

DESCRIÇÃO DAS LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO DA ENZIMA MONOOXIGENASE ATRAVÉS DE MÉTODOS QUÂNTICOS E CAMPO DE FORÇA CLÁSSICO

Description of the hydrogen bonds of the enzyme monooxygenase by quantum methods and classical force field

Descripción de los enlaces de hidrógeno de la enzima monooxygenasa usando métodos cuánticos y campo de fuerza clásica



Revista
Desafios

Artigo Original
Original Article
Artículo Original

Daniel Augusto Barra de Oliveira^{1*}

¹ Curso de Licenciatura em Química, Universidade Federal do Tocantins, Araguaína, Tocantins, Brasil

*Correspondência: Universidade Federal do Tocantins. Rua Paraguai s,n (esquina com Urixamas)- Setor Cimba-CEP-77838-824(Araguaína-TO) *danielchem@mail.uft.edu.br

Artigo recebido em 09/02/2017. Aprovado em 05/03/2017. Publicado em 23/03/2017.

RESUMO

O metabólito 20-hidroxiéquidisona é responsável por iniciar mudanças nos exoesqueletos de insetos. Esta molécula é também associada com suplementação alimentar e pode ser usada como indutora em pesquisas com transgênicos. Por isso o entendimento do processo bioquímico associado com a interação enzima/molécula é essencial para entender os fenômenos biológicos nos quais a 20-hidroxiéquidisona está envolvida. Por essa razão a modelagem molecular é muito importante para o entender quais interações ou ligações são mais importantes para descrever o ancoramento molecular da enzima/molécula. Neste trabalho foram realizados cálculos de otimização de geometria usando a mecânica molecular para a proteína inteira e mecânica molecular/quântica (QM/MM) baseado na aproximação ONIOM. Os resultados destes cálculos foram comparados com os dados experimentais de ligação de hidrogênio provenientes da técnica de difração de raio x. Os cálculos mostram que a combinação ONIOM (B3LYP/UFF) possui maior acurácia que aqueles provenientes unicamente do campo de força Charm para a descrição de ligações de hidrogênio no sítio catalítico.

Palavras-chave: ONIOM, Ecdisona, Campo de Força Charm.

ABSTRACT

The metabolite 20-hydroxyequidisona is responsible for initiate changes in insectsexoskeleton. This molecule is also associated with supplementary feed and it may be used as inductors in transgenic researches. Therefore the understanding of biochemical process associated with enzyme/molecule interaction is essential to comprehend all the biological phenomenon that the 20-hydroxyequidisona is involved. For this reason the molecular modeling play an important rule to understand which interaction or bond is more important to describe the enzyme/molecule docking. In this work it was performed an optimization using an ONIOM (QM/MM) approach based on quantum mechanics/classical mechanics and force field approaches for all enzyme that were compared with experimental hydrogen bond data provided by x ray data. The results show that the calculation using ONIOM (B3LYP/UFF) has more accuracy than Charm force field for entire enzyme in order to describe hydrogen bonds in catalytic site.

Keywords: ONIOM, Ecdisona, Charm Force Field.

RESUMEN

El metabolito 20-hidroxiéquidisona es responsable de iniciar los cambios en los exoesqueletos de insectos. Esta molécula también se asocia con la alimentación suplementaria y se puede utilizar como un inductor en la investigación de transgênicos. Por lo tanto es esencial para entender los fenómenos biológicos en los que participa el 20-hidroxiéquidisona la comprensión del proceso bioquímico asociado con la interacción enzima / molécula.

Por esta razón, el modelado molecular es muy importante entender lo que las interacciones o conexiones son más importantes para describir la enzima / molécula de anclaje molecular. En este trabajo se realizaron cálculos de optimización de geometría utilizando la mecánica molecular para toda la proteína y la mecánica molecular / cuántica (QM / MM) basándose en el oniom enfoque. Los resultados de estos cálculos se comparan con enlace de hidrógeno datos experimentales de difracción de rayos x técnica. Los cálculos muestran que la combinación oniom (B3LYP / UFF) tiene una precisión mayor que los que se derivan únicamente de campo de fuerza del encanto para la descripción de los enlaces de hidrógeno en el sitio catalítico.

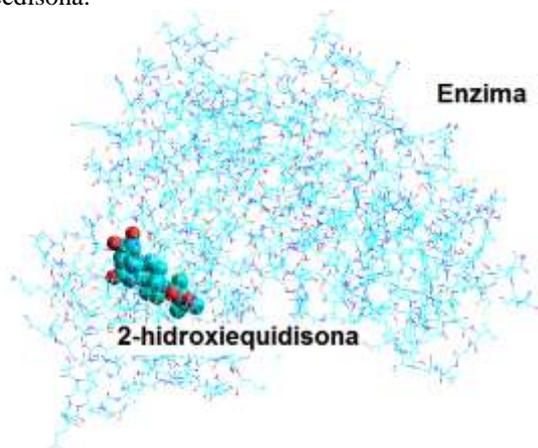
Palabras clave: ONIOM, ecdisona, encanto de la fuerza de campo.

INTRODUÇÃO

Os ecdizoos são grupos de animais que tem capacidade de se desfazer de seus exoesqueletos, e formar outra estrutura esquelética para poderem crescer e se desenvolver (STORER *et al*, 2003). Dentre os grupos de animais envolvidos em doenças tropicais se encontram os insetos da classe taxonômica *Aedes aegypti* que realizam a ecdise na fase larval. Neste sentido, o entendimento dessa fase de muda a nível bioquímico se torna essencial para o controle de doenças advindas desses insetos.

O metabólito 20-hidroxiectidisona associado ao receptor ecdisona é responsável por iniciar a mudança de exoesqueletos em insetos (BILLAS *et al*, 2003; CLAYTON *et al*, 2001; RIDDIFORD *et al*, 2000). O receptor é um heterodímero proteico com duas subunidades. A estrutura do metabólito 20-hidroxiectidisona ancorada ao sítio do receptor é mostrada abaixo na Figura 1.

Figura 1. Hormônio 20-hidroxiectidisona ancorado ao receptor ecdisona.



A 20-hidroxiectidisona é comercializada como suplemento nutricional em vários esportes, particularmente musculação. A evidência para tal uso é limitada (SAOWANEE *et al*, 2011). Alguns estudos concluíram que o uso de 20mg por dia não apresenta efeito (LAFONT E DINAN, 2003; SAOWANEE *et al*, 2011). O hormônio 20-hidroxiectidisona e outros ecdiesteróides são usados em pesquisas bioquímicas como indutores em animais transgênicos. Quando um novo gene é introduzido em um animal a sua expressão é controlada pela introdução do receptor ecdisona (SAEZ *et al*, 2000; GRAHAM, 2002). Há algumas evidências in vitro que mostram que a molécula 20-hidroxiectidisona tem efeitos em algumas células sanguíneas tais quais os linfócitos e neutrófilos, que podem agir como imunomodulador (TRENIN E VOLODIN, 1999). Em vista das inúmeras aplicabilidades do hormônio ecdisona, torna-se salutar a importância do estudo da interação entre a molécula 20-hidroxiectidisona e o seu respectivo receptor 20 monooxigenase. Neste sentido a química teórica pode se constituir em uma ferramenta apropriada para averiguar esse tipo de interação. Neste trabalho foram avaliadas as distâncias de ligação entre o receptor (20-monooxigenase) e o substrato (20-hidroxiectidisona) utilizando diferentes níveis de cálculo de estrutura eletrônica e mecânica molecular. Foram utilizados para este fim cálculos de estrutura eletrônica com múltiplas camadas (ONIOM) e cálculos utilizando somente o campo de força clássico. A ideia foi

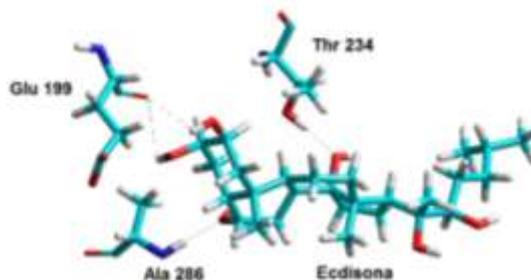
demonstrar a reprodutibilidade destes diferentes métodos no que tange os resultados de difração de Raio-X, relacionando custo computacional com reprodutibilidade dos dados experimentais. Os cálculos mostram satisfatória reprodutibilidade das ligações de hidrogênio com o funcional de densidade B3LYP e a função de base 6-31G.

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho foi realizada a otimização da estrutura 1Z5X (CARMICHAEL *et al*, 2005) proveniente do site “protein data bank” obtida via difração de raio-x com a resolução de 3,07 angstroms. Para quantificar as ligações de hidrogênio foi empregado o método ONIOM (DAPPRICH *et al*, 1999) presente no programa Gaussian 2009 (FRISCH *et al*, 2009). Diversos métodos de cálculo de estrutura eletrônica foram empregados neste trabalho. Foram usados, na camada alta, os métodos *ab initio*: Hartree Fock, a teoria de funcional de densidade (funcional B3LYP (STEPHENS *et al*, 1994) e o método semi-empírico PM6 (STEWART, 2007) para descrever as ligações presentes no sítio catalítico. O campo de força clássico UFF (RAPPE *et al*, 1992) foi utilizado para descrever os restantes dos aminoácidos, que foram mantidos fixos durante a otimização. Para a otimização da camada alta foi utilizada a função “quadmac”, que realiza passos quadráticos para todos os átomos. Os métodos *ab initio* foram empregados com as funções de base STO-3G e 6-31G para verificar relação entre reprodutibilidade da estrutura e tempo de cálculo. Também foram realizadas também duas otimizações da proteína inteira com o campo de força Charm (BROOKS *et al*, 1983) fazendo o uso do programa Hyperchem (HYPERCUBE). Na primeira levou-se em conta a subunidade que possui a molécula 20-Hidroxiecdisona ancorada no sítio catalítico. Na segunda foram consideradas todas as

subunidades da enzima conforme a Figura 1. As ligações de hidrogênio calculadas foram aquelas realizadas entre a molécula 20-Hidroxiecdisona e os aminoácidos glutamato (GLU 199), alanina (ALA 286) e treonina (THR 234) conforme a Figura 2.

Figura 2. Estrutura do sítio catalítico, contendo o hormônio ecdisona.

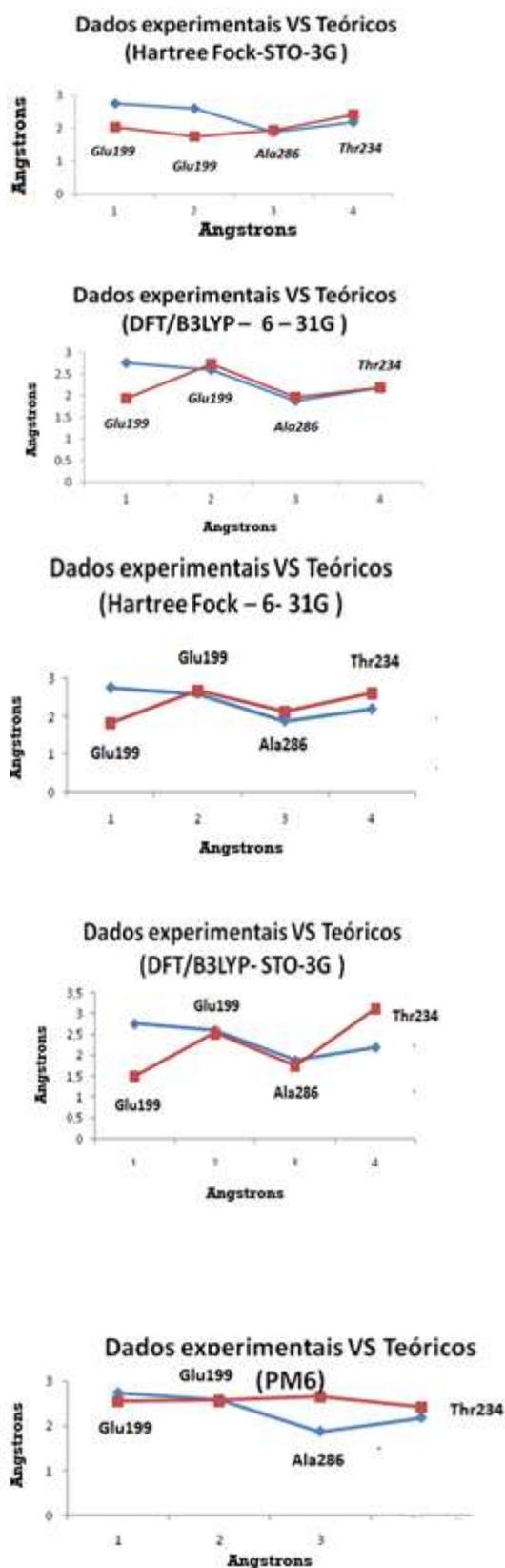


Estas ligações foram escolhidas por estarem presentes em todos os resultados de otimização.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

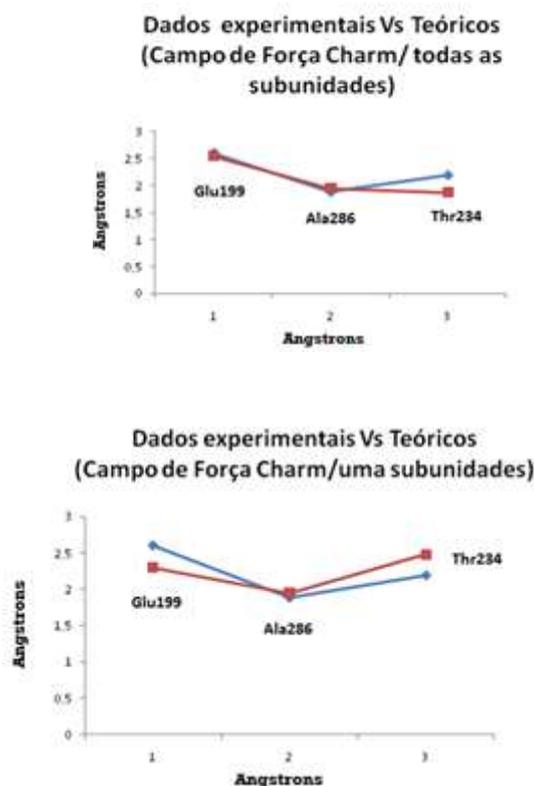
Os resultados inerentes aos cálculos de estrutura eletrônica do complexo enzima 20-Hidroxiecdisona são mostradas abaixo na Figura 3.

Figura 3. Gráficos mostrando a correlação entre os dados experimentais (Azul) com os calculados via métodos de cálculos de estrutura eletrônica (Vermelho).



funcional B3LYP com a função de base 6-31G. As análises dos dados mostram ainda que há um aumento na qualidade dos dados com o aumento da função de base, pois são verificadas melhorias nos dados teóricos para o método Hartree Fock com o aumento da função STO-3G para a função 6-31G. Há uma exceção quando são tratadas as ligações de hidrogênio com o GLU 199, para este caso verifica-se maior adequação dos dados experimentais com o método semi-empírico PM6. No que reporta aos cálculos com o campo de força Charm verifica-se a rotação do ângulo diedro associado ao grupo OH (Hidroxila) que se liga ao aminoácido Glu 199. Há um aumento da distância de ligação de 2.75 para 3.54 angstroms. Os gráficos inerentes às distâncias de ligação calculadas utilizando o campo de força Charm são mostrados abaixo na Figura 4.

Figura 4. Gráfico comparativo de distâncias de ligação obtidas via dados experimentais (azul) e através de cálculos usando o campo de força Charm (vermelho)



Os resultados mostram que o melhor método de cálculo de estrutura eletrônica para descrever as distancia de ligação de hidrogênio entre a molécula 20-Hidroxicidisona e o receptor no sítio catalítico é o

Os gráficos comparativos com as distâncias de ligação mostram que o uso da totalidade molecular da enzima aumenta a correlação com os dados convenientes da difração de raio-x para otimizações utilizando o campo de força Charm. Todavia os resultados são menos acurados que aqueles previstos por aqueles provenientes dos cálculos de mecânica quântica. Este resultado mostra a possibilidade da diminuição de custo computacional para a modelagem de moléculas biológicas, reduzindo à descrição do problema a otimização do sítio ativo, mantendo o resto da proteína fixa para o caso da enzima estudada.

CONCLUSÃO

Os cálculos de estrutura eletrônica apresentaram correlações satisfatórias com dados provenientes da técnica de difração de raio. Dentre aqueles métodos avaliados, o funcional B3LYP combinado com a função gaussiana 6-31G é aquele que apresenta maior correlação com os dados experimentais. Os cálculos mostram ainda a superioridade dos métodos QM/MM na reprodução de ligações de hidrogênio quando comparados ao uso integral de campos de força clássicos. Estes resultados podem vir a ser aplicados em futuros estudos de docking molecular, onde a enzima monooxigenase seja o receptor de interesse biológico, provendo descrições mais acuradas das ligações de hidrogênio envolvidas na inibição dessa proteína.

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

REFERÊNCIAS

BILLAS, I.M.; IWEMA, T.; GARNIER, J.M.; MITSCHLER, A.; ROCHEL, N.; MORAS, D. Structural adaptability in the ligand-binding pocket of

the ecdysone hormone receptor. *Nature* 2003, 426, 91.

CLAYTON, G. M.; PEAK-CHEW, S. Y.; EVANS, R. M.; SCHWABE, J. W. The structure of the ultraspiracle ligand-binding domain reveals a nuclear receptor locked in an inactive conformation. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 2001, 98 (4), 1549.

RIDDIFORD, L.M.; CHERBAS, P.; TRUMAN, J.W. Ecdysone receptors and their biological actions. *vitam. HORM. Vitamins & Hormones* 2000, 60: 1.

LAFONT, R.; DINAN, L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: An update. **Journal of Insect Science** 2003, 3, 7.

SAEZ, E.; NELSON M.C. ESHELMAN, B.; BANAYO, E.; KODER, A.; CHO, G.J.; EVANS, R.M. Identification of ligands and coligands for the ecdysone-regulated gene switch. **Proceedings of the National Academy of Science**. 2000, 97 (26), 14512.

GRAHAM, L. D. Ecdysone-controlled expression of transgenes. **Expert Opinion on Biological Therapy** 2002, 2 (5), 525.

TRENIN, D. S.; VOLODIN, V.V. 20-Hydroxyecdysone as a human lymphocyte and neutrophil modulator: In vitro evaluation. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 1999, 41(3), 153.

CARMICHAEL, J.A.; LAWRENCE, M.C.; GRAHAM, L.D.; PILLING, P.A.; EPA, V.C.; NOYCE, L.; LOVRECEZ, G.; WINKLER, D.A.; PAWLAK-SKRZECZ, A.; EATON, R.E.; HANNAN, G.N.; HILL, R.J. THE X-RAY Structure of a hemipteran ecdysone receptor ligand-binding domain: comparison with a lepidopteran ecdysone receptor ligand-binding domain and implications for insecticide design. **Journal of Biological Chemistry** 2005, 280 (23), 22258.

DAPPRICH, S.; KOMÁROMI, I.; BYUN, K. S.; MOROKUMA, K.; FRISCH, M. J. A NEW ONIOM IMPLEMENTATION IN GAUSSIAN 98. 1. The calculation of energies, gradients and vibrational frequencies and electric field derivatives. **Journal of Molecular Structure**. (THEOCHEM), 1999, 462, 1.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; CARICATO, M.; LI, X.;

HRATCHIAN, H. P.; IZMAYLOV, A. F.; BLOINO, J.; ZHENG, G.; SONNENBERG, J. L.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; MONTGOMERY, J. A., JR.; PERALTA, J. E.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J. J.; BROTHERS, E.; KUDIN, K. N.; STAROVEROV, V. N.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT, J. C.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; REGA, N.; MILLAM, J. M.; KLENE, M.; KNOX, J. E.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; MARTIN, R. L.; MOROKUMA, K.; ZAKRZEWSKI, V. G.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; DAPPRICH, S.; DANIEL S, A. D.; FARKAS, Ö.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CIOSLOWSKI, J.; FOX, D. J. **GAUSSIAN, INC.**, WALLINGFORD CT, 2009.

STEPHENS, P. J.; DEVLIN, F. J.; CHABLOWSKI, C. F.; FRISCH, M. **Journal of Physical Chemistry**. 1994, 98, 11623.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods. V. modification of nndo approximations and application to 70 elements. **Journal of Molecular Modelling**. 2007, 13, 1173.

RAPPE, A. K.; CASEWIT, C. J.; COLWELL, K. S.; GODDARDIII, W. A.; SKIFF, W. M. UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations. **Journal of American Chemical Society**. 1992, 114, 10024.

BROOKS, B. R.; BRUCCOLERI, R. E.; OLAFSON, B. D.; STATES, D. J.; SWAMINATHAN, S.; KARPLUS, M. CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. **Journal of Computational Chemistry** CHEM. 1983, 4 (2), 187.

HYPERCHEM(TM) PROFESSIONAL 7.51,
HYPERCUBE, INC., 1115 NW 4TH STREET,
GAINESVILLE, FLORIDA 32601, USA.
SAOWANEE KUMPUN, ANNICK MARIA,
SOPHIE CROUZET, NATHALIE EVRARD-
TODESCHI, JEAN-PIERRE GIRAULT,, RENÉ
LAFONT. Ecdysteroids from *Chenopodium quinoa*
Willd an ancient Andean crop of high nutritional
value. **Food Chemistry**. 2011, 125, 1226.
STORER, T. I. ; USINGER, R. L. ; STEBBINS, R.
C. ; NYBAKKEN, J. W. – **Zoologia Geral**, 6^a
edição – Companhia Editora Nacional, 2003.

DOI: <http://dx.doi.org/10.20873/uft.2359-3652.2017v4n1p130>