

# 3

## CAPÍTULO

# SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DE REAÇÕES ENZIMÁTICAS E SUAS APLICAÇÕES EM BIOTECNOLOGIA

Cláudio Nahum Alves  
Jerônimo Lameira Silva  
José Rogério de Araújo Silva

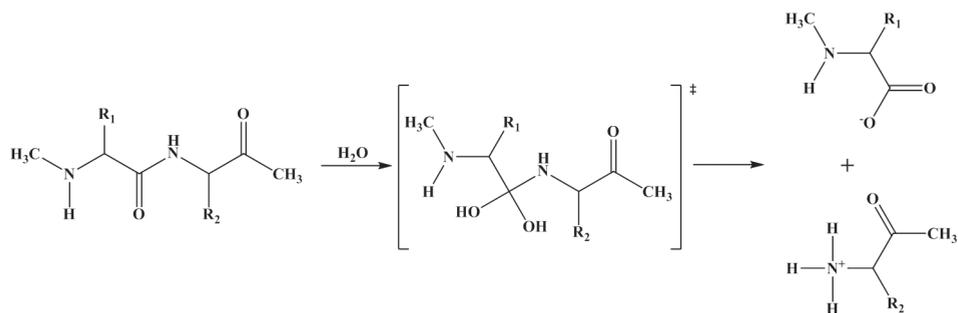
## 3.1 INTRODUÇÃO

O entendimento de reações enzimáticas em nível atômico é um dos maiores desafios para a biofísica moderna<sup>1</sup>. Técnicas experimentais como a difração de raios X e engenharia genética têm proporcionado um grande progresso na determinação estrutural de enzimas. Entretanto, tais técnicas não são capazes de explicar a origem do poder catalítico enzimático<sup>1</sup>. Informações mais detalhadas sobre reações enzimáticas podem ser obtidas através dos métodos de química computacional, química teórica e modelagem molecular<sup>1</sup>, os quais estão se tornando cada vez mais importantes para o entendimento do papel biológico das enzimas, bem como para a área da biotecnologia<sup>2</sup>. Usando tais métodos, pode-se, por exemplo, propor estruturas de novas enzimas com importância industrial e médica<sup>2</sup>, ou se pode ainda propor bioligantes ou

inibidores de alvos terapêuticos<sup>2</sup>. O desenvolvimento de métodos de cálculos, bem como os novos algoritmos matemáticos, muito mais efetivos, acompanhados do impressionante avanço de *software* e *hardware*, permitiu à modelagem molecular passar do estudo de pequenos sistemas em fase gasosa para explorar, calcular e caracterizar as propriedades de sistemas complexos como os enzimáticos. Os pioneiros na área de simulações computacionais enzimáticas, Martin Karplus, Michael Levitt e Arieh Warshel, foram contemplados com o prêmio Nobel de Química de 2013 pelo desenvolvimento de modelos multiescala para sistemas químicos complexos, o que ressalta a importância científica do tema abordado neste capítulo.

A principal corrente de pensamento para explicar a reatividade química e, em particular, a catálise enzimática, tem suas origens na ideia singular de Linus Pauling<sup>3</sup> o qual teve grande importância na área de química e bioquímica e, curiosamente, foi orientador de Martin Karplus (já citado) no Departamento de Química da Caltech (Instituto de Tecnologia da Califórnia). Segundo Pauling<sup>3</sup>, as enzimas acelerariam as reações químicas ao estabilizar o estado de transição (ET) com relação ao complexo de Michaelis. A evidência experimental que confirma essa hipótese é o fato de que compostos semelhantes ao ET, análogos ao estado de transição, que abreviaremos aqui como AET, são inibidores competitivos das enzimas, e dessa forma podem ser usados como fármacos<sup>4</sup>. Uma proposta geral dessa ideia é apresentada na Figura 3.1. Como exemplo de molécula desenhada com esse propósito, tem-se o Saquinavir, que foi o primeiro medicamento desenvolvido para inibir a enzima aspártica protease do HIV. Esse inibidor foi desenhado como AET do substrato dessa enzima. Assim, estabelecendo-se a natureza do ET, pode-se propor a síntese de moléculas com geometria e propriedades físico-químicas semelhantes, mas com estruturas estáveis<sup>4</sup>.

O uso de enzimas para produção de alimentos, tecidos, fármacos e biocombustível está bem estabelecido<sup>5</sup>. Milhões de anos foram necessários para criar poderosos biocatalisadores capazes de acelerar uma enorme variedade de reações químicas, mantendo a regioselectividade e a estereoselectividade. Entretanto, os químicos sintéticos estão criando cada vez mais compostos artificiais e novas reações, nas quais não existem enzimas naturais, para realizar a biocatálise. Dessa maneira, o desenho de enzimas capazes de catalisar tais reações tornou-se um dos maiores desafios em biotecnologia<sup>5</sup>. Baseando-se na ideia de Linus Pauling<sup>3</sup>, Jencks<sup>6</sup> propôs empregar os AETs como antígenos em sistemas vivos para gerar anticorpos catalíticos (ACs). Os estudos dos processos associados à atividade dos ACs propiciam uma oportunidade sem igual para entender a catálise enzimática e para melhorar



### Estrutura Análoga ao Estado de Transição

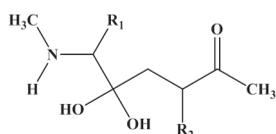


Figura 3.1 Representação esquemática de mecanismo reacional.

a estrutura de novos catalisadores<sup>2</sup>. É importante ressaltar que os ACs serão particularmente interessantes nas reações químicas nas quais não há enzimas conhecidas que as catalisem.

Este capítulo abordará os métodos mais utilizados em simulação de reações enzimáticas. Em seguida, serão apresentadas duas aplicações dos métodos apresentados aqui, sendo a primeira um trabalho publicado pelos autores deste capítulo no qual se mostra a possibilidade de usar o mecanismo molecular enzimático como ponto de partida para determinação de inibidores AETs, enquanto a segunda mostrará como o conhecimento da ET pode ajudar no desenho de anticorpos catalíticos.

## 3.2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 3.2.1 Métodos híbridos: mecânica quântica/mecânica molecular (MQ/MM)

Em 1976, Warshel e Levitt apresentaram uma nova metodologia baseada em hamiltonianos híbridos, que hoje é considerada essencial para o estudo de reações enzimáticas<sup>7,8</sup>. A essa metodologia foi dado o nome de método de

mecânica quântica combinado com mecânica molecular (QM/MM), do inglês *combined quantum-mechanics/molecular-mechanics*<sup>7,8</sup>. Nesse método realiza-se a partição do sistema em dois subsistemas: um contendo as moléculas que participam de forma ativa na reação química (rupturas e formações de ligações químicas) e outro englobando as demais moléculas presentes no sistema (meio ou entorno), que desempenham um papel passivo numa determinada reação química. A vantagem inerente de tal partição é que cada subsistema é tratado com o emprego de um método distinto, destinando o mais rigoroso à descrição do processo de reação e o mais simples à descrição das centenas ou milhares de moléculas que descrevem o meio em que ocorre a reação<sup>7</sup>.

O método usado para descrever adequadamente a molécula que participa de forma ativa da reação química é conhecido como método mecânico quântico (MQ), do inglês *quantum-mechanics*, e o método usado para descrever o meio é chamado de mecânica molecular (MM), do inglês *molecular-mechanics*, que é um método clássico baseado na aplicação de campo de forças, o que permite realizar rapidamente os cálculos com baixo custo computacional. Por outro lado, por não resolver a equação de Schrödinger, os métodos de mecânica molecular não podem ser aplicados a sistemas que impliquem a ruptura ou formação de uma ligação química, além de não descreverem adequadamente as interações eletrostáticas devido aos efeitos de polarização<sup>9-12</sup>.

Devido ao impressionante avanço no desenvolvimento de *software* e *hardware*, o estudo teórico de sistemas compostos por um elevado número de átomos, como é o caso das enzimas, tem se tornado possível. Há uma crescente aplicação do método de mecânica quântica combinado com mecânica molecular (MQ/MM) no estudo de problemas de natureza química e biológica relacionados a enzimas, especialmente em catálise enzimática<sup>9-18</sup>. Uma pesquisa básica no ISI Web of Science usando como palavra-chave “QM/MM”, apesar de não refletir todos os trabalhos dessa área, mostra um aumento no número de publicações a esse respeito em poucos anos (Figura 3.2).

Como já comentado acima, no método de mecânica quântica combinado com mecânica molecular (MQ/MM) o sistema completo divide-se em dois subsistemas, MQ e MM (Figura 3.3), e cada subsistema recebe tratamento distinto. O subsistema MQ é compreendido por aquelas moléculas que participam da reação química, sendo descrito por métodos quânticos, tais como *ab initio*, ou semiempíricos, como os métodos AM1<sup>19</sup> e PM3<sup>20</sup>, entre outros. O subsistema MM corresponde ao meio (proteína e moléculas de água) e é descrito por campos de força, sendo os mais usados os seguintes: *assisted model building with energy refinement* (AMBER)<sup>21,22</sup>, *chemistry at*

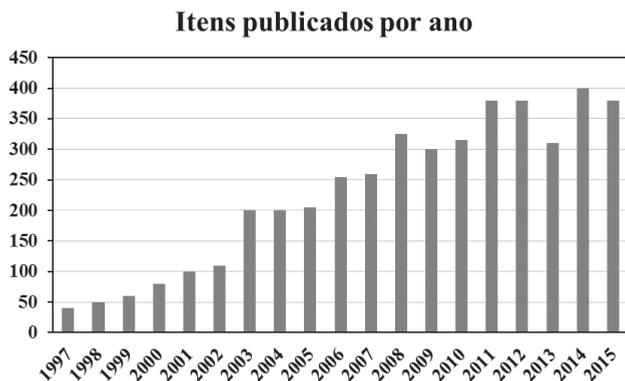


Figura 3.2 Representação das recentes publicações relacionadas ao método MQ/MM.

*HARvard macromolecular mechanics* (CHARMM)<sup>23</sup>, *Groningen molecular simulation* (GROMOS)<sup>24</sup> e *optimized potentials for liquid simulations – all atoms* (OPLS-AA)<sup>25</sup>. Geralmente esses campos de força incluem parâmetros para proteínas e ácidos nucleicos, mas alguns deles possuem parâmetros para lipídeos e carboidratos. Em suma, os métodos híbridos MQ/MM permitem incluir tanto a precisão de um tratamento quântico como a eficiência computacional da mecânica molecular.

A região MQ inclui todos os átomos envolvidos diretamente na reação química, ou seja, os átomos que participam da formação e rupturas das ligações. Os átomos dessa região são representados como elétrons e núcleos,

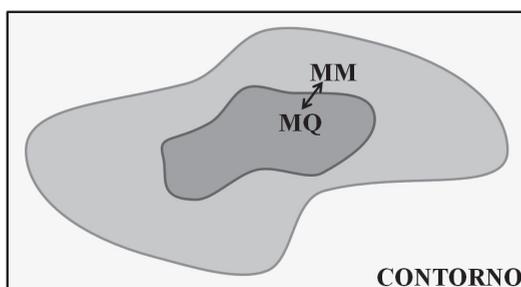


Figura 3.3 Partição do sistema MQ/MM.

e as superfícies de potencial associadas a eles são determinadas pela aproximação de Born-Oppenheimer<sup>26</sup>, de modo que a energia é descrita em função

das posições dos núcleos. Por outro lado, a zona MM contém o resto dos átomos do sistema. Estes são descritos classicamente, e suas interações são determinadas mediante funções de energia potencial empírica, de modo que esses átomos não podem estar envolvidos no processo de formações ou ruptura de ligações. Os átomos MM interagem com os átomos MQ envolvidos na reação, de modo que seus movimentos e interações influem sobre os átomos MQ, e vice-versa.

A função de onda do subsistema MQ dependerá das coordenadas dos elétrons dos átomos ( $\vec{r}_i$ ) e, parametricamente, dos núcleos que a formam ( $\vec{r}_\alpha$ ) e da posição do centro que formam o entorno ( $\vec{r}_\omega$ ) (Figura 3.4):

$$(Equação 3.1) \quad \Phi = (\vec{r}_i); (\vec{r}_\alpha); (\vec{r}_\omega)$$

Tal função de onda proporciona ou descreve a densidade eletrônica da região quântica submetidas às interações correspondentes ao entorno. O hamiltoniano efetivo do sistema é definido como:

$$(Equação 3.2) \quad \hat{H}_{eff} = \hat{H}_{MQ} + \hat{H}_{MQ/MM} + \hat{H}_{MM}$$

em que  $\hat{H}_{MQ}$  corresponde ao hamiltoniano da região quântica, cuja expressão é equivalente à do subsistema dos reagentes em vazio,  $\hat{H}_{MM}$  corresponde às interações entre as moléculas que formam o entorno e  $\hat{H}_{MQ/MM}$  descreve as interações entre as duas regiões e se decompõe em três termos, cada um deles com seu hamiltoniano correspondente: eletrostático, Van der Waals e de polarização.

$$(Equação 3.3) \quad \hat{H}_{MQ/MM} = \hat{H}_{MQ/MM}^{Elec} + \hat{H}_{MQ/MM}^{VdW} + \hat{H}_{MQ/MM}^{Pol}$$

O termo de polarização,  $\hat{H}_{MQ/MM}^{Pol}$ , estabelece um acoplamento entre a função de onda do sistema MQ e as cargas do entorno, o que deveria se resolver de modo autoconsistente. De maneira geral, costuma-se desprezar esse termo, de modo que se ignora a polarização instantânea que sofre o entorno, simplificando os cálculos. Dessa forma o hamiltoniano associado à interação de ambas as regiões é escrito em termos de coordenadas atômicas e se reduz a:

$$(Equação 3.4) \quad \hat{H}_{MQ/MM} = \sum_i \sum_\omega \frac{q_\omega}{r_{i\omega}} + \sum_\alpha \sum_\omega \frac{Z_\alpha q_\omega}{r_{\alpha\omega}} + \left[ \frac{A_{\alpha\omega}}{r_{\alpha\omega}^{12}} - \frac{B_{\alpha\omega}}{r_{\alpha\omega}^6} \right]$$

O primeiro termo contém as coordenadas eletrônicas ( $\vec{r}_i$ ), motivo pelo qual aparece em forma de integral de interação eletrônica entre os centros no ciclo do campo autoconsistente (do inglês, *self-consistent-field* – SCF).



**Figura 3.4** Descrição da função de onda do subsistema MQ, em que e- são os elétrons envolvidos no subsistema QM e n representa o núcleo atômico dos átomos envolvidos no subsistema QM.

### 3.2.2 Interação de não ligação

Há ocasiões em que não se pode desprezar o efeito polarizante que provocam algumas moléculas do meio (quando estão próximas às moléculas dos reagentes). Nessas ocasiões, essas moléculas devem ser incluídas no subsistema quântico. Essa solução, aparentemente simples no caso de se trabalhar em solução, pode não ser tão simples quando se trabalha com enzimas. No caso de proteínas em que os resíduos próximos atuam ativamente na reação, formando, por exemplo, ligação covalente com o substrato, não é possível uma partição nítida dos distintos subsistemas MQ e MM. Nesses casos, deve-se recorrer a algum tipo de aproximação que permita satisfazer as valências dos átomos quânticos que definem a ligação entre a região quântica e a região clássica, por onde se produzirá a divisão (ligação de fronteira). Podem-se usar os métodos baseados no formalismo do campo local autoconsistente (LSCF)<sup>27,28</sup>, que excluem do cálculo SCF o orbital do átomo quântico que forma parte da ligação de fronteira, permanecendo congelado durante todo o processo de otimização (Figura 3.5a). Tanto os coeficientes que definem o orbital congelado como sua população eletrônica devem ser determinados previamente empregando cálculos quânticos de modelos reduzidos. Outros métodos são os que empregam átomos adicionais de união (*link atom*)<sup>9,29</sup>. Nesses métodos, a valência dos átomos quânticos afetados

pelo corte é completada empregando átomos de união (que serão por sua vez incluídos no subsistema quântico), de modo que substituam a região MM da ligação de fronteira (Figura 3.5b). As características que devem apresentar os átomos de união não estão completamente estabelecidas, variando tanto sua natureza como o tipo de interação que são permitidas com o entorno clássico. No que diz respeito ao tipo de átomo, este deverá reproduzir com certa medida as propriedades (tanto eletrônica como espaciais) do grupo que substitui. Apesar disso, entre as distintas opções (como o uso de halogênios), o mais comum a ser empregado é o átomo de hidrogênio.

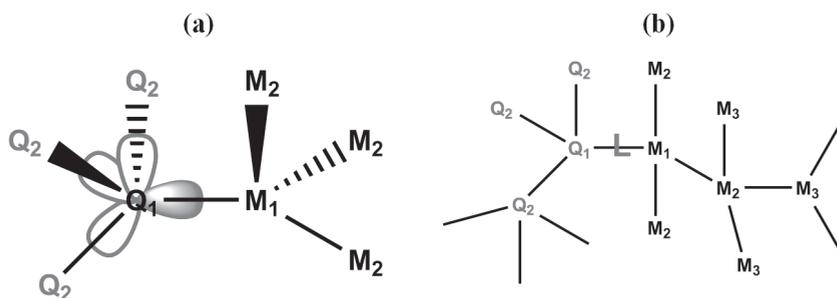


Figura 3.5 Representação dos métodos de complemento de valência. Este esquema localiza os orbitais híbridos da ligação e os mantém congelados. Dessa forma, eles completam a região QM, substituindo a ligação cortada.

### 3.2.3 Superfície de energia potencial

Para se estudar uma determinada reação enzimática, geralmente pode-se obter uma superfície de energia potencial (SEP) (Figura 3.6) que descreva as mudanças de certas coordenadas atômicas. As superfícies de energia potencial surgem no contexto da aproximação de Born-Oppenheimer, em que se realiza uma separação no tratamento da dinâmica dos núcleos e dos elétrons<sup>26</sup>. Quando se aplica tal aproximação à equação de Schrödinger independente do tempo pode-se expressar a função de onda e energia como uma função paramétrica das posições dos núcleos. Dessa forma, para cada configuração nuclear se obtém uma solução para o sistema eletrônico, o qual depende das coordenadas do núcleo ( $\vec{r}_\alpha$  e  $\vec{r}_\omega$ ). Ao variar tais coordenadas surge a superfície de energia potencial, uma vez que, resolvido o problema eletrônico, o cálculo da contribuição da energia potencial é imediato. A SEP uma vez obtida permite caracterizar cada espécie participante no processo

de reação (reativos, produtos, intermediários e estruturas de transição), bem como mostra possíveis caminhos de reação.

Tanto para analisar ou localizar os pontos estacionários sobre a superfície de energia potencial, é necessário conhecer o vetor gradiente ( $\vec{G}$ ) e a matriz hessiana ( $H$ ) da energia:

$$(Equação 3.5) \quad \mathcal{U}(r_{\alpha,\omega}) = \mathcal{K}_{El}(r_i) + \mathcal{U}_{El}(r_i, r_{\alpha}, r_{\omega}) + \mathcal{U}_{Nuc}(r_{\alpha}, r_{\omega})$$

$$(Equação 3.6) \quad \vec{G} = \begin{pmatrix} \frac{\partial \mathcal{U}(r_{\alpha,\omega})}{\partial r_{\alpha x}} \\ \dots \\ \frac{\partial \mathcal{U}(r_{\alpha,\omega})}{\partial r_{\omega z}} \end{pmatrix} \quad H = \begin{pmatrix} \frac{\partial^2 \mathcal{U}(r_{\alpha,\omega})}{\partial r_{\alpha x}^2} & \dots & \frac{\partial^2 \mathcal{U}(r_{\alpha,\omega})}{\partial r_{\omega z} \partial r_{\alpha x}} \\ \dots & \dots & \dots \\ \frac{\partial^2 \mathcal{U}(r_{\alpha,\omega})}{\partial r_{\alpha x} \partial r_{\omega z}} & \dots & \frac{\partial^2 \mathcal{U}(r_{\alpha,\omega})}{\partial r_{\omega z}^2} \end{pmatrix}$$

Todo ponto estacionário supõe um vetor gradiente nulo ( $\vec{G} = \vec{0}$ ), enquanto a natureza do ponto estacionário está armazenada na matriz hessiana. Em função dos valores próprios da matriz hessiana, os pontos estacionários da SEP podem ser classificados como:

- a) Mínimos (ou de ordem zero): se possuem unicamente valores próprios positivos. Tal comportamento deve-se ao fato de que qualquer deslocamento que se realize sobre o ponto conduz a uma situação de maior energia. A esta categoria pertencem estruturas estáveis, como reagentes, intermediários e produtos de reação.
- b) Pontos de sela (ou primeira ordem): se caracterizam por apresentar um único valor próprio negativo, de modo que todas as possíveis modificações da geometria nuclear dão lugar a incremento da energia, exceto em uma direção que conecta o ponto com os mínimos associados. Esses pontos correspondem às estruturas de transição.

Tanto o vetor gradiente quanto a matriz hessiana, além de servirem como provas para caracterizar as estruturas obtidas, podem ser empregados também para localizar tais estruturas<sup>30</sup>. A superfície de energia potencial está intimamente relacionada com o conceito de mecanismo de reação, uma vez que em toda reação química existe uma coordenada interna, ou combinação destas, que rege o trânsito entre as duas espécies, portanto, é possível representar a energia potencial unicamente em função de uma coordenada, denominada coordenada de reação. Assim se dispõe da maior quantidade de informação possível: a posição relativa das distintas estruturas localizadas (tanto a energia

como em termos geométricos) e o caminho como variação de coordenada de reação que as une, denominado caminho de reação. Além disso, as estruturas que definem o caminho de reação devem possuir um vetor gradiente cujas componentes devem ser nulas, exceto as que estejam associadas à própria coordenada de reação, ou seja, as geometrias dadas estão em situação de mínimo para todas as variáveis que formem parte da coordenada de reação. Em geral, costuma-se optar pela combinação de coordenadas internas que apresentam um maior peso<sup>31</sup>, denominando-se então coordenadas distinguidas.

### 3.2.4 Potencial de força média

Em geral, as simulações computacionais de reações químicas apresentam dois desafios: o primeiro é a descrição acurada das moléculas presentes no sistema e o segundo é amostragem estatística suficiente para assegurar que os resultados tenham relevância do ponto de vista termodinâmico<sup>32,33</sup>. Para calcular propriedades termodinâmicas, é necessário um número muito grande de informações sobre os distintos estados acessíveis ao sistema. As simulações de dinâmica molecular (DM)<sup>33-37</sup> e de Monte Carlo (MC)<sup>38-39</sup> fornecem valiosas informações termodinâmicas e são empregadas para avaliar as distintas conformações de um sistema. Dessa forma, apesar das numerosas vantagens que oferece a exploração da superfície de energia potencial para reações em fase condensada, tanto em nível de mecanismo de reação como de caracterização de pontos estacionários, não é recomendável recorrer unicamente a essa técnica para estudar reações químicas. A razão baseia-se no efeito do meio: a presença de inúmeras conformações (ou estados) acessíveis, de baixo custo energético, se traduz no aumento da “rugosidade” na superfície de energia potencial. O efeito final é o agrupamento de pontos estacionários em família (unidos através dos correspondentes caminhos de reação), que se diferenciam principalmente em pequenas mudanças geométricas.

Portanto, em vez de obter somente a superfície de energia potencial, torna-se mais útil dispor de um observável de energia livre que dependa, por sua vez, da coordenada de reação. O potencial de força média (*potential of mean force* – PMF) se ajusta bem a essa definição:

$$\text{(Equação 3.7)} \quad PMF(\epsilon_0) \propto -\frac{1}{\beta} \ln \langle p(\epsilon_0) \rangle$$

em que  $\langle p(\epsilon_0) \rangle$  corresponde à média da função de probabilidade para a coordenada de reação:

$$(Equação 3.8) \quad \langle p(\varepsilon_0) \rangle = \frac{\int \delta[\varepsilon_0 - \varepsilon(r)] e^{-\beta u(r)} dr}{\int e^{-\beta u(r)} dr}$$

O delta de Dirac na equação anterior assegura que unicamente leva-se em consideração a coordenada de reação elegida,  $\varepsilon_0$ .

Um método para calcular o PMF foi descrito por Kumar e colaboradores em 1992<sup>40</sup>. Nesse método, a função de distribuição de probabilidade se expressa com uma combinação de um número  $\mathcal{W}$  de funções de distribuição para distintos valores da coordenada de reação ( $\varepsilon_{0,i=1,\mathcal{W}}$ ):

$$(Equação 3.9) \quad \langle p(\varepsilon_0) \rangle = \sum_i^{\mathcal{W}} c_i \langle p(\varepsilon_{0,i}) \rangle \left\{ \begin{array}{l} \sum_i^{\mathcal{W}} c_i = 1 \\ \langle p(\varepsilon_0)^2 \rangle - \langle p(\varepsilon_0) \rangle^2 \text{ Mínimo} \end{array} \right.$$

em que os coeficientes  $c_i$  são eleitos de modo a se minimizar o erro aleatório. As dinâmicas moleculares são realizadas com distintos valores de  $\varepsilon_{0,i}$  (denominados janelas), de onde serão obtidas as correspondentes funções de distribuição  $\langle p(\varepsilon_{0,i}) \rangle$  (ou histograma de frequência).

Neste ponto, o problema continua sendo a capacidade de exercer o controle sobre o processo de exploração das dinâmicas, uma vez que toda janela que tenha sua origem numa região que não corresponda a um mínimo evoluirá até estados de menor energia. Deve-se levar em consideração que, diferentemente da superfície de energia potencial, nas dinâmicas moleculares o sistema possui sempre uma quantidade de energia mínima, associada à existência de agitação térmica. Dentre os distintos métodos existentes, um dos mais empregados é denominado *umbrella sampling*. Essa técnica permite recuperar o valor de uma variável à qual foi aplicada uma restrição durante o processo de medida. Por exemplo, supondo que se pretende calcular o valor médio de uma variável,  $\mathcal{X}$ , o qual está definido por uma função de potencial determinada,  $U(r)$ , é possível demonstrar que existe uma relação entre o valor médio, o qual é obtido – *denominando restrições* (“*biased*”) – aplicando uma função  $\mathcal{V}_{Umb}(r)$  que restrinja algum aspecto do sistema:

$$(Equação 3.10)$$

$$\langle \mathcal{X} \rangle = \frac{\int \mathcal{X}(r) e^{-\beta u(r)} dr}{\int e^{-\beta u(r)} dr} = \frac{\int \frac{\mathcal{X}(r)}{\mathcal{V}_{Umb}(r)} \mathcal{V}_{Umb}(r) e^{-\beta u(r)} dr}{\int \mathcal{V}_{Umb}(r) e^{-\beta u(r)} dr} = \frac{\int \mathcal{V}_{Umb}(r) e^{-\beta u(r)} dr}{\int \frac{1}{\mathcal{V}_{Umb}(r)} \mathcal{V}_{Umb}(r) e^{-\beta u(r)} dr}$$

$$\langle \mathcal{X} \rangle = \frac{\langle \frac{\mathcal{X}(r)}{\mathcal{V}_{Umb}(r)} \rangle_{biased}}{\langle \frac{1}{\mathcal{V}_{Umb}(r)} \rangle_{biased}}$$

Dessa forma, sobre cada um desses intervalos (janelas) se aplica um potencial de “guarda-chuva” (“*umbrella*”), cuja única finalidade é evitar que se produzam desvios importantes no valor da coordenada interna:

$$(Equação 3.11) \quad \mathcal{V}_{Umb,i}(\varepsilon_{0,i}) = e^{\beta \frac{1}{2} K_{Umb,i} (\varepsilon_{0,i} - \varepsilon_{0,i}^{ref})^2}$$

Neste caso foi adotado um potencial tipo harmônico, caracterizado por uma constante de força  $K_{Umb,i}$ , e um valor de referência para coordenada de reação de uma determinada janela  $\varepsilon_{0,i}^{ref}$ . A definição de uma constante de força distinta para cada janela faz com que se intensifique o efeito da função nas zonas mais conflitantes (a região que envolve o estado de transição, por exemplo).

O seguinte passo é a construção da função de distribuição de probabilidade para cada uma das janelas, a partir dos dados obtidos durante a simulação:

$$(Equação 3.12) \quad \langle p(\varepsilon_{0,i}) \rangle = \frac{e^{-\frac{1}{2}\beta K_{Umb,i} (\varepsilon_{0,i} - \varepsilon_{0,i}^{ref})^2} \langle p(\varepsilon_{0,i}) \rangle}{\langle e^{-\frac{1}{2}\beta K_{Umb,i} (\varepsilon_{0,i} - \varepsilon_{0,i}^{ref})^2} \rangle}$$

Finalmente, ao gerar por combinação linear a função total de distribuição, os coeficientes  $c_i$  resultam dependentes do valor do PMF nas distintas janelas (PMF ( $\varepsilon_{0,i}$ )).

$$(Equação 3.13) \quad \begin{cases} \langle p(\varepsilon_0) \rangle = \frac{\sum_i^W n_i \langle p(\varepsilon_{0,i}) \rangle_{biased}}{\sum_j^W n_j e^{-\beta (V_{Umb,j} - PMF(\varepsilon_{0,j}))}} \\ e^{-\beta PMF(\varepsilon_{0,i})} = \int \text{caminho de reação} \langle p(\varepsilon_0) \rangle \mathcal{V}_{Umb,i}(\varepsilon_0) d\varepsilon_0 \end{cases}$$

em que  $n_{i/j}$  representa o número de dados empregados para calcular a função de distribuição de probabilidade de uma determinada janela. Este acoplamento entre as distintas janelas resolve-se por interações de modo auto-consistente: inicialmente se determina um valor a todas as energias livres [PMF ( $\varepsilon_{0,i}$ )] (usualmente zero), resolvendo-se a equação anterior, obtendo assim um conjunto de energias melhorado. O processo é então repetido com este novo grupo de valores e a interação segue até que sejam produzidas modificações tanto nas energias livres como na função de densidade total<sup>41</sup>.

### 3.2.5 Perturbação de energia livre

Outro método usado para prever a energia livre de reações enzimáticas, ou ainda a energia livre de ligação entre o ligante e a proteína, é o método de perturbação de energia livre (*free energy perturbation* – FEP)<sup>42</sup>. A FEP baseia-se na equação de Zwanzig (Equação 3.14), a qual expressa a energia livre como a diferença de energia potencial média entre um estado inicial (0) e um final (1), levando em consideração uma média de configurações. A diferença de energia livre, que acompanha a transformação entre um estado inicial (0) e um estado final (1), pode ser escrita como:

$$\text{(Equação 3.14)} \quad \Delta G(0 \rightarrow 1) = -k_B T \ln \langle \exp[-(E_1 - E_0)/k_B T] \rangle_0$$

em que  $k_B$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura,  $E_1 - E_0$  é a diferença de energia entre os estados (0) e (1) e  $\langle \dots \rangle_0$  indica a média de *ensemble* para o estado (0). O método FEP, quando combinado com dinâmica molecular, pode ser usado para estudar a interação enzima-inibidor e o mecanismo de reação.

## 3.3 APLICAÇÕES

### 3.3.1 Mecanismo enzimático molecular como ponto de partida para o desenvolvimento de inibidores análogos ao estado de transição

A teoria do estado de transição foi desenvolvida por Henry Eyring em 1935<sup>43</sup>, o que provavelmente foi uma das maiores contribuições para química no século XX. Tal teoria foi desenvolvida de acordo com os princípios da termodinâmica, cinética e mecânica estatística<sup>44</sup>. Eyring tomou como base a ideia de que as forças entre os átomos resultam de movimentos e distribuição dos elétrons e devem ser calculadas com base na mecânica quântica. Entretanto, pode-se assumir que o movimento dos núcleos dos átomos pode ser tratado de acordo com a mecânica clássica; assim, torna-se possível calcular constantes cinéticas de reação através da mecânica estatística<sup>43</sup>.

O estado de transição (ET) pode ser definido como um grupo instável de átomos, em que ligações químicas podem ser formadas ou quebradas levando à formação do produto ou do reagente, em que energeticamente o

ET é o ponto na coordenada de reação de maior valor de energia. Um grupo de átomos pode se organizar de infinitas maneiras, seguindo diferentes caminhos. Se a energia do sistema (grupo de átomos) para os estados quânticos de menor energia for plotada em função das distâncias entre os núcleos, obtém-se uma superfície de energia potencial que descreve o movimento dos núcleos (Figura 3.6), na qual se pode observar diferentes caminhos de reação, em que as regiões de menor energia na superfície correspondem às moléculas que são separadas por baixas barreias de energia (Figura 3.6). Uma reação consiste em um sistema passando de uma região de menor energia para outra na superfície<sup>43</sup>, onde o complexo ativado ou estado de transição corresponde ao ponto mais alto ao longo do caminho de menor energia (Figura 3.6). À luz da mecânica estatística, o estado de transição é definido como o ponto no qual a energia de formação ou quebra de ligação tem igual probabilidade de conduzir o ET ao produto ou ao reagente.

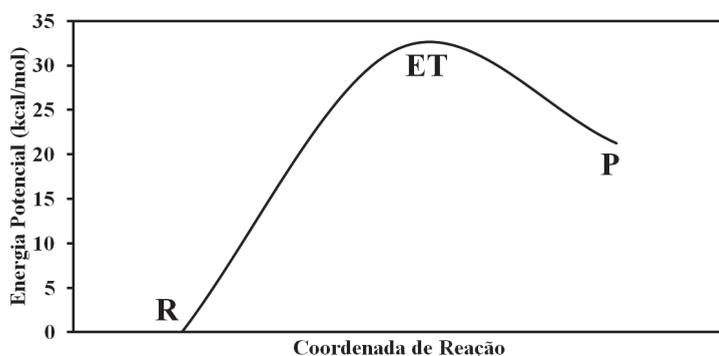


Figura 3.6 Representação esquemática de uma superfície de energia potencial.

A maior aplicação do estado de transição enzimático envolve o desenho de análogos ao ET, uma vez que esses análogos podem formar ligações com as enzimas milhões de vezes mais forte do que o substrato natural, o que torna a pesquisa nessa área promissora para o desenvolvimento de fármacos. Finalmente, podemos definir como análogos ao ET estruturas químicas que imitam características geométricas e propriedades físico-químicas do ET.

Nesta seção serão apresentados resultados de uma pesquisa desenvolvida recentemente por alguns dos autores deste capítulo, que trata do estudo do mecanismo catalítico da enzima hOGA envolvendo o substrato O-GlcNac, fazendo uso de métodos híbridos MQ/MM, SEP e PMF.

### 3.3.1.1 Alvo estudado

A reação estudada ocorre em quase todas as células eucarióticas em que algumas proteínas são glicosiladas. Nessa reação está envolvido o sacarídeo *N*-acetil- $\beta$ -glicosamina, conhecido também como *O*-GlcNac, que se liga aos resíduos de serina e treonina de glicoproteínas através de grupos hidroxilas. A enzima que atua na hidrólise do *O*-GlcNac (Figura 3.7) no corpo humano é chamada de *O*-GlcNacase humana (hOGA), que é um membro da família 84 glicosídeo hidrolase (GH 84)<sup>45</sup>. Alguns estudos mostram que hOGA usa um mecanismo envolvendo o grupo alfa-acetamido do substrato *O*-GlcNac para realizar a clivagem de tal substrato a partir de resíduos de serina ou treonina de proteínas modificadas após a etapa de tradução<sup>46,47</sup>. A reação inicia com um aspartato atuando como doador de próton e outro como receptor, o que favorece o ataque nucleofílico do oxigênio grupo carbonílico do substrato sobre o carbono do centro anomérico, levando à formação de um intermediário biciclo oxazolina, como mostrado na Figura 3.7<sup>48</sup>. No

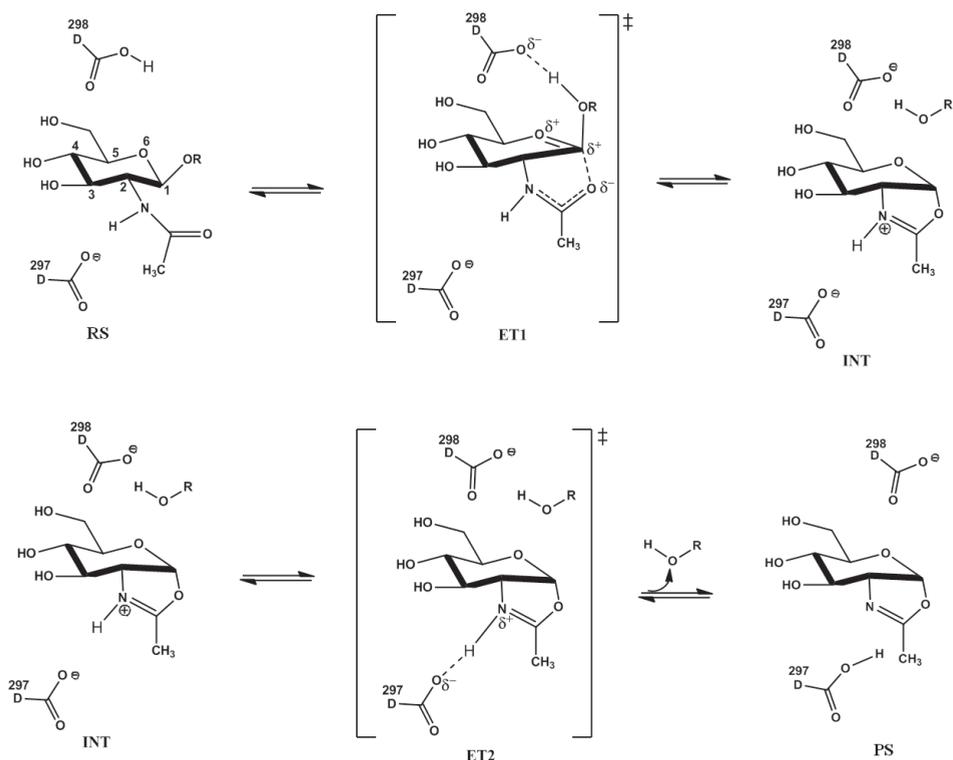


Figura 3.7 Representação esquemática do mecanismo proposto experimentalmente.

segundo passo da reação ocorre a abertura do ciclo formado. A ruptura do intermediário oxazolina é provocada via ataque de uma molécula de água (que atua como uma base) sobre o centro anomérico. Pela Figura 3.7 pode-se observar que a reação global ocorre em dois planos ordenados, cada um envolvendo inversão estereoquímica no centro anomérico, sendo que a reação global ocorre com a retenção estereoquímica<sup>49</sup>. O desenvolvimento racional de inibidores de hOGA vem sendo um tópico importante de pesquisa durante anos, e tal interesse deve-se ao fato de que esses inibidores são promissores agentes terapêuticos que podem ajudar no combate de doenças neurodegenerativas, câncer e diabetes tipo II<sup>50-55</sup>.

### 3.3.1.2 Métodos

A estrutura de partida foi obtida no banco de dados de proteínas (Protein Data Bank – PDB) com o código (2CBJ)<sup>56</sup>, em que o substrato foi desenhado usando as mesmas coordenadas do inibidor (PUGNAc) complexado à estrutura da proteína. O pKa foi calculado para os distintos estados de protonação dos resíduos ionizáveis (ASP, GLU, HIS, TYR e LYS) usando o servidor *propKa*<sup>57</sup>. Em seguida, átomos de hidrogênios foram adicionados à estrutura da proteína considerando o estado de protonação dos aminoácidos a um pH 7. Por conseguinte, a enzima foi colocada em uma caixa cúbica (80 Å de lado) de água com moléculas TIP3P, tendo como centro de massa o substrato. Para reduzir o tempo de cálculo computacional, todos os resíduos que estavam a uma distância maior do que 20 Å do centro de massa foram congelados. O substrato foi descrito pelo método semiempírico AM1<sup>19</sup>, estando, portanto, dentro da região MQ. Os aspartatos 297 e 298 foram incluídos na região MQ (Figura 3.8a), o restante do sistema foi tratado com campo de força OPLS-AA. O sistema estudado apresentou um total de 23.465 átomos e 5.346 resíduos. O número de átomos móveis corresponde a 4.224, enquanto o número de átomos fixos corresponde a 19.247. No total, foram realizados 1,1 ns de dinâmica molecular (DM) através dos algoritmos Langevin-Verlet considerando uma temperatura de 300 K.

A energia livre associada à transferência de próton e à formação do ciclo foi determinada usando PMF obtido através do método WHAM<sup>36</sup>, do inglês, *weighted histogram analysis method*, o qual traduzimos como método de análise de histogramas ponderados. Esse método foi combinado com *umbrella sampling*<sup>58</sup> seguindo a implementação da biblioteca fDynamo<sup>59</sup>, usada para realizar todas as simulações descritas aqui. Como já comentado

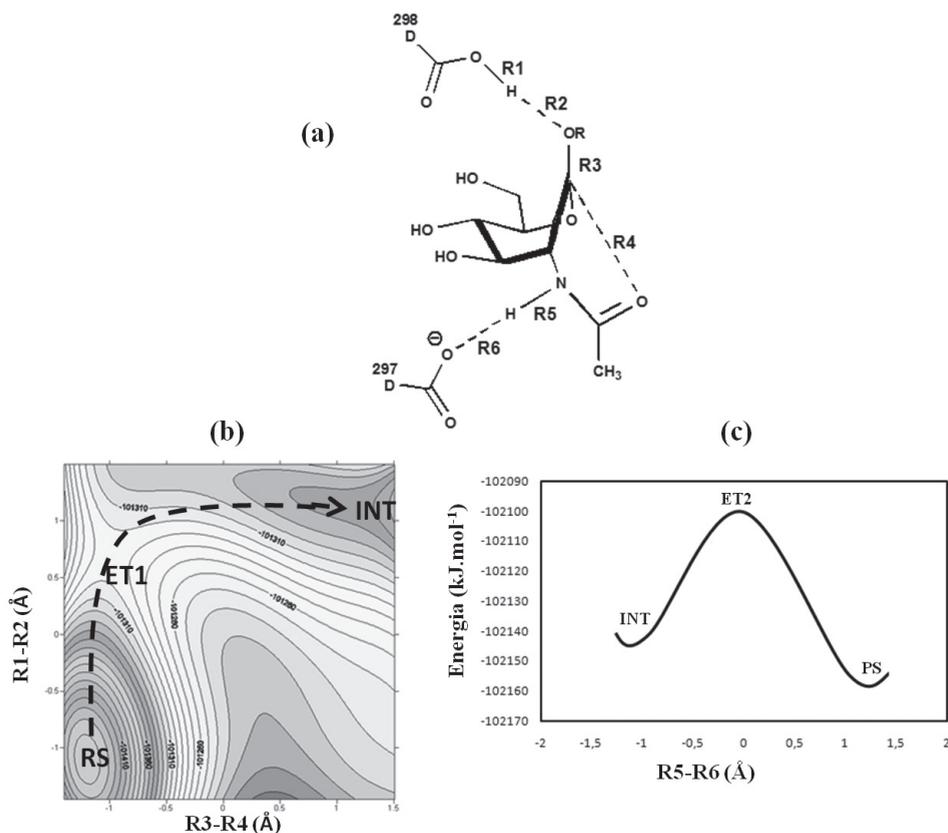


Figura 3.8 Resultados obtidos. (a) Coordenadas de reação utilizadas; (b) SEP-2D; (c) PMF.

na Seção 3.2, de fundamentação teórica, a realização do PMF requer uma série de simulações de dinâmica molecular na qual uma coordenada de reação é fixada em torno de um determinado valor, sendo que foi gerado um total de 39 simulações. Para cada simulação foi realizado 5,0 ps de relaxamento seguido de 10,0 ps de produção usando passos de 0,5 fs.

O uso de hamiltonianos *ab initio* é muito limitado quando se aplicam métodos híbridos MQ/MM. A forma mais viável do ponto de vista do tempo computacional é usar hamiltonianos semiempíricos, que são menos acurados. Uma das alternativas para inclusão de tratamento *ab initio* em cálculos MQ/MM é o uso da paradinâmica (PD)<sup>60,61</sup>, que fornece uma maneira eficiente de incluir um tratamento *ab initio* nos cálculos de energia livre usando os métodos MQ/MM. O ponto de partida para se aplicar PD é usar um potencial de referência, por exemplo, os métodos empíricos de ligação

de valência (*empirical valence bond* – EVB)<sup>61</sup>, e a partir desse potencial de referência aplicam-se perturbações que permitem a determinação de um potencial *ab initio* para descrever o perfil de uma determinada reação em fase condensada<sup>61</sup>. A alternativa para incluir o tratamento *ab initio* na descrição de reações de fase condensada através de MQ/MM é usar correções interpoladas propostas por Truhlar<sup>62</sup> e implementadas por Ruiz-Penia<sup>63</sup>. No exemplo mostrado aqui, optamos por esta última para incluir as correções *ab initio* nas simulações MQ/MM, a fim de evitar as parametrizações exigidas pelo método EVB. O hamiltoniano Austin model 1 (AM1) foi usado para descrever a região MQ na construção das SEPs e PMF 2D e, em seguida, as correções foram feitas em nível B3LYP/6-31(d) usando estruturas obtidas com o método AM1/MM. Mais detalhes podem ser encontrados nas referências<sup>63-67</sup>.

### **3.3.1.3 Resultados e discussão**

#### SEP e PMF

Para estudar o mecanismo de reação em questão, foram geradas diferentes superfícies de energia potencial (SEP) usando combinações das distâncias mostradas na Figura 3.8a. As superfícies foram geradas considerando o substrato e os aspartatos 298 e 297 como quânticos (tratados com o método AM1), e o restante do sistema foi tratado com mecânica molecular. Com base nas superfícies de energia potencial foi proposto um mecanismo por etapas, no qual pode ocorrer a formação de um intermediário (Figura 3.7). Aqui mostramos apenas a SEP (Figura 3.8b). De acordo com os resultados, o fechamento do ciclo pode ocorrer durante a transferência do hidrogênio do aspartato 298 para o substrato (Figura 3.8c), enquanto a transferência do próton do substrato para o Asp297 pode ocorrer após o fechamento do ciclo. Na Figura 3.10, a região de menor energia é representada pela coloração verde, enquanto a região de maior energia é representada pela cor azul. A diferença de energia entre as estruturas de transição na região ET1 e os reagentes (RS) corresponde a 35,0 Kcal/mol, enquanto a diferença de energia entre INT correspondeu a 12,0 Kcal/mol. Deve-se destacar que esses resultados foram comparados com outras propostas de mecanismo através de diferentes SEP geradas. Em seguida, o PMF em 2D foi determinado usando AM1/MM, levando-se em consideração as mesmas coordenadas da SEP

comentada acima, em que a energia livre de ativação para o ET1 e ET2 correspondeu a 46,6 Kcal/mol e 9,6 Kcal/mol respectivamente. Com base nestes resultados pode-se inferir que a formação do INT é a etapa limitante da reação. A barreira de energia obtida com PMF 2D AM1/MM foi corrigida utilizando-se B3LYP(6-31(d))/MM, resultando em uma energia livre de ativação de 37,0 Kcal/mol, valor ainda elevado para o tipo de reação estudada, o que pode ser explicado pelo fato de as correções terem sido realizadas com base em geometrias obtidas com método AM1/MM. Por outro lado, as correções usadas apresentam um valor de energia de ativação significativamente mais baixo do que o obtido através do método AM1/MM.

### Mapa do potencial eletrostático (MPE)

O mapa do potencial eletrostático (MPE) pode ser definido como a interação de energia entre distribuição de cargas de uma molécula e uma unidade de carga positiva. Em outras palavras, o potencial eletrostático de um ponto definido pelas coordenadas  $x$ ,  $y$  e  $z$  é obtido em termos da energia do potencial eletrostático entre uma carga imaginária (+1) e a molécula em questão. Caso a carga seja atraída pela molécula, o potencial é negativo, se a carga for repelida pela molécula, o potencial é positivo. Os MPEs fornecem informações importantes para a predição de reatividade química, e também podem ser usados para demonstrar similaridades entre pontos estacionários e inibidores.

Entre os inibidores conhecidos de glicosídeo hidrolase estão o PUGNAC (Figura 3.9), NAG-tiazolina e GlcNAcstatin, sendo que este último é o mais potente<sup>70</sup>. No exemplo tratado aqui, usamos as estruturas do RS, ET1, ET2 e PS obtidas através da SEP e do PMF para calcular o MEP. Em seguida comparamos o MEP dos pontos estacionários com o MEP dos inibidores citados acima. Os resultados foram encorajadores, pois a distribuição de carga do inibidor mais potente é semelhante a do TS1 (Figura 3.8), o que está de acordo com dados experimentais e com a ideia de Pauling, comentada no início do capítulo, de que os inibidores AET seriam mais efetivos. Na Figura 3.9 queremos ilustrar a importância da construção da SEP e PMF para determinação dos pontos estacionários (R, ET e P) e, conseqüentemente, para o entendimento de reações enzimáticas. Além disso, queremos ilustrar a possibilidade de desenhar moléculas semelhantes ao ET. Mais informações sobre o exemplo mostrado aqui podem ser obtidas a partir da referência<sup>65</sup>.

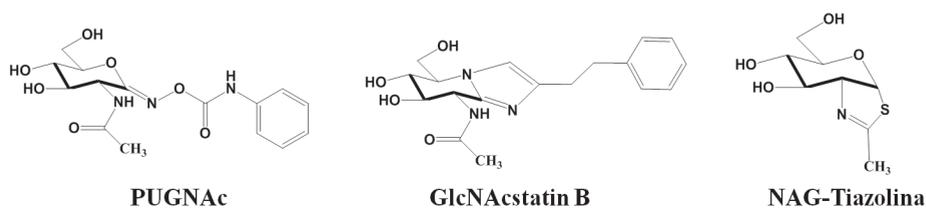


Figura 3.9 Inibidores de glicosídeo hidrolase utilizados neste estudo.

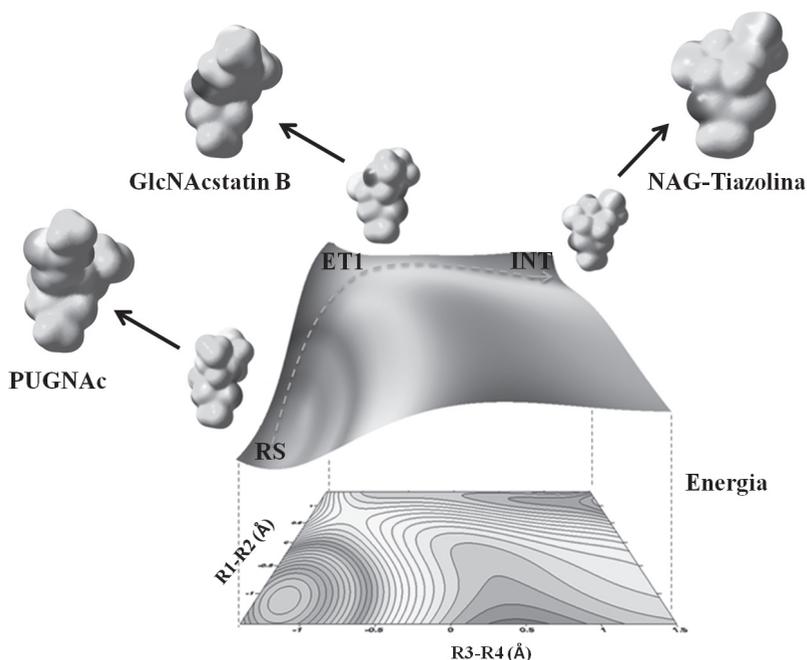


Figura 3.10 PMF-2D do mecanismo enzimático.

### 3.3.2 Desenho racional de catalisadores biológicos

O estudo de reações químicas e a síntese de moléculas complexas compreendem um campo de estudo e pesquisa ainda a ser explorado, uma vez que a própria natureza possui habilidade de produzir estruturas moleculares complexas envolvidas nos importantes processos da vida como, por exemplo, no reconhecimento molecular e na catálise enzimática. Apesar de a

catálise química ser uma área bastante explorada, a habilidade ilimitada de selecionar ou produzir catalisadores específicos para qualquer transformação química desejada, a partir de qualquer reagente químico, ainda não foi concretizada. Assim, o desenho racional de catalisadores específicos ainda é um árduo problema tanto para os químicos sintéticos como para os bioquímicos. Dessa forma, uma alternativa bem-sucedida para esse problema faz uso da diversidade do sistema imune para produzir uma nova classe de enzimas: os anticorpos catalíticos<sup>68</sup>.

Anticorpos catalíticos são proteínas, pertencentes à classe das globulinas, produzidas pelo sistema imune para reconhecer substâncias estranhas, chamadas de antígenos, e iniciar o processo de neutralização ou destruição de tais agentes estranhos. A habilidade em selecionar um dentre  $10^{12}$  possíveis anticorpos que se ligam virtualmente a qualquer molécula-alvo torna o sistema imune uma fonte atrativa de catalisadores específicos. O princípio básico para a geração de anticorpos catalíticos foi primeiramente proposto por Jencks<sup>6</sup> e construído no preceito de Pauling<sup>3</sup>, em que as enzimas seriam moléculas complementares ao complexo ativado da reação na qual atuam como catalizadores, sendo que a atração da enzima pelo complexo ativado levaria a uma diminuição de energia<sup>3</sup>. Dessa forma, as enzimas podem ser comparadas aos anticorpos, que são estruturas complementares aos antígenos. As enzimas possuem seu poder de catálise especificado a partir de seu processo de evolução, então, ao se produzir um anticorpo catalítico, uma atividade secundária é adquirida pela enzima em questão. Enzimas catalisam reações por estabilizarem preferencialmente estados de transição, proporcionando diminuição da energia livre de ativação ao longo da coordenada de reação. Anticorpos são extremamente eficientes quanto à capacidade de ligação, podendo exceder a de enzimas, mas o fazem ao estado fundamental<sup>69</sup>.

Nesta seção serão apresentados resultados de uma pesquisa desenvolvida por Martí e colaboradores<sup>70</sup> sobre a proposta de desenho racional de anticorpos catalíticos a partir do uso de métodos híbridos MQ/MM e PMF.

### **3.3.2.1 Alvo estudado**

Como ponto de partida para o estudo de uma reação no meio enzimático, utiliza-se uma estrutura cristalográfica da proteína que contenha uma molécula que seja estável e análoga ao estado de transição (ET); entretanto, essa molécula não corresponde ao substrato real de que a proteína necessita para realizar a catálise. Nesse ponto, dois inconvenientes surgem: em primeiro

lugar, as interações encontradas entre a molécula análoga e os resíduos que compõem o sítio catalítico da proteína não correspondem exatamente às que são encontradas para o ET e, em segundo lugar, as técnicas experimentais de cristalografias não refletem a flexibilidade do sistema. Essas limitações levam apenas a uma parcial compreensão do completo mecanismo molecular da reação química catalisada pela proteína<sup>71-73</sup>, o qual necessita de técnicas adicionais para sua completa elucidação. Nesse ponto, os métodos de modelagem molecular tornam-se cruciais não só para a elucidação dessa reação, bem como, para a proposição de mudanças estruturais (ou mutações) que favoreçam ou não o caminho reacional.

No estudo realizado por Martí e colaboradores<sup>70</sup> um protocolo teórico é apresentado com o objetivo de avaliar a eficiência de um anticorpo catalítico, denominado 1F7, que catalisa a corismato a pufenato por um rearranjo (Figura 3.11). As informações obtidas pelos métodos computacionais aplicados permitiram a proposta de mutação de um resíduo que componha o sítio catalítico da proteína, sendo que essa mutação levou a uma diminuição da energia de ativação do sistema em relação ao estado original (não mutado), favorecendo aumento da constante de velocidade da reação em um grau de magnitude ( $10^3$ )<sup>70</sup>.

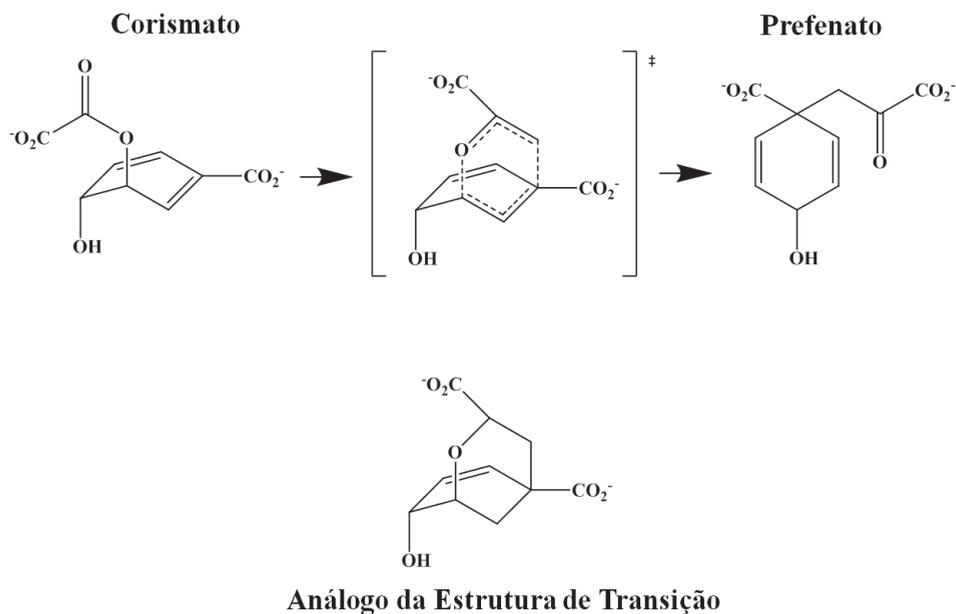


Figura 3.11 Mecanismo molecular do corismato a pufenato por rearranjo.

### 3.3.2.2 Métodos

Como relatado pelos autores do estudo, a estrutura cristalográfica contendo as coordenadas tridimensionais do sistema de interesse foi obtida do banco de dados de proteína (Protein Data Bank) com o código de acesso 1F7<sup>74</sup> (Figura 3.12). A mutação no sistema 1F7 foi induzida manualmente, e o resíduo Asn na posição 33 foi mutado para o resíduo Ser (Figura 3.13). Para simular a reação ocorrida no meio aquoso, todos os sistemas (proteína e substrato) foram imersos em uma caixa cúbica composta por moléculas de água. O substrato foi descrito utilizando o método de mecânica quântica AM1<sup>19</sup>, enquanto a proteína e as moléculas foram descritas com os métodos de mecânica clássica, formados pelos campos de forças OPLS-AA e TIP3P. As simulações foram realizadas utilizando o pacote computacional fDynamo<sup>59</sup>.

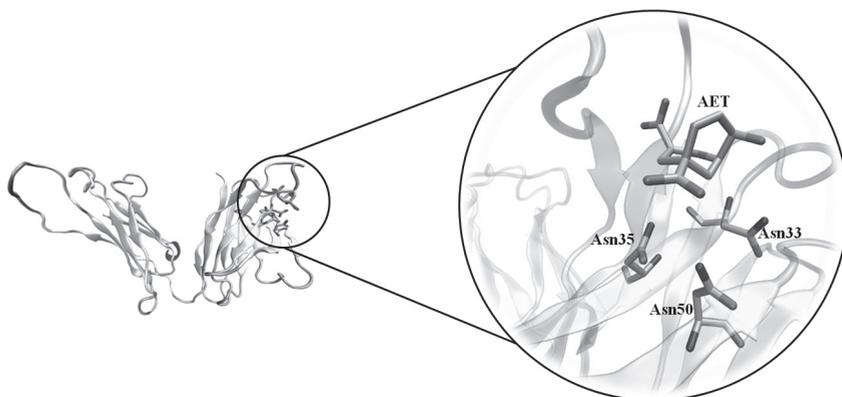


Figura 3.12 Representação da estrutura 3D do 1F7.

Os sistemas foram equilibrados a 300 K usando o *ensemble* canônico\* (NVT), em que N (número de átomos), V (volume) e T (temperatura) foram mantidos constantes ao longo do processo. O potencial de força média (PFM) foi obtido a partir da combinação antissimétrica de duas coordenadas de reação previamente determinadas pelos autores. O potencial parabólico

\* Um *ensemble* estatístico é um conjunto de vários sistemas que, apesar de suas condições iniciais diferentes, são idênticos a um sistema estatisticamente considerado. Em física estatística, *ensemble* canônico é um *ensemble* estatístico que modeliza um sistema físico em contato com um reservatório térmico de temperatura fixa, supondo que o volume e o número de partículas do sistema também são fixos. O *ensemble* canônico descreve tipicamente um sistema em contato com um reservatório térmico através de uma parede diatérmica, fixa e impermeável, mas sua aplicação transcende os limites da física.

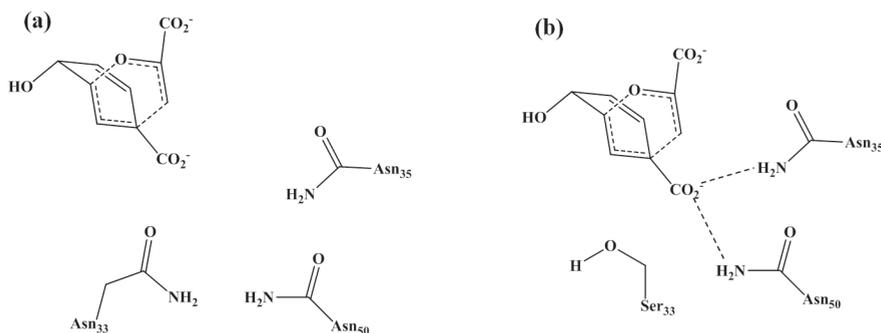


Figura 3.13 Principais interações induzidas pela mutação Asn33Ser.

que restringe as coordenadas de reação ao longo do processo reacional foi mantido com uma constante de  $2.500 \text{ KJ/mol.}\text{\AA}$ , durante uma série de 70 simulações. Cada uma dessas simulações consiste de 5 ps de um estágio de equilíbrio e 10 ps de um estágio de produção, sendo que apenas neste último os valores de coordenadas são considerados para o cálculo do PFM. Por fim, o método WHAM<sup>36</sup> foi utilizado para obter a função de probabilidade total das coordenadas de reação.

### 3.3.2.3 Resultados e discussão

A energia envolvida na catálise realizada pelo anticorpo catalítico 1F7 pode ser comparada com a eficiência catalítica das enzimas corismato mutase (CM), que são enzimas-chave na rota biossintética do chiquimato para a produção de aminoácidos aromáticos em bactérias, fungos e plantas<sup>75,76</sup>. As CM de diferentes organismos, como *Bacillus subtilis* (BsCM)<sup>77</sup> ou *E. coli* (EcCM)<sup>78</sup>, exibem similares propriedades cinéticas, uma vez que mantêm um grau de similaridade em sua sequência de aminoácidos. O 1F7 possui uma modesta atividade em relação a CM determinada experimentalmente<sup>79,80</sup>.

Dentre os resíduos importantes para a manutenção da atividade CM do 1F7 destacam-se os resíduos Asn33, Asn35 e Asn50 (Figura 3.11), que fazem parte da região catalítica desse anticorpo e, portanto, interagem diretamente no reconhecimento do substrato utilizado na catálise. Assim, Martí e colaboradores propuseram a mutação do resíduo Asn33 para Ser33, bem como analisaram qual a influência desta para a catálise realizada pelo 1F7.

Dentre os resultados mais relevantes, a mutação induziu uma redução da energia de ativação do processo em relação ao estado não mutado do 1F7. A energia obtida a partir do estado mutado desse anticorpo pode ser comparada de forma mais próxima aos resultados teóricos e experimentais encontrados para as enzimas (*BsCM*)<sup>77</sup> ou *E. coli* (*EcCM*)<sup>78</sup> (Tabela 3.1). Sendo assim, a eficiência catalítica do 1F7 foi melhorada quando o resíduo Asn33 foi mutado para Ser33. Ainda de acordo com os pesquisadores, a mutação induzida nesse estudo facilitou a acomodação do substrato no sítio catalítico do 1F7; dessa forma, também contribuiu para o seu reconhecimento e diminuição da energia envolvida no processo.

**Tabela 3.1** Valores teóricos e experimentais de energia livre<sup>70</sup>

	<i>BSCM</i>	<i>ECCM</i>	1F7	1F7 (ASN33SER)
$\Delta G_{\text{teo.}}^{\ddagger}$	20,6	20,9	27,5	23,0
$\Delta G_{\text{exp.}}^{\ddagger}$	15,4	17,2	21,6	–

Com o intuito de validar o método teórico aplicado, os autores do estudo verificaram a eficácia do método aplicado comparando os resultados teóricos e experimentais, como pode ser observado na Tabela 3.1. A princípio foram determinados os valores energéticos experimentais para as duas enzimas com atividade CM<sup>77,78</sup> e o anticorpo 1F7, também com atividade CM<sup>79,80</sup>. Os resultados teóricos encontrados estão em concordância com os resultados experimentais previamente determinados. Assim, o efeito da mutação sugerida no estudo em questão inferiu em uma diminuição da energia, portanto, o mesmo comportamento energético deve ser esperado experimentalmente. No entanto, é necessário que as mutações propostas por métodos computacionais sejam realizadas experimentalmente com o intuito de melhorar a atividade do anticorpo catalítico 1F7.

### 3.4 CONCLUSÕES

A diminuição da energia de ativação envolvida no processo de catálise pode implicar em um aumento na constante de velocidade na ordem de  $10^3$ , o que representa uma melhora na eficiência catalítica do anticorpo 1F7 com atividade CM. A partir do estudo realizado utilizando métodos computacionais juntamente com estratégias experimentais, abrem-se novas e eficientes

perspectivas para a produção de novos anticorpos catalíticos, bem como de enzimas com uma atividade secundária. Dessa forma, estes podem ser aproveitados nos campos farmacêutico e industrial, nos quais novas bio-transformações podem ser propostas sob um ponto de vista biotecnológico. Além disso, o mesmo procedimento pode ser aplicado para outros sistemas que possuam o mesmo interesse biológico.

### 3.5 PERSPECTIVAS FUTURAS

Em princípio, o entendimento detalhado de um determinado mecanismo enzimático pode contribuir para o desenho de potentes inibidores ou anticorpos catalíticos. Entretanto, até o momento os métodos apresentados aqui ainda não apresentam grande impacto nestas áreas, o que se deve principalmente ao elevado custo computacional que o emprego desses métodos ainda exige. No entanto, com o desenvolvimento de supercomputadores, esses métodos podem se tornar cada vez mais rotineiros para tais propósitos.

Deve-se enfatizar também que o desenho computacional de enzimas com base na ET ainda é um desafio muito grande, pois a sequência primária de uma determinada proteína pode assumir na prática inúmeras conformações. Por outro lado, muitos avanços já foram alcançados na área, entre os quais se pode destacar o desenho com êxito de sítios ativos enzimáticos para reações de Diels-Alder<sup>81</sup> e de eliminação de Kemp<sup>82</sup>. Em princípio, pode-se usar o protocolo descrito pelos autores do Rosetta<sup>83</sup> para desenho *de novo* de enzimas para qualquer reação química de interesse. Este protocolo consiste nas seguintes etapas: (1) escolher o mecanismo catalítico e determinação de um modelo de reação para o sítio ativo; (2) identificar regiões entre um conjunto de proteínas nas quais esta reação pode ser realizada; (3) determinar e otimizar resíduos vizinhos capazes de estabilizar o ET e os resíduos catalíticos; e (4) avaliar e classificar as sequências analisadas. Após a determinação por técnicas computacionais, as enzimas desenhadas podem ser produzidas e testadas experimentalmente.

Dessa forma, o desenho racional de sistemas biológicos estáveis, como as enzimas, os inibidores e os anticorpos, com novas atividades catalíticas, é de grande interesse prático e possui potenciais aplicações em biotecnologia, biomedicina e processos industriais, e não somente vistos de uma perspectiva teórica. Finalmente, na Tabela 3.2 são mostradas algumas aplicações de métodos de simulação computacional em sistemas de interesses biológicos.

Tabela 3.2 Aplicações computacionais de sistemas biológicos

BIOMOLÉCULA	PROCESSO ESTUDADO	NÍVEL MQ	NÍVEL MM	REF.
Várias	Mecanismo catalítico	AM1 DFT	CHARMM AMBER	84
Acetilcolinesterase	Mecanismo de inibição	DFT	AMBER	85
Protease de HIV-1	Interação de inibidores	AM1 DFT	OPLS	86
Lipase	Estudo de mutações	AM1	UFF	87
Dihidroorotato	Mecanismo catalítico	AM1 DFT	OPLS	67
D-Glucarato Desidratase	Reconhecimento de substrato	DFT	AMBER	88
Alcalino Fosfatase	Estabilização do estado de transição	AM1	CHARMM	89
Amido Hidrolase	Mecanismo de inibição	DFTB	CHARMM	90
Gliceraldeído-3-Fosfato Dehidrogenase	Mecanismo catalítico	AM1 DFT	OPLSA	66
Butirilcolinesterase	Estudo de mutações	DFT	AMBER	91

## REFERÊNCIAS

1. Warshel A. Computer simulations of enzyme catalysis: Methods, progress, and insights. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 2003;32: 425-43.
2. Ferrer S, et al. Hybrid schemes based on quantum mechanics/molecular mechanics simulations: goals to success, problems, and perspectives. In: Christov C, editor. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, Vol. 85: Computational Chemistry Methods in Structural Biology. Oxford: Academic Press; 2011. p. 81-142.
3. Pauling L. Nature of forces between large molecules of biological interest. *Nature*. 1948;161(4097):707-9.
4. Schramm VL. Transition States, Analogues, and Drug Development. *Acs Chemical Biology*, 2013;8(1):71-81.
5. Golynskiy MV, Seelig B. De novo enzymes: from computational design to mRNA display. *Trends in Biotechnology*. 2010;28(7):340-5.
6. Jencks WP. *Catalysis in Chemistry and Enzymology*. New York: M. Hill; 1969.
7. Warshel A, Levitt M. Theoretical studies of enzymic reactions – dielectric, electrostatic and steric stabilization of carbonium-ion in reaction of lysozyme. *Journal of Molecular Biology*. 1976;103(2):227-49.
8. Senn HM, Thiel W. QM/MM Methods for Biomolecular Systems. *Angewandte Chemie-International Edition*. 2009;48(7):1198-1229.
9. Field MJ, Bash PA, Karplus M. A combined quantum-mechanical and molecular mechanical potential for molecular-dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*. 1990;11(6):700-33.
10. Shurki A, Warshel A. Structure/function correlations of proteins using MM, QM/MM, and related approaches: Methods, concepts, pitfalls, and current progress. In: Daggett V, editor. *Protein Simulations*. Oxford: Academic Press; 2003. p. 249-313.
11. Gao JL. Hybrid quantum and molecular mechanical simulations: An alternative avenue to solvent effects in organic chemistry. *Accounts of Chemical Research*. 1996;29(6):298-305.
12. Bakowies D, Thiel W. Hybrid models for combined quantum mechanical and molecular mechanical approaches. *Journal of Physical Chemistry*. 1996;100(25):10580-94.
13. Arantes GM. Free-energy profiles for catalysis by dual-specificity phosphatases. *Biochemical Journal*. 2006;399:343-50.
14. Friesner RA, Beachy MD. Quantum mechanical calculations on biological systems. *Current Opinion in Structural Biology*. 1998;8(2):257-62.
15. Marti S, et al. Transition structure selectivity in enzyme catalysis: a QM/MM study of chorismate mutase. *Theoretical Chemistry Accounts*. 2001;105(3):207-12.
16. Field MJ. Simulating enzyme reactions: Challenges and perspectives. *Journal of Computational Chemistry*. 2002;23(1):48-58.

17. Lyne PD, Mulholland AJ, Richards WG. Insights into chorismate mutase catalysis from a combined QM/MM simulation of the enzyme reaction. *Journal of the American Chemical Society*. 1995;117(45):11345-50.
18. Ruiz-Pernia JJ, et al. A QM/MM study of the reaction mechanism for the 3'-processing step catalyzed by HIV-1 integrase. *Journal of Molecular Structure-Theochem*. 2009;898(1-3):115-120.
19. Dewar MJS, et al. The developments and use of quantum-mechanical molecular-models .76. AM1 – A new general-purpose quantum-mechanical molecular-model. *Journal of the American Chemical Society*. 1985;107(13):3902-9.
20. Stewart JJP. Optimization of parameters for semiempirical methods .1. method. *Journal of Computational Chemistry*. 1989;10(2):209-20.
21. Cornell WD, et al. A 2nd generation force-field for the simulation of proteins, nucleic-acids, and organic-molecules. *Journal of the American Chemical Society*. 1995;117(19):5179-97.
22. Wang JM, Cieplak P, Kollman PA. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *Journal of Computational Chemistry*. 2000;21(12):1049-74.
23. MacKerell AD, et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *Journal of Physical Chemistry B*. 1998;102(18):3586-3616.
24. Foloppe N, MacKerell AD. All-atom empirical force field for nucleic acids: I. Parameter optimization based on small molecule and condensed phase macromolecular target data. *Journal of Computational Chemistry*. 2000;21(2):86-104.
25. Jorgensen WL, Maxwell DS, Tirado Rives J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *Journal of the American Chemical Society*. 1996;118(45):11225-36.
26. Born M, Oppenheimer R. Quantum theory of molecules. *Annalen Der Physik*. 1927;84(20):0457-84.
27. Brooks CL, Karplus M. Deformable stochastic boundaries in molecular-dynamics. *Journal of Chemical Physics*. 1983;79(12):6312-25.
28. They V, et al. Quantum-mechanical computations on very large molecular-systems – The local self-consistent-field method. *Journal of Computational Chemistry*. 1994;15(3):269-82.
29. Singh UC, Kollman PA. A combined abinitio quantum-mechanical and molecular mechanical method for carrying out simulations on complex molecular-systems – Applications to the CH<sub>3</sub>CL + CL- exchange-reaction and gas-phase protonation of polyethers. *Journal of Computational Chemistry*. 1986;7(6):718-30.
30. Carlson HA, Jorgensen WL. Monte Carlo investigations of solvent effects on the chorismate to prephenate rearrangement. *Journal of the American Chemical Society*. 1996;118(35):8475-84.

31. Bornemann S, Lowe DJ, Thorneley RNF. The transient kinetics of Escherichia coli chorismate synthase: Substrate, consumption, product formation, phosphate dissociation, and characterization of a flavin intermediate. *Biochemistry*. 1996;35(30):9907-16.
32. Marti S, et al. A hybrid potential reaction path and free energy study of the chorismate mutase reaction. *Journal of the American Chemical Society*. 2001;123(8):1709-12.
33. Hu H, et al. Quantum mechanics/molecular mechanics minimum free-energy path for accurate reaction energetics in solution and enzymes: Sequential sampling and optimization on the potential of mean force surface. *Journal of Chemical Physics*. 2008;128(3).
34. Alder BJ, Wainwright TE. Phase transition for a hard sphere system. *Journal of Chemical Physics*. 1957;27(5):1208-9.
35. Alder BJ, Wainwright TE. Studies in molecular dynamics .1. general method. *Journal of Chemical Physics*. 1959;31(2):459-466.
36. Roux B. The calculation of the potential of mean force using computer-simulations. *Computer Physics Communications*. 1995;91(1-3):275-82.
37. Verlet L. Computer experiments on classical fluids .I. thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Physical Review*. 1967;159(1):98-8.
38. Metropolis N, et al. Equation of state calculation by fast computing machines. *Journal of Chemical Physics*. 1953;21(6):1087-92.
39. Barlette VE, Freitas LCG. Statistical thermodynamics of liquids using the Monte Carlo method. I. Methodology. *Química Nova*. 1999;22(2):254-62.
40. Kumar S, et al. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules .1. the method. *Journal of Computational Chemistry*. 1992;13(8):1011-21.
41. MacBeath G, Kast P, Hilvert D. A small, thermostable, and monofunctional chorismate mutase from the archeon *Methanococcus jannaschii*. *Biochemistry*. 1998;37(28):10062-73.
42. Zwanzig RW. High-temperature equation of state by a perturbation method .1. nonpolar gases. *Journal of Chemical Physics*. 1954;22(8):1420-6.
43. Eyring H. The activated complex in chemical reactions. *Journal of Chemical Physics*. 1935;3(2):107-15.
44. Laidler KJ, King MC. The development of transition-state theory. *Journal of Physical Chemistry*. 1983;87(15):2657-64.
45. Henrissat B, Bairoch A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal*. 1996;316:695-6.
46. Dong DLY, Hart GW. Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(30):19321-30.
47. Wells L, Vosseller K, Hart GW. Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: Signal transduction and O-GlcNAc. *Science*. 2001;291(5512):2376-8.

48. Macauley MS, et al. O-GlcNAcase uses substrate-assisted catalysis – Kinetic analysis and development of highly selective mechanism-inspired inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(27):25313-22.
49. Whitworth GE, et al. Analysis of PUGNAc and NAG-thiazoline as transition state analogues for human O-GlcNAcase: Mechanistic and structural insights into inhibitor selectivity and transition state poise. *Journal of the American Chemical Society*. 2007;129(3):635-44.
50. Akimoto Y, et al. O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins and diabetes. *Medical Molecular Morphology*. 2005;38(2):84-91.
51. Vosseller K, et al. Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(8):5313-8.
52. Shafi R, et al. The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(11):5735-9.
53. Arnold CS, et al. The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(46):28741-4.
54. Butters TD, Dwek RA, Platt FM. New therapeutics for the treatment of glycosphingolipid lysosomal storage diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2003;535:219-26.
55. Mendel DB, et al. Oral administration of a prodrug of the influenza virus neuramidase inhibitor GS 4071 protects mice and ferrets against influenza infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998;42(3):640-6.
56. Rao FV, et al. Structural insights into the mechanism and inhibition of eukaryotic O-GlcNAc hydrolysis. *Embo Journal*. 2006;25(7):1569-78.
57. Li H, Robertson AD, Jensen JH. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pK(a) values. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*. 2005;61(4):704-21.
58. Torrie GM, Valleau JP. Non-physical sampling distributions in Monte-Carlo free-energy estimation. Umbrella sampling. *Journal of Computational Physics*. 1977;23(2):187-99.
59. Field MJ, et al. The Dynamo library for molecular simulations using hybrid quantum mechanical and molecular mechanical potentials. *Journal of Computational Chemistry*. 2000;21(12):1088-100.
60. Plotnikov NV, Warshel A. Exploring, Refining, and Validating the Parodynamics QM/MM Sampling. *Journal of Physical Chemistry B*. 2012;116(34):10342-56.
61. Warshel A, Weiss RM. An empirical valence bond approach for comparing reactions in solutions and in enzymes. *Journal of the American Chemical Society*. 1980;102(20):6218-26.

62. Nguyen KA, Rossi I, Truhlar DG. A dual-level shepard interpolation method for generating potential-energy surfaces for dynamics calculations. *Journal of Chemical Physics*. 1995;103(13):5522-30.
63. Ruiz-Pernia JJ, et al. Hybrid QM/MM potentials of mean force with interpolated corrections. *Journal of Physical Chemistry B*. 2004;108(24):8427-33.
64. Heightman TD, Vasella AT. Recent insights into inhibition, structure, and mechanism of configuration-retaining glycosidases. *Angewandte Chemie-International Edition*. 1999;38(6):750-70.
65. Lameira J et al. Enzyme Molecular Mechanism as a Starting Point to Design New Inhibitors: A Theoretical Study of O-GlcNAcase. *Journal of Physical Chemistry B*. 2011;115(20):6764-75.
66. Reis M, et al. The catalytic mechanism of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* elucidated via the QM/MM approach. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2013;15(11):3772-85.
67. Silva NDF, et al. Computational study of the mechanism of half-reactions in class 1A dihydroorotate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2013;15(43):18863-71.
68. Justo GZ. Catalytic antibodies: Expanding the scope of enzymatic catalysis. *Química Nova*. 1998;21(1):86-98.
69. Tramontano A, Janda KD, Lerner RA. Catalytic antibodies. *Science*. 1986;234(4783):1566-70.
70. Marti S, et al. Computer-aided rational design of catalytic antibodies: The 1F7 case. *Angewandte Chemie-International Edition*. 2007;46(1-2):286-90.
71. Gustafsson C, Govindarajan S, Emig R. Exploration of sequence space for protein engineering. *Journal of Molecular Recognition*. 2001;14(5):308-14.
72. Morley KL, Kazlauskas RJ. Improving enzyme properties: when are closer mutations better? *Trends in Biotechnology*. 2005;23(5):231-7.
73. Penning TM, Jez JM. Enzyme redesign. *Chemical Reviews*. 2001;101(10):3027-46.
74. Haynes MR, et al. Routes to catalysis – Structure of a catalytic antibody and comparison with its natural counterpart. *Science*. 1994;263(5147):646-52.
75. Haslam E. *Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites*, New York: Wiley; 1993.
76. Weiss U, Edwards JM. *The Biosynthesis of Aromatic Compounds*. New York: Wiley; 1980.
77. Chook YM, Ke HM, Lipscomb WN. Crystal-structures of the monofunctional chorismate mutase from *Bacillus subtilis* and its complex with a transition-state analog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(18):8600-3.
78. Lee AY, et al. Atomic-structure of the buried catalytic pocket of *Escherichia coli* chorismate mutase. *Journal of the American Chemical Society*. 1995;117(12):3627-8.

79. Hilvert D, et al. Catalysis of concerted reactions by antibodies – The Claisen rearrangement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(14):4953-5.
80. Hilvert D, Nared KD. Stereospecific Claisen Rearrangement Catalyzed by an antibody. *Journal of the American Chemical Society*. 1988;110(16):5593-4.
81. Siegel JB, et al. Computational Design of an Enzyme Catalyst for a Stereoselective Bimolecular Diels-Alder Reaction. *Science*. 2010;329(5989):309-13.
82. Rothlisberger D, et al. Kemp elimination catalysts by computational enzyme design. *Nature*. 2008;453(7192):190-95.
83. Richter F, et al. De Novo Enzyme Design Using Rosetta3. *Plos One*. 2011;6(5).
84. Van der Kamp MW, Mulholland AJ. Combined Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM) Methods in Computational Enzymology. *Biochemistry*. 2013;52(16):2708-28.
85. Sirin GS, et al. Aging Mechanism of Soman Inhibited Acetylcholinesterase. *Journal of Physical Chemistry B*. 2012;116(40):12199-207.
86. Swiderek K, Marti S, Moliner V. Theoretical studies of HIV-1 reverse transcriptase inhibition. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2012;14(36):12614-24.
87. Ni Z, et al. Just an additional hydrogen bond can dramatically reduce the catalytic activity of *Bacillus subtilis* lipase A I12T mutant: An integration of computational modeling and experimental analysis. *Computers in Biology and Medicine*. 2013;43(11):1882-8.
88. Tian B, et al. Predicting Enzyme-Substrate Specificity with QM/MM Methods: A Case Study of the Stereospecificity of D-Glucarate Dehydratase. *Biochemistry*. 2013;52(33):5511-3.
89. Hou G, Cui Q. Stabilization of Different Types of Transition States in a Single Enzyme Active Site: QM/MM Analysis of Enzymes in the Alkaline Phosphatase Superfamily. *Journal of the American Chemical Society*. 2013;135(28):10457-69.
90. Lodola A, et al. Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Modeling of Fatty Acid Amide Hydrolase Reactivation Distinguishes Substrate from Irreversible Covalent Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2013;56(6):2500-12.
91. Yao Y, Liu J, Zhan C-G. Why Does the G117H Mutation Considerably Improve the Activity of Human Butyrylcholinesterase against Sarin? Insights from Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Free Energy Calculations. *Biochemistry*. 2012;51(44):8980-92.

