrição de processos eletrônicos, como reações químicas ou transferências de carga, com uma descrição apropriada dos efeitos do meio (biomolecular ou solvente). O primeiro passo no estudo de catálise enzimática geralmente consiste em avaliar os caminhos de reação definindo coordenadas de reação para o mecanismo. Por exemplo, para uma reação simples envolvendo a quebra de uma ligação e a formação de outra, a coordenada de reação pode ser definida como a diferença no comprimento da ligação a ser quebrada e daquela que será formada. A seguir, procura-se definir o perfil de energia do sistema.

Reações enzimáticas frequentemente estão associadas a barreiras de energia de ativação que ultrapassam as atuais escalas de tempo em simulações

QM/MM, que vão de picosegundos a algumas de dezenas de nanosegundos dependendo dos métodos QM e MM escolhidos. Portanto, estas simulações geralmente aparecem associadas a métodos de intensificação de amostragem para o cálculo de energia livre como *umbrella sampling* [39], integração termodinâmica [40], *steered molecular dynamics* [41] ou metadinâmica [42]. Neste trabalho, utilizaremos a interfaces QM/MM AMBER e pDynamo/GTKDynamo, associadas à *umbrella sampling* e PES (*Potential Energy Scan*), respectivamente.

3. Detalhes Computacionais

3.1 Docking

3.1.1 Esfingomielina

Uma esfingomielina com cauda de 16 carbonos foi desenhada no software Avogrado 1.0.3 [43], no qual também foi realizada uma minimização de energia utilizando o campo de força MMFF94 com 500 passos de *steepest descent* e 500 passos de gradiente conjugado. Esta estrutura foi utilizada para o *docking* do substrato desta seção e para a obtenção de parâmetros GAFF na seção 3.2.1.

Para o *docking* do substrato esfingomielina junto a SMase D de *Loxosceles laeta* utilizamos a interface Autodock Tools 4 com AutoDock 4.2 [14] e com a cadeia A do PDB 1XX1. Todos os íons sulfato e as moléculas de EPE presentes na estrutura cristalográfica foram removidos, assim como a maior parte das moléculas de água. O íon magnésio e as três moléculas de água que coordenam o íon magnésio foram mantidos junto ao receptor.

O centro da *grid* para o *docking* da esfingomielina foi escolhido como a posição do centro do íon sulfato localizado no sítio ativo da SMase D no PDB 1XX1. Uma caixa de 126x126x126 pontos e espaçamento de 0.375 Å se mostraram suficientes para incluir toda região do sítio ativo e permitir a rotação e translação do substrato nessa região. Aplicou-se o algoritmo genético Lamarckiano [17] com número máximo de avaliações de energia de 250000. Para cada um dos 20 simulações independentes, usamos um número máximo de 27000 operações GA e populações de 150 indivíduos. Para o íon magnésio foram utilizados os potencias do campo de força do AMBER como definido no programa AutoDock.

Devido ao tamanho e a alta flexibilidade do ligante, torções em quatro carbonos das pontas das caudas hidrofóbicas da esfingomielina foram mantidas restritas. Atingindo assim as 32 torções permitidas dentro do programa AutoDock. A estrutura com menor energia dentro do cluster em que o fósforo da esfingomielina se

mostrou próxima às histidinas catalíticas foi escolhida como estrutura de partida para as simulações de dinâmica molecular clássica.

3.1.2 Suramina

A suramina foi escolhida para estudos de *docking* molecular após ensaios prévios experimentais e de *virtual screening* que indicaram atividade de inibição para este ligante (artigo submetido [44]). Neste trabalho, optamos pelo AutoDock Vina 1.1.2 [15] para o *docking* do inibidor. Mantivemos os 16 graus de liberdade da suramina e parâmetros de *docking* padrão do AutoDock Vina, com exceção da exaustividade que foi alterada entre 8 e 32 para conferir a convergência dos clusters de ligantes fornecidos pela função escore.

A *grid* foi centrada na região do sítio ativo próximo à superfície da proteína e o *docking* foi executado para diferentes tamanho de caixa: 70x70x70, 60x60x60 e 34x34x46, todas com tamanho suficiente para encobrir a suramina. Para as cargas parciais foi aplicado o método de Gasteiger através do AutoDock Tools [14]. Todas as caixas indicaram dois clusters com posições ligeiramente diferentes para parte da suramina localizada mais distante do sítio ativo. Selecionamos a posição do cluster de menor energia fornecido pela caixa de 34x34x46 para as simulações de dinâmica molecular.

3.2 Parâmetros GAFF

3.2.1 Esfingomielina

A estrutura da esfingomielina obtida em 3.1.1 teve os hidrogênios não polares adicionados através do AutoDock Tools 4.2 [14]. A estrutura da esfingomielina foi submetida à otimização de geometria através do *Gaussian03* [45] com nível RHF/6-31G*. A carga total do ligante foi atribuída zero.

A partir da estrutura otimizada pelo *Gaussian*, os parâmetros para o campo de força *General AMBER Force Field (GAFF)* [46] foram gerados utilizando o pacote *antechamber* e *parmcheck* [47] implementado no AMBER11 [25]. Para o método de cargas adotamos o *Restrained Eletrostatic Potential* (RESP) [48] disponível no *antechamber*.

3.2.2 Mio-inositol-1-fosfato

As coordenadas para o ligante mio-inositol-1-fosfato foram obtidas a partir da estrutura PDB 4RW3 (artigo aceito [49]). Os hidrogênios que faltavam na estrutura cristalográfica foram adicionados a fim de otimizar a geometria do ligante pelo método de gradiente conjugado no programa Avogrado 1.0.3 [43]. O gradiente convergiu após 131 passos usando o campo de força GAFF e critério de convergência de 10^{-5}.

A estrutura obtida no último passo de otimização foi utilizada para otimização de geometria com Gaussian 09 [50], com nível de teoria HF/6-31G* e carga total -2. As cargas RESP e os parâmetros do campo de força para o *General AMBER Force Field (GAFF)* [46] foram calculadas a partir dos pacotes *antechamber* e *parmcheck* implementados no AMBER11 [25].

3.2.3 Suramina

A estrutura da suramina após o *docking* foi utilizada como entrada para otimização de geometria. Hidrogênios foram completados usando AutoDock Tools 4, resultando em um total de 120 átomos. Para otimização utilizou-se o *Gaussian* 03 [45] e aplicamos o método DFT com nível B3LYP/6-31G(d). A carga total da suramina foi atribuída -6 e um critério de convergência de 10^{-6}.

A estrutura final da otimização e as cargas Mulliken, obtidas via otimização de geometria no *Gaussian,* foram utilizadas para gerar os parâmetros da suramina

baseados no campo de força GAFF. Para isso utilizamos os pacotes *antechamber* e *parmcheck* implementados no AMBER 14 [28].

3.3 Dinâmica Clássica

3.3.1 Íon Sulfato

Dinâmica molecular clássica com o íon sulfato dentro e fora do sítio ativo da enzima (PDBs 1XX1 e 2F9R) foi realizada no pacote Gromacs 4.5.4 [51] como o campo de força 43A1. As simulações foram realizadas a 1atm e 300K com termostato de Berendsen [52] e modelo de água SPC [53]. Aplicamos PME para interações de longo alcance e raio de corte de 14 Å. Ligações envolvendo átomos de hidrogênio foram restringidas com LINCS [54] e o passo de integração foi de 2 fs.

3.3.2 Esfingomielina

Para simulações clássicas da enzima com substrato esfingomielina foram utilizados os pacotes Gromacs e AMBER. Em simulações com o Gromacs aplicamos os parâmetros do pacote 43A1-S3 [55] para esfingomielina e no AMBER utilizamos os parâmetros para esfingomielina obtidos na seção 3.2.1.

3.3.3 Mio-inositol-1-fosfato

Simulações de dinâmica molecular clássica utilizando AMBER 11 foram realizadas em três estados de protonação diferentes para HIS47 e HIS12 a partir do PDB 4RW3. No primeiro estado, ambos os nitrogênios ND1 e NE2 foram protonados nas HIS12 e HIS47; no segundo estado, ambos os nitrogênios ND1 e NE2 foram

protonados na HIS12 e apenas ND1 na HIS47; no terceiro estado, ND1 e NE2 foram protonados na HIS47 e apenas ND1 na HIS12.

Aplicamos os parâmetros previamente obtidos para o mio-inositol-1-fosfato (seção 3.2.2) e o campo de força AMBER 99SB para a proteína. Todos os sistemas foram neutralizados com íons Cl^-, quando necessário, e colocados em uma caixa retangular com águas TIP3P [56] construída com as bordas com pelo menos 10 Å longe da proteína ou do ligante. Minimizações com restrição e sem restrição foram realizadas com 10000 passos de steepest descent seguidos por 10000 passos de gradiente conjugado.

Os sistemas foram aquecidos durante 100 ps de 0 a 300 K com constante de restrição de 25 kcal/mol.$Å^2$ e termostato de Langevin [57]. A seguir 300 ps de equilibração com pressão de 1atm e sem restrição foram realizadas, seguidas de aproximadamente 25 ns de simulação de produção. Interações de longo alcance foram tratadas com PME e as ligações de átomos de hidrogênio foram restritas com o algoritmo SHAKE [58]. Raio de corte de 12 Å e passo de integração de 2 fs foram aplicados no aquecimento, equilibração e produção.

3.3.4 Suramina

O complexo SMase-suramina obtido na seção 3.1.2 foi submetido a simulações de dinâmica molecular no AMBER 14 [28]. Para o íon magnésio utilizamos os parâmetros de íons bivalentes para água TIP3P obtidos por Li, Roberts, Chakravorty e Merz em 2013 [59] e o campo de força ff14SB para a proteína. Para a suramina foram utilizados os parâmetros baseados em GAFF obtidos na seção 3.2.1.

Uma caixa octaédrica foi construída com água TIP3P [56] distante 10 Å de qualquer átomo do complexo. Quatro átomos de sódio foram necessários para atribuir carga zero ao sistema. Minimizações com restrição e sem restrição foram realizadas com 10000 passos de steepest descent seguidos por 10000 passos de gradiente conjugado

A caixa foi aquecida de 0 a 300 K durante 200 ps com termostato de Langevin [57] e restrição em todos os átomos de soluto. A equilibração foi então realizada

durante 500 ps a 300 K e 1 atm, seguida por aproximadamente 100 ns de produção. Aplicamos PME para as interações de longo alcance e o algoritmo SHAKE [58] para as ligações contendo átomos de hidrogênio. Raio de corte de 12 Å e passo de integração de 2 fs foram aplicados no aquecimento, equilibração e produção.

3.4 Dinâmica Molecular a pH Constante (CpHMD)

A fim de determinar o estado de protonação das histidinas 12 e 47 em várias condições de pH e na presença ou ausência de ligantes, foi utilizado o método de simulação a pH constante (CpHMD) implementado no pacote AMBER 12 [60]. O solvente foi descrito de modo implícito usando o modelo de Born generalizado (igb=2) [61] com uma concentração de sal de 0,1 M. O algoritmo de Monte Carlo usado para avaliar o estado de protonação dos resíduos ionizáveis (HIS12 e HIS47) durante CpHMD foi empregado a cada 100 fs.

Todas as simulações foram submetidas à minimização com e sem restrição com 10000 passos de *steepest descent* seguidos por 10000 passos de gradiente conjugado, e aquecidos classicamente de 0 a 300 K com termostato de Langevin [57] e restrição em todos os átomos de soluto. O aquecimento foi seguido por equilibração clássica entre 200 ps e 400 ps a 300 K e dinâmicas CpHMD de aproximadamente 6 ns. Foram aplicados passo de integração de 2 fs e restrição nas ligações de hidrogênio utilizando o algoritmo SHAKE [58].

3.5 QM/MM-AMBER Interface

Conformações de dinâmica molecular clássica com o substrato em posição apropriada para o ataque nucleofílico da HIS47 ao fósforo foram escolhidos para iniciar as simulações QM/MM através da interface implementada dentro do AMBER 12 [60]. Dois modelos quânticos foram analisados: um deles abrangendo o anel da HIS47 e região próxima ao grupo fosfato da esfingomielina com 30 átomos e outro levando em conta também a HIS12, o íon magnésio e a parte carregada dos

resíduos de coordenação ao magnésio (GLU32, ASP34 e ASP91) com um total de 62 átomos.

Os sistemas foram previamente equilibrados por aproximadamente 100 ps antes do início da aplicação de *umbrella sampling* para os cálculos de energia livre. A coordenada de reação escolhida foi a distância entre o fósforo presente na esfingomielina (P1) e o nitrogênio (NE2) da HIS47. O fósforo foi aproximado do nitrogênio utilizando janelas teste com intervalos de 0,2 Å e janelas de com passo de 0,1 Å para cálculo de energia livre. Para cada janela 100 ps de simulação QM/MM foram realizados. Os perfis de energia livre foram obtidos através do pacote WHAM (Weighted Histogram Analysis Method) [62].

Todas as simulações QM/MM foram mantidas a 1 atm e 300 K com termostato de Langevin [57]. Interações do longo alcance são calculadas com uma modificação do método PME para a interface QM/MM [63] e raio de corte de 12 Å. Em simulações QM/MM o algoritmo SHAKE não foi utilizado e o passo de integração foi de 1 fs. Foi aplicada a aproximação de *link atom,* com átomo de hidrogênio para todas as ligações covalentes que cruzaram a fronteira QM e MM. No modelo menor foram testados para a parte QM os métodos empíricos AM1, PM3, PM6, RM1 e também SCC-DFTB [64], enquanto o modelo maior foi testado para AM1D, PM3 e PM6.

3.6 QM/MM pDynamo/GTKDynamo Interface

Conformações de dinâmica molecular clássica com a esfingomielina em posição apropriada para a catálise enzimática foram selecionados para iniciar as simulações QM/MM com a interface pDynamo/GTKDynamo [65].

O primeiro modelo para região QM envolvia as duas histidinas catalíticas e o substrato completo, em um total de 168 átomos e carga total +1. Raios de 37 Å em torno da parte quântica foram adicionados à parte MM e tratados como o campo de força do AMBER (ff99SB). Uma camada de 4 Å em volta da parte clássica foi mantida com os átomos fixos na posição inicial. O segundo modelo, inclui as

histidinas catalíticas, o íon magnésio e parte da esfingomielina, envolvendo 169 átomos e carga total +3.

DFT e vários métodos QM semi-empíricos foram testados nestes modelos. Todos os sistemas QM/MM foram previamente minimizados com gradiente conjugado. *Potential energy scans* (PES) foram utilizados para trazer o átomo de fósforo da esfingomielina até o nitrogênio NE2 da HIS47 e/ou o hidrogênio ligado ao nitrogênio NE2 da HIS12 até o oxigênio que liga o grupo colina ao fósforo ambos com restrição simples de distância.

4. Resultados e Discussões

4.1 Esfingomielinase D ou Fosfolipase D?

As fosfolipases D (PLDs) são enzimas conhecidas por liberar colina a partir de constituintes de membrana. Lee e Lynch [66] propuseram em 2005 que as enzimas responsáveis pela toxicidade das aranhas do gênero *Loxosceles* fossem chamadas de PLDs devido à especificidade não estar restrita apenas à esfingomielina, mas também a alguns liso-glicerofosfolípidios, como liso-fosfatitilcolina (liso-PC). Eles sugeriram que esfingomielinase D (SMase D) seria um nome muito restrito para uma enzima que, adicionalmente, possui uma atividade liso-PC, e, portanto, o termo PLD englobaria as duas ações catalíticas.

As PLDs também são conhecidas por possuírem uma sequência conservada do tipo $HxKxxxxDx_6GSxN$, ou sequência HKD, próximo ao sítio ativo [10]. Recentemente, Selvy e co-autores [67] classificaram a superfamília das fosfolipases D de acordo com a presença da sequência HKD. Enzimas com a sequência HKD seriam chamadas HKD PLD e enzimas que não a possuem, não-HDK PLD, como mostra o diagrama na Figura 8. Essa divisão incluiu as enzimas de *Loxosceles* e *Corynebacterium* como PLDs não-HKD, uma vez que elas não possuem essa sequência conservada. Até então, vários autores consideravam que enzimas que não possuíam essa sequência não deveriam ser chamadas de fosfolipases D.

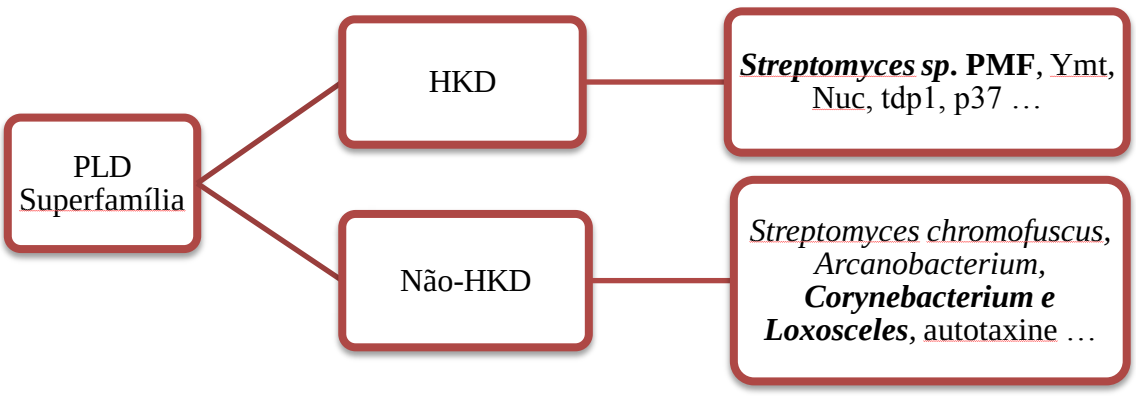


Figura 8: Classificação da superfamília das fosfolipases D por Selvy et al. [67].

Atualmente, muitos autores têm aderido ao termo PLD, embora SMase D ainda possa ser encontrado em publicações recentes. Salientamos aqui a atividade singular destas enzimas na produção direta de ceramida-1-fosfato a partir de esfingomielina citado no capítulo2, uma particularidade que é atenuada através do termo PLD. Ensaios de atividade com esfingomielina e lisoPC para a LiRecDT1 recombinante (Figura 9), tem indicado uma maior eficiência catalítica para esfingomielina (artigo submetido [44]). Tendo em vista a preferência pela esfingomielina e particularidade da ação da enzima como esfingomielinase, e, uma vez que este trabalho visa o estudo da interação e mecanismo da enzima com o substrato esfingomielina, o termo SMase D será mantido.

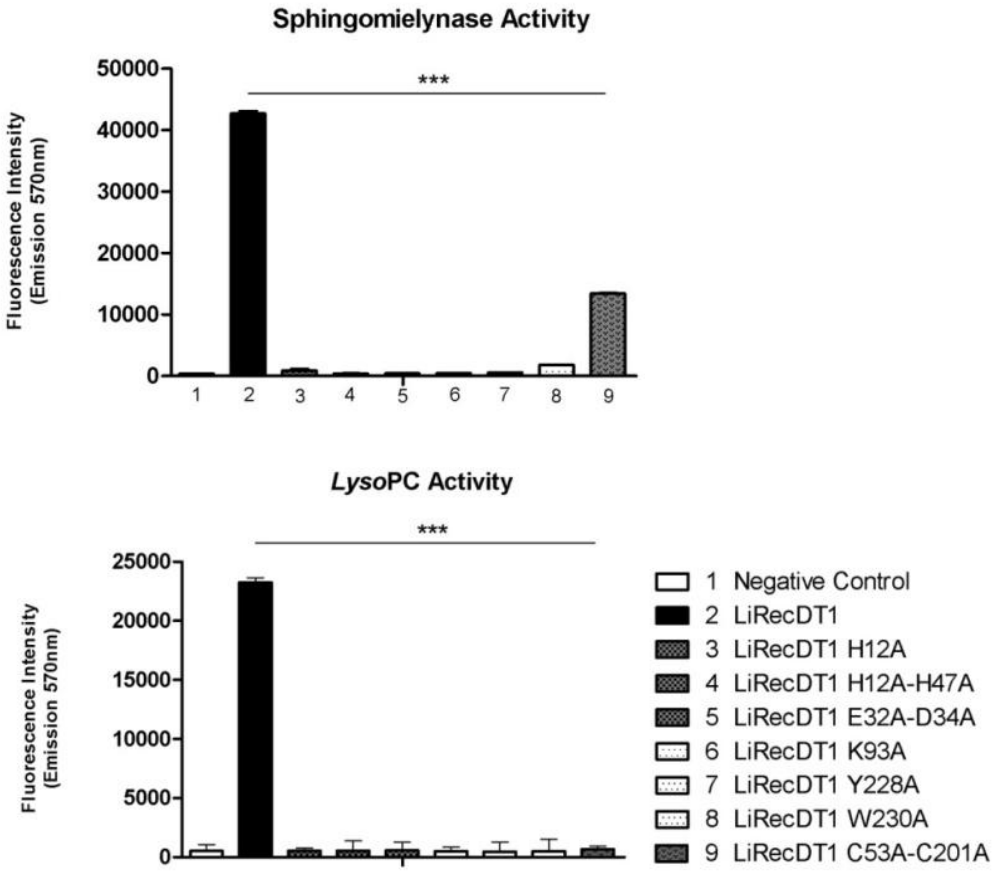


Figura 9: Emissão de fluorescência a 570nm em ensaios de atividade da SMase II (LiRecDT1) e SMases II mutantes contra esfingomielina e liso-PC (artigo submetido [44])

Ainda na Figura 9, encontramos ensaios de atividade para a SMase II com mutações em diversos resíduos conservados entre as SMases D de *Loxosceles* e *Corynebacterium* (seção 2.3) como HIS12, HIS47, GLU32, ASP34, LYS93, Y228, TRP230, CYS53, CYS201. Nota-se que mutações nestes resíduos conservados eliminam ou reduzem drasticamente a atividade da enzima. Na ausência de estrutura cristalográfica com o substrato ou análogo do substrato, estes ensaios foram um importante direcionamento para estudo computacional do mecanismo catalítico das SMases D descrito a seguir.

4.2 Os Estados de Protonação das Histidinas

4.2.1 Quem inicia o ataque nucleofílico?

As histidinas 12 e 47 são conhecidas por desempenharem papel fundamental no mecanismo catalítico das esfingomielinases conforme indicado nas seções2.3 e 4.1. Ao longo do trabalho, notou-se que não havia consenso na literatura sobre qual destas duas histidinas seria responsável pelo ataque nucleofílico que daria início ao mecanismo ácido-básico, uma questão fundamental para o estudo do mecanismo catalítico.

Frente à dificuldade de estudar os estados de protonação do ponto de vista experimental, partimos então para testes com simulação clássica para diferentes estados de protonação, cálculos de pKa via *web servers* e simulações a pH constante com intuito de avaliar os estados de protonação em diferentes condições do meio.

4.2.2 Estados de protonação

Sabe-se que as SMases D de Loxosceles são dependentes de magnésio para exercer sua função e que o mecanismo ácido-básico para as histidinas 12 e 47 exige que uma delas esteja carregada positivamente e a outra não. Murakami et al. [9]

propuseram em 2005 que a HIS47 estaria carregada positivamente e a HIS12 começaria o ataque nucleofílico, baseando-se na estrutura cristalográfica que determinaram para SMase D de *Loxosceles laeta* com a presença de um íon sulfato no sítio ativo. No ano seguinte, um novo cristal foi obtido por este mesmo grupo, na ausência de ligantes no sítio ativo, que indicava que HIS12 deveria fazer um giro de 180º para fazer o ataque nucleofílico do substrato [7]. Eles sugeriram então que os estados de protonação iniciais deveriam estar invertidos: a HIS47 estaria não carregada e faria o ataque ao fósforo, enquanto a HIS12 seria a responsável pela hidrólise do grupo colina.

Uma questão interessante a ser investigada consiste no papel do MG na questão dos estados de protonação, uma vez que, no mecanismo proposto, o magnésio não participa diretamente na catálise. O *web server* H++ [68], que faz uso da equação de Poisson-Boltzmann para determinar o potencial eletrostático, foi utilizado em duas situações distintas para estimar o pKa das histidinas. Num primeiro caso o MG foi removido da estrutura cristalográfica (1XX1) e submetida à análise no servidor. O resultado foi a protonação total das duas histidinas, nas posições δ e ε, com mais de 80% de probabilidade. O sítio catalítico é rico em resíduos com carga negativa e a protonação das histidinas se mostrou extremamente favorável na ausência do íon.

Submetendo a estrutura com o MG a situação é bem distinta e mostra probabilidade de 60% da HIS47 estar desprotonada na posição ε, e a HIS12 protonada acima de 70% nas duas posições, indicando uma tendência para mecanismo sugerido no trabalho de 2006. Logo, a dependência com o MG para a ação catalítica provavelmente se deve ao fato que o metal estabelece o pKa apropriado para o mecanismo ácido-básico.

Notamos através de simulações clássicas que os estados de protonação esperados para o mecanismo catalítico, com HIS12 carregada positivamente e HIS47 neutra, não era capaz de manter o íon sulfato dentro do sítio ativo na posição cristalográfica dentro da estrutura 1XX1. Partimos então para simulações de dinâmica a pH constante, na qual poderíamos incluir o íon sulfato restrito à posição cristalográfica dentro do sito ativo e avaliar se haviam diferenças nos pKas das histidinas na presença da carga referente ao íon.

A Tabela 1 mostra a fração de tempo que as histidinas 12 e 47 permanecem protonadas nas posições δ, ε e nas posições δ e ε simultaneamente após 6 ns de simulação a pH constante na presença de sulfato ou esfingomielina em pH 7,4. É possível observar que na presença do íon sulfato, tanto a HIS12 quanto a HIS47 tendem a ficar protonadas nas posições δ e ε simultaneamente, e, portanto, positivamente carregadas. Estes dados sugerem que, assim como no caso do magnésio, a carga do íon sulfato é capaz de alterar os estados de protonação das histidinas em sua entrada no sítio ativo. Na seção 4.3 apresentaremos com mais detalhes as interações com o íon sulfato do ponto de vista estrutural e de dinâmica molecular clássica.

Tabela 1: Fração de tempo que as histidinas 12 e 47 ficam protonadas nas posições δ, ε ou δ e ε durante 6 ns de simulação a pH constante em solvente implícito na presença do ligante SO_4^{-2} (íon sulfato).

	HIS 12			**HIS 47**		
	ε	**δ**	**δ e ε**	**ε**	**δ**	**δ e ε**
Íon Sulfato	0,018	0	0,982	0	0	1,000
Esfingomielina	0.246	0,001	0.754	0,001	0,999	0

Nota-se ainda na Tabela 1que na presença da esfingomielina, um substrato zwiteriônico, a HIS47 tende a ficar protonada apenas na posição δ e a HIS12 permanece cerca de 75% do tempo carregada positivamente. Este estado de protonação, diferente do estado na presença do íon sulfato, cria uma situação propícia para a enzima execute a catálise do substrato através do mecanismo ácido-básico. Detalhes das interações da enzima com a esfingomielina serão discutidos nas seções a seguir e também na da seção 4.4.

4.2.3 Relação entre pH, atividade e estados de protonação das histidinas

Estudos experimentais com esfingomielinases da classe II têm nos indicado uma maior atividade da esfingomielinase em pHs de 7,4 a 9. A Figura 10 mostra

atividade acentuada em pH 7,4 em experimentos de fluorescência, seguida pelos pHs 8 e 9. Nota-se que pouca atividade é observada nos pHs 6 e 5. Decidimos avaliar uma possível relação entre estes dados de atividade e os estados de protonação das histidinas através de simulações de dinâmica molecular a pH constante em solvente implícito.

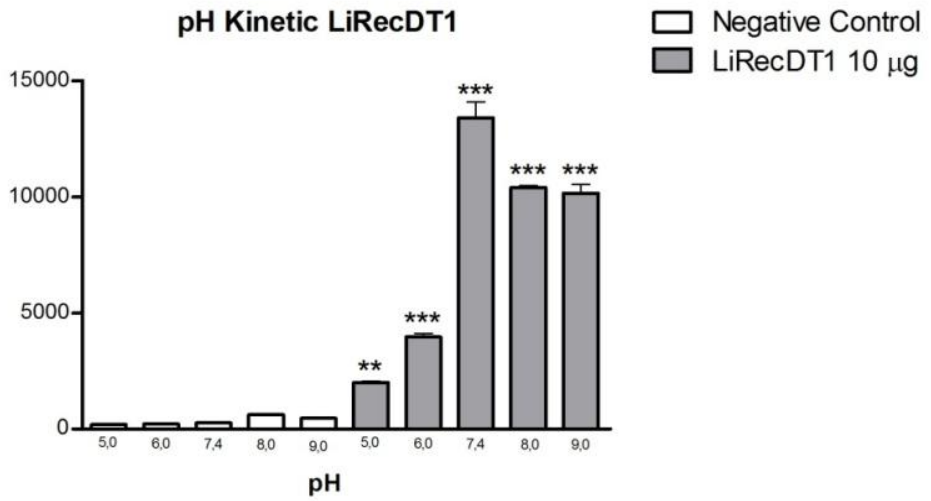


Figura 10: Ensaios de atividade da SMase recombinante LiRecDT1 com esfingomielina (dados cedidos por Silvio Sanches Veiga e colaboradores – artigo a ser submetido).

A Tabela 2 mostra a fração de tempo que as histidinas 12 e 47 permanecem protonadas nas posições δ, ε e nas posições δ e ε simultaneamente após 6 ns de simulação a pH constante na presença esfingomielina. Nota-se que a HIS12 tende a ficar carregada positivamente dentro de uma faixa de pH de 5 a 9, indicando que este resíduo está apto para exercer sua atividade catalítica no modelo de mecanismo proposto. No entanto, a HIS47 aumenta a possibilidade de se manter carregada positivamente com a diminuição de pH. Nos pHs 5 e 6, a HIS47 se apresenta com 100 e 85% de possibilidade de estar carregada positivamente, impossibilitando o ataque nucleofílico necessário para o início da clivagem da esfingomielina.

Tabela 2: Fração de tempo que as histidinas 12 e 47 ficam protonadas nas posições δ, ε ou δ e ε durante 6 ns de simulação a pH constante em solvente implícito na presença de substrato dentro do sítio ativo.

	HIS12			HIS47		
	δ e ε	**δ**	**ε**	**δ e ε**	**δ**	**ε**
pH 5	0.996	0	0.004	1.0	0	0
pH 6	0.962	0	0.038	0.854	0	0.146
pH 7.4	0.999	0	0.001	0.246	0	0.754
pH 8.0	0.967	0.009	0.024	0	0.338	0.662
pH 9.0	1.0	0	0	0.010	0.001	0.989

Na seção 4.2.2 discutimos a importância do MG e da presença do substrato no ajuste correto do pKa das histidinas. Ressaltamos aqui que o mecanismo catalítico da SMase D está relacionado a um delicado equilíbrio entre o pH do meio, a carga iônica e a presença do substrato. Tem-se discutido na literatura que, em determinadas condições, esfingomielinases D podem ser capazes de produzir CPA (um ácido fosfatídico cíclico) ao invés de ceramida-1-fosfato (produto não cíclico) [69]. Métodos computacionais podem ajudar a esclarecer qual o real produto final em determinadas condições.

4.2.4 Ampliação da faixa de pH ativo

O mencionado estudo empregando o *web server* H++ [68], descrito na seção 4.2.2, foi realizado sem a presença do substrato. O H++ também permite cálculos de pKa com ligantes, fazendo uma modelagem automatizada destes através do *Open Babel* e *antechamber* com o método de cargas AM1-BCC.Como apresentado na seção anterior, uma questão interessante a ser investigada consiste em entender a atividade da enzima numa ampla escala de valores de pH. No caso da SMase, vimos que a atividade está presente (em níveis distintos) numa escala de pH entre 6 a 9 (ver Figura 10).

O mecanismo ácido-básico exige um resíduo nucleofílico (base), desprotonado na posição δ, e outro resíduo eletrofílico (ácido) ou um doador de próton, protonado nas duas posições (δ e ε). O mecanismo estaria ativado de acordo com o diagrama a seguir. Seja pKa (ácido) o resíduo que funciona como doador de próton e pKa (base) o resíduo nucleofílico. A situação ideal para que isso ocorra é que o pH esteja entre esses dois valores:

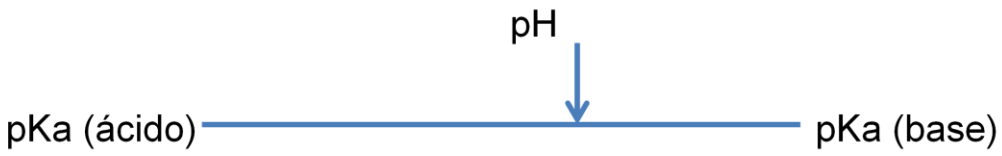


Figura 11: Situação ideal para o mecanismo ácido-básico com o valor do pH entre os valores de pKa para os resíduos ácido e básico.

De acordo com a ilustração acima, se a seta que indica o valor do pH estivesse à esquerda do valor pKa (ácido), ambos os resíduos teriam alta chance de estarem carregados, desfavorecendo o mecanismo ácido-básico. E, se a seta estivesse à direita de pKa (base) ambos os resíduos teriam alta chance de estarem não carregados, também desfavorecendo o mecanismo ácido-básico. A seta próxima da região central seria a situação ideal para estabelecer o mecanismo ácido-básico, no qual o resíduo com pKa (ácido) estaria carregado e o resíduo pKa (base) desprotonado na posição adequada.

Cálculos de pKa, usando o H++, mostraram que as histidinas HIS12 e HIS47, mantêm valores de pKa quase que inalterados, ou com discreta variação, para valores de pH entre 5 e 9. O fato de o sítio ativo estar posicionado no interior da molécula, e em geral, numa região hidrofóbica pode, eventualmente, contribuir para essa baixa sensibilidade. Porém, a entrada de um ligante ou substrato altera significativamente os valores de pKa dos resíduos catalíticos. De acordo com resultados do H++ na presença do ligante sulfato (SO_4) e do substrato esfingomielina (SM), os valores de pKa se alteram de forma distinta nos dois casos. Isto também foi observado na seção 4.2.2, através de simulações a pH constante.

Um diagrama análogo ao desenhado acima, ilustra bem esse aspecto e pode ajudar a diferenciar substratos de ligantes do tipo inibidor ou não substrato (Figura 12). Para cada valor de pH (5, 7.4 e 9) são ilustradas três situações para as quais são calculados os dois pKas para duas histidinas catalíticas (HIS12 e HIS47). As três situações são: sítio catalítico vazio, sítio com substrato esfingomielina (SM) e sítio com o ligante sulfato (SO_4). A estrutura utilizada para o ligante SO_4 foi a estrutura cristalográfica 1XX1 e, para o sítio vazio, a estrutura 2F9R. No caso do sítio ocupado pelo substrato esfingomielina, uma estrutura foi selecionada de uma trajetória de dinâmica molecular. Os valores de pKa desses resíduos estão representados nas duas extremidades da reta horizontal vermelha. E o valor do pH está representado pela seta vertical azul.

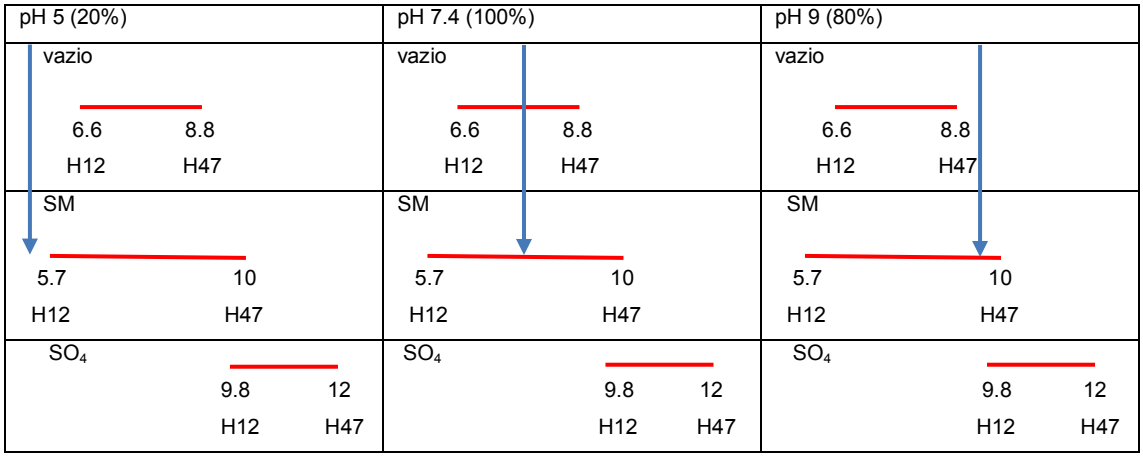


Figura 12: Diagrama indicando o pKa das histidinas 12 e 47 em diferentes condições de ocupação do sítio ativo e pH. A seta em azul indica o pH do meio e o traço em vermelho a faixa ideal de pH para o mecanismo catalítico.

Por exemplo, para pH 5, a seta azul (apontando para o valor 5) está um pouco à esquerda do valor 5.7, que é o pKa da HIS12, na presença do substrato. No diagrama acima, foi mencionado que a situação ideal para o mecanismo ácido base consiste em que o valor de pH esteja entre os valores de pKa dos resíduos que funcionam como ácido e como base, pois dessa forma um deles, HIS12, estará carregado (para transferir o próton para o substrato) e o outro não, HIS47 (adequado para o ataque nucleofílico ao substrato). Para pH 5 a seta fica levemente à esquerda na presença de esfingomielina, de modo que a HIS12 teria 20% de chance de estar

carregada positivamente e a HIS47 estaria totalmente desprotonada na posição ε, situação pouco favorável para ativar o mecanismo ácido básico.Se considerarmos a atividade em pH 7.4 como 100%, os percentuais 20% (para pH 5) e 80% (para pH 9), obtidos na Figura 12, correlacionam bem com as alturas das colunas de atividade apresentadas na Figura 10.

Um fato interessante surge do comportamento observado para o segmento de reta vermelho. Em relação ao sítio vazio, o segmento vermelho, na presença de SM, se amplia nas duas extremidades, enquanto que, na presença de ligante SO_4, a reta é simplesmente deslocada para a direita, tendendo a carregar positivamente os dois resíduos para os três valores de pH. Vale notar que a protonação dos dois resíduos no caso do SO_4 em pH 7 foi também observada nas simulações a pH constante (Tabela 1) e também em simulações convencionais na presença do SO_4, que serão discutidas na seção 4.3. O fato da reta vermelha se ampliar na presença do substrato SM implica em favorecer o mecanismo ácido-básico. Por exemplo, em pH 9, a seta azul não está entre os valores de pKa das duas histidinas, no caso do sítio vazio. Mas na presença de SM a seta azul está posicionada entre os dois valores de pKa, ativando o mecanismo ácido-básico.

Analogamente, para a outra extremidade em pH 5. Para o sítio vazio, a probabilidade da HIS47 estar desprotonada é extremamente baixa (menor que 1%), pois o valor 6.6 é significativamente distante de 5, com uma diferença de 1.6. No entanto, na presença da SM, o estiramento da faixa de pKa para a esquerda, diminui essa diferença para 0.7, o que contribui para produzir alguma chance (20%) de ocorrer o mecanismo ácido-básico. A Figura 10 mostra que, mesmo em pH5, ainda se nota alguma atividade catalítica, curiosamente menor numa proporção análoga, em torno de 20% do caso ideal (pH 7.4).

Nesse caso, o de pH 7.4, é o único em que a seta azul está entre os dois valores de pKa para o sítio vazio, o que implica que o sítio ativo vazio já está pronto para executar o mecanismo ácido-básico para catalisar o substrato. Interessante que esse é exatamente o valor de pH que maximiza a atividade catalítica, segundo a Figura 10. Essa explicação, caso tenha validade um pouco mais geral, poderia ajudar a entender a existência de um pH ótimo para reações catalíticas envolvendo o mecanismo ácido-básico. No pH ótimo, o sítio já estaria na condição adequada

para a catálise, sem necessitar que, na entrada do substrato, se protone ou se desprotone um resíduo catalítico. E à medida que o pH se afasta desse valor ótimo, a necessidade de protonar ou desprotonar um resíduo faria decrescer a atividade catalítica.

Esse estiramento da faixa de valores de pKa na presença de substrato, em relação ao sítio vazio, pode contribuir para entender as razões da atividade catalítica ainda ocorrer numa ampla faixa de valores de pH. Caso esse tipo de análise se mostre válido para outras enzimas que também dependam do mecanismo ácido-básico para executar a catálise, seria possível acrescentar mais um critério de diferenciação (aos já existentes) entre substratos e não-substratos. Substratos estariam associados ao estiramento da faixa de pKa quando entram no sítio ativo, mantendo o valor do pH entre os dois valores de pKa, enquanto os não substratos apenas deslocam a faixa de valores de pKa, deixando o valor do pH fora da faixa.

4.3 Interações da SMase D com Ligantes

4.3.1 Íon Sulfato

Conforme resultados discutidos na seção 4.2, as histidinas 12 e 47 provavelmente estão carregadas positivamente na presença do íon sulfato, o qual ocupa uma posição entre as duas histidinas do sítio ativo na estrutura cristalográfica de código PDB 1XX1 (detalhes na Figura 21a). Com relação ao íon magnésio, o qual é essencial para a atividade da enzima, notamos que há três moléculas de água coordenando o magnésio nesta estrutura, e, na ausência do íon sulfato, no PDB 2F9R, há apenas uma molécula de água de coordenação (Figura 5 na seção 2.3).

Com o objetivo de comprovar os resultados tanto das simulações a pH constante quanto do servidor H++ e avaliar a coordenação do magnésio, foram feitas simulações de dinâmica clássica convencionais nas quais a estrutura de partida é a 2F9R, com a presença de um íon SO_4 longe do sítio ativo, a 15 Å do mesmo, com as duas histidinas protonadas (como sugerem as simulações a pH

constante) e apenas uma molécula de água coordenando com o MG (como indica a estrutura na ausência de ligante).

Na Figura 13 apresentamos um gráfico de distâncias relativo a esta simulação. A curva em preto representa a distância entre o MG e o enxofre do íon sulfato (S), inicialmente igual 15 Å. A curva em vermelho é a distância entre o átomo de enxofre e o nitrogênio da HIS12 e a curva verde representa a distância entre o átomo de enxofre S e o nitrogênio da HIS47. Finalmente, a curva azul é a distância entre o MG e o oxigênio de uma molécula de água, que inicialmente estava a 7 Å do MG.

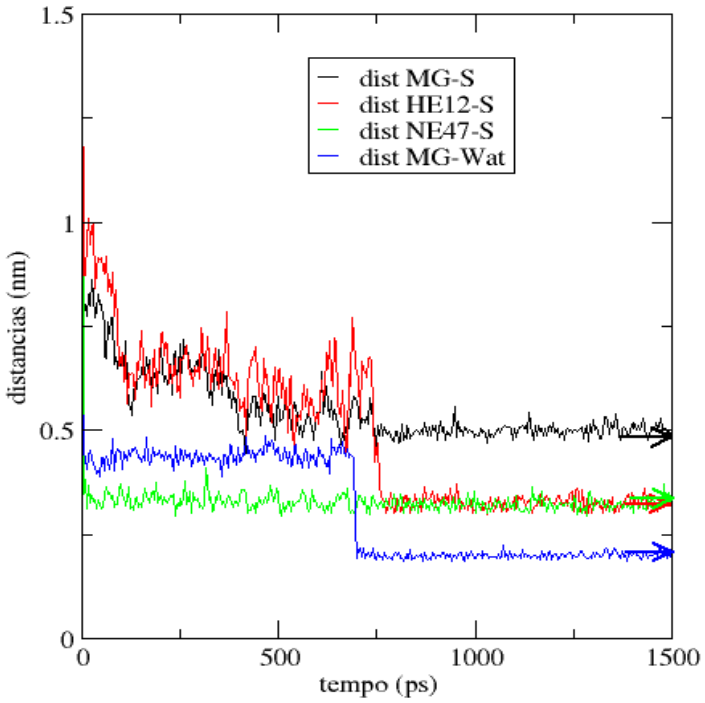


Figura 13: Gráfico de distâncias relativas à simulação de dinâmica molecular clássica com o PDB 2F9R como estrutura de partida e o íon sulfato inicialmente a 15 Å do sítio ativo. Sendo MG (magnésio), S (enxofre do íon SO_4), HE12 (hidrogênio ligado ao NE2 da HIS12) e NE47 (nitrogênio NE2 da HIS47).

As setas mostradas à direita da Figura 13, representam essas distâncias tal como mostradas na estrutura cristalográfica da 1XX1. Após 800 ps de dinâmica, nota-se que o SO_4 se aproxima do MG e fica a uma distância praticamente igual à distância vista no cristal (seta em preto). O mesmo ocorre para as demais distâncias, que também são reproduzidas, tal como no cristal (setas em vermelho,

verde e azul). Além de reproduzir as distâncias da estrutura cristalográfica, nota-se a entrada de uma molécula de água (em azul) mais ou menos em torno de 700 ps, quando o SO_4 se fixa na distância nativa que tem com relação ao íon MG. Interessante que essa não é uma molécula da camada de hidratação do SO_4, pois inicialmente o SO_4 estava a 15 Å do MG e molécula de água em questão a 7 Å, próximo da superfície da proteína.

O gráfico na Figura 14 mostra a distribuição radial de pares integrada, que fornece o número de moléculas de água em função da distância ao átomo de magnésio.

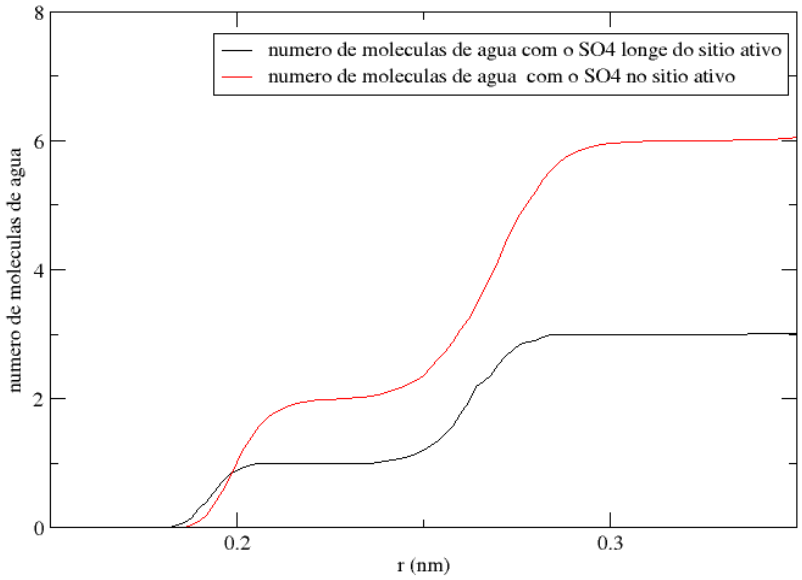


Figura 14: Número de moléculas de água em relação a distancia do íon magnésio em dinâmica molecular clássica com o íon sulfato inicialmente a 15 Å do sítio ativo. Em preto, no início da simulação e em vermelho, após 800 ps.

A curva em preto representa a distribuição radial de pares integrada no início da simulação para as moléculas de água em relação à distância que possuem em relação ao MG. Vale notar que entre 2 e 2.5 Å, só existe uma molécula de água. A curva vermelha é a distribuição radial de pares integrada em torno dos 800 ps de simulação. Nota-se uma molécula de água a mais em torno do MG. A 2.7 Å já se observam três moléculas de água, como no cristal da 1XX1.

É de fundamental importância frisar que outras três simulações como esta foram feitas, com os seguintes estados de protonação: HIS12 e HIS47 não carregadas positivamente, HIS12 carregada positivamente e HIS47 neutra, e HIS12 neutra e HIS47 carregada positivamente. Esses dados não estão mostrados, mas somente o estado de protonação da simulação descrita (ambas protonadas nas posições δ e ε) conseguiu reproduzir as distâncias vistas na estrutura cristalográfica. Isso contribuiu fortemente para validar as simulações a pH constante, que posteriormente vão ser de importância fundamental quando for estudado o mecanismo catalítico da enzima, já o mecanismo ácido-básico proposto, pressupõe uma histidina carregada positivamente e outra não.

4.3.2 Mio-inositol-1-fosfato

A SMase D recombinante de *Loxosceles intermedia* foi recentemente cristalizada no Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular com um ligante *mio*-inositol-1-fosfato dentro do sítio ativo e depositada no PDB com o código 4RW3 (artigo aceito [49]). A presença não esperada deste ligante proporcionou um indicativo de que a SMase D possa estar envolvida também na clivagem de fosfatidilinositol fosfato (PIP), participando em outros caminhos de sinalização como inflamação e proliferação, ainda não descritos na literatura.

A Figura 15 mostra as interações do mio-inositol-1-fosfato com HIS12, HIS47, LYS94 e TYR 223, resíduos que, juntamente com TRP230, ASP34, ASP92 e GLU32, são conservados entre as SMases D como discutido na seção 4.1. Pela primeira vez, interações com estes resíduos puderam ser observadas em um cristal, uma vez que não há na literatura estrutura cristalizada com o substrato ou análogo do substrato.

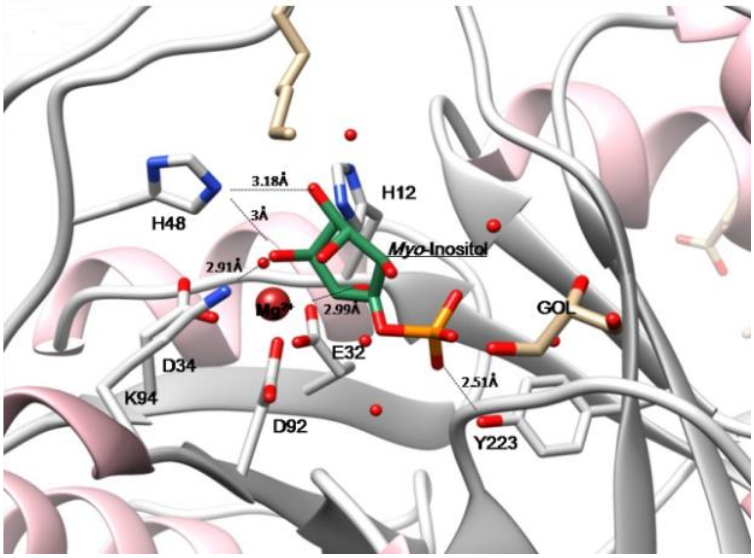
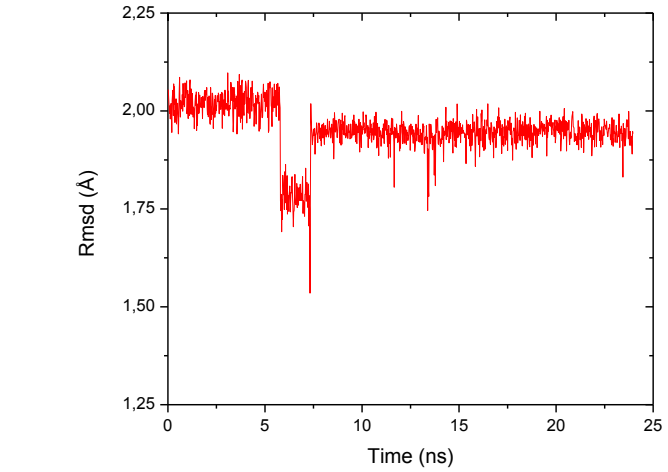
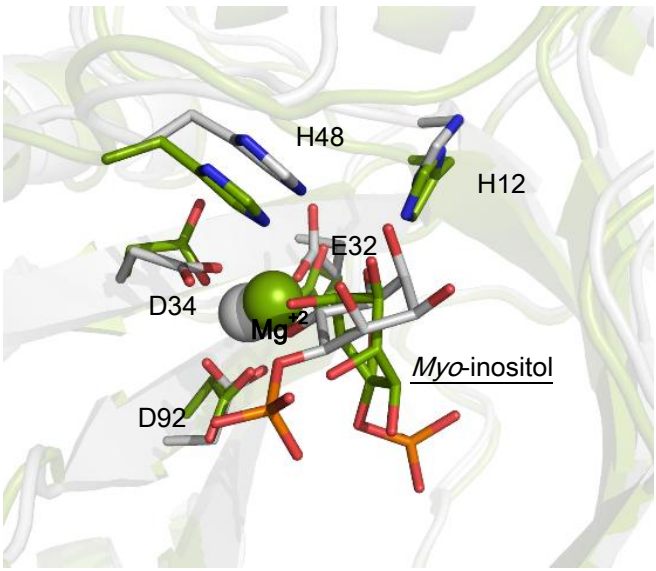


Figura 15: Mio-inositol-1fosfato localizado no sítio ativo no PDB 4RW3 (modificado de artigo aceito [49]).

De acordo com o servidor H++, a HIS12 deve estar carregada positivamente e a HIS47 neutra, um indicativo da viabilidade do mecanismo ácido-básico, discutido na seção 4.2. Foram realizadas três simulações de dinâmica clássica nas seguintes condições: HIS12 e HIS47 carregadas positivamente, HIS12 positiva e HIS47 neutra, HIS12 e HI47 ambas neutras. Dentre essas condições, HIS12 positiva com HIS47 neutra mantiveram o ligante em uma conformação mais estável durante a simulação (ver RMSD do inositol na Figura 16a), o que suporta os estados de protonação do servidor H++. No entanto, notamos que o anel inositol gira dentro do sítio ativo (Figura 16b), fazendo com que o grupo fosfato se aproxime da LYS94 e desfazendo a ligação com TYR223.



(a)



(b)

Figura 16: (a) RMSD do mio-inositol-1-fosfato com relação à estrutura cristalográfica (b) Carbonos em verde indicam as posições na estrutura cristalográfica e carbonos em cinza, as posições após 25 ns de dinâmica molecular (figuras modificadas de [49]).

Testes experimentais vêm sendo realizados pelo CMIB e UFPR a fim de avaliar a atividade da SMase D com relação ao PIP e a afinidade do mio-inositol-1-fosfato pelo sítio ativo. Temos sugerido em [49] que a SMase D de *Loxosceles intermedia* possa ter uma faixa mais ampla de esfingolipídios como substrato, além dos já demonstrados na literatura. Neste caso, o mio-inositol-1-fosfato que aparece no cristal seria indicado como um o produto da ação catalítica da enzima que possui certa afinidade pelo sítio ativo. Um ponto talvez interessante não apenas para a ação da SMase D nos caminhos de sinalização celular, mas também para o estudo e *design* de inibidores para SMase D.

4.3.3 Suramina

Em um trabalho mais recente avaliamos a preferência da SMase D tipo II por substratos de diversos tamanhos e também inibidores em potencial para a enzima com o suporte de técnicas experimentais e computacionais (artigo submetido [44]). Através de estudos de *virtual screening,* foram encontrados possíveis candidatos a inibidores de atividade da SMase D contra esfingomielina, os quais foram testados experimentalmente: suramina (Figura 17a), Vu0355056 e Vu0159595.

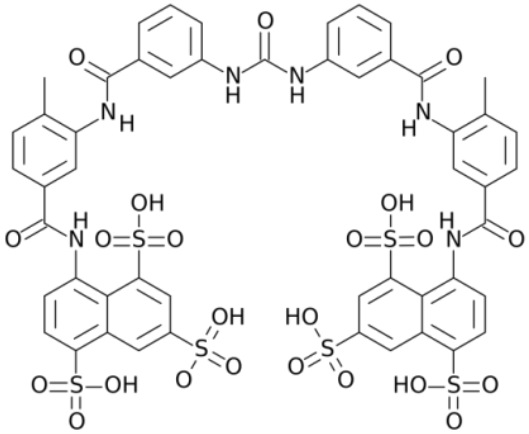


Figura 17: Forma química da suramina.

Devido à alta afinidade da suramina pela enzima indicada experimentalmente, foram realizados estudos de *docking* e dinâmica molecular a fim de esclarecer os detalhes moleculares da interação enzima-inibidor, avaliar a afinidade do inibidor com o sítio ativo e buscar perspectivas para o desenho de drogas para o tratamento do loxoscelismo.

A Figura 18a mostra o *docking* da suramina na cavidade do sítio ativo. Observa-se que uma das pontas polisulfonadas interage diretamente com o íon magnésio, indicado em roxo. Detalhes das interações com as histidinas catalíticas, LYS93 e TRP230 podem ser observadas na Figura 18b.

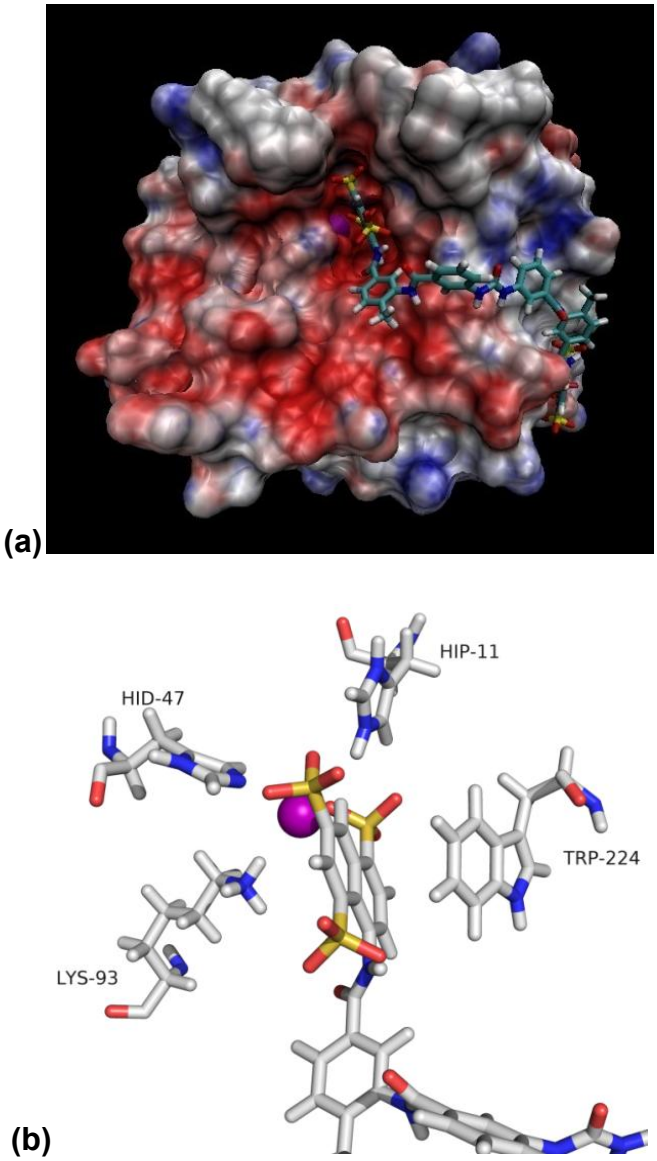
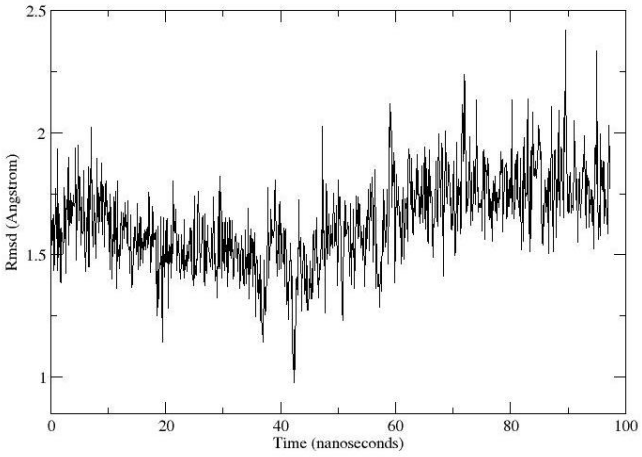
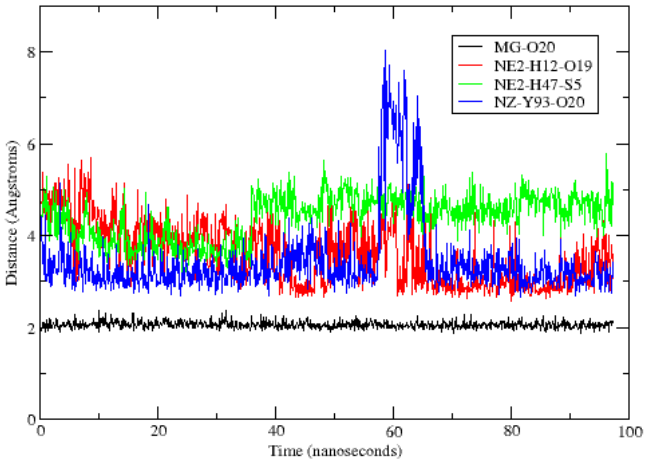


Figura 18: *Docking* da suramina na cavidade do sítio ativo. (a) Superfície de carga negativa e positiva, em vermelho e azul, respectivamente, calculadas pelo APBS Tools. Em roxo, o íon magnésio. (b) Detalhes da interação da suramina com resíduos do sítio ativo (HIS11 e TRP224 na estrutura 4RW3 correspondem à HIS12 e TRP230, respectivamente, na nomenclatura adotada em [9]).

Dinâmica molecular clássica de aproximadamente 100 ns indicou pouca alteração no modo de ligação do complexo enzima-inibidor. A Figura 19a mostra o RMSD da suramina com relação estrutura inicial. O RMSD se mantém abaixo de 2 Å durante a maior parte da simulação, suportando a da afinidade da suramina pela enzima observada experimentalmente.



(a)



(b)

Figura 19: (a) RMSD da estrutura com relação à estrutura inicial durante aproximadamente 100 ns (b) Distancias relativas entre átomos durante a simulação clássica.

Na Figura 19b apresentamos algumas distancias entre átomos de resíduos importantes para atividade da enzima e átomos da suramina. Um dos oxigênios da suramina (O20) permanece coordenado ao magnésio, a uma distância de 2 Å, durante toda a simulação. A distância entre o NZ da LYS93 o O20 diminui com relação à estrutura de partida, formando uma ligação de hidrogênio na maior parte da simulação. A distancia entre o enxofre S5 e o NE2 da HIS47 permanece entre 4 e 5 Å, interação que se assemelha a interação entre o fósforo e a HIS47 em simulações de dinâmica clássica com esfingomielina.

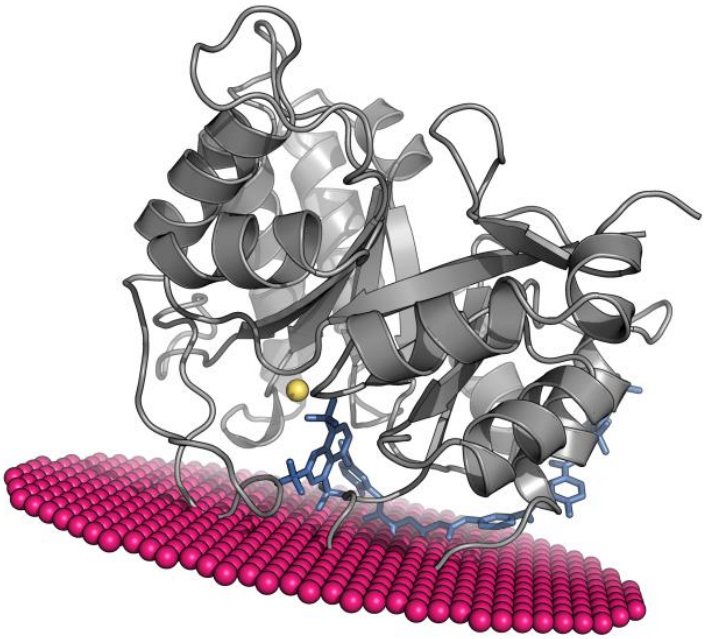


Figura 20: Esquema do posicionamento da SMase na membrana via PPM Server [70] (http://opm.phar.umich.edu/server.php)

A fim de avaliar as interações do complexo enzima-inibidor com bicamadas lipídicas, obtivemos a posição otimizada da posição do complexo com relação a um modelo de bicamada através do servidor PPM [70] (Figura 20). Nota-se que a suramina se liga em uma parte fundamental para ligação da enzima com o modelo de bicamada. A identificação dos resíduos envolvidos nessas interações pode ser interessante para o *design* de inibidores que não interagem diretamente com o sítio ativo e têm sido investigada.

4.4 Interações da SMase D com o Substrato

4.4.1 *Docking* da Esfingomielina

Como indicado na seção 2.3, O mecanismo catalítico ácido-básico proposto para as SMases D (ver Figura 6) é baseado nas estruturas cristalográficas da enzima na presença ou ausência de íon sulfato no sítio ativo, com códigos PDB 1XX1 e 2F9R, respectivamente. Inicialmente, a estrutura 1XX1 foi escolhida para

iniciar os estudos de *docking* e dinâmica molecular devido à presença do átomo do íon sulfato, uma vez que poderia fornecer uma idéia inicial da posição do átomo de fósforo presente na esfingomielina e direcionar a ligação apropriada da esfingomielina no sítio ativo. Optamos por manter a coordenação do magnésio de acordo com a coordenação encontrada no PDB 1XX1 (Figura 5a) e sugerimos que a entrada do substrato poderia estar relacionada com a entrada de águas extras no sítio ativo, de modo similar ao íon sulfato discutido na seção 4.3.1.

A esfingomielina foi posicionada procurando manter a posição do fósforo o mais próximo possível da posição do enxofre na estrutura 1XX1 como mostra a Figura 21. Devido ao tamanho e a flexibilidade da esfingomielina, parte das torções nas pontas da cauda do substrato foram mantidas rígidas, atingindo assim o máximo de 32 torções permitidas dentro do programa AutoDock. Na Figura 22a é possível observar o posicionamento do substrato na cavidade do sítio ativo.

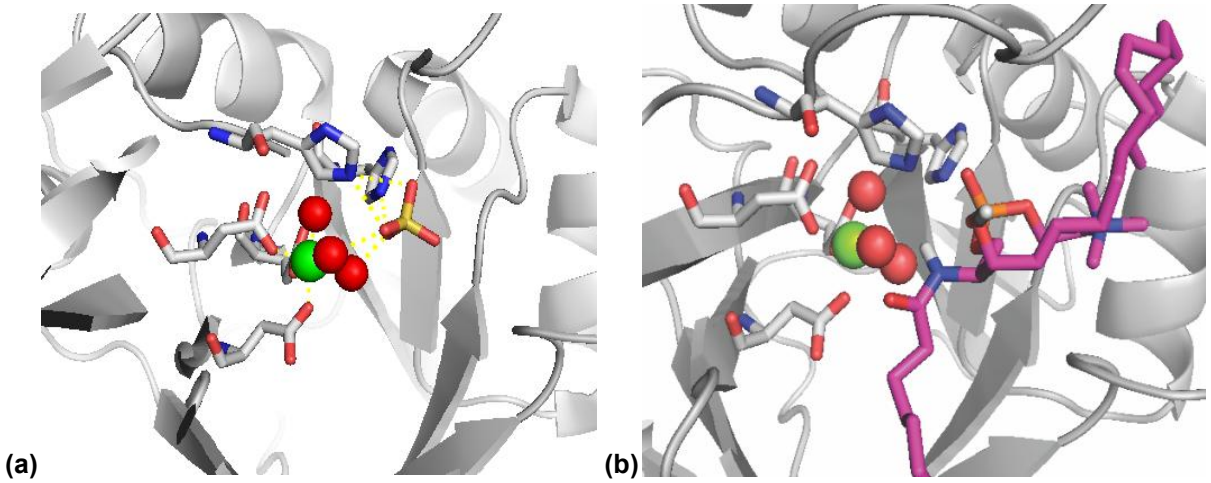
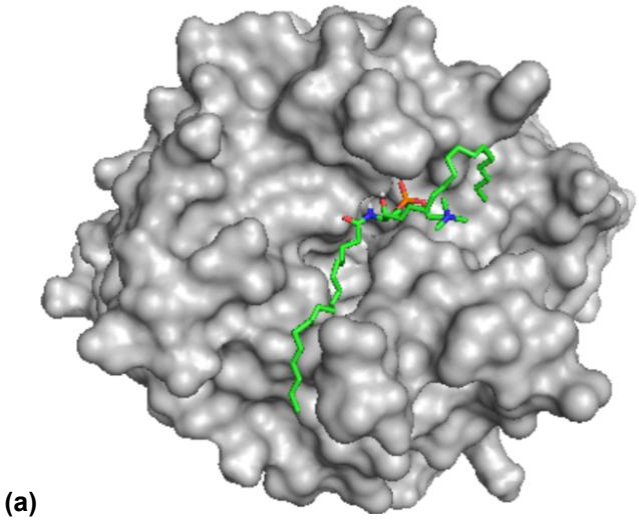
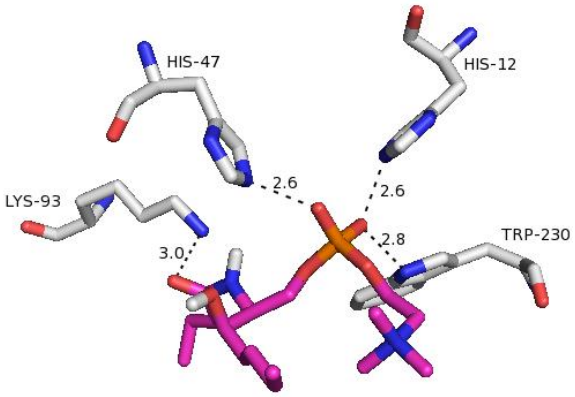


Figura 21: (a) Grupo sulfato no sítio ativo da estrutura cristalográfica 1XX1; (b) Posição do fósforo da esfingomielina em relação às histidinas catalíticas do sítio ativo após o *docking*. Esferas em verde, o íon magnésio, esferas em vermelho, a representação das moléculas de água de coordenação.



(a)



(b)

Figura 22: (a) Representação do *docking* da esfingomielina na cavidade do sítio ativo. (b) Interações da esfingomielina com HIS47, HIS12, LYS93 e TRP230.

No cristal a distancia S-MG é de 4.6 Å, enquanto a distância P-MG no *docking* com a esfingomielina foi de 5,4 Å. Na Figura 22b são destacadas as interações do substrato com as histidinas catalíticas e com LYS93 e TRP230. O oxigênio da ligação C=O da esfingomielina se encontra em uma distancia de ligação de hidrogênio como nitrogênio da LYS93. Outra ligação de hidrogênio é observada entre um oxigênio do grupo fosfato da esfingomielina e o nitrogênio do TRP230.Nota-se que a esfingomielina não se encontra em uma posição apropriada para um ataque nucleofílico da HIS47 ao fósforo e para a liberação da colina. Portando, a estrutura do complexo enzima-substrato foi utilizada em simulações de dinâmica molecular clássica a fim de aperfeiçoar essas posições.

4.4.2 Dinâmica Molecular Clássica

Simulações de dinâmica molecular clássica foram feitas a partir do *docking* da seção 4.4.1. O primeiro aspecto a ser avaliado foi a coordenação do íon magnésio com relação às águas de coordenação presentes na estrutura 1XX1 (Figura 5a). Inicialmente, esperávamos que a presença do substrato estivesse associada à presença de três águas na coordenação do íon magnésio de modo similar à presença do ligante sulfato apresentado na seção 4.3.1. No entanto, em simulações de dinâmica molecular nota-se que duas moléculas de água saem do sítio ativo e mantém um padrão de coordenação mais parecido com o a estrutura 2F9R (Figura 5b) durante a interação com o substrato. É importante ressaltar que foi através da análise estrutural do 2F9R que o mecanismo de hidrólise iniciando pela HIS47 foi proposto.

O grupo hidroxila presente na esfingomielina têm demonstrado papel fundamental na atividade da esfingomielinase de *Bacillus Cereus*. Sergelius et al. demonstraram que uma alteração no grupo OH pode reduzir drasticamente a atividade da enzima [71]. Notamos em simulações de dinâmica clássica um comportamento bimodal para ligação do grupo hidroxila, no qual a ligação de hidrogênio ora é formada com um oxigênio do próprio substrato (Figura 23A), ora com o nitrogênio NE2 da histidina 47 (Figura 23B).

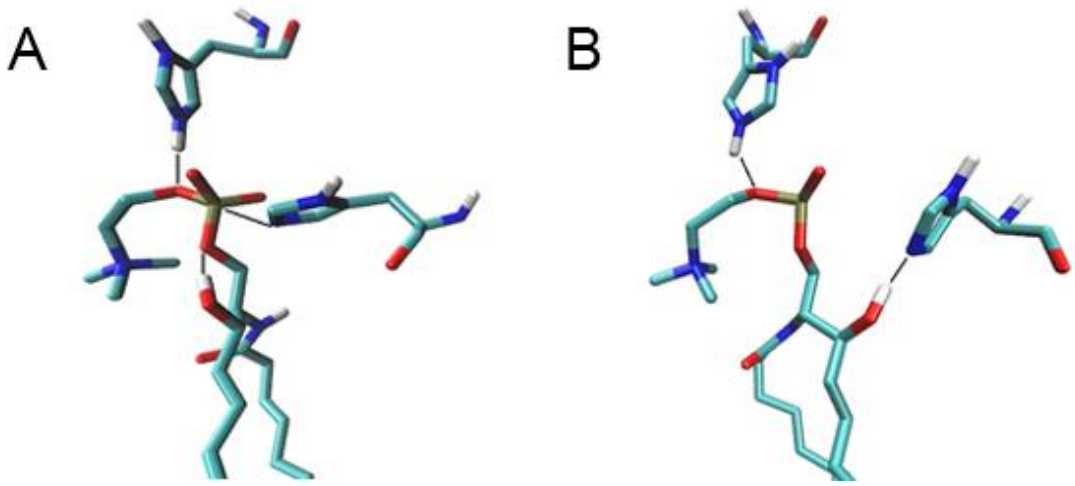


Figura 23: Conformações extraídas de dinâmica molecular da SMase D de Loxosceles laeta com o substrato esfingomielina, representado os modos de ligação A (propício para formação de intermediário pentacoordenado) e modo de ligação B (propício para catálise não covalente)

Nota-se que o modo de ligação **A** apresentado na Figura 23 seria mais adequado para o ataque nucleofílico da HIS47 ao fósforo, levando em conta o mecanismo catalítico ácido-básico descrito na seção 2.3. Neste caso, a ligação de hidrogênio formada pelo grupo hidroxila poderia blindar parcialmente o excesso de carga negativa do grupo fosfato, o que deixaria o fósforo mais susceptível ao ataque nucleofílico da HIS47. A possibilidade de o mecanismo catalítico ser assistido pelo próprio substrato explicaria porque a atividade da enzima é reduzida diante de substrato sem o grupo hidroxila indicados por Sergelius.

Conformações extraídas de dinâmica molecular apresentado o modo de ligação **A** e **B** e foram selecionados para os estudos de QM/MM apresentados no capítulo 4. O modo de ligação de **B** pode estar relacionado a um modo de catálise que não envolve a formação de uma ligação covalente entre o átomo de fósforo e a HIS47. Detalhes do mecanismo sem formação de intermediário pentacoordenado serão apresentados na seção 4.5.4.

Um aspecto em aberto na literatura está relacionado à participação efetiva do magnésio no processo de catálise. Têm-se sugerido que o íon seria responsável por guiar o substrato ao sítio ativo e direcionar o posicionamento do ligante devido à interação com a carga negativa do grupo fosfato do substrato. Não se sabe, porém, se os oxigênios ligados ao fósforo coordenam diretamente com o íon magnésio durante a catálise ou não.

Nos campos de força para a proteína (ff99SB e 43A1) e parâmetros para esfingomielina (gaff e 43A1-S3) testados, não foi possível observar a ligação espontânea do magnésio a algum dos oxigênios do grupo fosfato. Em simulações de dinâmica clássica, aproximamos lentamente o fósforo na direção do íon magnésio utilizando o *pull code* tal como implementado no pacote Gromacs. Notamos que após a ligação de um dos oxigênios ao magnésio, a interação MG-O não é mais desfeita ao longo da simulação.

4.5 Mecanismo Catalítico

4.5.1 Evidências do Mecanismo Associativo

Um forte indício da existência da ligação fósforo-histidina surgiu em 2004, quanto Leiros, Macsweeney e Hough [72] cristalizaram uma série de estruturas cristalográficas para Streptomyces sp. PMF, uma típica fosfolipase D do tipo HKD (discutido na seção4.1). Através de experimentos de *soaking* com um análogo de substrato (dibutirilfosfatidilcolina - diC_4PC), eles foram capazes de identificar um intermediário pentacoordenado em uma das estruturas cristalográficas (Figura 24a). Além de uma clara evidência de que a histidina seria nucleofílica o suficiente para um ataque a um grupo fosfato, estes experimentos forneceram um dado relevante para nossos estudos: o comprimento da ligação N-P de 1,85 Å, destacado na Figura 24b.

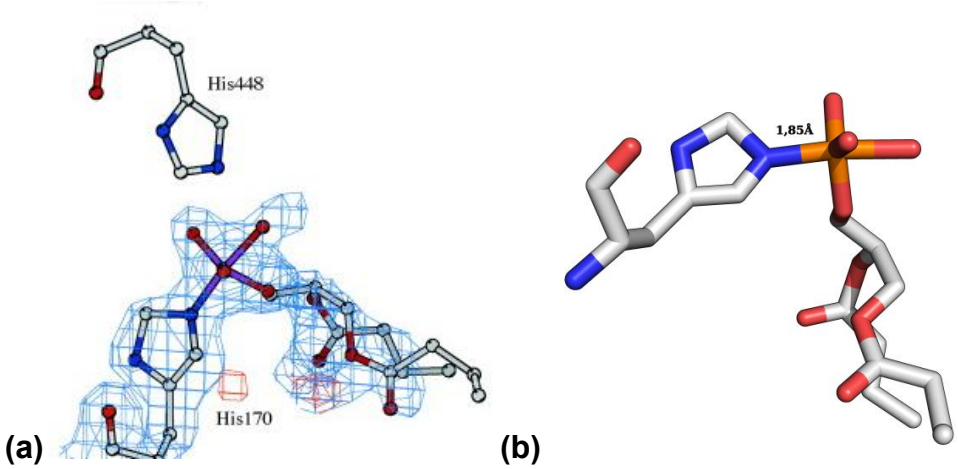


Figura 24: (a) Formação de ligação N-P na estrutura 1V0Y (modificado de [72]). (b) Comprimento da ligação N-P entre a HIS170 e o fósforo na estrutura 1V0Y.

Recentemente, DeYonker e Webster [11] publicaram um estudo quântico sobre transferências de grupos fosforil baseado nestas estruturas. Utilizando uma metodologia ONIOM QM:QM (DFT:PM6), os autores criaram vários modelos de reagentes e produtos de todos os passos de reação do mecanismo catalítico da

fosfolipase D. A energia livre para liberação da colina foi estimada em 20.3 kcal/mol e apontada por eles como o passo limitante da reação. Essa é uma informação importante visto que boa parte dos experimentos que envolvem a cinética de reação das fosfolipases D avalia apenas a liberação de colina e não de ácido fosfatídico (no caso de fosfatidilcolina) ou ceramida-1-fosfato (no caso de esfingomielina).

Nota-se que De Yonker e Webster encontraram valores razoáveis para a barreira de energia livre dentro do contexto atual das aplicações de métodos híbridos. No entanto, os comprimentos para a ligação N-P citados no artigo são de 2,13 e 2,01 Å, ligeiramente maiores que a distância no cristal, de 1,85 Å. É importante ressaltar que foram utilizadas camadas de alto nível (DFT/B3LYP) entre 95 e 98 átomos (Figura 25a) para a enzima com um modelo reduzido do substrato (Figura 25b). Neste modelo, o substrato modelo possuía uma carga inicial negativa, enquanto os substratos naturais conhecidos são neutros.

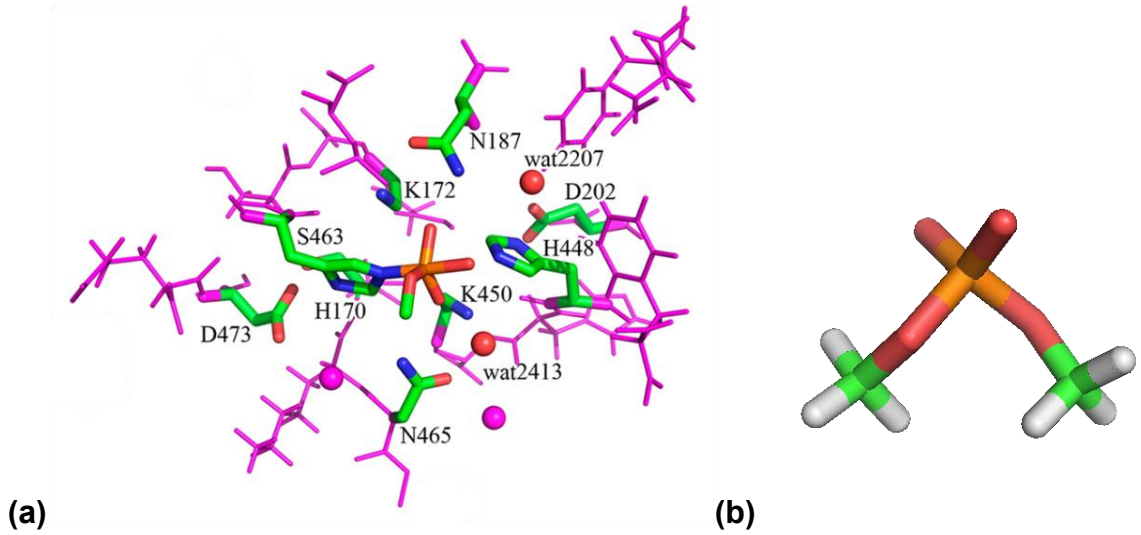


Figura 25: (a) Modelo enzimático (figura modificada de [11]) e (b) modelo reduzido do substrato utilizado por De Yonker e Webster [11].

Outra questão, ainda em aberto na literatura, envolve o real efeito da dinâmica do meio no estudo de catalise enzimática. Enquanto alguns grupos acreditam que uma modelagem quântica adequada é suficiente para a descrição de uma reação enzimática [73,74] como no artigo em questão, outros defendem que a

dinâmica do meio pode ser fundamental para a estabilização de estados de transição [75]. Nosso objetivo nas próximas seções é buscar metodologias QM/MM que propiciem a termodinâmica e geometria apropriadas para formação do intermediário pentacoordenado, aplicando um modelo completo do substrato e da enzima.

Primeiramente, buscamos estimar a barreira de energia livre da reação para as SMases D de *Loxosceles laeta*, nosso alvo de estudo. Aplicando a teoria do estado de transição, a barreira de energia livre do complexo de Michaelis ao estado de transição da enzima pode ser estimada através da equação:

$$\Delta G_{cat}^{\ddagger} = -RTln\left(\frac{k_{cat}\,h}{k_B T}\right)$$

onde k_{cat} é constante cinética da reação, *h* é a constante de Planck,*R* é a constante universal dos gases e k_B a constante de Boltzman. Utilizando a constante k_{cat} =0.24 ± 0.03 min^{-1} obtida por Ferrara et al. [76] à temperatura, T, de 310K, a barreira estimada é de aproximadamente 21 kcal/mol. Com esse dado em mãos, apresentaremos algumas aplicações de métodos QM/MM.

4.5.2 Testes com QM/MM-AMBER Interface

Dentro da interface QM/MM-AMBER foram testados alguns métodos semi-empíricos para um modelo QM reduzido que incluía apenas o anel da histidina 47 e o grupo fosfato da esfingomielina. O fósforo da esfingomielina foi aproximado do nitrogênio NE2 da histidina 47 com o intuito de observar o primeiro passo da reação que consiste na formação do intermediário pentacoordenado. Para isso, *umbrella sampling* para intensificação de amostragem e WHAM para calcular o perfil de energia livre.

Os métodos semi-empíricos testados para este modelo foram AM1, PM3, PM6, DFTB e RM1. Dentre estes métodos, apenas o RM1 [33] foi capaz de identificar a formação de um pentacoordenado com uma diminuição da energia livre na região de 1,9 Å como mostrado na Figura 26. Na estrutura de partida, fósforo

estava a uma distância de 4,2 Å. Nota-se uma pequena depressão na região de 2,8 Å, na qual os oxigênios começam a se rearranjar para permitir o ataque nucleofílico da histidina. A energia livre de ativação para a formação do pentacoordenado é de aproximadamente 25 kcal/mol.

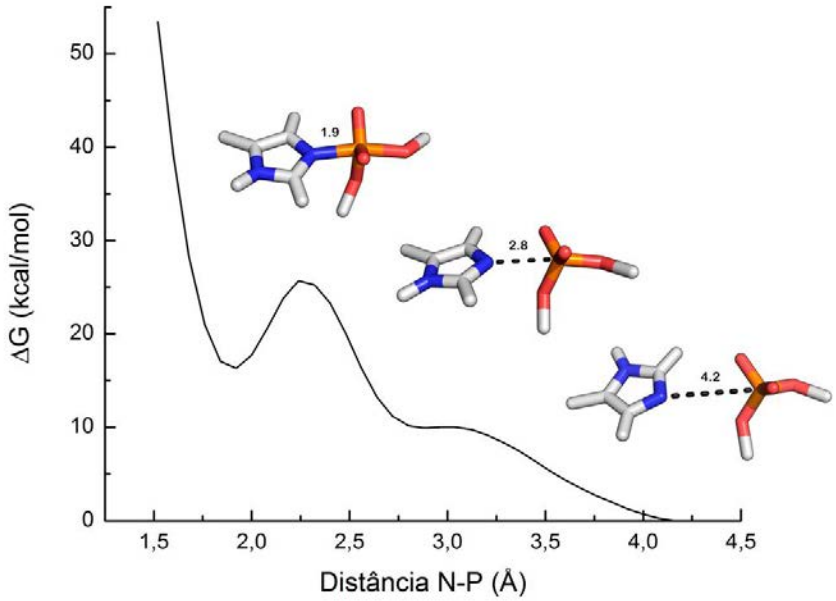


Figura 26: Identificação de um pentacoordenado na região de 1,9 Å utilizando o método semi-empírico RM1 e *umbrella sampling* com passo de 0,1 Å e 300 ps por janela. Região QM sem magnésio.

Os outros métodos mostraram um aumento contínuo na energia livre, indicando que apenas o RM1 seria indicado para este modelo. A escolha de uma região QM adequada e suficientemente grande tem se mostrado um passo crucial em estudos QM/MM. Partimos então para um aumento na região QM, incluindo o íon magnésio e suas coordenações (cadeias laterais de ASP32, ASP91, GLU34 e uma molécula de água) assim como anel da HIS12. Neste modelo maior, testamos métodos semi-empíricos que possuíam parâmetros para o magnésio disponíveis como AM1D, PM3 e PM6. A Figura 27 mostra a variação de energia livre e a distância N-P para cada um destes métodos.

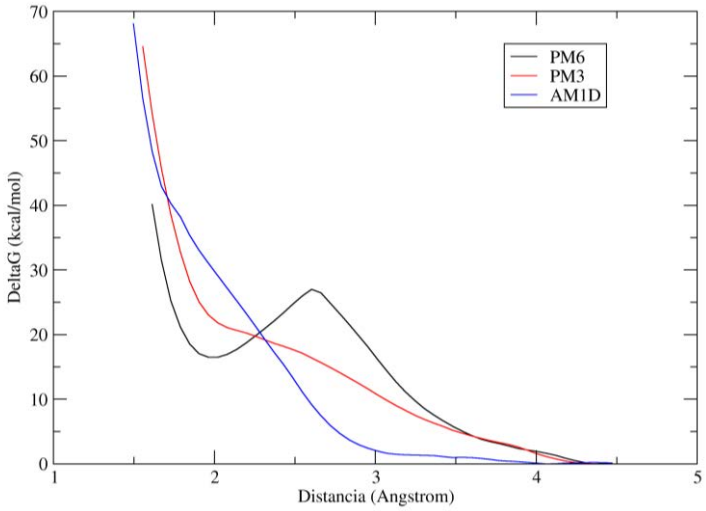


Figura 27: Variação de Energia livre nos métodos PM6, PM3 e AM1D para a região QM com magnésio. Aplicamos *umbrella sampling* com passo de 0,1 Å e 300 ps por janela.

No modelo maior, o método PM6 foi capaz de identificar uma diminuição na energia livre na região próxima a 2 Å com uma barreira de aproximadamente 29 kcal/mol. Essa barreira não pode ser observada no modelo reduzido, sugerindo que a inclusão do íon magnésio é essencial para a formação do intermediário pentacoordenado através do método PM6. No entanto, para os métodos PM3 e AM1D essa aumento na região QM pode não ter sido suficiente. O método RM1 não possui parâmetros para o íon magnésio para que fosse possível observar efeitos da barreira de acordo com o tamanho da região quântica.

Na seção anterior (4.5.1), calculamos uma barreira experimental de aproximadamente 21 kcal/mol para formação do intermediário e liberação da colina através da constante catalítica da enzima e da teoria do estado de transição. Neste caso, se a formação do intermediário pentacoordenado for considerada como o passo limitante da reação ao invés da liberação da colina como proposto por De Yonker e Webster [11], a barreira obtida para o método RM1 estaria em concordância razoável com os valores experimentais. A interface QM/MM AMBER apresenta problemas de desempenho quando aplicada a grandes sistemas QM uma vez que a parte QM não está totalmente paralelizada dentro da interface, fato que nos levou a testar outras interfaces e programas ao longo do trabalho.

4.5.3 QM/MM com pDynamo/GTKDynamo

GTKDynamo [65] é uma interface auxilia o estudo de mecanismos em sistemas biológicos integrando um programa de visualização molecular, o Pymol, e o Dynamo, um pacote para cálculos QM/MM em sua versão pDynamo [77]. Através da interface pDynamo/GTKDynamo estudamos o mecanismo catalítico com formação de intermediário pentacoordenado das SMases D utilizando métodos semi-empíricos como AM1, PM3 e PM6 para a parte quântica e o campo de força do AMBER para clássica.

Os primeiros testes envolveram a análise do mecanismo no estilo *stepwise* (Figura 28). Na Figura 28a temos um estado inicial do complexo em posicionamento adequado para o início do ataque nucleofílico. Utilizando *Potencial Energy Scan (PES)* implementado na interface, aproximamos o fósforo da esfingomielina em direção ao nitrogênio NE2 da histidina 47. Com a formação favorável do pentacoordenado (Figura 28b), o hidrogênio do nitrogênio NE2 da histidina 12 é aproximado do oxigênio que liga o grupo colina e o fósforo, e então a colina é liberada (Figura 28c).

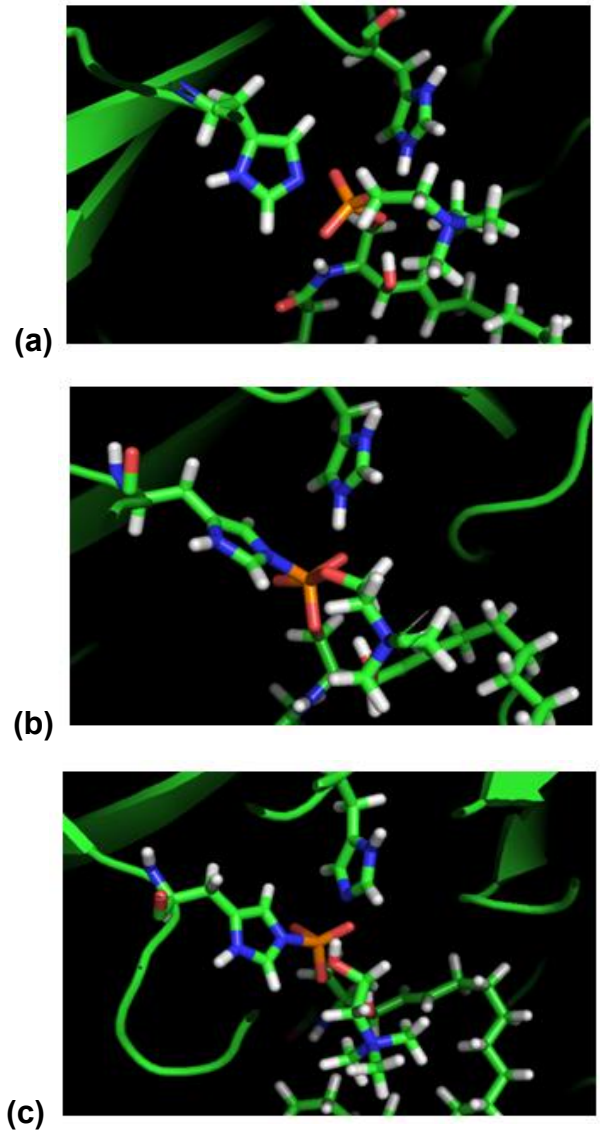


Figura 28: Caminho de reação para catálise covalente das SMases D sendo (a) estado inicial (b) formação do intermediário pentacoordenado (c) liberação da colina.

A seguir, analisamos o mecanismo no estilo *concerted*. O fósforo (P) da esfingomielina foi aproximado do nitrogênio NE2 da HIS47 (N) juntamente com o hidrogênio NE2 da HIS12 (H) em direção ao oxigênio (O) que liga o grupo colina ao fósforo. A Figura 29 mostra um PES bidimensional para o método semi-empírico PM3 com 168 átomos na parte quântica e um raio de 37 Å em torno da parte quântica adicionado como parte clássica.

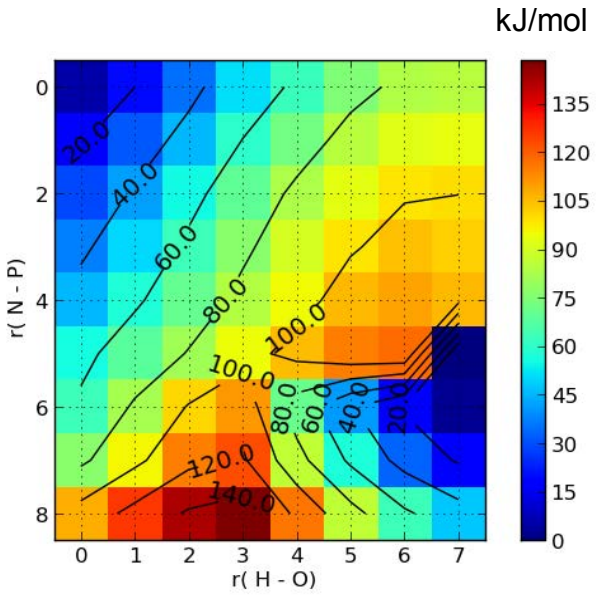


Figura 29: 2D *Potential energy scan* (PES) para o método semi-empírico PM3 com 168 átomos na parte quântica.r(N-P) e r(H-O) indicam os números do frame da distância N-P e H-O, respectivamente.

O gráfico da Figura 29 indica uma barreira de energia de aproximadamente 100 kJ/mol ou 24 kcal/mol. Rigorosamente, o que o procedimento faz é a otimização de geometria, minimizando a energia potencial a cada passo, e não a energia livre. Por isso, nesse estudo, eventuais diferenças na barreira de energia livre experimental não são passíveis de análises definitivas. Alguns estudos sugerem uma discreta contribuição de origem entrópica, abaixo de 3 kcal/mol para reações de hidrólise de diversos compostos [78,79,80]. No entanto, conclusões definitivas dos valores de barreira estimados por QM/MM só poderão ser encontrados com métodos teóricos que permitam estimar a energia livre, como na seção 4.5.2, onde se usou *umbrella sampling*.

Logo, se considerarmos uma contribuição entrópica muito pequena e a liberação da colina como o passo limitante da reação como sugerido por De Yonker e Webster [11], esta barreira de energia está em concordância com a energia livre estimada para *Loxosceles laeta*, de 21 kcal/mol, calculada na seção 4.5.1. Testes com diferentes métodos semi-empíricos e com a inclusão do íon magnésio na parte QM têm fornecido barreiras entre 18 e 24 kcal/mol. Sendo que valores mais baixos de energia de ativação tendem a estarem relacionados à presença do íon magnésio na parte QM e análise ao cálculo da barreira no estilo *concerted*.

4.5.4 Catálise Covalente x Catálise Não-Covalente

Lajoie et al. [69] sugeriram em 2013, através de experimentos de ^{31}P NMR e espectroscopia de massa, que as SMases D de *Loxosceles* não são capazes de formar ceramida-1-fosfato (C1P) a partir de esfingomielina. O produto formado teria um fosfato cíclico (CC(1,3)P) como mostra a Figura 30, exclusivamente através de do processo de transfosfatidilação via um mecanismo catalítico que não envolve ligação covalente entre o resíduo de histidina e o substrato. Os autores afirmam que os experimentos encontrados na literatura procuraram observar apenas a colina e não o restante do produto, fazendo que fossem incapazes de identificar o fosfato cíclico.

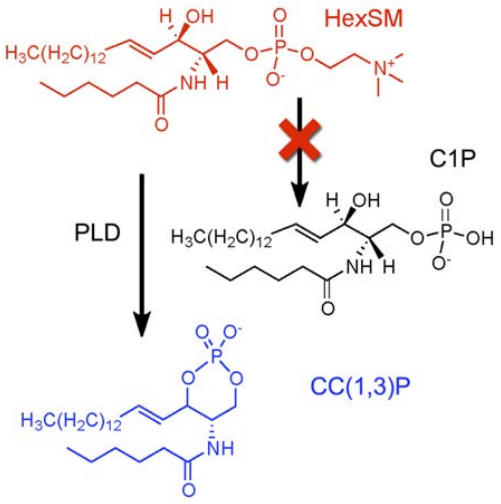


Figura 30: Produto com fosfato cíclico CC(1,3)P formado pela SMase D a partir de esfingomielina (figura modificada de [69]).

A possibilidade da formação de produtos com fosfato cíclico para outras fosfolipases D, como *Streptomyces chromouscus*, pode ser encontrada em outros na literatura [67,81,82,83]. É importante ressaltar que a preferência pelo processo de hidrólise ou transfosfatidilação é fortemente dependente das condições bioquímicas da reação como presença de álcool, concentração de cátions e concentração de substrato [67], o que não foi avaliado por Lajoie e co-autores.

Na seção 4.4.2 apontamos que a esfingomielina apresenta dois modos de ligação, **A** e **B**, em simulações de dinâmica molecular clássica (ver Figura 23). Nota-se que, no modo de ligação **B** (reproduzido na Figura 31a abaixo) se encontra em posição apropriada para a transferência do hidrogênio do grupo hidroxila para o nitrogênio NE2 da HIS47, assim como o hidrogênio ligado ao nitrogênio NE2 da HIS12 está bem posicionado para liberação do grupo colina.

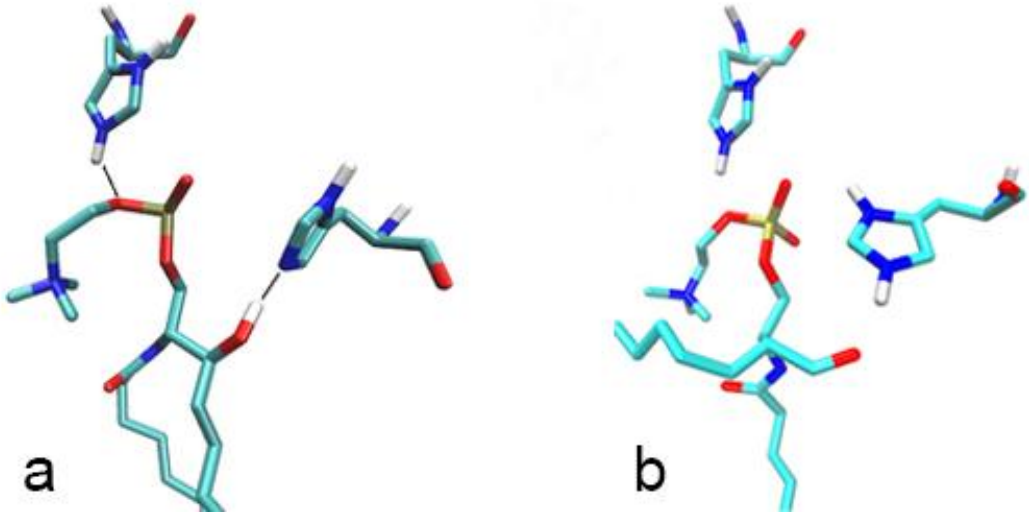


Figura 31: Transferência de um hidrogênio da esfingomielina para a HIS47 durante o processo de transfosfatidilação, sendo (a) o estado inicial e (b) o estado final. Método QM/MM na interface pDynamo/GTKDynamo com DFT/BLYP 6-31G, 46 átomos na parte QM e carga +2.

Uma simulação de QM/MM, na qual parte quântica foi simulada através com DFT/BLYP 6-31G na interface pDynamo/GTKDynamo, produziu um resultado interessante: o hidrogênio do grupo hidroxila se ligou espontaneamente ao nitrogênio da HIS47, no processo de otimização de estrutura. A Figura 31b mostra a configuração final do processo de otimização e nota-se a completa transferência do hidrogênio para a HIS47.

A consequência desta transferência é que o oxigênio da hidroxila se torna agora, um ótimo agente nucleofílico, que poderia, via rearranjo do substrato, se colocar em posição adequada para atacar o fósforo, produzindo assim um produto contendo fosfato cíclico, em um mecanismo de reação não-covalente. Temos trabalhado recentemente em calcular, via QM/MM, a barreira de energia para a formação do fosfato cíclico e liberação da colina.

A estrutura obtida após a transferência do hidrogênio da hidroxila à HIS47 (Figura 31b) em um PES bidimensional na interface pDynamo/GTKDynamo com o método AM1, no qual as coordenadas de reação foram as distancias do oxigênio do grupo hidroxila ao fósforo da esfingomielina e do hidrogênio da HIS12 ao oxigênio da colina. A Figura 32 representa o *Minimum Energy Pathway*, os estados inicial e final da reação.

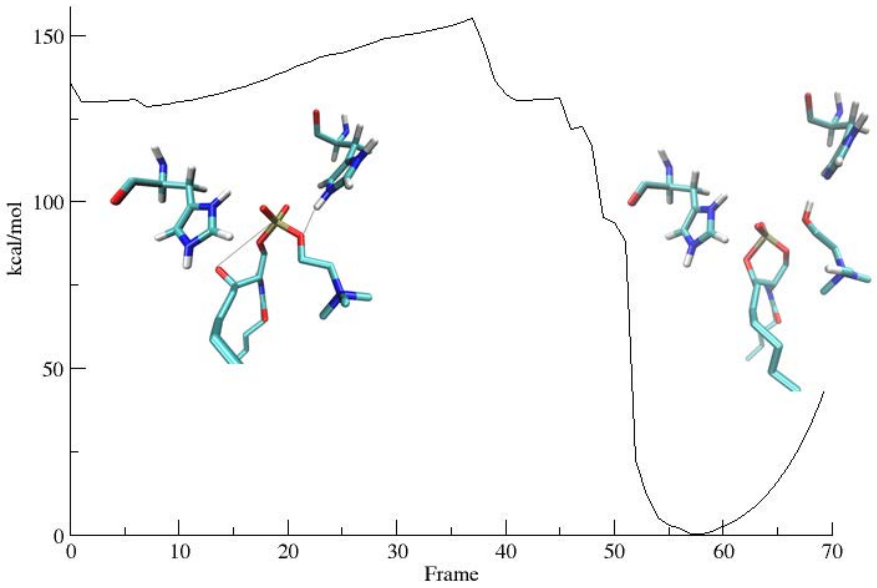


Figura 32: *Minimum Energy Pathway* para formação do produto com fosfato cíclico usando as distâncias O-P e H-O como coordenadas de reação. As estruturas representam os estados inicial e final do processo. Método AM1 e 168 átomos na parte QM foram aplicados na interface pDynamo/GTKDynamo.

Foi possível observar a formação do produto cíclico com uma barreira energia de cerca de 25 kcal/mol e formação do produto cíclico esperado como um mínimo de energia. Nota-se que este valor de barreira é comparável ao obtido para a hidrólise covalente de 24 kcal/mol obtido na seção anterior com o método AM1 e mesmo número de átomos na parte QM.

Os resultados parciais contidos aqui sugerem, portanto, que as duas vias de reação (catálise covalente e não covalente) podem ocorrer em simulações computacionais com energias de ativação comparáveis, dependendo da preferência do hidrogênio do grupo OH do substrato esfingomielina (orientação **A** ou **B,** na Figura 23). A possibilidade da particular posição da hidroxila catalisar a reação de

catálise covalente (como no caso **A**) ou a reação de transfosfatidilação produzindo fosfato cíclico (como no caso **B**) também foi proposta a partir de dados experimentais por Friedman et al. em 1996 [81]. Sugerimos aqui a influência do meio para determinação da via de mecanismo catalítico pode estar diretamente relacionada à estabilização dos modos de ligação **A** ou **B** encontrados em simulações de dinâmica molecular.

É bastante relevante o fato de que Sergelius et al. [71] tenham demonstrado que alterações no grupo hidroxila do substrato esfingomielina removem drasticamente a atividade da enzima, ou seja, tanto o processo de transfosfatidilação quanto o hidrólise, dentro das condições experimentais utilizadas. No caso da catálise covalente (modo de ligação **A** da Figura 21), a importância da hidroxila estaria associada à ponte de hidrogênio que forma com o grupo fosfato. Ao blindar parcialmente a carga negativa dos oxigênios ligados ao fósforo (seção 4.4.2), facilitaria o ataque nucleofílico da histidina 47 ao fósforo. Para nos certificar dessa hipótese pretendemos futuramente aplicar alterações no grupo hidroxila e recalcular as barreiras de energia para formação do intermediário pentacoordenado no processo de hidrólise. A importância da hidroxila no outro processo, o de transfosfatidilação, é mais óbvia, pois no modo de ligação **B** da Figura 21, a catálise não covalente começa com a transferência do hidrogênio da hidroxila para a histidina 47, produzindo assim um ótimo agente nucleofílico O^-, que ao atacar o fósforo produz o fosfato cíclico. Portanto, nossos resultados indicam que a remoção da hidroxila do substrato não poderia produzir nenhuma das reações, nem a catálise covalente e tampouco a catálise não covalente. Isso é o que foi verificado experimentalmente por Sergelius et al. [71], ao constatarem a quase total ausência de produto no caso do substrato sem a hidroxila.

4.6 Interações da SMase D com Membranas

A NPP7 é uma esfingomielinase alcalina humana que compartilha similaridade de sequência com nucleotídeo pirofosfatase/fostodiesterases embora não possua atividade contra nucleotídeos [84]. Em sua atividade como fosfolipase C, esta enzima é capaz de hidrolisar esfingomielina formando fosfocolina e ceramida.

Acredita-se que a ceramida resultante desta reação possa ter um papel crucial na permeabilidade e estrutura de membranas [85]. A Figura 33 mostra um esquema da possível ação da ceramida em uma bicamada lipídica. Antes da ação da SMase, temos a membrana em um estado fluído. Com a liberação da fosfocolina, a bicamada passaria para um estado metaestável com uma mistura de fosfolipídios e a ceramida resultante da catálise enzimática. A ausência da cabeça polar confere caráter fortemente hidrofóbico à ceramida que, por isso mesmo, teria tendência a se agregar formando domínios ricos em ceramida, alterando a curvatura e permeabilidade da bicamada.

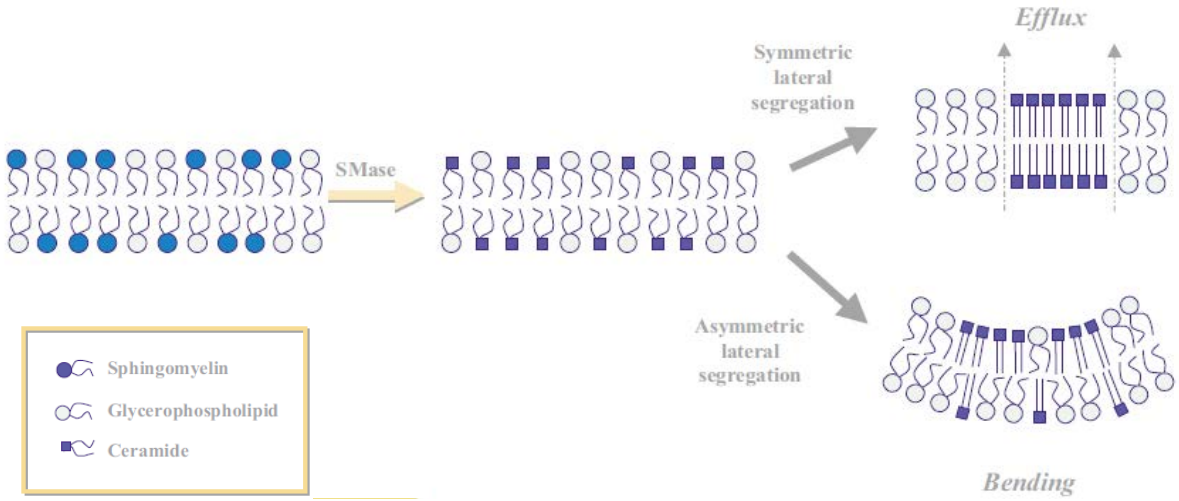


Figura 33: Possíveis efeitos da ceramida em membranas biológicas (modificado do artigo de revisão de Goñi e Alonso [85]).

A primeira tentativa na direção de avaliar a afinidade das esfingomielinases por membranas envolveu a montagem de uma caixa de simulação com uma mistura de água e TFE com a NPP7, como mostrado na Figura 34a. O TFE é uma molécula anfifílica que já foi muito utilizada com o intuito de mimetizar características de membrana. Note que o TFE foi distribuído entre camadas de água e TFE.

A NPP7 foi modelada por homologia com o *template* 2GSO pelo servidor Mholine http://www.mholline.lncc.br/ [86]. Após 20ns de simulação, observou-se a formação espontânea de um cluster de TFE dentro da caixa (Figura 34b). A NPP7 ficou acomodada na superfície desse cluster com uma parte voltada para o TFE e outra para a água, indicando que a enzima possui caráter anfipático.

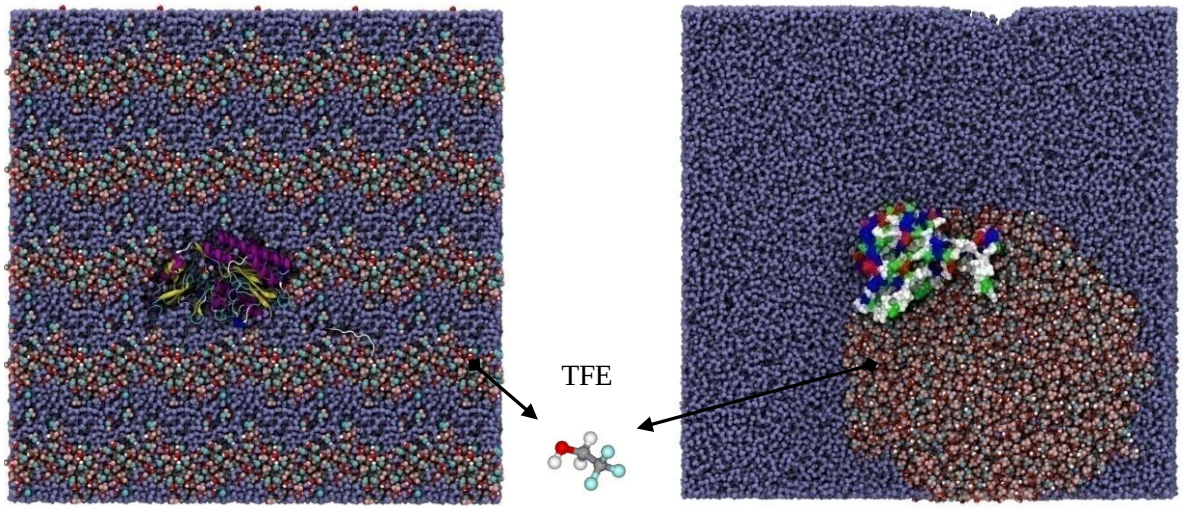
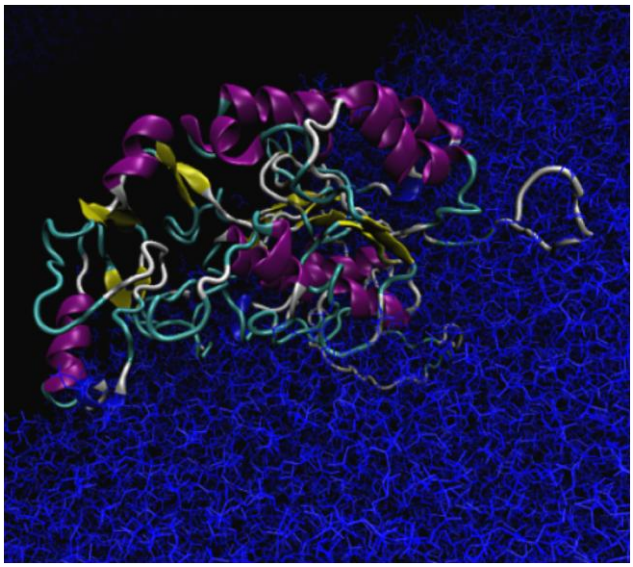


Figura 34: (a) Disposição da NPP7 e das moléculas de água e TFE no início da simulação e (b) após 20 ns.

A otimização da orientação da NPP7 com relação a um modelo de bicamada lipídica também foi obtida através do servidor PPM (Figura 35b). É possível observar que o modo como a enzima se liga à membrana como mostrado pela dinâmica molecular em água+TFE (Figura 35a) é bem similar ao modo de ligação como calculado pelo servidor *http://opm.phar.umich.edu/server.php* [70] que obtém a orientação da molécula em relação a um modelo de bicamada através da otimização de uma função baseada na área acessível ao solvente.

(a)



(b)

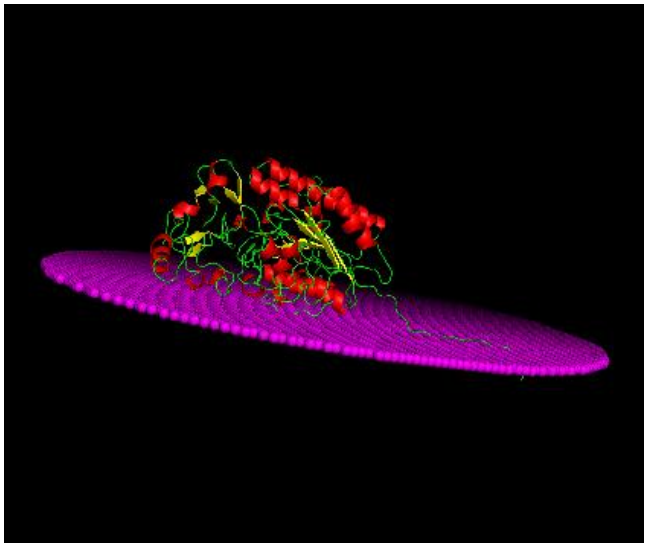


Figura 35:a) Modo de ligação da esfingomielina à membrana na presença.água e TFE e b) otimização com relação a um modelo de bicamada lipídica calculada no servidor PPM [70] http://opm.phar.umich.edu/server.php .

Foi possível observar que a parte voltada tanto para o TFE na simulação de dinâmica molecular quanto na membrana mimética do servidor envolvia a face relacionada ao sítio ativo da enzima. Estes resultados obtidos para a NPP7 contribuíram para as dinâmicas da esfingomielinase D com o seu substrato, esfingomielina, no sentido de orientar a esfingomielina em posições favoráveis na região do sítio ativo, assim como apresentaram um incentivo o início de estudos de interação proteína-membrana.

4.7 Dinâmica Molecular Ab initio (em andamento)

A fim de obter valores precisos do perfil de energia livre para a formação do intermediário pentacoordenado e liberação da colina temos utilizado a dinâmica molecular *ab initio*. O método QM/MM desenvolvido por Laio, VandeVondele e Röthlisberger [87] combina o método de dinâmica *ab initio* Car-Parrinello (CP) [88] com métodos campos de força clássicos. Simulações CP-QMMM associadas à metadinâmica [42] vêm sendo aplicado com sucesso no estudo de sistemas biológicos e na estabilização de intermediários de reação.

Na metadinâmica a superfície de energia livre é reconstruída como função de um ou mais graus de liberdade do sistema, geralmente chamados de variáveis coletivas (CVs). Um potencial externo historicamente dependente, que é uma função das CVs, faz com que o sistema escape de regiões de mínimo e evita a amostragem de regiões da superfície de energia livre já tenham sido exploradas. Uma característica interessante da metadinâmica é a vasta possibilidade de criar variáveis coletivas, desde uma simples distância entre átomos até número de coordenação entre átomos e grupos de átomos ou propriedades geométricas.

Neste projeto, ainda em andamento, temos utilizado a interface Gromos QMMM implementada no programa CPMD (Car-Parrinello Molecular Dynamics). Definimos inicialmente uma região quântica de 64 átomos (não incluindo o íon magnésio). Nesta região, os átomos são descritos por um conjunto de ondas planas com uma energia de corte de 70 Ry, funcional de troca-correlação BLYP e pseudopotencial de Martins-Troullier [89]. As otimizações iniciais de estrutura foram feitas através de *simulated annealing*, uma vez que os método de gradiente conjugado ou o de *steepest descent* não estavam implementados para a interface QMMM.

Várias tentativas de equilibração a 300 K com termostato de Nose-Hoover e passo de integração de 0,12 fs foram feitas a fim de ajustar o parâmetro para a massa eletrônica fictícia. Conseguimos a equilibração do sistema utilizando 900 a.u. (unidades arbitrárias internas do CPMD) para massa eletrônica fictícia durante 10 ns e o último frame deste passo vêm sendo utilizado em simulações CP-QMMM com metadinâmica para obtenção do perfil de energia livre.

Para a metadinâmica, foi escolhida uma CV simples que envolvia a distância do nitrogênio da HIS12 e o fósforo da esfingomielina a fim de estudar o mecanismo de hidrólise via formação de intermediário pentacoordenado. Também precisaram ser testados os parâmetros que envolvem a altura e a largura das gaussianas que são adicionadas à Hamiltoniana do sistema em metadinâmica. A altura geralmente é recomendada ser um pequeno percentual da barreira estimada da energia livre e a largura uma estimativa da variação da CV escolhida em simulações de dinâmica clássica. Uma largura de 0,2 Å, relacionada à distância N-P, e uma altura de 2 kcal/mol permitiram uma boa relação custo/benefício para explorar o perfil de energia livre.

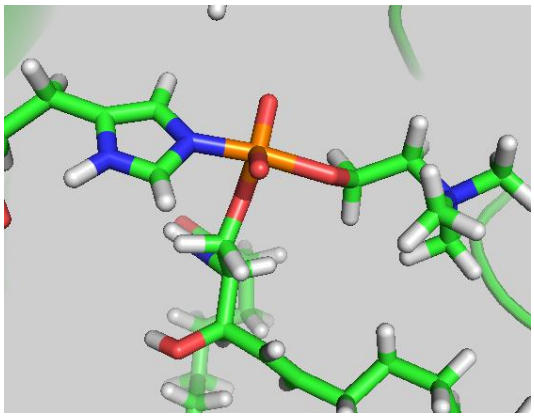


Figura 36: Intermediário pentacoordenado em simulações CP-QMMM-Metadynamics com 64 átomos na parte quântica.

No entanto, embora a região para a formação da ligação N-P de 1,82 Å tenha sido amostrada (Figura 36), temos encontrado barreiras muito altas de energia para formação do intermediário pentacoordenado. Um dos motivos pode envolver a variável coletiva escolhida para a metadinâmica, a qual pode não ter sido suficiente para descrever o mecanismo. Temos testado adicionar uma segunda variável coletiva como o número de coordenação do átomo de fósforo da esfingomielina e distancia do hidrogênio da HIS12 a ser doado para o oxigênio da esfingomielina. Outro fator que pode contribuir para a alta barreira está relacionado ao tamanho da região quântica, portanto os equilibração para uma região quântica com 85 átomos, incluindo o íon magnésio, também vem sendo testada. Finalmente, um terceiro fator,

pode ser a ausência do íon MG na região quântica, o que, segundo o Yang e Roberts [83], pode levar a barreiras significativamente mais altas para a formação do estado intermediário pentacoordenado.

5. Conclusões

Uma questão fundamental para classificar definitivamente as enzimas com atividade D em *Loxosceles* como fosfolipase D ou esfingomielinase D pode estar relacionada ao mecanismo catalítico destas enzimas. Nossos resultados têm indicado a viabilidade o mecanismo de hidrólise ácido-básico via formação de intermediário pentacoordenado, um dos mecanismos sugerido na literatura como o mais provável em fosfolipases D to tipo HKD. Avaliamos também a viabilidade do mecanismo sem formação de intermediário a partir de dados obtidos por dinâmica molecular.

O estudo dos estados de protonação das histidinas permitiu esclarecer qual poderia ser o resíduo de histidina responsável pelo ataque nucleofílico. Simulações a pH constante, assim como o servidor H++, indicaram que na presença do substrato, a HIS47 pode atuar como resíduo básico, iniciando o ataque nucleofílico e a HIS12 como resíduo ácido, doando um próton para liberação da colina. Estes estados de protonação suportam o mecanismo proposto por Murakami e co-autores no qual a HIS47 iniciaria o processo de hidrólise.

Adicionalmente, notamos através do servidor H++ que a presença do íon magnésio, sem o qual a enzima não é ativa, possui um papel fundamental para atribuir o pKa apropriado para catálise. Dados de simulação a pH constante indicaram que a atividade da enzima em uma escala de pH de 5 a 9 pode estar relacionada com os estados de protonação das histidinas 12 e 47, de modo que a HIS12 carregada positivamente e HIS47 neutra contribuem para atividade da enzima. Determinar o estado de protonação mais provável foi uma etapa essencial para as simulações de dinâmica clássica e QM/MM.

Ainda no contexto de cálculos de pKa, sugerimos uma ampliação na faixa de pH ativo da enzima devido à presença de substrato no sítio ativo. Os valores de pKa para a SMase D com o sítio vazio indicaram estados de protonação nos quais o mecanismo ácido-básico seria pouco provável para os pHs 5 e 9. No entanto, na presença do substrato no sítio, há um aumento da diferença entre os valores de pKa das histidinas 47 e 12 que poderia favorecer os estados de protonação apropriados.

Testes com lisofosfolípideos para o qual a enzima é ativa podem esclarecer se este comportamento é típico ou não para substratos nesta enzima.

Através de simulações de dinâmica clássica foi possível avaliar a coordenação apropriada do íon magnésio com relação ao número de águas de coordenação. Na presença do íon sulfato, três moléculas de água permanecem ligadas ao íon magnésio, reproduzindo o estado de coordenação presente na estrutura 1XX1. No entanto, a presença do substrato não é capaz de manter as três moléculas de água ligadas ao íon e mantém um padrão de apenas uma água como na estrutura 2F9R, a qual não possui ligante no sítio ativo e para a qual foi proposto que a HIS47 iniciaria o ataque nucleofílico.

A recente obtenção do cristal da SMase D recombinante de *Loxosceles intermedia* com um mio-inositol-1-fosfato presente no sítio ativo permitiu observar a coordenação do íon magnésio com apenas uma molécula de água e as interações do ligante com os resíduos importantes para a catálise. Simulações de dinâmica clássica mostraram uma tendência do ligante a permanecer dentro do sítio ativo com a HIS12 carregada positivamente e a HIS47 neutra, estado de protonação adequado para o mecanismo-ácido básico. Estudos experimentais têm sido realizados com pesquisadores do CMIB e da UFPR para avaliar se o ligante encontrado pode ser produto da catálise da enzima após clivar uma molécula de fosfatidilinositol fosfato, o que poderia revelar a participação da SMase D em caminhos de sinalização ainda não descritos na literatura.

A atividade da SMase D de recombinante de *Loxosceles intermedia* na presença de candidatos a inibidores também foi realizada em colaboração com pesquisadores do CMIB e a UFPR. Simulações de dinâmica clássica com o inibidor de maior afinidade pela enzima, a suramina, mostraram que este inibidor,que possui carga -6, permanece no sítio ativo em simulações de até 100 ns, interagindo diretamente com o íon magnésio e os resíduos positivos HIS12 e LYS93. Cotatamos através do servidor PPM que parte da suramina interage com uma região que pode essencial para ligação em uma bicamada modelo e pretendemos trabalhar na identificação destas interações.

A dinâmica clássica com o substrato apresentou dois modos de ligação envolvendo o grupo hidroxila do substrato, os quais podem estar diretamente

relacionados à via de reação da enzima. Um modo favorece a catalise covalente formando uma ligação de hidrogênio entre o grupo hidroxila e os oxigênios ligados ao fósforo, a qual poderia blindar parcialmente a carga do grupo fosfato. No outro modo, a ligação de hidrogênio entre o grupo hidroxila e o nitrogênio da HIS47 favorece o processo de catálise não covalente. Temos sugerido que as condições do meio podem favorecer a estabilização de um dos modos ligação e, portanto, de uma das vias catalíticas.

A viabilidade do mecanismo catalítico via formação de intermediário foi estudada por simulações QM/MM utilizando as interfaces QM/MM-AMBER e pDynamo/GTKDynamo. Para comparação com valores experimentais, estimamos uma barreira de energia livre de aproximadamente 21 kcal/mol para liberação da colina a partir de esfingomielina em SMases D de *Loxosceles laeta*, utilizando a constante catalítica obtida por Ferrara e co-autores. Importante ressaltar que nestes experimentos é acompanhado apenas o produto colina e não ceramida-1-fosfato.

Simulações QM/MM com a interface QM/MM-AMBER, aplicadas a um modelo com QM que não incluía o íon magnésio e *umbrella sampling*, forneceram barreiras de energia livre para formação de um intermediário pentacoordenado de aproximadamente 25 kcal/mol apenas para o método semi-empírico RM1. Após a inclusão do íon magnésio na parte QM, uma barreira de energia livre de aproximadamente 29 kcal/mol para formação do intermediário pentacoordenado pode ser observada para o método semi-empírico PM6. Notou-se nestas simulações uma dependência do tamanho da região QM com relação ao método semi-empírico PM6 e alto custo computacional nesta interface.

A interface pDynamo/GTKDynamo permitiu cálculos QM/MM com PES para vários métodos semi-empíricos com uma boa relação entre o custo computacional e o tamanho da região QM. Foi possível obter barreiras de energia entre 18 e 24 kcal/mol avaliando não apenas a formação do intermediário pentacoordenado, mas também a transferência do hidrogênio da HIS12 para o substrato. Estes valores estão em boa concordância com o valor experimental de 21 kcal/mol estimado para a liberação da colina.

Observamos também na interface pDynamo/GTKDynamo a formação do produto cíclico resultante de catálise sem a formação de intermediário com uma

barreira de energia de 25 kcal/mol, valor comparável a barreira de 24 kcal/mol para a catálise com formação de intermediário utilizando o mesmo método semi-empírico AM1. Portanto, nossos cálculos QM/MM com AM1 indicam que a catálise covalente e a catálise não covalente podem ser ambos favoráveis do ponto de vista termodinâmico para as SMases D de *Loxosceles*. Esperamos que os métodos *ab initio,* ainda em andamento, sejam capazes de fornecer valores precisos para as barreiras de energia livre dos dois mecanismos, de modo que possa detectar ligeiras diferenças na energia de ativação entre as vias de reação.

O indicativo por dinâmica molecular clássica e resultados parciais de simulações QM/MM de que o mecanismo da SMase D de *Loxosceles* também pode ocorrer via formação de compostos com fosfato cíclico nos levam a concluir que, embora não compartilhem similaridade de sequência, as SMases D de *Loxosceles* provavelmente possuem o mesmo mecanismo catalítico observado em fosfolipases D do tipo HKD.

6. Referências

1. TANIGUCHI, M.; OKAZAKI, T. The role of sphingomyelin and sphingomyelin synthases in cell death, proliferation and migration: from cell and animal models to human disorders. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1841, p. 692-703, 2014.

2. BINFORD, G. J.; CORDES, M. H.; WELLS, M. A. Sphingomyelinase D from venoms of Loxosceles spiders: Evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure. **Toxicon**, v. 45, p. 547–560, 2005.

3. SILVA, P. H. et al. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v. 44, n. 7, p. 693–709, 2004.

4. FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **American Journal of the Medical Sciences**, v. 304, n. 4, p. 261-267, 1992.

5. ROSEN, J. L. et al. Emergency department death from systemic loxoscelism. **Annals of Emergency Medicine**, v. 60, n. 4, p. 439-441, 2012.

6. RAMOS-CERRILLO, B. et al. Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders Loxosceles boneti and Loxosceles reclusa. **Toxicon**, v. 44, n. 5, p. 507-14, 2004.

7. MURAKAMI, M. T. et al. Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 342, p. 323-329, 2006.

8. GIUSEPPE, P. O. et al. Structure of a novel class II phopholipase D: Catalytic cleft is modified by a disulphide bridge. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 409, p. 622-627, 2011.

9. MURAKAMI, M. T. et al. Structural Basis for Metal Ion Coordination and the Catalytic Mechanism of Sphingomyelinases D. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 14, p. 13658 –13664, 2005.

10. STUCKEY, J. A.; DIXON, J. E. Crystal structure of a phospholipase D family member. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 6(3), p. 278-284, 1999.

11. DEYONKER, N. J.; WEBSTER, C. E. Phosphoryl Transfers of the Phospholipase D Superfamily: A Quantum Mechanical Theoretical Study. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, p. 13764-13774, 2013.

12. GUEDES, I. A.; MAGALHÃES, C. S.; DARDENNE, L. E. Receptor–ligand molecular docking. **Biophyscal Reviews**, v. 6, p. 75–87, 2014.

13. GUEDES, I. A.; DE MAGALHÃES, C. S.; DARDENNE, L. E. Receptor-ligand molecular docking. **Biophysical Reviews**, v. 6 (1), p. 75-87, 2014.

14. MORRIS, G. M. et al. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexiblity. **Journal of Computational Chemistry**, v. 16, p. 2785-2791, 2009.

15. TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31 (2), p. 455–461, 2010.

16. SANTOS-MARTINS, D. et al. AutoDock4Zn: An improved AutoDock force field for small-molecule docking to zinc metalloproteins. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54 (8), p. 2371-2379, 2014.

17. MORRIS, G. M. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 15, p. 1639–1662, 1999. ISSN 14.

18. HUEY, R. et al. A Semiempirical Free Energy Force Field with Charge-Based Desolvation. **Journal of Computational Chemistry**, v. 28, p. 1145–1152, 2007.

19. MACKERELL JR, A. D.; FEIG, M.; BROOKS III, C. L. Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, p. 1400-1415, 2004.

20. OOSTENBRINK, C. et al. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, p. 1656–1676, 2004.

21. HORNAK, V. et al. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. **Proteins**, v. 65, p. 712–725, 2006.

22. KAMINSKI, G. A. et al. Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 105 (28), p. 6474–6487, 2001.

23. LEE, M. S.; SALSBURY JR., F. R.; BROOKS III, C. L. Constant-pH molecular dynamics using continuous titration coordinates. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 56 (4), p. 738–752, 2004.

24. MORGAN, J.; CASE, D. A.; MCCAMMON, J. A. Constant pH Molecular

Dynamics in Generalized Born. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 16, p. 2038-2048, 2004.

25. CASE, D. A. et al. AMBER 11, University of California, San Francisco, 2010.

26. BASHFORD, D.; CASE, D. A. Generalized Born Models of Macromolecular Solvatation Effects. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 51, p. 129-152, 2000.

27. SWAILS, J. M.; YORK, D. M.; ROITBERG, A. E. Constant pH Replica Exchange Molecular Dynamics in Explicit Solvent Using Discrete Protonation States: Implementation, Testing, and Validation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 10, p. 1341−1352, 2014.

28. CASE, D. A. et al. AMBER 2015. **University of California, San Francisco**, 2015.

29. DEWAR, M. J. S. et al. AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, p. 3902–3909, 1985.

30. IMHOF, P. et al. AM1/d Parameters for Magnesium in Metalloenzymes. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 2, p. 1050–1056, 2006.

31. STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method. **Journal of Computational Chemistry**, v. 10, p. 209–220., 1989.

32. STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **Journal of Molecular Modeling**, v. 13, p. 1173–1213, 2007.

33. ROCHA, G. B. et al. RM1: A reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I. **Journal of Computational Chemistry**, v. 27 (10), p. 1101–1111, 2006.

34. KOHN, W.; SHAM, L. J. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. **Physical Review**, v. 140 (4A), p. A1133-A1138, 1965.

35. SENN, H. M.; THIEL, W. QM/MM Methods for Biomolecular Systems. **Theoretical Chemistry**, 48, n. 1198-1229, 2009.

36. FIELD, M. J.; BASH, P. A.; KARPLUS, M. A combined quantum mechanical and molecular mechanical potential for molecular dynamics simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 11 (6), p. 700–733, 1990.

37. ANTES, I.; THIEL, W. Adjusted Connection Atoms for Combined Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Methods. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 103 (46), p. 9290–9295, 1999.

38. GAO, J. et al. A Generalized Hybrid Orbital (GHO) Method for the Treatment of Boundary Atoms in Combined QM/MM Calculations.

39. KUMAR, S. et al. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. **Journal of Computational Chemistry**, v. 16, p. 1339–1350, 1995.

40. KOLLMAN, P. Free energy calculations: Applications to chemical and biochemical phenomena. **Chemical Reviews**, v. 93, p. 2395–2417., 1993.

41. PARK, S. et al. Free energy calculation from steered molecular dynamics simulations using Jarzynski's equality. **The Journal of Chemical Physics**, v. 119, p. 3559–3356, 2003.

42. LAIO, A.; PARRINELLO, M. Escaping free-energy minima. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 12562–12566, 2002.

43. HANWELL, M. D. et al. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics 2012, 4:17**, v. 4, p. 17, 2012.

44. CHAVES-MOREIRA, D. et al. Potential Implications for Drug Design against Phospholipase D from Loxosceles intermedia, 2015.

45. FRISCH, M. J. et al. Gaussian 03, Revision C.02. **Gaussian, Inc., Wallingford CT**, 2004.

46. WANG, J. et al. Development and Testing of a General AMBER Force Field. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, p. 1157-1174, 2004.

47. WANG, J. et al. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 25, p. 247260, 2006.

48. BAYLY, C. I. et al. A well-Behaved electrostatic potential based method using charge restraints for determining atom-centered charges: The RESP model. **Journal Physical Chemistry**, v. 97, p. 10269–10280, 1993.

49. CORONADO, M. A. et al. Structural Insights into Substrate Binding of Brown Spider Venom Class II Phospholipases D. **Current Protein and Peptide Science**, v. 16, 2015.

50. FRISCH, M. J. et al. Gaussian 09, Revision D.01. **Gaussian, Inc., Wallingford CT**, 2009.

51. PRONK, S. et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. **BIOINFORMATICS**, v. 29 (7), p. 845–854, 2013.

52. BERENDSEN, H. J. C. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, v. 81, p. 3684–3690, 1984.

53. FERGUSON, D. M. Parametrization and evaluation of a flexible water model. **Journal of Computational Chemistry**, v. 16, p. 501–511, 1995.

54. HESS, B. et al. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, p. 1463–1472, 1997.

55. CHIU, S. W. et al. An Improved United Atom Force Field for Simulation of Mixed Lipid Bilayers. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 113 (9), p. 2748–2763, 2009.

56. JORGENSEN, W. L. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, v. 79, p. 926–935, 1983.

57. LONCHARICH, R. J.; BROOKS, B. R.; PASTOR, R. W. Langevin dynamics of peptides: The frictional dependence of isomerization rates of N-acetylalanyl-N′-methylamide. **Biopolimers**, v. 32 (5), p. 523–535, 1992.

58. RYCKAERT, J. P.; CICCOTTI, G.; BERENDSEN, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkanes. **Journal of Computational Physics**, v. 23, p. 327–341, 1977.

59. LI, P. et al. Rational Design of Particle Mesh Ewald Compatible Lennard-Jones Parameters for +2 Metal Cations in Explicit Solvent. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 9, p. 2733–2748, 2013.

60. CASE, D. A. et al. AMBER 12, University of California, San Francisco, 2012.

61. ONUFRIEV, A.; BASHFORD, D.; CASE, D. A. Exploring protein native states and large-scale conformational changes with a modified generalized Born model. **Proteins**, v. 55, p. 383–394, 2004.

62. GROSSFIELD, A. WHAM: an implementation of the weighted histogram analysis method. **http://membrane.urmc.rochester.edu/content/wham/**, v. version 2.0.6.

63. WALKER, R. C.; CROWLEY, M. F.; CASE, D. A. The implementation of a fast and efficient hybrid QM/MM potential method within The Amber 9.0 sander module. **Journal of Computational Chemistry**, v. 29, p. 1019–1031, 2008.

64. ELSTNER, M. et al. Self-consistent charge density functional tight-binding method for simulation of complex material properties. **Physical Review B**, v. 58, p. 7260, 1998.

65. BACHEGA, J. F. R. et al. GTKDynamo: A PyMOL Plug-In for QC/MM Hybrid Potential Simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 34, p. 2190–2196, 2013.

66. LEE, S.; LYNCH, K. R. Brown recluse spider (Loxosceles reclusa) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). **Biochemical Journal**, v. 391, p. 317–323, 2005.

67. SELVY, P. E. et al. Phospholipase D: Enzymology, Functionality, and Chemical Modulation. **Chemical Reviews**, v. 111, p. 6064–6119, 2011.

68. ANANDAKRISHNAN, R.; AGUILAR, B.; ONUFRIEV, A. V. H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulation. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. 537-541, 2012.

69. LAJOIE, D. M. et al. Phospholipase D Toxins of Brown Spider Venom Convert Lysophosphatidylcholine and Sphingomyelin to Cyclic Phosphates. **Public Library Of Science**, v. 8, 8, p. e72372, 2013.

70. LOMIZE, M. A. et al. OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. D370–D376, 2012.

71. SERGELIUS, C. et al. Structure–activity relationship of sphingomyelin analogs with sphingomyelinase from Bacillus cereus. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1818 (3), p. 474-80, 2012.

72. LEIROS, I.; MCSWEENEY, S.; HOUGH, E. The Reaction Mechanism of Phospholipase D from Streptomyces sp. Strain PMF. Snapshots along the Reaction Pathway Reveal a Pentacoordinate Reaction Intermediate and an Unexpected Final Product. **Journal Molecular Biology**, v. 339, p. 805–820, 2004.

73. KAMERLIN, S. C.; WARSHEL, A. At the dawn of the 21st century: Is dynamics the missing link for understanding enzyme catalysis? **Proteins**, v. 78(6), p. 1339-1375, 2010.

74. KAMERLIN, S. C. L.; WARSHEL, A. Reply to Karplus: Conformational dynamics have no role in the chemical step. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107 (17), 2010.

75. KARPLUS, M. Role of conformation transitions in adenylate kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107(17).

76. FERRARA, G. I. S. et al. SMase II, a New Sphingomyelinase D from Loxosceles laeta venom gland: Molecular Cloning, Expression, Function and Structural Analysis. **Toxicon**, v. 53, p. 743-753, 2009.

77. FIELD, M. J. The pDynamo Program for Molecular Simulations using Hybrid Quantum Chemical and Molecular Mechanical Potentials. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4 (7), p. 1151–1161, 2008.

78. HU, P.; ZHANG, Y. Catalytic Mechanism and Product Specificity of the Histone Lysine Methyltransferase SET7/9: An ab Initio QM/MM-FE Study with Multiple Initial Structures. **Journal of the American Chemical Society**, v. 28 (4), p. 1272-1278., 2006.

79. VILLÀ, J. et al. How important are entropic contributions to enzyme catalysis? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97 (22), p. 11899–11904, 2000.

80. MINETTI, C. A.; REMETA, D. P.; BRESLAUER, K. J. A continuous hyperchromicity assay to characterize the kinetics and thermodynamics of DNA lesion recognition and base excision. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 05 (1), p. 70-75, 2008.

81. FRIEDMAN, P. et al. Conversion of lysophospholipids to cyclic lysophosphatidic acid by phospholipase D. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 953-957, 1996.

82. TSUDA, S. et al. Cyclic phosphatidic acid is produced by autotaxin in blood. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281 (36), p. 26081-26088, 2006.

83. YANG, H.; ROBERTS, M. F. Phosphohydrolase and transphosphatidylation reactions of two Streptomyces phospholipase D enzymes: Covalent versus noncovalent catalysis. **Protein Science**, v. 12, p. 2087–2098, 2003.

84. DUAN, J. et al. Understanding the Molecular Activity of Alkaline Sphingomyelinase (NPP7) by Computer Modeling. **Biochemistry**, v. 49, p. 9096–9105, 2010.

85. GOÑI, F. M.; ALONSO, A. Sphingomyelinases: enzymology and membrane

activity. **FEBS Letters** , v. 531, p. 38-46, 2002.

86. CAPRILES, P. V. S. Z. et al. Structural modelling and comparative analysis of homologous, analogous and specific proteins from Trypanosoma cruzi versus Homo sapiens: putative drug targets for chagas' disease treatment. **BMC Genomics**, v. 11, p. 610, 2010.

87. LAIO, A.; VANDEVONDELE, J.; ROTHLISBERGER, U. A Hamiltonian Electrostatic Coupling Scheme for Hybrid Car-Parrinello Molecular Dynamics Simulations. **Journal of Chemical Physics**, v. 116, p. 6941-6947, 2002.

88. CAR, R.; PARRINELLO, M. Unified Approach for Molecular Dynamics and Density-Functional Theory. **Physical Review Letters**, v. 55, p. 2471, 1985.

89. TROULLIER, N.; MARTINS, J. L. Efficient pseudopotentials for plane-wave calculations. **Physical Review B**, v. 43, p. 1993-2006, 1991.

Apêndice 1

Alinhamento de sequência entre as SMases de classe I e II.

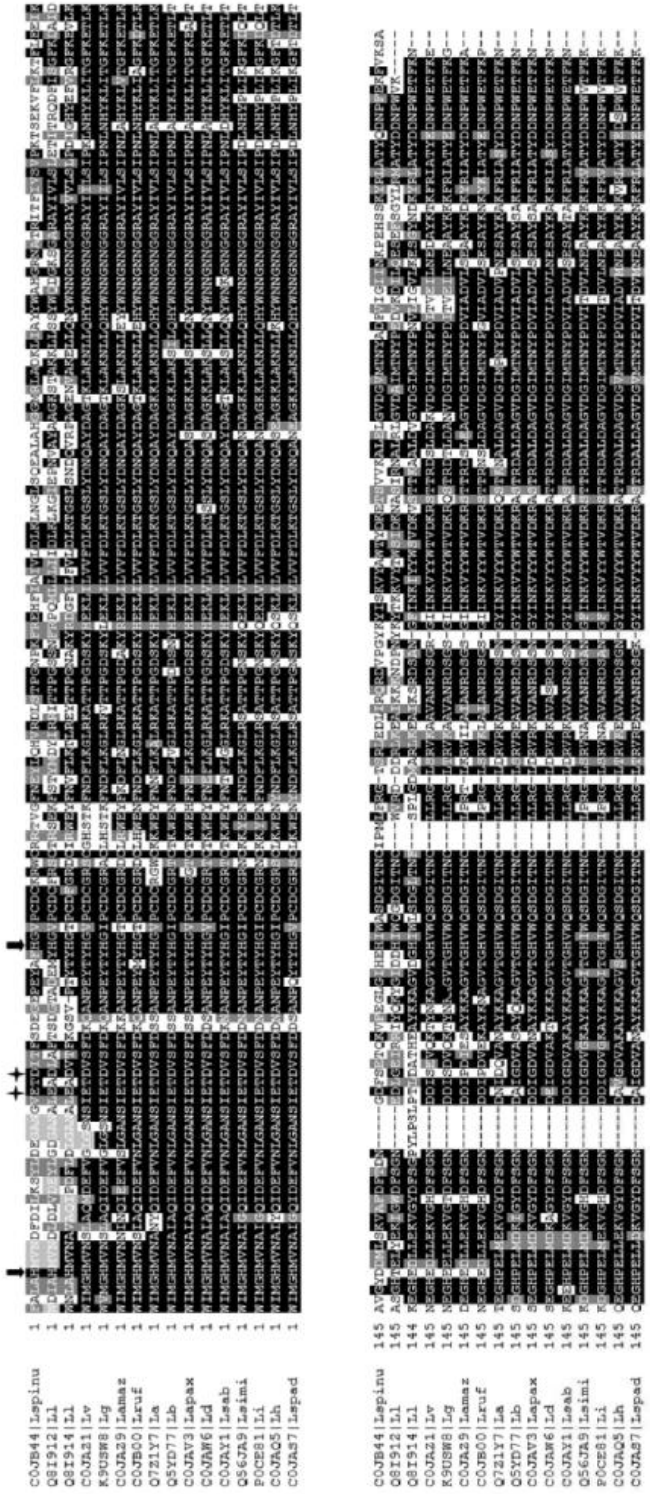


Figura 37: *Loxosceles spinulosa (ID:* C0JB44); *Loxosceles laeta* (ID: Q8I912); *Loxosceles laeta* (ID: Q8I914): *Loxosceles variegate* (ID: C0JAZ1); *Loxosceles gaucho* (ID: K9USW8); *Loxosceles amazonica* (ID: C0JAZ9); L*oxosceles rufescens* (ID: C0JB00); *Loxosceles arizonica* (ID: Q7Z1Y7); *Loxosceles boneti* (ID: Q5YD77); *Loxosceles apachea* (ID: C0JAV3); *Loxosceles deserta* (ID: C0JAW6); *Loxosceles sabina* (ID: C0JAY1); *Loxosceles similis* (ID: Q56JA9); *Loxosceles intermedia* (ID: P0CE81); *Loxosceles hirsute* (ID: C0JAQ5); *Loxosceles spadicea* (ID: C0JAS7).