

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

MUDANÇAS CONFORMACIONAIS ENVOLVIDAS NA ATIVAÇÃO
INTERFACIAL DE FOSFOLIPASES A_2 – UMA ANÁLISE COMPUTACIONAL

Tiago Charão de Oliveira

Porto Alegre – Brasil

Outubro de 2006

MUDANÇAS CONFORMACIONAIS ENVOLVIDAS NA ATIVAÇÃO INTERFACIAL
DE FOSFOLIPASES A₂ – UMA ANÁLISE COMPUTACIONAL

Tiago Charão de Oliveira

Dissertação de mestrado elaborada no Laboratório de Bioquímica Farmacológica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob orientação do professor doutor:

Jorge Almeida Guimarães

Porto Alegre – Brasil

Outubro de 2006

MUDANÇAS CONFORMACIONAIS ENVOLVIDAS NA ATIVAÇÃO INTERFACIAL
DE FOSFOLIPASES A₂ – UMA ANÁLISE COMPUTACIONAL

Tiago Charão de Oliveira

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Banca Examinadora:

Jorge Almeida Guimarães (Presidente)

Carlos Termignoni

Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo

Hubert Karl Stassen

Paulo Augusto Netz (Suplente)

Esta dissertação foi realizada sob a orientação do professor Doutor Jorge Almeida Guimarães, com o auxílio financeiro de CNPq-MCT (Brasília, DF) e CAPES-MEC (Brasília, DF), como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, junto ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Tiago Charão de

Mudanças Conformacionais Envolvidas na Ativação
Interfacial de Fosfolipases A₂ – Uma Análise Computacional

Rio Grande do Sul, UFRGS, Centro de Biotecnologia, 2006.

Dissertação: Mestre em Ciências (Biologia Celular e Molecular)

- | | |
|-------------------------|--------------------------------|
| 1. Dinâmica Molecular | 2. Fosfolipases A ₂ |
| 3. Ativação Interfacial | 4. Serpente |

- I. Jorge Almeida Guimarães
- II. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Centro de Biotecnologia
- III. Títulos

AGRADECIMENTOS

Ao professor Jorge Almeida Guimarães, pela oportunidade e pela confiança em mim depositada durante todo o meu percurso de pós-graduando;

Ao professor Hermes Amorim, pelo convite, pelo inestimável auxílio (mesmo não tendo nem um vínculo formal com esse trabalho), pelas caronas, por me ouvir quando eu estava chateado, ou, mesmo, simplesmente chato;

Ao professor Paulo Augusto Netz, revisor dessa dissertação e do artigo nele anexado, por ter tão prontamente aceito essas duas tarefas;

Aos professores Carlos Termignoni, Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo e Hubert Karl Stassen por terem tão gentilmente aceito o convite para a apreciação desta dissertação;

Aos professores Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini e Paulo Augusto Netz, pelo aceite e auxílio ao participarem da minha comissão de acompanhamento;

Aos professores Aoi Masuda, Augusto Schrank, Carlos Termignoni, Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini, Hubert Karl Stassen, Irene Silveira Scharank, Paolo Roberto Livotto e Sandra Estrazulas Farias, pelos valiosos ensinamentos transmitidos nas disciplinas que cursei durante o período de pós-graduação;

Ao professor Tarso B. Ledur Kist pela oportunidade de trabalhar conjuntamente com sua turma de Bioinformática para a graduação. Uma experiência valiosa e que foi importante para a obtenção do meu crédito didático;

Aos colegas Antônio, Camila, Fabiano, Hugo, Igor, Kátia, Marcos, Rafael, Renata e Rose, pelo companheirismo e por todo o restante que não caberia aqui;

Aos amigos Luciano e Sílvia pela atenção e sempre prestativas informações;

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, pela oportunidade de realização deste trabalho;

À Universidade Luterana do Brasil - ULBRA, em especial ao Grupo de Bioinformática Estrutural por possibilitar a utilização dos equipamentos necessários para a realização dos experimentos finais dessa dissertação;

Ao CNPq-MCT (Brasília, DF) e CAPES-MEC (Brasília, DF), pelo suporte financeiro na compra das máquinas utilizadas nesse trabalho;

A Escola Técnica Municipal Farroupilha (ETMF) e ao Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (DQO - UFRGS), locais onde trabalhei durante a maior parte da realização dessa dissertação; pela compreensão e pelas liberações, mesmo quando conduzia minha vida feito uma rapsódia;

Aos mais de 300 estudantes de ensino-médio, profissionalizante e graduação, que durante o período de mestrado assistiram às minhas aulas. Não é fácil fazer um mestrado acadêmico trabalhando, mas sempre pensei que os maiores prejudicados foram vocês. Sinceramente, peço que me perdoem se não dei de mim tanto quanto mereciam;



Meus agradecimentos especiais:

Aos colegas acadêmicos ou de idiomas, pois a mente é tudo;

Aos colegas de Boxe, Musculação, Body-Pumb e Jiu-Jitsu, pois a mente não é tudo;

Aos amigos de longa data: Adriano, Darlan, Fabrício, Jéferson, Márcio e Rafael. As décadas nos tornaram mais experientes e maduros, mas de forma alguma mais velhos; são todos belvederes;

Aos amigos de mais curta data: Cláiton, Fábio (Sidão), Fabiano (Teteco), Leandro (Di Lara), Régis e Tiago Martins. Certamente os conheço há menos tempo que os acima, mas nem por isso nossa amizade é menor;



Meus agradecimentos **muito** especiais:

Aos meus pais, não vou citar o porquê. Há coisas demais para agradecer e não posso tornar a sessão de agradecimentos maior que o corpo da dissertação*;

Ao meu irmão Túlio, que ajudou muito mais do que imagina;

Ao restante dos meus familiares, que são muitos e para não cometer o descuido de esquecer alguém, desta vez não irei citar nomes;

A minha futura família. Prometo: de 2007 não passa;



Meus agradecimentos **“interessantemente”** especiais

A Lavínia Borba Moraes, grande amiga, companheira e amada; Se minha família é o meu solo, ela é o meu mar.

* Ainda assim, foram duas páginas. Têm capítulos aqui que são menores do que isso...

“As retas sempre podem ser traçadas de volta a alguma narrativa anterior, e às narrativas que a precederam; embora, à medida que a voz do narrador se perde no tempo, as conexões parecerão cada vez mais tênues, pois cada época desejará contar a história como se sua fosse.

Assim, o pagão será santificado, o trágico se tornará cômico; grandes amantes deixarão de ser sentimentais, e demônios se reduzirão a brinquedos de corda”.

Barker, Clive. *A Trama da Maldade*. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 1995.

“A equação relevante é: Conhecimento = poder = energia = matéria = massa. Uma boa livraria não passa de um Buraco Negro civilizado que sabe ler”.

Pratchett, Terry. *Guardas! Guardas!* São Paulo: Conrad Editora do Brasil, 2005.

Dedico esta Dissertação a duas pessoas cuja honra, carinho e dignidade sempre me servirão de modelo. O nome de ambas era Manoel: Manoel Adolfo Charão e Manoel Santiago de Oliveira, em ordem alfabética.

Talvez estas qualidades não venham com o sangue, mas sim, com a educação.

Nunca conseguirei estimar o quanto devo a estes dois.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS	ii
ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1 Introdução	01
1.1 Fosfolipases	03
1.1.1 A Grande família fosfolipase A ₂	05
1.1.1.1 FLA ₂ Grupos I e II	06
1.1.1.2 FLA ₂ Grupo III	09
1.1.1.3 FLA ₂ Grupo IV	10
1.1.1.4 FLA ₂ Grupo V	11
1.1.1.5 FLA ₂ Grupo VI	12
1.1.1.6 FLA ₂ Grupo VII	12
1.1.1.7 FLA ₂ Grupo VIII	13
1.1.1.8 FLA ₂ Grupo IX	14
1.1.1.9 FLA ₂ Grupo X	14
1.1.1.10 FLA ₂ Grupo XI	14
1.1.1.11 FLA ₂ Grupos XII, XIII, XIV e além	15
1.2 Fosfolipases A ₂ secretadas	18
1.2.1 Interações com a face <i>i</i>	19
1.2.2 Mecanismo catalítico das FLA ₂	20
1.3 Estudos computacionais relacionados a fosfolipases	22
2 Objetivos	24
3 Metodologia	25
3.1 Dinâmica molecular	25
3.1.1 Campo de forças	26
3.1.1.1 Cálculo das interações ligadas	27
3.1.1.2 Cálculo das interações não-ligadas	27
3.1.2 Campo de forças do GROMOS	28

3.1.3 Condições periódicas de contorno	29
3.1.4 “ <i>Constraints</i> ” e “ <i>Restraints</i> ”: SHAKE e LINCS	30
3.1.5 Termostato e barostato	32
3.1.6 Etapas da simulação	33
3.1.7 Validação da simulação de DM	34
3.2 Métodos estocásticos	35
3.3 Programas utilizados	36
3.4 Obtenção da estrutura inicial	37
3.5 Geração das caixas de solvente	38
3.5.1 Simulações em meio aquoso	38
3.5.2 Simulação em metanol	39
3.5.3 Simulação em octanol	39
3.6 Protocolo das simulações	39
4 Resultados	41
4.1 Artigo I	42
5 Discussão geral	70
5.1 Discussão geral dos dados obtidos	71
5.1.1 Flutuação das cadeias laterais de importância para a interação interfacial	76
5.1.2 Estabilidade de cátions no sítio ativo de FLA ₂	77
6 Conclusões	79
7 Perspectivas	80
8 Referências bibliográficas	81
9 CURRICULUM VITÆ resumido	86

LISTA DE ABREVIATURAS

D49M – monômero de fosfolipase A₂ com aspartato catalítico

DM – dinâmica molecular

E - enzima

EC ou EC number – enzyme commission number

Face *i* – face de ativação interfacial

FLA₁ – fosfolipase A₁

FLA₂ – fosfolipase A₂

FLA_{2sm} – fosfolipase A₂ secretada de mamífero

FLA_{2sv} – fosfolipase A₂ secretada de veneno

FLB – fosfolipase B

FLC – fosfolipase C

FLD – fosfolipase D

K – constante de equilíbrio

K_{cat} – constante de equilíbrio catalítico

LPL - lisofosfolipase

LPTA – lisofosfolipase-transacilase

P – produto catalítico

PDB – RCSB Protein Data Bank

PDB ID – Protein Data Bank identifier

RCSB - Research Collaboratory for Structural Bioinformatics

RMN – ressonância magnética nuclear

RMS - root mean square

sPLA₂ – secreted phospholipase A₂

svPLA₂ – secreted venom phospholipase A₂

GPCR - receptores acoplados a proteína G

S – substrato catalítico

TI –intermediário tetraédrico

LISTA DE ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS

Nome	Código	
	3 letras	1 letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido Aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido Glutâmico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Fig. 1. Modelo cinético para catálise e ativação interfaciais.	02
Fig. 2. Sítios de ação de fosfolipases sobre glicerofosfolipídios.	03
Fig. 3. Regiões estruturalmente conservadas em FLA ₂ s.	07
Fig. 4. Pontes de enxofre estruturalmente conservadas em FLA ₂ s.	08
Fig. 5. Modelo estrutural de uma fosfolipase A ₂ citosólica	11
Fig. 6. Modelo estrutural do heterodímero catalítico $\alpha 1/\beta 2$ do fator de ativação plaquetário acetilhidrolase Ib de cérebro bovino.	13
Fig. 7. Representação esquemática da superfície molecular destacando as regiões que formam a face <i>i</i> da fosfolipase de <i>Gloydius halys pallas</i> .	19
Fig. 8. O mecanismo de ativação e de ação interfacial de FLA ₂ .	20
Fig. 9. Mecanismo catalítico típico de fosfolipases A ₂ .	21
Fig. 10. Interações ligadas.	27
Fig. 11. Interações não-ligadas.	28
Fig. 12. Representação simplificada do uso de condições periódicas de contorno em uma simulação.	30
Fig. 13. Dodecaedro rômbo e octaedro truncado, ambos em orientações Arbitrárias	30
Fig. 14. Seqüência de aminoácidos e estrutura secundária da fosfolipase A ₂ ácida de <i>Gloydius halys pallas</i> .	38
Fig. 15. Rampa de termalização das simulações	40
Fig. 16. Raios de giro das simulações.	72
Fig. 17. Número de ligações de hidrogênio das simulações.	73
Fig. 18. RMS do esqueleto protéico das simulações.	74
Fig. 19. Superfície acessível ao solvente das simulações.	75
Fig. 20. Estruturas finais (5 ns) das simulações D49M-PR0.5 e D49M-OcOH comparadas com a estrutura cristalográfica (1PSJ).	76
Fig. 21. Movimentação de resíduos de importância interfacial.	77
Tabela 1: características das FLA ₂ GII	09
Tabela 2: classificação das fosfolipases A ₂	16
Tabela 3: constantes de estabilidade de íons divalentes no sítio ativo de fosfolipases	78

RESUMO

Fosfolipases A_2 constituem uma família de enzimas interfaciais que catalisam a hidrólise de fosfolipídios de membrana na posição sn-2. Nas fosfolipases cataliticamente ativas (FLA₂ D49), o resíduo Asp49 possui um importante papel na coordenação do íon cálcio divalente que auxilia na estabilização do intermediário tetraédrico.

Nesse trabalho, foram realizadas simulações por dinâmica molecular (DM) de uma fosfolipase secretada de veneno de *Agkistrodon halys pallas* utilizando como solventes: água, metanol e octanol. Devido à baixa afinidade do íon cálcio em ambientes aquosos, diferentes forças de restrição foram aplicadas nesse íon e mediu-se o comportamento desse, através da variação da sua distância em relação ao resíduo Asp49. Todas as simulações foram realizadas por um período de tempo de 5 ns, somando um total de 45 ns de simulação, utilizando o pacote GROMACS implementado com o campo de força GROMOS96 43a2.

Os resultados mostraram uma série de mudanças conformacionais importantes na fosfolipase durante a sua aproximação à superfície da membrana, como o aumento da área acessível ao solvente e a reorientação de cadeias laterais de resíduos com importância catalítica. Os dados obtidos com as simulações foram utilizados para propor um modelo interfacial de ativação para FLA_{2sv}.

Desta forma, os principais eventos associados com a ativação de FLA_{2sv} envolvem: a) a reorganização da alça de coordenação de cálcio na proximidade da membrana, seguida pela captura do íon Ca^{2+} ; b) a reorientação da cadeia lateral de Trp31, que irá definir um novo sítio de especificidade para a cadeia fosfolipídica; c) a redução da distância entre os resíduos His48 e Asp49, para aumentar a nucleofilicidade da His48; d) a reorientação da cadeia lateral do resíduo Lys69 concomitante com a projeção da alça-69 para o solvente, resultando no aumento da acessibilidade ao sítio ativo.

Assim, esses resultados, em adição ao conhecimento bioquímico e a dados cristalográficos, abrem acesso a uma compreensão mais detalhada dos mecanismos moleculares associados com a ação de fosfolipases A_2 .

ABSTRACT

Phospholipases A₂ (PLA₂) are interfacial active enzymes that catalyze hydrolysis at the sn-2 position of membrane phospholipids. In the catalytic active PLA₂ (D49 PLA₂), the Asp49 residue plays a key role in the coordination of the calcium ion that assists in the stabilization of the transition state intermediary. Despite the catalytic importance of Ca²⁺, it has low affinity for the sPLA₂ active site.

Molecular dynamics simulations of a D49 svPLA₂ from *Agkistrodon halys pallas* were performed in aqueous environment, methanol and octanol. Because of the svPLA₂ low affinity for the calcium ion in aqueous systems, different restrain forces were applied on Ca₂⁺ and evaluated with respect to ion coordination with key residues. All simulations were performed for a time period of 5 ns using the GROMACS package with GROMOS96 43a2 force field.

The results have showed a series of important conformation changes of sPLA_{2v} during its approaches to membrane surface, as the increase of the solvent accessible surface area and the reorientation of side chains of residues of catalytic importance. Analyses of the simulations data were utilized to propose an interfacial activation model for svPLA₂.

According, the principal events associated with svPLA₂ activation involve: a) the reorganization of calcium binding loop at membrane proximity followed by the Ca²⁺ uptake; b) side chain reorientation of Trp31, which will define a new specificity pocket for the phospholipid chain; c) reduction of the distance between His48 and Asp49, in order to increase the nucleophilicity of His48; d) side chain reorientation of Lys69 concomitant with the projection of the 69-loop to solvent resulting in an increase of the active site accessibility.

These results, in addition with biochemical and crystallographic data knowledge, open access to a more detailed understanding for the molecular mechanism associated with the interfacial activation of phospholipases A₂.

1 Introdução

Nas células, aproximadamente metade das proteínas está associada a membranas. Elas podem se apresentar como proteínas integrais de membranas ou como proteínas associadas à superfície (interfaciais). Ao longo dos anos, um esforço considerável foi dedicado ao estudo estrutural e funcional das primeiras. Por outro lado, um número limitado de proteínas interfaciais foi caracterizado de forma mais extensiva. Como resultado, as proteínas interfaciais permanecem como um dos mais desafiadores sistemas nas biociências moleculares (BAHNSON, 2005).

Catalise interfacial é o nome dado ao mecanismo de catalise heterogênea que ocorre na interface entre dois sistemas. Esse fenômeno não é exclusivo dos processos biológicos, pois existe em diversos sistemas, como, por exemplo, na interface óleo-água, na superfície de filmes ultrafinos e nos sistemas de extração de metais, entre diversas outras aplicações de interesse industrial (VOLKOV, 2002).

Em enzimologia, a catálise interfacial é caracterizada naqueles sistemas onde, como consequência da transição do substrato de um estado monomérico para um estado agregado, é observado um aumento substancial da atividade enzimática (TATULIAN *et al.*, 1997). Tal fenômeno representa o mecanismo enzimático característico das superfamílias das lipases e das fosfolipases, sendo que essas últimas têm servido como modelo para o desenvolvimento do conhecimento desse tópico (BERG *et al.*, 1998).

Uma grande variedade de enzimas está envolvida no metabolismo de diversos grupos de solutos apolares e anfifílicos, incluindo fosfolipídios, ácidos graxos, esteróides, eicosanóides, carotenóides e clorofilas. Na natureza, as enzimas interfaciais evoluíram de forma a otimizar o processo catalítico dentro das realidades biofísicas dos agregados moleculares de substratos apolares (e anfipáticos) em dispersões aquosas. De forma simplificada, para realizar o ciclo catalítico, uma enzima interfacial acessa o seu substrato, o qual é insolúvel em água, posicionando-se na interface entre as fases polar e apolar. As enzimas pertencentes às superfamílias das lipases e das fosfolipases exercem sua ação fisiológica em sistemas bifásicos, onde a fase polar é de natureza aquosa e a fase apolar é constituída pelos próprios substratos (i.e. principalmente lipídeos, no caso das lipases, ou fosfolipídeos, no caso das fosfolipases) (COSTA & de AMORIM, 1999).

O fenômeno da catálise interfacial foi largamente estudado nas décadas de 1960 e

1970, quando se tornou claro que muitas outras enzimas cuja atividade é exercida na membrana requerem o componente lipídico presente numa concentração mínima. Em trabalho pioneiro, VERGER *et al.* (1973) mostraram que a atividade enzimática é perdida com a remoção dos lipídeos do sistema, sendo restaurada com a sua reposição.

Existem diversas interpretações do fenômeno da ativação interfacial enzimática. Um delas (chamada de hipótese do substrato) considera as propriedades físicas da membrana, incluindo fluidez, curvatura, carga superficial, entre outras como os determinantes majoritários da ativação enzimática na superfície de membrana. Outra teoria difundida (hipótese enzimática) postula que mudanças conformacionais na enzima são as principais responsáveis por esse fenômeno (TATULIAN, 2001). Estas duas interpretações representam casos limites, sendo que o mais provável é que a ativação interfacial decorra tanto em decorrência de fatores particulares da membrana quanto da capacidade da enzima adotar uma conformação ótima (plasticidade) para a atividade catalítica.

À parte dessas interpretações, estudos diversos demonstram que a ativação interfacial em enzimas depende do estado físico do substrato (TATULIAN, 2001), e da extensão da interface (observa-se que a atividade enzimática é proporcional à área interfacial) (COSTA & de AMORIM, 1999).

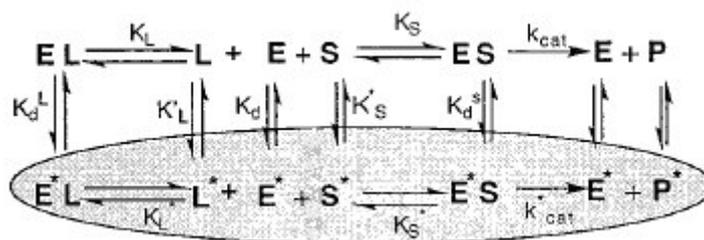


Figura 1. Modelo cinético para catálise e ativação interfaciais. As espécies marcadas com um asterisco estão na interface e em equilíbrio com as espécies correspondentes na fase aquosa. A espécie “L” pode ser um inibidor, um substrato competitivo ou o solvente. Figura adaptada de BERG *et al.* (1998).

A figura 1 ilustra de forma simplificada as relações cinéticas e de equilíbrio entre uma enzima (E) e seus ligantes (L, S ou P) em um ambiente heterogêneo. Os equilíbrios relacionando com as espécies nas duas fases (aquosa e de membrana) controlam a catálise interfacial (número de ciclos catalíticos enquanto a enzima permanece na interface) assim como a acessibilidade do substrato.

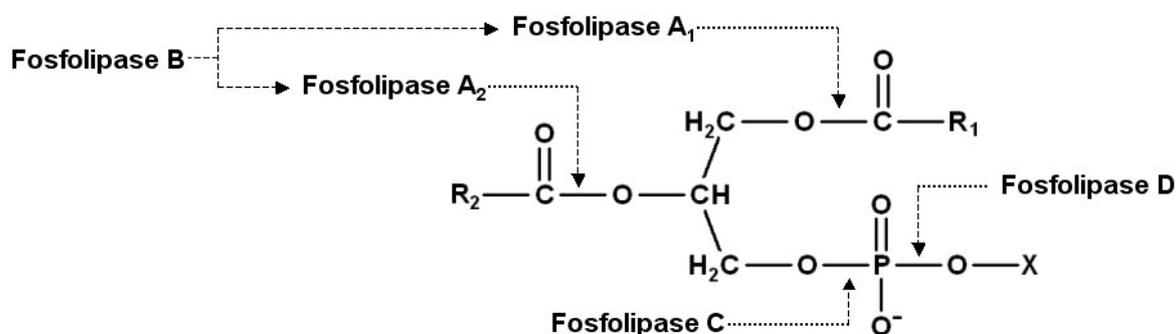
Foram propostas diversas equações visando à descrição das várias etapas da catálise interfacial [BERG *et al.* (1998); BERG *et al.* (2001)]. De forma geral, a cinética de uma

biocatálise interfacial irá variar conforme o tipo de enzima, substrato e ligantes envolvidos. Outros fatores a serem considerados são a acessibilidade e a dinâmica de difusão das moléculas do substrato e do produto entre as interfaces coexistentes (i.e. membrana, ou partículas dispersas, e fase aquosa interveniente). Geralmente, o processo de difusão ocorre numa escala de tempo superior àquela do ciclo catalítico. Além disso, numerosas rotas cinéticas são possíveis, dependendo das contribuições das velocidades e dos equilíbrios que controlam o ciclo catalítico.

1.1 Fosfolipases

Entre as enzimas que apresentam o fenômeno da catalise interfacial, as fosfolipases compõem uma superfamília de esterases cuja função envolve a hidrólise de glicerofosfolipídios (KINI, 1997). Além da atividade catalítica, estas proteínas podem apresentar uma grande diversidade de funções, tais como miotoxidade, neurotoxidade, miocardiotoxidade, entre outras (KINI & EVANS, 1987).

De forma mais geral, as fosfolipases podem ser classificadas quanto à ligação clivada em seus substratos, originando, assim, cinco grandes famílias: fosfolipases A₁, fosfolipases A₂, fosfolipases B, fosfolipases C e fosfolipases D (figura 2).



X: álcool polar como colina, serina, etanolamina, mio-inositol, glicerol e fosfatidilglicerol

R₁ e R₂: cadeias hidrocarbônicas de ácidos graxos

Figura 2. Sítios de ação de fosfolipases sobre glicerofosfolipídios. Adaptada de KINI (1997)

Fosfolipases A₁ (FLA1; EC 3.1.1.32) caracterizam-se pela hidrólise de ligações na posição sn-1 de fosfolipídios, reação que resulta na formação de 2-acilfosfolipídios e de ácidos graxos livres. Esta família está amplamente distribuída em diversos tecidos e organismos (AOKI *et al.*, 2002). Além de sua importância fisiológica, FLA₁ possuem

especial interesse em aplicações industriais, devido à produção de 2-acilfosfolipídios de valor comercial considerável. Já os lisofosfolipídios resultantes da ação das FLA₁ têm propriedades emulsificantes, sendo úteis em processos relacionados com a tecnologia de alimentos e nas indústrias farmacêutica e cosmética (SONG & RHEE, 2001).

Fosfolipases A₂ (FLA₂; EC 3.1.1.4) catalisam a hidrólise da posição sn-2 de glicerofosfolipídios de membrana, produzindo 1-acilfosfolipídios e ácidos graxos livres. Esta reação é particularmente importante quando o ácido graxo gerado é o ácido araquidônico, já que este último é convertido por enzimas metabólicas em vários compostos bioativos (eicosanoides), tais como as prostaglandinas e os leucotrienos. Outros produtos da reação, por exemplo ácido lisofosfatídico e lisofosfatidilcolina, também são biologicamente ativos, sendo precursores de outros potentes mediadores bioativos, tais como o fator de ativação plaquetária (PAF) (KUDO, 2004). Além disso, estudos recentes indicam que FLA₂ possuem função na apoptose, homeostasia de Ca²⁺ e isquemia miocárdial (MURAKAMI, 2004).

Fosfolipases B (FLB; EC 3.1.1.5) representam enzimas da superfamília das fosfolipases capazes de realizar a clivagem das ligações sn-1 e sn-2 de glicerofosfolipídios, apresentando assim não somente ação fosfolipídica, mas também lisofosfolipídica (LPL; EC 3.1.1.5), desacilando completamente os seus substratos. Além disso, descreve-se para estas enzimas atividade tipo fosfolipase-transacilase (LFTA; EC 3.1.1.5) em fungos (CHEN *et al.*, 2000), sendo consideradas como fatores de virulência para organismos patogênicos (SHEN *et al.*, 2004). Desta forma, as FLB apresentam simultaneamente três atividades enzimáticas (fosfolipídica, lisofosfolipídica e transacilase) em uma única proteína. Contudo, ainda não se conhece qual destas atividades é mais importante para a ação patogênica (GANENDREN *et al.*, 2006).

Fosfolipases C (FLC; EC 3.1.4.3) compõem uma família de fosfodiesterases de múltiplos domínios, importantes no metabolismo de fosfolipídios inositólicos. FLC têm como substrato fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato [PI(4,5)P₂], gerando dois produtos intracelulares: inositol 1,4,5-trisfosfato (InsP₃), um reconhecido mensageiro mobilizador de cálcio, e diacilglicerol (DAG), um ativador da quinase C (REBECCHI & PENTYALA, 2000). Em razão dessas ações, as FLC desempenham um papel importante no mecanismo de sinalização celular em mamíferos, com função reconhecida na ação de muitos hormônios, neurotransmissores, fatores de crescimento e outros estímulos extracelulares

(HARDEN & SONDEK, 2006). Nas células de mamíferos, várias formas distintas de FLC foram identificadas e agrupadas em três subfamílias: FLC β , FLC γ e FLC δ . Projetos de seqüenciamento de genoma tem possibilitado a identificação de três novos membros da família FLC: FLC ϵ , FLC ζ e FLC η (COCKCROFT, 2005). Baseado na caracterização molecular das isoformas de FLC e em estudos de sua regulação, KATAN (2005) propôs que as isoformas dentro das famílias estabelecidas não somente preservam uma grande similaridade de seqüência, mas também compartilham uma organização comum de domínios.

A ativação de FLCs é um processo regulado principalmente por mecanismos de ligação a receptores localizados na superfície celular. FLC β são reguladas por receptores acoplados a proteína G (GPCR – *G protein coupled receptors*) enquanto que enzimas da subfamília FLC γ são reguladas por receptores e outras proteínas relacionadas à tirosina kinase. A presença de domínios adicionais específicos nas subfamílias contribui para a existência dos diferentes mecanismos regulatórios observados nas proteínas da família FLC (COCKCROFT, 2005).

Fosfolipases D (FLD; EC 3.1.4.50) têm como função principal a hidrólise de glicerofosfolipídios, produzindo ácido fosfatídico e um aminoálcool. Além disso, observado-se que FLD apresentam potencial para catalisar reações de transfosfatidilação onde, na presença de um álcool acceptor apropriado, elas catalisam a substituição da cadeia hidroxilada. Todavia, a ocorrência bioquímica e a função fisiológica deste último mecanismo ainda são desconhecidas (ULBRICH-HOFMANN *et al.*, 2005). A primeira atividade tipo FLD foi descrita, em 1947, por Hanahan e Chaikoff em extratos de cenoura. Atualmente, membros da família FLD são encontrados em organismos tão diversos como vírus, bactérias, fungos, plantas e animais. Nas células de mamíferos, fosfolipases D são encontradas na maioria dos tipos celulares, exercendo atividade regulatória sobre o citoesqueleto, além de estarem envolvidas nos processos de sinalização celular e no tráfego vesicular associado à secreção e à endocitose (JENKINS & FROHMAN, 2005).

1.1.1 A Grande família das fosfolipase A₂

Dentro da superfamília das fosfolipases, as fosfolipases A₂ formam a família que provavelmente apresenta a maior diversidade funcional. Em 1994, DENNIS (1994)

revisou os então existentes grupos I, II e III, assim como o emergente grupo IV. Três anos após, o mesmo autor publicou uma nova revisão onde o número de grupos conhecidos já havia saltado para nove (DENNIS, 1997). Em 1999, eles já eram dez (BALSINDE *et al.*, 1999). No ano seguinte passaram a ser onze (SIX & DENNIS, 2000) e, com as recentes inserções de três grupos: XII (HO *et al.*, 2001), XIII (CANANAN *et al.*, 2004) e XIV (BALSINDE *et al.*, 2002), chega-se aos quatorze grupos atualmente conhecidos.

Segundo SIX & DENNIS (2000), quatro critérios devem ser empregados para a classificação de uma enzima em um dos diferentes grupos de FLA₂:

- 1) apresentar como principal atividade (porém não necessariamente a única) a capacidade de catalisar a hidrólise de ligações sn-2 de substratos fosfolipídicos;
- 2) possuir a estrutura primária conhecida;
- 3) FLA₂ que possuam um determinado grau¹ de identidade de seqüência devem estar no mesmo grupo;
- 4) caso haja mais de um gene de FLA₂ homólogo dentro de uma espécie, a cada um deles deve ser atribuído uma letra indicativa de subgrupo (exemplo: Grupos IVA, IVB e IVC). Variações ativas de proteínas geradas por processamento devem ser consideradas proteínas diferentes, porém pertencentes ao mesmo subgrupo, podendo receber um numeral diferenciador após suas atividades serem confirmadas (e.g. grupos VIA-1 e VIA-2).

1.1.1.1 FLA₂ Grupos I e II

Os primeiros estudos de atividade tipo fosfolipase foram realizados em suco pancreático bovino e em veneno de cobras². Esses ocorreram na década final do século XIX e no princípio do século XX, sendo posteriormente estendidos a vários venenos de serpentes, abelhas e suco pancreático de outros mamíferos (DENNIS, 1994; SIX & DENNIS, 2000). A maior compreensão mecanística (SCOTT, 1997) e a resolução da estrutura tridimensional das FLA₂ levou, inicialmente, à divisão dessas em dois grupos de

¹ O autor não define qual seria o percentual mínimo de identidade necessário para classificar uma fosfolipase dentro de um mesmo grupo.

² termo que se refere às serpentes venenosas da família *Elapidae*.

acordo com os seguintes critérios (DENNIS, 1994; SIX & DENNIS, 2000):

- a) posição das pontes dissulfídicas;
- b) presença de alças exclusivas;
- c) seqüência de aminoácidos.

As fosfolipases A₂ dos grupos I e II compartilham um conjunto homólogo invariável de estrutura terciária (figura 3), o qual inclui três alfa-hélices (resíduos 1-12, 37-54 e 90-109) e uma alça na região dos resíduos 24-30 (SCOTT, 1997). Os modelos estruturais obtidos por cristalografia de raios-X dessas enzimas demonstram um conteúdo de cerca de 50% de alfa-hélices (DENNIS, 1994) e uma quantidade relativamente pequena de folhas beta, normalmente formada por um única região (resíduos 74-84, localizados entre as hélices 2 e 3), a qual é estabilizada pelo nitrogênio N-terminal (SCOTT, 1997).

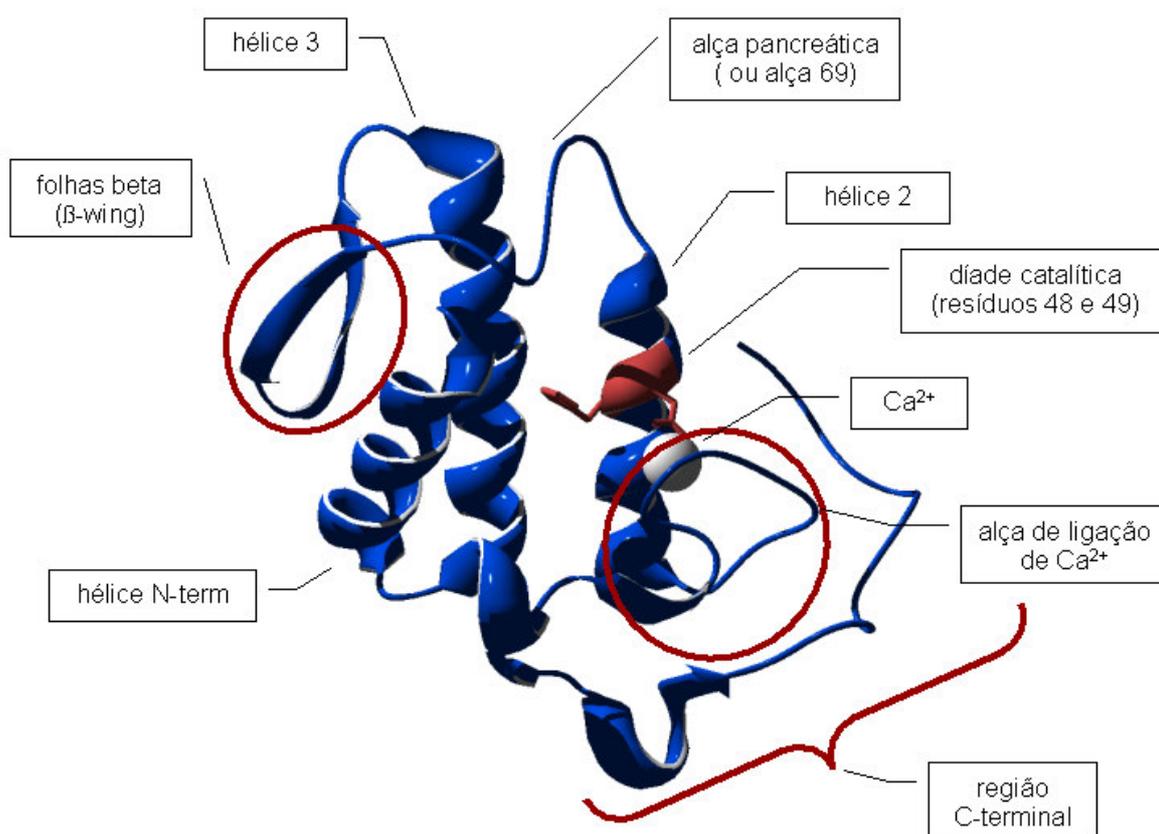


Figura 3. Regiões estruturalmente conservadas em FLA_{2S}. Modelo estrutural de uma fosfolipase A₂ do veneno de *Gloydius halys pallas* (PDB ID: 1PSJ), obtido por WANG *et al.* (1996).

Fosfolipases A₂ dos grupos I e II possuem seqüência de aminoácidos e conteúdo de pontes de enxofre altamente conservados, sendo seis delas em posições fixas, unindo os resíduos 27-131, 29-45, 44-109, 51-102, 61-95 e 85-100 (figura 4), além de uma sétima, cuja a posição é variável.

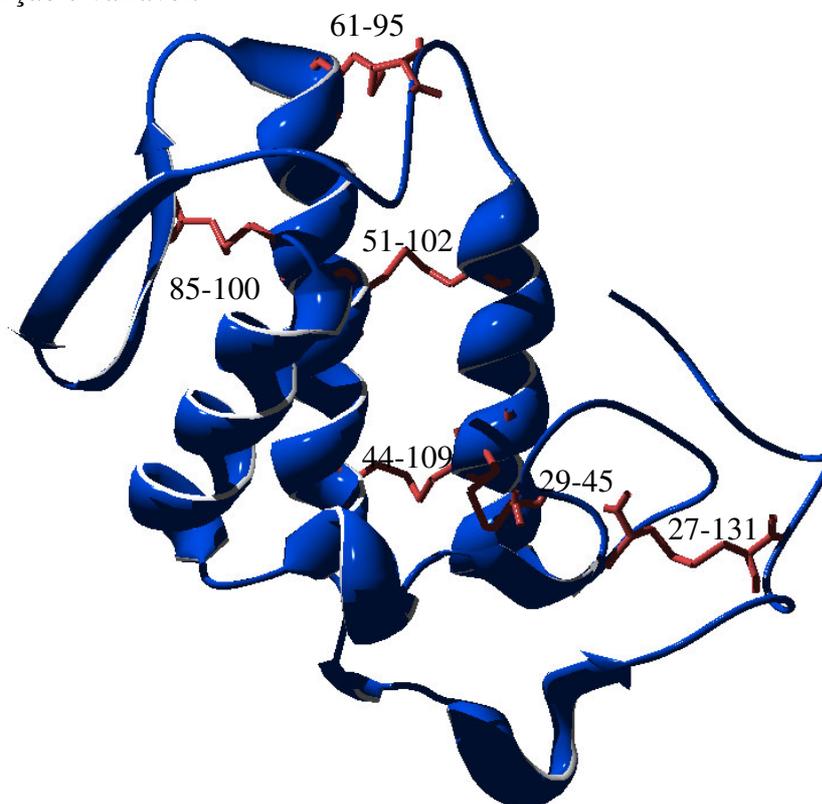


Figura 4. Pontes de enxofre estruturalmente conservadas em FLA₂s. Modelo estrutural de uma fosfolipase A₂ do veneno de *Gloydius halys pallas* (PDB ID: 1PSJ), obtido por WANG *et al.* (1996). A numeração dos resíduos, não consecutiva, emprega o esquema comum proposto para todas as fosfolipases, o qual toma como base a posição do resíduo Asp49.

Fosfolipases do grupo IA possuem como característica típica a presença de uma alça localizada na superfície chamada “alça elapídica”, a qual conecta a hélice 2 a uma folha beta (SIX & DENNIS, 2000). Essas enzimas são encontradas no veneno de cobras e *kraits* (serpente indiana). Elas possuem um tamanho que varia entre 13 e 15 kDa (DENNIS, 1997). Além das seis pontes de dissulfeto conservadas, estas FLA₂ apresentam uma ponte que liga os resíduos 11 e 77 (SIX & DENNIS, 2000).

Por sua vez, fosfolipases do grupo IB foram as primeiras enzimas da família FLA₂GI identificadas a partir de fontes não-venenosas, sendo encontradas no suco pancreático de mamíferos. Como característica exclusiva, estas proteínas apresentam uma extensão única

de 5 aminoácidos chamada "alça pancreática", assim como uma ponte de enxofre ligando os resíduos 11 e 77 (característica de FLA₂GI). FLA₂GIB são secretadas como zimogênios, cuja atividade catalítica só é possível após a clivagem de uma seqüência de 7 aminoácidos por proteases endógenas (SIX & DENNIS, 2000).

O Grupo II de fosfolipases apresentou um rápido crescimento nas duas últimas décadas, onde ele passou de 2 subgrupos (DENNIS, 1994), até chegar nos 6 subgrupos conhecidos (SIX & DENNIS, 2000). Trata-se de um extenso número de fosfolipases que se diferenciam entre si por características como pontes de enxofre (uma ponte ligando os resíduos 50 e 137 é típica para esse subgrupo), tamanho, extensão da alça C terminal e ocorrência na natureza (tabela 1).

Tabela 1: características das FLA₂GII

Subgrupo FLA ₂ GII	Massa molecular aproximada (kDa)	No. de pontes de dissulfeto	Extensão da região C-terminal (em a.a.)	Exemplos de ocorrência
A	13-15	7	7	Fluído sinovial humano, plaquetas de cascavéis e veneno de víboras
B	13-15	6	6	Veneno de víboras gaboon
C	15	8	7	Testículo de ratos e camundongos
D	14-15	7	7	Pâncreas / baço de humanos e ratos
E	14-15	7	7	Cérebro/ coração/ útero de humanos e ratos
F	16-17	7	30	Embrião e testículo de camundongos

Tabela parcialmente adaptada de SIX & DENNIS (2000)

1.1.1.2 FLA₂ Grupo III

O terceiro grupo de fosfolipases foi criado originalmente para agrupar enzimas presentes no veneno de abelhas. Atualmente, ele comporta uma série de outras FLA₂ secretadas, presentes no veneno de escorpiões, de lagartos e de águas vivas. Uma busca no genoma humano encontrou um fragmento com 31% de identidade à FLA₂ GIII da abelha doméstica (*Apis mellifera*) (SIX & DENNIS, 2000). O grupo III das FLA₂ possui muitas semelhanças bioquímicas com os grupos I e II, o que pode ser atribuído a semelhanças de

seqüência (SIX & DENNIS, 2000). Pertencem ao grupo III proteínas com tamanho de cerca de 15 a 18 kDa e que apresentam 5 pontes de enxofre características.

Em comparação com as demais fosfolipases dos grupos III, as FLA₂GIII de humanos são proteínas que se destacam pelo maior tamanho (massa molecular 55 kDa). São constituídas por três domínios, incluindo um domínio central homólogo a fosfolipase A₂ (com uma massa molecular de 16 kDa), o qual apresenta todas as características das demais enzimas do grupo III. Transcritos dos genes que expressam essas proteínas foram detectados em rim, coração, fígado e músculo esquelético. Porém, até o momento não foi descoberto como estas enzimas são proteoliticamente processadas nas células (MURAKAMI, 2004).

1.1.1.3 FLA₂ Grupo IV

As fosfolipases deste grupo foram as primeiras encontradas (em 1986) que não apresenta a estrutura catalítica comum aos grupos anteriores (e.g. His48-Asp49). Foi proposto para as enzimas deste grupo um novo modelo de mecanismo catalítico onde a díade catalítica é formada pelos resíduos Ser228-Asp-549 (SIX & DENNIS, 2000).

Além disso, estas enzimas caracterizam-se pela presença de um domínio C2 (figura 5) no qual ligam-se dois íons cálcio. O domínio C2 é a região utilizada para a ligação de FLA₂ do grupo IV com superfícies fosfolipídicas. In vivo, esse domínio possui a função de transportar a proteína do citosol para a região da membrana em resposta a um aumento da concentração intracelular de íons cálcio.

Por terem sido encontradas originalmente no citosol, as fosfolipases deste grupo passaram a ser conhecidas por fosfolipases citosólicas ou FLA₂c (SIX & DENNIS, 2000).

Estas enzimas são cálcio dependentes e apresentam um tamanho consideravelmente maior que as pertencentes aos grupos anteriores. Atualmente, estas fosfolipases estão divididas em três subgrupos: FLA₂GIV_A (com cerca de 85 kDa) FLA₂GIV_B (114 kDa) e FLA₂GIV_C (61 kDa) (SIX & DENNIS, 2000).

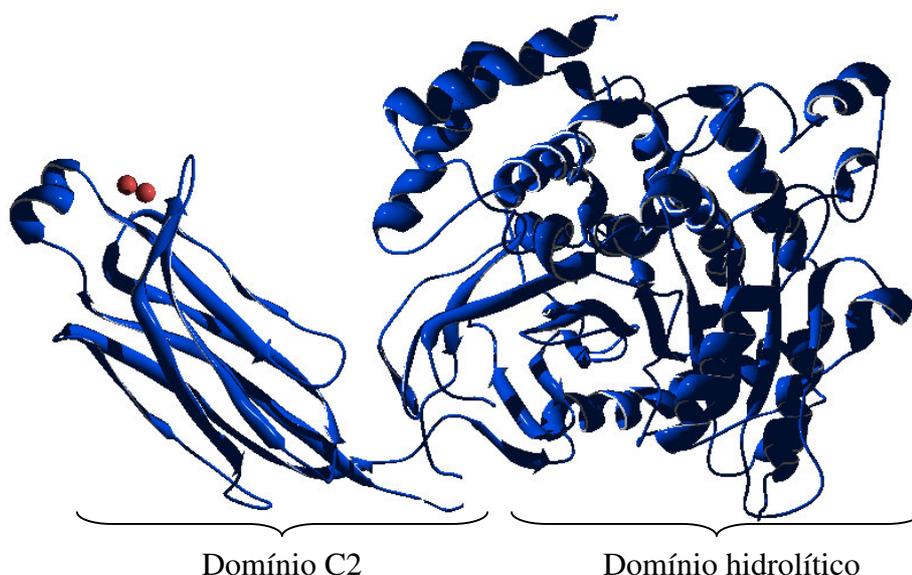


Figura 5. Modelo estrutural de uma fosfolipase A₂ citosólica (PDB ID: 1CJY), obtido por Dessem *et al.* (1999).

Fosfolipases do grupo IV apresentam um papel importante na mediação de processos inflamatórios e nas rotas de transdução de sinal, pois hidrolisam preferencialmente fosfolipídios contendo ácido araquidônico (HIRABAYASH *et al.*, 2004). Além disso, fosfolipases A₂ do grupo IV_B apresentam atividades de lisofosfolipase e transacilase *in vitro* (DENNIS, 1997).

1.1.1.4 FLA₂ Grupo V

O grupo V das fosfolipases A₂ foi proposto em 1994. FLA₂ deste grupo possuem cerca de 14 kDa e seis pontes de enxofre conservadas dos grupos I e II, sem apresentar as pontes específicas destes dois grupos (seção 1.1.1). O grupo V de fosfolipases A₂ reúne enzimas secretadas que não se enquadram facilmente nos grupos anteriores (SIX & DENNIS, 2000).

FLA₂GV foram inicialmente encontradas em camundongos, onde são transcritas e expressas em níveis muito superiores as PLA₂GII em vários tecidos e células imunológicas. Porém são também amplamente encontradas em tecidos humanos, onde sua maior expressão dá-se no coração (MURAKAMI, 2004).

1.1.1.5 FLA₂ Grupo VI

Dentre as enzimas deste grupo, encontra-se a primeira fosfolipase não-dependente de cálcio caracterizada. Ela foi inicialmente denominada iFLA₂ sendo, após, nomeada FLA₂ GVIA-1 (SCOTT, 1997). Primeiramente isolada e caracterizada em macrófagos P388D₁, possui aproximadamente 750 aminoácidos e 85 kDa e Apresenta a seqüência consenso Gly-X-Ser-X-Gly, característica de lípases, a qual contém a serina nucleofílica própria das fosfolipases citosólicas. (SIX & DENNIS, 2000).

As enzimas do subgrupo GVIA são encontradas nas células pancreáticas de humanos, camundongos e ramster e possuem uma função importante na homeostasia e na tradução de sinais de outros processos fisiológicos (SIX & DENNIS, 2000).

Um grupo GVIB foi identificado baseado na seqüência preliminar derivada do projeto genoma humano e posteriormente clonado de cDNA de músculo esquelético e coração. As proteínas do subgrupo GVIB possuem aproximadamente 25% de similaridade de seqüência com as proteínas do subgrupo GVIA.

Foi detectada a existência de outras proteínas relacionadas com o grupo FLA₂GVI, em espécies evolutivamente distantes (e.g. batata). Porém, não foi determinado se essas enzimas pertencem a um dos dois sub-grupos já existentes ou se necessitarão da criação de um novo³ (SIX & DENNIS, 2000).

1.1.1.6 FLA₂ Grupo VII

Até o momento da redação desse trabalho, o grupo VII de FLA₂ apresentava apenas duas proteínas, classificadas em dois subgrupos distintos:

a) subgrupo GVIIA-FLA₂: constituído por uma proteína secretada de 45 kDa e 441 aminoácidos, encontrada na corrente sanguínea de muitos animais; contém o motivo consenso Gly-X-Ser-X-Gly, além da tríade clássica das hidrolases: Ser273, Asp296 e His351. Entre outras atividades, esta enzima possui ação acetil-hidrolase sobre o fator de ativação plaquetária do plasma (pPAF-AH: *plasma platelet activating factor acetylhydrolase*). (SIX & DENNIS, 2000).

b) subgrupo GVIIIB-FLA₂: constituído por uma proteína intracelular (PAF-AH II),

³ Até meados de 2006 não havia sido criado um novo subgrupo para agrupar essas enzimas.

originalmente purificada a partir de tecido cerebral bovino. Possui 41% de identidade de seqüência com a pPAF-AH, além de apresentar o motivo consenso Gly-X-Ser-X-Gly. Esta enzima é expressa em taxas elevadas no fígado e nos rins e, em menor quantidade, em outros tecidos. Atua na célula como agente auxiliar de inibição da apoptose ativada por oxidação (SIX & DENNIS, 2000).

1.1.1.7 FLA₂ Grupo VIII

Também constituído por dois subgrupos (VIII A e VIII B), estas enzimas são expressas intracelularmente em cérebro bovino, nas subunidades heterotriméricas da proteína PAF-AHib.

Cada um dos subgrupos de FLA₂ VIII tem aproximadamente 26 kDa e guardam uma identidade de 62% entre si, apresentando-se como duas subunidades dentro do heterotrimerico PAF-AHib (platelet-activating factor acetylhydrolase isoform Ib) (figura 6) que ainda apresenta uma subunidade regulatória de 45 kDa (SIX & DENNIS, 2000).

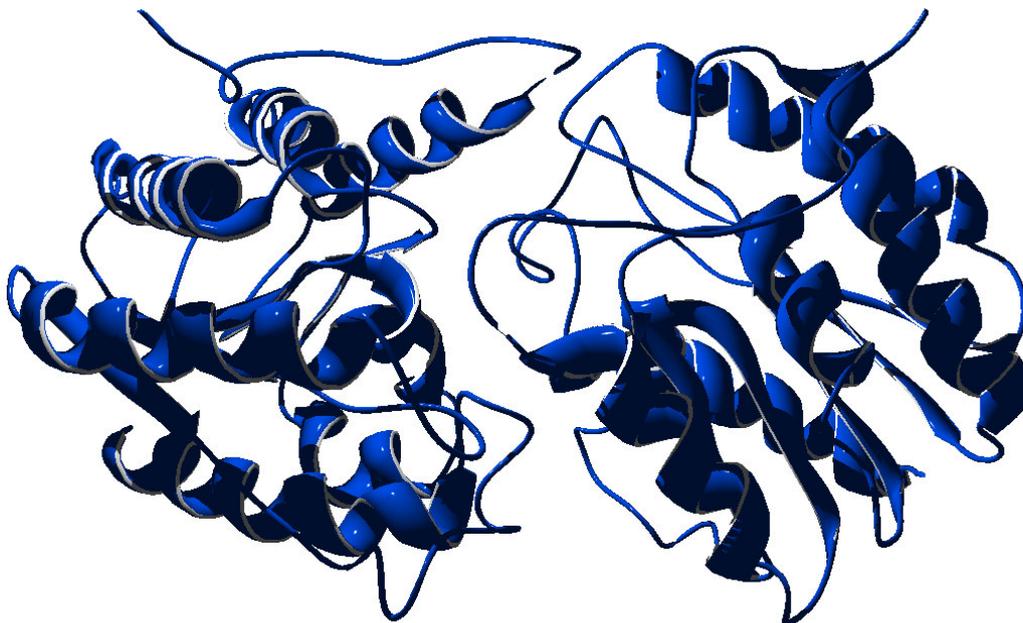


Figura 6. Modelo estrutural do heterodímero catalítico $\alpha 1/\beta 2$ do fator de ativação plaquetário acetilhidrolase Ib de cérebro bovino (PDB ID: 1FXW), obtido por SHEFFIELD *et al.* (2001).

1.1.1.8 FLA₂ Grupo IX

Este grupo de enzimas de aproximadamente 14 kDa apresenta atualmente uma única proteína, chamada conodipina-M, obtida do veneno da lesma marinha *Conus magus* (McINTOSH *et al.*, 1995). Composta por dois polipeptídeos unidos por pontes dissulfídicas, ela apresenta a díade His/Asp característica das fosfolipases secretadas, mas possui um baixo requerimento do íon cálcio divalente (20 μM de Ca^{2+} para uma atividade de 50%).

Até o momento da redação do presente trabalho, a estrutura tridimensional da conodipina-M não havia ainda sido resolvida, segundo consulta na base de dados PDB.

1.1.1.9 FLA₂ Grupo X

Assim como o grupo V, este grupo reúne enzimas cuja classificação nos grupos já existentes é difícil. Estas fosfolipases possuem elementos estruturais característicos de outros grupos de FLA₂ secretadas: i) as pontes dissulfídicas dos grupos I e II; ii) a seqüência da extensão C terminal do grupo II; iii) a seqüência propeptídica do grupo I. As fosfolipases A₂ do grupo X possuem aproximadamente 14 kDa e 123 resíduos (SIX & DENNIS, 2000).

Transcritos de FLA₂-X são expressos nos órgãos dos sistemas imunológico e digestivo de humanos (MURAKAMI, 2004).

1.1.1.10 FLA₂ Grupo XI

Este grupo é composto por fosfolipases secretadas presentes em plantas, tais como arroz, olmo, cravo e *Arabidopsis* (SIX & DENNIS, 2000). Até o momento da redação do presente trabalho, apenas duas fosfolipases são incluídas neste grupo, estando subdivididas em dois subgrupos: GXIA e GXIB.

Apesar de apresentar vários resíduos conservados em relação aos grupos secretados já conhecidos, a baixa identidade de seqüência (menor que 25%), assim como a presença de sete cisteínas estruturalmente únicas, distinguem estas fosfolipases das demais, justificando a classificação como um grupo próprio.

1.1.1.11 FLA₂ Grupo XII, XIII, XIV e além

Em 2001, HO *et al.* reportaram um novo grupo de fosfolipases, identificado como FLA₂ GXII, que se distingue dos outros grupos ricos em cisteína com um motivo catalítico imidazólico, com 20 kDa e distribuição de 14 cisteínas dentro da proteína. Isoformas geradas por processamento alternativo com localização subcelular diferente foram identificadas. Os autores sugerem que este grupo auxilia a resposta de células imonológicas T, a partir da liberação de sinais secundários e geração de eicosanóides.

Recentemente, uma nova fosfolipase secretada foi identificada em camundongos e humanos, sendo classificada em um novo subgrupo: XIIB. A proteína madura tem uma massa molecular de 19,7 kDa e características estruturais similares àquelas previamente identificadas como FLA₂ GXII, que passou a ser conhecido como GXIIA (ROUAULT *et al.*, 2003).

O grupo XIII foi proposto por Cannan *et al.* (2004), contendo fosfolipases oriundas de capsídeos de parvovirus. Essas proteínas possuem atividade auxiliar na entrada do parvovírus na célula hospedeira. Este grupo possui pouca identidade de seqüência com as demais fosfolipases secretadas e não apresenta pontes de dissulfeto. Ensaio com inibidores de fosfolipases conhecidos resultaram em nenhuma ou baixa capacidade inibitória. Estas diferenças estruturais e no mecanismo catalítico levaram os autores a propor a classificação destas enzimas como o novo grupo FLA₂ GXIII.

Em 2001, SORAGNI *et al.* encontraram uma fosfolipase dependente de cálcio associada à superfície de membrana no fungo *Tuber borchii*. Esta enzima foi chamada de TbSP1, sendo a primeira fosfolipase A₂ descrita em fungos. Caracteriza-se como uma nova classe de FLA₂, a qual foi posteriormente classificada como FLA₂ GXIV (BALSINDE *et al.*, 2002). A fosfolipase TbSP1 é sintetizada inicialmente como uma pré-proteína secretada durante a fase micelial. A proteína madura, porém, também encontra-se distribuída na parte interna da membrana celular, próxima à membrana plasmática. Estudos feitos por SORAGNI *et al.* (2001) apontam o papel desta proteína na adaptação do fungo a condições persistentes de limitação nutricional.

Desta forma, a descoberta de fosfolipases A₂ em novos organismos, as quais não se enquadram nos atuais grupos, trará a necessidade da ampliação desta classificação, tanto criando novos subgrupos como gerando outros grupos além dos quatorze já existentes.

Um critério mais simples utilizado para classificar as fosfolipases A₂ leva em consideração a distribuição destas no meio intra ou extra-celular:

1 – FLA₂ secretadas: composto por enzimas menores, que apresentam a díade catalítica His48-Asp49 conservada;

2 - FLA₂ citosólicas: composto por proteínas relativamente maiores, encontradas no citosol; estas proteínas caracterizam-se pela presença da díade catalítica Ser-Asp, a qual não está estruturalmente conservada entre as proteínas desta classe.

Uma classificação simplificada dos grupos existentes de fosfolipases A₂ é apresentada na tabela 2⁴.

Tabela 2: classificação das fosfolipases A₂^a

Grupo	Localização	Tamanho (kDa)	Fontes	Características
I A	Secretada	13-15	Venenos de cobras e <i>kraits</i>	Par His-Asp, 7 pontes dissulfídicas
I B	Secretada	13-15	Pâncreas mamífero	Par His-Asp, Alça Elapídica, 7 pontes dissulfídicas
II A	Secretada	13-15	Fluído sinovial humano, plaquetas de cascavéis e veneno de víboras	Par His-Asp, extensão carboxílica, 7 pontes dissulfídicas
II B	Secretada	13-15	Veneno de víboras <i>gaboon</i>	Par His-Asp, extensão carboxílica, 6 pontes dissulfídicas
II C	Secretada	15	Testículo de ratos e camundongos	Par His-Asp, extensão carboxílica, 8 pontes dissulfídicas
II D	Secretada	14-15	Pâncreas / baço de humanos e ratos	Par His-Asp, extensão carboxílica, 7 pontes dissulfídicas
II E	Secretada	14-15	Cérebro/ coração/ útero de humanos e ratos	Par His-Asp, extensão carboxílica, 7 pontes dissulfídicas
II F	Secretada	16-17	Embrião e testículo de camundongos	Par His-Asp, extensão carboxílica, 7 pontes dissulfídicas
III	Secretada	15-18	Abelhas, lagartos, escorpiões, humanos	Par His-Asp, 5 pontos dissulfídicas

⁴ Visando uma maior facilidade de consulta, na tabela estão repetidos alguns dados apresentados na tabela 1

Grupo	Localização	Tamanho (kDa)	Fontes	Características
IV A	Citosólica	85	Células U937 humanas, plaquetas 264.7, rim de rato	Domínio C2, fosforilação regulatória
IV B	Citosólica	114	Pâncreas, fígado, coração e cérebro humano	Domínio C2
IV C	Citosólica	61	Coração e músculo esquelético humano	Domínio C2, fenilada
V	Secretada	14	Coração e pulmão de macrófagos e humanos	Par His-Asp, ausência de alça elapídica, ausência de extensão C terminal
VI A-1	Citosólica	84-85	Macrófagos P388D ₁ , CHO	Processamento menor, 8 repetições <i>ankyrin</i> ^b
VI A-2	Citosólica	88-90	Linfócitos B humanos, testículos	7 repetições <i>ankyrin</i> ^b
VI B	Citosólica	88	Coração Humano, Músculo esquelético	Ligada à membrana
VIIA	Secretada	45	Plasma humano, bovino, suíno e de camundongos.	Tríade Ser/His/Asp
VII B	Citosólica	40	Rim e fígado humano e bovino	Intracelular, miristoilada
VIII A	Citosólica	26	Cérebro humano	Intracelular, enovelamento tipo proteína G, tríade catalítica Ser/His/Asp, dimérica
VIII B	Citosólica	26	Cérebro humano	Igual a anterior, ativa como heterodímero ou homodímero
IX	Secretada	14	Veneno de lesma marinha	Par His-Asp
X	Secretada	14	Leucócito, <i>baço</i> e timo humanos	Par His-Asp, alça elapídica, extensão C terminal
XI A	Secretada	12,4	Vegetais	Cisteínas estruturalmente únicas
XI B	Secretada	12,9	Vegetais	Cisteínas estruturalmente únicas
XII A	Secretada	20	Células Th2	Par His-Asp, 14 cisteínas
XII B	Secretada	19.7	Camundongos e humanos	Leu48, 14 cisteínas
XIII	Secretada	<10 ^c	Capsídeos de parvovírus	Não apresenta pontes de sulfeto, sítio catalítico diferenciado

Grupo	Localização	Tamanho (kDa)	Fontes	Características
XIV	Secretada	13-19	Fungo simbiótico e <i>Streptomyces</i>	Única encontrada em fungos, sintetizada como zimogênio

^aDados obtidos de BALSINDE *et al.* (2002), CANAAN *et al.* (2004), DENNIS (1997), HO *et al.* (2001) e SIX & DENNIS (2000).

^bClasse de proteínas Alfa-Beta $\alpha\beta$ constituída principalmente por folhas betas antiparalelas (regiões segregadas Alfa e Beta) com repetições organizadas em estruturas alongadas.

^cO motivo fosfolipase de parvovírus possui cerca de 108 resíduos (massa total da proteína: 81-89 kDa).

A grande complexidade estrutural e funcional descrita anteriormente justifica o imenso fascínio que as fosfolipases A_2 vem exercendo sobre a comunidade científica. O detalhamento das relações estrutura-função das fosfolipases A_2 , além de contribuir para o entendimento de diversos eventos biológicos, abre espaço para a possibilidade de planejamento de novas proteínas, com atividades desejadas, bem como para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para um grande número de estados patológicos (MURAKAMI, 2004).

1.2 Fosfolipases A_2 secretadas

Fosfolipases A_2 secretadas (FLA_{2s}) estão presentes em venenos de vertebrados e invertebrados. Em muitos casos, elas representam os maiores componentes das peçonhas desses animais (VALENTIN & LAMBEAY, 2000).

A diversidade molecular observada nas fosfolipases A_2 secretadas de veneno de serpentes (FLA_{2sv}), associada com a presença de receptores para estas proteínas em mamíferos, aponta para a possível existência de um grande número de diferentes fosfolipases A_2 secretadas de mamíferos (FLA_{2sm}). As FLA_{2sm} representariam ligantes endógenos naturais para tais receptores (VALENTIN & LAMBEAY, 2000). No genoma humano foram identificados genes de fosfolipases A_2 dos grupos IB, IIA, IID, IIE e IIF, IIIA, V, X, e XII (BERG *et al.*, 2001).

Conforme já visto, embora a seqüência de aminoácidos das FLA_{2sv} possa diferir significativamente, a estrutura tridimensional é bastante conservada, apresentando diversas características em comum.

A especificidade de uma FLA_{2sv} é determinada pela sua capacidade de reconhecimento interfacial e pela presença de sub-sítios de especificidade na região do sítio catalítico. Desta forma, duas regiões são particularmente importantes no que concerne ao estudo da

atividade dessas proteínas: o sítio catalítico e o sítio de reconhecimento interfacial (face *i*), sendo este último responsável por fazer contatos com moléculas fosfolipídicas na superfície da membrana (BERG *et al.*, 2001).

Os resíduos catalíticos das fosfolipases A₂ secretadas estão localizados em uma das extremidades do sítio ativo. A fenda hidrofóbica de acesso ao sítio catalítico é formada pelos resíduos Leu2, Phe4, Ile9, Ala102, Ala103 e Phe106. O sítio catalítico é circundado pela face *i*, a qual age como um domínio ou sítio de ligação interfacial (figura 7). Todas as estruturas ativas de FLA₂s contêm a mesma díade catalítica: His48-Asp49. As propriedades que diferenciam as diversas FLA₂s são, geralmente, os resíduos que formam a face *i* e outros resíduos da superfície protéica que fazem parte de domínios de reconhecimento para outras funções (tais como miotoxicidade e neurotoxicidade).

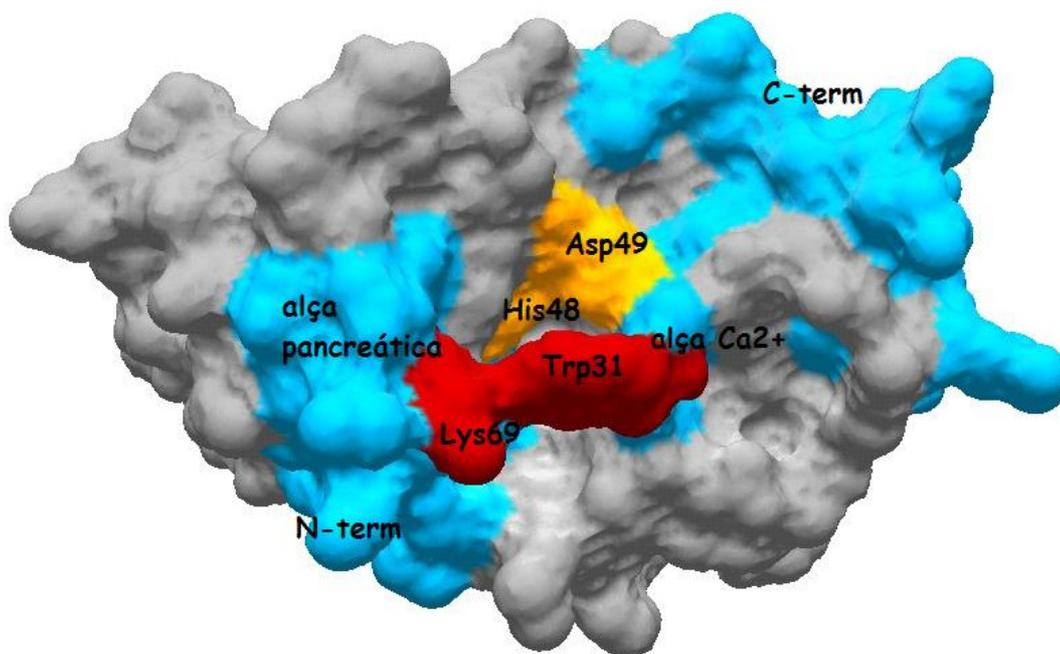


Figura 7. Representação esquemática da superfície molecular destacando as regiões que formam a face *i* da fosfolipase de *Gloydius halys pallas*, PDB ID 1PSJ (WANG *et al.*, 1996). Em amarelo: resíduos que compõem a díade catalítica; em vermelho: resíduos diretamente relacionados com a interação interfacial - Trp31 e Lys69 (SIX & DENNIS, 2000); em azul: demais resíduos que compõem a face *i*.

1.2.1 Interações com a face *i* - Mecanismo de ativação interfacial das Fosfolipases A₂

De uma forma simplificada, pode-se afirmar que o mecanismo de ativação interfacial de fosfolipases A₂, envolvendo desde a aproximação da enzima à superfície fosfolipídica

até a liberação dos produtos de catalise, é um processo que ocorre em cinco etapas bem definidas, sendo cada uma delas finamente controlada por uma constante de equilíbrio. Na figura 8 estão detalhadas estas etapas.

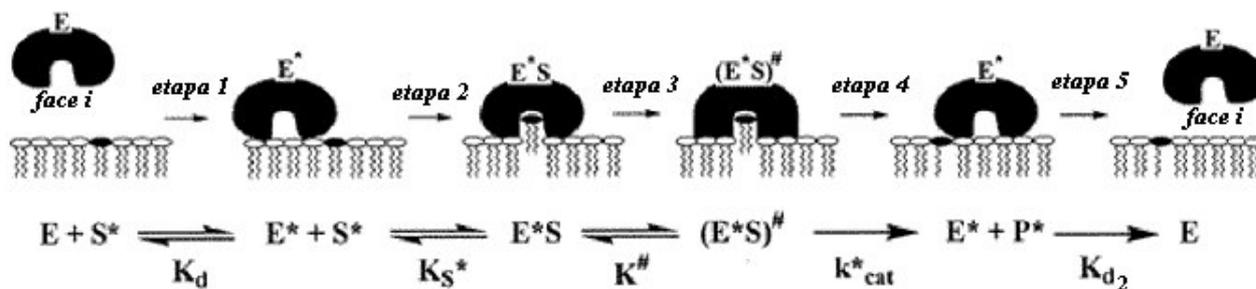


Figura 8. O mecanismo de ativação e de ação interfacial de FLA₂. Figura adaptada de BERG *et al.* (2001).

Como pode ser observado na figura 8, inicialmente, enquanto que a enzima permanece no meio extracelular, ela encontra-se na forma inativa (E). Durante o processo de aproximação da enzima à membrana, mudanças conformacionais originadas na face *i* induzem à passagem para um estado ativado (E*) (Etapa 1). Na segunda etapa do processo de ativação interfacial, a enzima captura um fosfolipídio da membrana, o qual é direcionado para o seu sítio catalítico (complexo E*S). Na etapa 3, forma-se o complexo enzima ativada-substrato, (E*S)[#]. É nessa etapa que ocorre a clivagem da ligação éster. Após (etapa 4), há a liberação dos produtos de catalise, deixando vago o sítio ativo da fosfolipase. A existência da quinta etapa desse processo ainda é motivo de controvérsia. Os modelos propostos divergem quanto à necessidade do retorno da enzima para o meio extracelular para que o ciclo catalítico se reinicie.

1.2.2 Mecanismo catalítico das FLA₂

Apesar de não ser requerido para a ligação da enzima na interface, a presença de um íon cálcio divalente (Ca²⁺) é um cofator essencial para a ligação do substrato no sítio catalítico e para o processo enzimático das fosfolipases A₂ (BERG *et al.*, 2001).

O mecanismo atualmente aceito para a ação catalítica de FLA₂ foi originalmente proposto por SCOOT *et al.* (1990), sendo posteriormente revisado por KINI (2003) (figura 9).

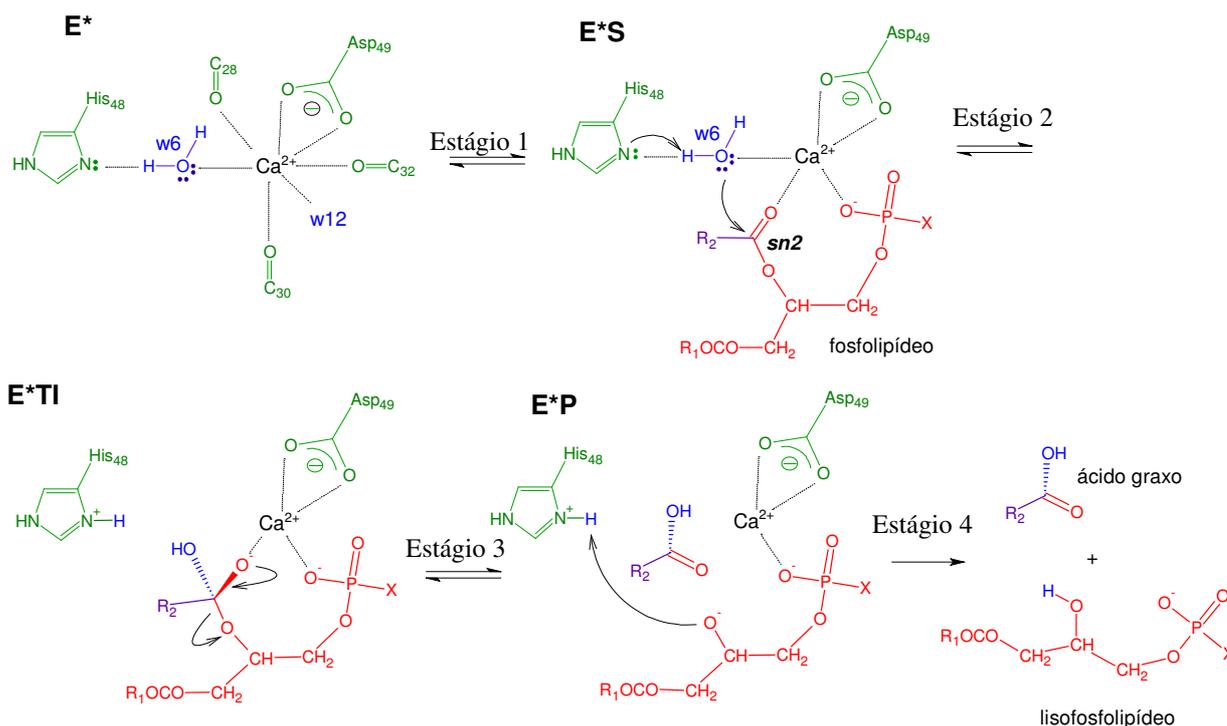


Figura 9. Mecanismo catalítico típico de fosfolipases A₂. Verde: componentes enzimáticos; Vermelho: substrato; Azul: moléculas de água; Lilás: cadeia alifática do grupo ligado à carbonila sn-2 do fosfolípido. Os símbolos C28, C30 e C32 se referem aos carbonos alfa dos resíduos 28, 30 e 32 respectivamente. “w6” e “w12” representam duas moléculas de água. R₁ e R₂ são cadeias alifáticas quaisquer.

Este mecanismo ocorre durante a “etapa 3” do mecanismo de ativação interfacial (figura 8, seção 1.2.1), em quatro estágios principais.

O sítio catalítico da enzima na forma ativada (E*) possui um íon cálcio que é coordenado pela carboxila da cadeia lateral do aspartato 49, pelos oxigênios carbonílicos dos resíduos 28 e 30 da alça de ligação de cálcio (figura 3, na seção 1.1.1.1) e por duas moléculas de água estrutural (na figura 9, as moléculas de água estão em azul e o restante dos resíduos em verde). O nitrogênio gama (γ) da cadeia lateral da histidina auxilia na coordenação de uma das moléculas de água. O complexo enzima ativada - substrato (E*S) é formado a partir do deslocamento, pelo fosfolípido, de uma das moléculas de água (w12) coordenadas pelo íon cálcio presente no sítio ativo. Através de interações eletrostáticas, o íon cálcio polariza a carbonila localizada na posição sn-2 do substrato, aumentando o caráter eletrofílico do carbono carbonílico.

No estágio seguinte, ocorre o ataque nucleofílico de uma molécula de água (w6) sobre a carbonila sn-2. O aumento do caráter nucleofílico da molécula de água é provocado pela

polarização de uma das ligações H-O da água pelo nitrogênio γ da cadeia lateral de His48. O ataque à carbonila leva à formação do complexo enzima ativada – intermediário tetraédrico (E*TI). Após, o caráter de dupla ligação da carbonila é restituído mediante a cisão heterolítica do (complexo enzima ativada – produto (E*P)).

Por último, ocorre a protonação do lisofosfolípido formado, juntamente com a desprotonação do nitrogênio gama da histidina (estágio 4). Observa-se que, neste ponto, o sítio catalítico é regenerado às condições iniciais e ocorre a formação de produtos não ionizados, liberados na seqüência de reações.

1.3 Estudos computacionais relacionados a fosfolipases

Apesar de toda a contribuição que a modelagem molecular pode dar ao entendimento das fosfolipases, há poucos estudos existentes na literatura. Um dos trabalhos precursores foi o realizado por DEMARET & BRUNIE (1992), onde uma simulação de dinâmica molecular de 100 ps foi utilizada com o objetivo corroborar a verossimilhança de uma estrutura catalítica atípica de uma fosfolipase do veneno de *Crotalid A. p. piscivorus*⁵. Neste trabalho, a estrutura do sítio catalítico foi remodelada para uma conformação similar àquela então conhecida de outras fosfolipases. Após o período de simulação, observou-se a convergência do modelo gerado para a estrutura originalmente proposta, resolvida por cristalografia de raios-X. Desta forma, os autores concluíram que as características observadas são próprias da proteína e não representam um artefato de cristalização.

JONES *et al.* (1993) utilizaram a modelagem molecular para realizar uma simulação de 48 ps de uma fosfolipase A₂ complexada com 1,2-Dilauroil-D,L-fosfatidiletanolamina (DLPE) em água. Foi encontrada uma grande semelhança⁶ entre a estrutura prevista para o complexo e a obtida por cristalografia de raios-X.

Posteriormente, ZHOU & SCHULTEN (1996) investigaram a interação de uma FLA₂ com uma superfície de uma membrana monocamada. Trajetórias de DM de 138 ps foram geradas para a fosfolipase A₂ livre (no estado não complexado) e dois complexos enzima-membrana, com diferentes condições de ligação (com uma variação de distância de 2,5 Å

⁵ A estrutura não se encontra depositada no PDB.

⁶ Essa semelhança pode ser causada, em grande parte, pelo baixo tempo de simulação realizado (quando comparado aos padrões atuais), pois talvez não houve tempo para que ocorresse uma completa relaxação da proteína e que esta assumisse uma estrutura diferenciada própria do meio fisiológico.

entre si, chamados pelo autor de fortemente ligado, o mais próximo, e fracamente ligado, o mais distante). As energias livres de solvatação (meio aquoso) foram calculadas para as moléculas lipídicas na interface enzima-membrana. Os resultados deste trabalho mostraram que a dessolvatação dos lipídios ocorre somente na simulação onde a ligação membrana-enzima era mais forte. Neste trabalho é mostrado que os fosfolipídeos da membrana interagem preferencialmente com resíduos hidrofóbicos. Os resultados obtidos apontam para um modelo onde os produtos de hidrólise desestabilizam a membrana facilitando o acesso da enzima ao substrato e conseqüentemente aumentando a velocidade da reação.

Dentre os mais recentes trabalhos de dinâmica molecular relacionados a fosfolipases, destaca-se o realizado por HYVÖNEN *et al.* (2001). Um ponto especialmente interessante nesse trabalho é que nele não foram feitas simulações de fosfolipases, mas de três diferentes situações de membranas fosfolípicas para relatar a ação das FLA₂. Simulações de 1 ns foram realizadas para uma membrana composta por 1-palmitoil-2-linoleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (PLPC) e para duas de suas versões hidrolisadas (bicamadas consistindo de lisofosfolipídios e íons linoleato ou de lisofosfolipídios e moléculas de ácido linoléico). Os resultados revelaram que a perda da estrutura da bicamada hidrolisada deve-se ao aumento da mobilidade das moléculas lipídicas na direção do interior da bicamada.

Utilizando uma metodologia computacional que difere dos trabalhos anteriores, DIRAVIYAM & MURRAY (2006) empregaram o método de diferencial finito de Poisson Boltzmann para, quantitativamente, analisar a contribuição das interações eletrostáticas para a associação de duas FLA₂GII altamente básicas com membranas fosfolipídicas. Os cálculos deste trabalho tinham como objetivo prever o quanto à ligação com a membrana é afetada pela força iônica, pela composição da membrana, pela substituição de resíduos na enzima e pela presença de cálcio no sítio ativo. Os resultados mostraram que interações eletrostáticas não específicas não somente possuem um papel fundamental no recrutamento de enzimas pela membrana, mas também orientam as enzimas para a catálise na região da interface. Em relação à presença do cálcio, um leve aumento na força de interação com a membrana foi observado na ausência desse íon. Porém, os autores, não consideram clara a interpretação desse resultado.

2 Objetivos

A presente dissertação propõe-se a estudar as fosfolipases D49 utilizando ferramentas de dinâmica molecular, visando atingir as seguintes metas:

- a. obter modelos estruturais de FLA_{2SV} em água e em ambiente pouco polar (visando um modelo de baixo custo computacional para simular o ambiente de membrana);
- b. a partir de simulações mais longas, complementar os estudos de dinâmica molecular de FLA_{2SV} já existentes;
- c. estudar a dinâmica do mecanismo de ativação interfacial de FLA_{2SV};
- d. propor um modelo para o mecanismo de ativação interfacial de FLA_{2SV}.

Desta forma, espera-se com esse trabalho a obtenção de um maior detalhamento dos mecanismos de catálise interfacial e de catálise enzimática de FLA_{2SV} buscando contribuir para o futuro desenvolvimento de fármacos para o tratamento de estados patológicos relacionados a essas enzimas.

3. Metodologia

3.1 Dinâmica molecular

Dentre as diversas técnicas que compõem o domínio da química computacional, a dinâmica molecular apresenta-se como uma metodologia de grande adequação para o tratamento de sistemas complexos, constituídos por centenas ou milhares de átomos, tais como aqueles usados no estudo das proteínas. Essa adequação surge pelo fato da dinâmica molecular basear-se nas equações clássicas do movimento newtoniano, cuja resolução, em comparação com as metodologias que utilizam tratamento quântico, é substancialmente mais rápida, possibilitando assim a inserção da dimensão tempo.

Essa particularidade define o principal objetivo de uma dinâmica molecular, que é a obtenção de uma trajetória que determine a posição dos átomos de um sistema em função do tempo.

No início da simulação, são atribuídas aos átomos velocidades iniciais que correspondem à distribuição de Maxwell a uma temperatura determinada. Após, a simulação continua em uma série de passos, correspondendo a pequenos incrementos de tempo, onde a força sobre cada átomo é atualizada (FLORES & MOSS, 1990).

Essa força $F_i(t)$ é calculada de acordo com a equação 3.1, através da derivação da função de energia potencial em relação à posição de cada átomo do sistema $r_i(t)$:

$$F_i(t) = -\frac{\partial}{\partial r_i} V(r_1, r_2, \dots, r_n) \quad (3.1)$$

A aceleração $a_i(t)$ de cada átomo com massa m_i , é dada por

$$a_i(t) = \frac{F_i(t)}{m_i} \quad (3.2)$$

Assim, a posição atômica pode ser obtida por

$$\frac{d^2 r_i}{dt^2}(t) = \frac{F_i(t)}{m_i} \quad (3.3)$$

Nas subseções a seguir, são detalhados os elementos mais importantes para o entendimento da metodologia desse trabalho.

3.1.1 Campo de forças

O termo campo de forças refere-se ao conjunto de funções e parâmetros utilizados para descrever a energia potencial de um sistema de partículas. Esses dados são obtidos a partir de uma combinação de valores experimentais e cálculos de mecânica quântica de alto nível.

Basicamente, um campo de forças é constituído por dois componentes distintos (van der SPOEL *et al.*, 2002):

1. um conjunto de equações (chamadas de funções potenciais) usadas para gerar as energias potenciais (e suas derivadas: as forças potenciais);
2. os parâmetros usados nesse conjunto de equações.

Apesar de um campo de forças possuir implementado um conjunto de funções potenciais, seus parâmetros podem ser modificados para se adequarem melhor às necessidades do usuário ou devido a atualizações do conhecimento utilizado na sua construção.

As funções potenciais podem ser subdivididas em 3 tipos, descritos a seguir.

1. Cálculo das interações entre átomos covalentemente ligados: envolve o cálculo dos estiramentos das ligações covalentes, ângulos entre ligações químicas vizinhas, diedros próprios e diedros impróprios (os cálculos são realizados tendo como ponto de partida listas pré-estabelecidas contendo os valores padrão para estes parâmetros).
2. Cálculo das interações entre átomos que não estão conectados por ligações covalentes: essas interações, cujo cálculo é realizado somente para os átomos não covalentemente ligados que estão dentro de um raio pré-determinado (lista de vizinhos), levam em conta a impenetrabilidade das nuvens eletrônicas, as forças de dispersão e indução dipolar, assim como atrações e repulsões eletrostáticas.
3. Especiais: levam em conta a necessidade de impor, para certos grupos do sistema, restrições de posição e restrições de distância. Essas forças são usadas para impor restrições de movimento ao sistema, tanto para evitar o aparecimento de artefatos de simulação, quanto para incluir conhecimento obtido por dados experimentais. Em ambos os casos, elas não fazem realmente parte do campo de forças, pois são adicionadas pelo usuário. Essas forças são discutidas mais adiante, na seção 3.1.4.

3.1.1.1 Cálculo das interações ligadas

Interações ligadas são baseadas em listas de átomos previamente elaboradas. Elas compreendem não somente interações entre pares atômicos, mas incluem também interações entre três e quatro corpos. São divididas em estiramento de ligação (dois corpos), ângulo de ligação (três corpos), e ângulo diedro (quatro corpos). Um tipo especial de interação por diedro (chamada de diedros impróprios) é utilizado para forçar átomos a permanecerem em um plano ou para prevenir transições para uma configuração de quiralidade oposta (imagem espelhada) (figura 10).

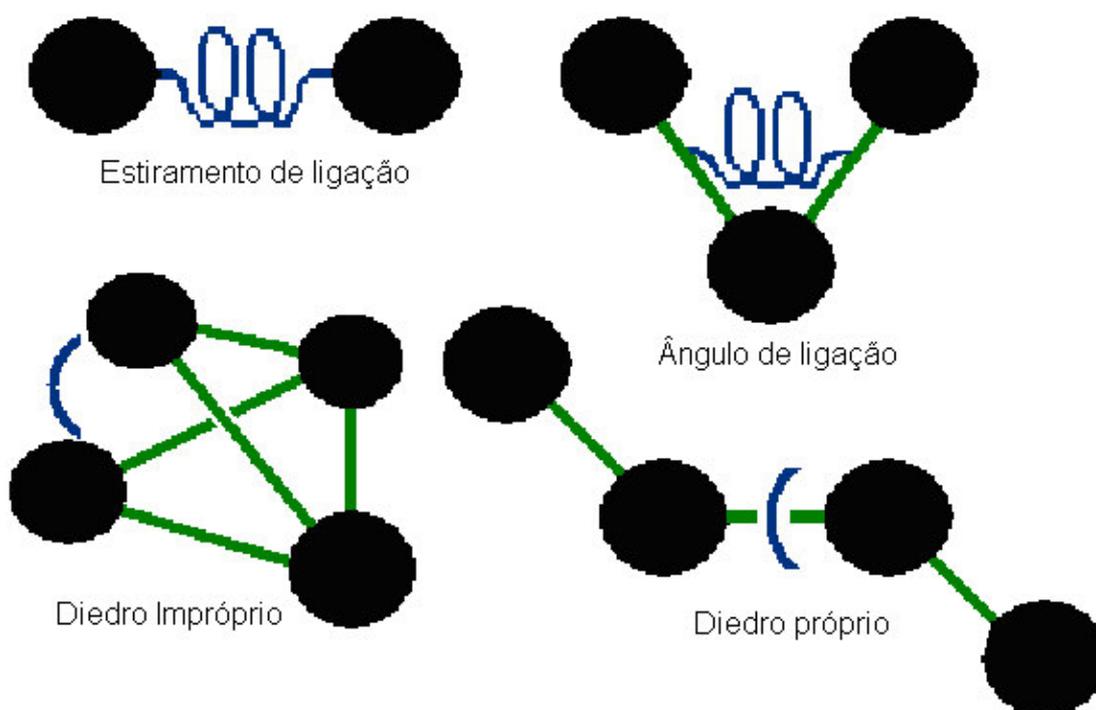


Figura 10. Interações ligadas.

3.1.1.2 Cálculo das interações não-ligadas

As interações não ligadas são calculadas com base em três diferentes termos: repulsão, dispersão e coulombico (ou eletrostático).

Como não é possível obter soluções exatas para a interação não-ligada entre dois átomos, são empregadas metodologias que trabalham com aproximações. Além disso, computacionalmente é muito custoso calcular as interações não-ligadas entre todos os

pares de átomos existentes. Para reduzir o tempo de computação, um raio de corte R_{cut} é utilizado onde, além desse raio, as interações são consideradas negligenciáveis e assim não são incluídas. É geralmente aceito que R_{cut} não deve ser menor do que 8 Å (FLORES & MOSS, 1990).

Uma outra forma de diminuir o gasto computacional é atualizar a lista de vizinhos somente após um determinado número de passos de simulação (normalmente 10). Além disso, essa lista pode ser dividida em duas partes, uma que lida com interações de curto alcance, e uma segunda para interações de longo alcance, que poderá ser atualizada com menor frequência.

Geralmente, os termos de repulsão e dispersão são combinados em tratamentos tipo Lennard-Jones (interação 6-12) ou Buckingham (interação de expoente 6). O potencial de Buckingham é mais flexível e realístico que a interação de Lennard-Jones, porém apresenta um maior custo computacional. Em adição, as interações entre átomos carregados são calculadas através da aplicação de um termo eletrostático.

A figura 11 exemplifica os diferentes tipos de interação não-ligadas existentes.



Figura 11. Interações não-ligadas.

3.1.2 Campo de forças do GROMOS

A qualidade das simulações de sistemas de interesse biológico realizada por dinâmica molecular depende criticamente do campo de forças utilizado para descrever as interações entre as partículas do sistema. Campos de força são geralmente parametrizados usando dados experimentais de moléculas pequenas – assim, eles somente podem ser considerados confiáveis após a realização de simulações de sistemas biológicos relevantes seguida da validação dos resultados obtidos mediante a comparação com dados obtidos na bancada.

GROMOSTM (atualmente GROMOS96TM) é o nome dado para um pacote comercial de simulação molecular adaptado para o estudo de sistemas biológicos, associado com diversos campos de forças.

De uma forma geral, os campos de força do GROMOSTM dividem-se em dois tipos: os campos de forças “versão-A”, desenvolvidos para a aplicações com soluções aquosas ou apolares, empregados para proteínas, nucleotídeos ou açúcares e os campos de forças “versão-B”, elaborados para simulações com moléculas isoladas em fase gasosa.

De acordo com *The van Gunsteren group's Home Page*⁷ (2006), o primeiro conjunto de parâmetros (campo de forças) para o GROMOS data de 1984 e os campos de forças mais utilizados atualmente são: GROMOS 37C4 de 1985; GROMOS 43A1 de 1996 e o GROMOS 45A3 de 2001. As versões mais atuais são o GROMOS 45A4 (campo de forças otimizado com parâmetros para carboidratos) e GROMOS 53A5/6 (ambos otimizados para calcular a energia livre de solvatação de cadeias laterais de aminoácidos).

3.1.3 Condições periódicas de contorno

O uso de condições periódicas de contorno em simulações de DM serve para eliminar os efeitos de superfície e para expandir uma simulação de um único sistema (e.g. proteína mais moléculas de solvente) para o infinito, pois o mesmo sistema é replicado em todas as direções da caixa simulada (figura 12).

Nesse tratamento, os átomos do sistema a ser simulado são colocados em uma caixa, a qual é circulada por cópias transladadas de si mesma. Desta forma passam a inexistir fronteiras no sistema. Assim, o artefato causado por fronteiras indesejadas é substituído pela abordagem das condições periódicas (van der SPOEL *et al.*, 2002).

Existem muitas geometrias de caixas possíveis para o uso em condições periódicas de contorno, tais como o dodecaedro rômico e octaedro truncado (Figura 13). Esses sistemas são mais próximos de uma esfera do que um sistema cúbico, sendo considerados computacionalmente menos custosos para o estudo de macromoléculas em solução (van der SPOEL *et al.*, 2002), já que poucas moléculas de solvente são requeridas para preencher a caixa.

⁷ <http://www.igc.ethz.ch/>

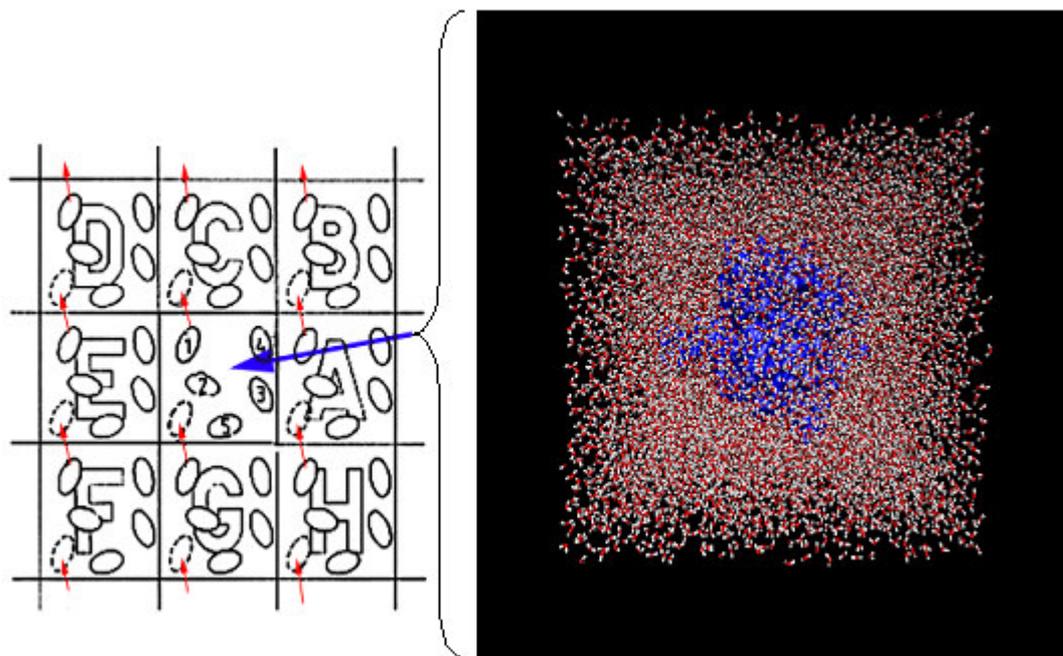


Figura 12. Representação simplificada do uso de condições periódicas de contorno em uma simulação.

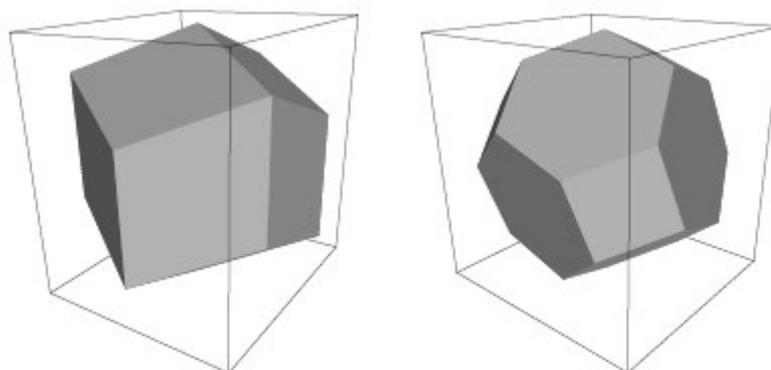


Figura 13. Dodecaedro rômico e octaedro truncado, ambos em orientações arbitrárias. Figura adaptada de van der SPOEL *et al.* (2002).

3.1.4 “Constraints” e “Restrains”: SHAKE e LINCS

Os termos “*constraints*” e “*restraints*” são usados normalmente para fixar posições de referência. Elas podem ser utilizadas durante a equilibração, para evitar reorganizações muito drásticas de partes críticas do sistema (como restringir o movimento em uma proteína que está sujeita a grandes perturbações causadas por um solvente que ainda não se

encontra equilibrado).

Outra aplicação é a restrição de partículas que estão sobre um perímetro ao redor de uma região que é simulada. No passado, tendo como objetivo economizar custo computacional, essa aplicação foi bastante empregada, geralmente para modelar determinadas regiões de interesse de macromoléculas, (e.g. sítio de interesse de uma proteína) deixando o restante do sistema totalmente ou parcialmente “preso”.

No ambiente computacional (virtual) não existem ligações covalentes reais mantendo os átomos conectados. Mas, como há um potencial harmônico para cada ligação, é virtualmente impossível rompê-las. Ligações com átomos leves, contudo, podem vibrar em frequências cujo tempo característico é inferior ao do passo de integração, levando a erros na propagação das posições e na conservação da energia. Essas ligações devem ser corrigidas usando *constraints* para eliminar o efeito espúrio dos movimentos rápidos. Dessa forma, os algoritmos SHAKE, RATTLE e LINCS são exemplos de alternativas empregadas para contornar esse problema.

No caso da rotina SHAKE, por exemplo, um conjunto r de distâncias (e ângulos) de referência é empregado para alterar um conjunto de coordenadas r' , gerando um novo conjunto r'' , o qual deve satisfazer os valores presentes em uma lista pré-definida de distâncias constringidas (*constrained bond lengths*):

$$\text{SHAKE } (r' \rightarrow r''; r)$$

A partir da escolha de um valor de tolerância, O algoritmo SHAKE corrige as coordenadas atômicas da lista de ligações constringidas de forma iterativa até que seja satisfeito o critério de tolerância relativa escolhido, para só então permitir que a simulação avance para o próximo passo.

Por sua vez, o LINCS (*LINear Constraint Solver*) é um algoritmo que retorna as ligações aos seus comprimentos corretos após uma atualização sem a aplicação de constringimentos moleculares (*unconstrained update*). Esse método não é iterativo e, embora esteja baseado em operações que envolvem matrizes, não são realizadas multiplicações entre matrizes. O algoritmo LINCS é considerado mais estável e rápido que o algoritmo SHAKE. Contudo, pode ser utilizado somente com ligações constringidas (*bond constraints*) e com ângulos isolados de ligação constringidos (*isolated angle constraints*) (e.g. ângulo do próton na hidroxila).

3.1.5 Termostato e barostato

A utilização de um termostato e de um barostato nas simulações de dinâmica molecular serve para manter a temperatura e a pressão, respectivamente, dentro de valores desejados.

Em uma dinâmica molecular, a temperatura T está relacionada com a diferença de velocidades atômicas e é definida como a energia cinética do sistema. Por diversas razões (e.g. flutuações durante a etapa de ambientação, flutuações como resultado do truncamento de forças e erros de integração) faz-se necessário o controle da temperatura do sistema. Essa propriedade pode ser mantida constante durante uma DM através de métodos variados. Um método bastante utilizado trata de acoplar o sistema fracamente a um banho externo. Nesse procedimento as velocidades das partículas são corrigidas a cada passo da simulação (van der SPOEL *et al.*, 2002). Normalmente, o acoplamento térmico é realizado através do uso de um termostato de Berendsen em um banho com temperatura Ref_t [K], e uma constante de atualização de tempo Tau_t [ps]. Diversos grupos podem ser acoplados separadamente.

De forma semelhante ao acoplamento de temperatura, o sistema também pode ser imerso em um “banho de pressão”. Essa propriedade pode ser mantida constante de uma maneira similar através do ajuste do volume da caixa do sistema. Existem diversas formas de controlar a pressão durante uma DM, entre as principais destacam-se:

1. Isotrópica – a pressão é tratada isotropicamente com uma constante de tempo Tau_p [ps]. A compressibilidade e pressão de referência são escolhidas pelo fornecimento das propriedades compressibilidade [bar^{-1}] e $refp$ [bar];
2. Semi-isotrópica – a pressão acopla isotropicamente nas direções x e y , mas de uma forma diferente na direção z . Esse método pode ser útil em simulações com membranas. Dois conjuntos de valores são necessários para as direções x/y e z respectivamente.
3. Anisotrópica – De forma semelhante a anterior, só que seis valores são necessários para os componentes xx , yy , zz , xy/yx , xz/zx e yz/zy respectivamente.
4. Tensão-superficial – O acoplamento por tensão superficial se dá para superfícies paralelas a uma plano xy . Esse método utiliza um acoplamento de pressão normal para a direção z , enquanto que a tensão de superfície é acoplada com as

dimensões x/y da caixa.

5. Triclínico – Esse método utiliza uma caixa completamente dinâmica, utiliza seis valores para compressibilidade e seis pressões de referência.

3.1.6 Etapas da simulação

Didaticamente, a descrição de um procedimento de simulação por dinâmica molecular pode ser dividida em seis etapas, resumidas a seguir.

1. Etapa inicial. Nessa etapa ocorre o assinalamento das condições iniciais do sistema, tais como coordenadas atômicas, temperatura inicial, pressão, entre outras. Nessa etapa, nenhum cálculo é rodado.
2. Minimização de energia. A função dessa etapa é a realização de um cálculo prévio, que visa à relaxação da estrutura proteína e dos ligantes, removendo desta forma eventuais contatos irreais gerados em consequência do empacotamento cristalino.
3. Simulação com restrição de posições. Nessa etapa, a proteína e os ligantes (quando existirem) são mantidos rígidos, enquanto as moléculas do solvente são relaxadas. Essa etapa pode variar, de poucos picosegundos até algumas centenas, dependendo da complexidade do sistema utilizado.
4. Termalização. Corresponde ao período da simulação em que é feito um aumento gradual da temperatura, objetivando evitar o choque térmico no sistema simulado. A duração da etapa de termalização varia de acordo com a complexidade do sistema.
5. Ambientação. É uma etapa onde o sistema já se encontra nas condições de pressão e temperatura desejadas, mas ainda não teve tempo suficiente para relaxar e assumir uma configuração de equilíbrio estrutural e termodinâmico. Uma etapa de ambientação mais longa, geralmente, garante resultados de melhor qualidade na próxima etapa.
6. Produção. A última etapa de uma simulação por dinâmica molecular. Essa etapa gerará uma trajetória que será utilizada para a obtenção dos dados experimentais.

Às seis etapas anteriormente comentadas, pode ser acrescentadas novas etapas, como a inserção de íons, a inserção de outros solventes (para sistemas bifásicos), uma nova etapa de restrição de posições após a termalização, etapas para o equilíbrio da pressão do sistema, entre outras podem se fazer necessárias conforme a complexidade do sistema simulado.

3.1.7 Validação da simulação de DM

Estudos realizados através de simulações de dinâmica molecular são verificados pela comparação de propriedades simuladas e experimentalmente medidas (não-computacionais) do sistema considerado.

Segundo van GUNSTEREN & MARK (1998), deve-se considerar cinco fatores durante a validação de resultados de uma simulação computacional: qualidade da teoria ou modelo, acurácia do tratamento das interações interatômicas ou do campo de forças, grau de amostragem estatística e convergência, qualidade do software de simulação e o quão competentemente esse software é utilizado.

Os autores dividiram os resultados de comparações entre valores não-computacionais (de bancada) e simulados (teóricos) em dois casos extremos:

1. Valores convergem. O que pode ser devido a uma ou mais das seguintes razões: a simulação adequadamente reflete o sistema real, a propriedade examinada é insensível aos detalhes da simulação ou aconteceu uma compensação de erros.
2. Não há convergência entre os valores. O que pode ser causado por duas razões principais: a simulação não reflete o sistema real (teoria ou modelo incorreto, campo de força inadequado, simulação não convergiu, software falho ou utilizado incorretamente) ou os dados experimentais estão incorretos.

Para que os resultados de uma dinâmica molecular possam ser considerados válidos, possuindo um grau de amostragem estatística e convergência adequada, vários fatores podem ser estimados. Esses fatores podem ser divididos em três categorias principais:

1. Propriedades Estruturais, tais como posição atômica média ou distâncias interatômicas, manutenção de estruturas secundárias, adequação ao diagrama de Ramachandran, raio de giro (Rg), superfície acessível ao solvente (SAS), fatores de

- temperatura cristalográficos (fatores B); fatores de distribuição radial e densidade do sistema;
2. Propriedades Termodinâmicas, entre elas as energias do sistema (e.g. energia total e energia livre de solvatação), capacidade calorífica, coeficiente de expansão térmica e tensão superficial;
 3. Propriedades Dinâmicas, tais como constantes de difusão, tempo de correlação rotacional, tempo de correlação dielétricos e viscosidade do sistema.

Observa-se que essas propriedades só podem ser utilizadas para fins de validação quando obtidas em sistemas equilibrados e deve-se sempre utilizar os valores médios das propriedades.

3.2 Métodos estocásticos

Uma alternativa à utilização aos métodos de dinâmica molecular é o uso de técnicas que permitam a inserção de parâmetros aleatórios nas simulações, através das ferramentas da mecânica estatística⁸.

A habilidade de fazer previsões baseadas em propriedades microscópicas é uma das principais vantagens da mecânica estatística quando comparada aos métodos puramente termodinâmicos. Apesar de ambos os modelos serem governados pela segunda lei da termodinâmica através da medição da entropia, nos métodos termodinâmicos, essa propriedade pode ser apenas medida empiricamente, sendo que na mecânica estatística, ela é uma função da distribuição do sistema em seus micro-estados.

A principal distinção dos métodos de mecânica estatística em relação à dinâmica molecular é que esses são estocásticos, ou seja, são não-determinísticos, usualmente através da incorporação de valores aleatórios na simulação.

Existem vários métodos computacionais utilizados para a simulação de sistemas biológicos que acoplam ferramentas da mecânica estatística. Entre estes, os métodos de Monte Carlo (MC) e de dinâmica Browniana (DB) aparecem com grande frequência.

⁸ A dinâmica molecular também está baseada na mecânica estatística. As médias de “ensemble” que correspondem às propriedades termodinâmicas são assumidas como sendo iguais às médias temporais (hipótese ergódica).

Monte Carlo é um método para interativamente validar um modelo determinístico, usando um conjunto de números aleatórios como entrada. Uma simulação por Monte Carlo gera configurações de um sistema ao fazer mudanças de posições randômicas (orientações e conformações) nas espécies presentes. Uma técnica chamada de amostragem por importância é utilizada nessas simulações para que haja um cálculo acurado das propriedades moleculares. Por ser um método não-dinâmico, MC não possui contribuição da dimensão tempo, sendo ineficaz para calcular propriedades que dependem desse parâmetro.

Por sua vez, a dinâmica browniana é um método utilizado para a investigação da dinâmica de grandes complexos em grandes escalas de tempo. Os princípios básicos envolvendo a dinâmica browniana são os mesmos da dinâmica molecular. Assim, a DB pode ser definida como um métodos de DM acrescido de parâmetros aleatórios.

Porém, a descrição detalhada de átomos individuais é perdida. Nesse método, as moléculas são tratadas como corpos rígidos ou semi-rígidos. Desta forma, a dinâmica browniana é geralmente um método mais conveniente matematicamente do que acurado, porém ele permite a ampliação do tempo de simulação para microsegundos, através da adição dessas novas aproximações.

3.3 Programas utilizados

Na realização desse trabalho, diversos programas e pacotes de dados, de autoria de terceiros e de licença gratuita foram utilizados. Dentre eles, inclui-se:

Programa para obtenção das trajetórias de Dinâmica Molecular: GROMACS 3.1.4. (GROMACS, 2006; van der SPOEL *et al.*, 2002; BERENDSEN *et al.*, 1995; LINDAHL *et al.*, 2001);

Programa utilizado para geração de topologias: PRODRG (van AALTEN *et al.*, 1996);

Programa utilizado para a manipulação de estruturas: Swis-PDB Viewer (GUEX & PEITSCH, 1997);

Ferramenta utilizada para o refino de estruturas: POV-ray for Windows (POV-RAY, 2006);

Campo de forças utilizado: GROMOS96 43a2 (van GUSTEREN *et al.*, 1996; SCHULER *et al.*, 2001).

3.4 Obtenção da estrutura inicial

As coordenadas iniciais das simulações realizadas no presente trabalho foram obtidas da estrutura cristalográfica da fosfolipase A₂ ácida de *Gloydius halys pallas*, catalogada como “1PSJ” no Protein Data Bank (RCSB PROTEIN DATA BANK, 2006). Essa estrutura foi obtida, através de experimentos de difração de Raio-X, por WANG, X.Q. e LIN, Z.J. e depositada em 24 de maio de 1995. Ela possui uma resolução de 2.0 Å e foi citada inicialmente em WANG *et al.* (1996).

Halys é o nome genérico proposto em 1849 para um grupo de víboras venenosas encontradas na Ásia. Devido a grandes semelhanças morfológicas, até recentemente (1999), essas serpentes foram classificadas no gênero *Agkistrodon*, porém, atualmente, elas pertencem ao gênero *Gloydius*. Por isso, a estrutura depositada no PDB é denominada como pertencente a uma proteína extraída da serpente *Agkistrodon halys pallas*, porém essa subespécie na nova classificação passou a denominar-se *Gloydius halys pallas*.

A subespécie *Gloydius halys pallas* (encontrada somente na china) contém, em seu veneno, três diferentes fosfolipases A₂ (com pontos isoelétricos de 4,5; 6,9 e 9,3 e classificadas como ácida, neutra e básica, de acordo com essa propriedade). Elas diferem grandemente em atividade enzimática, potência letal e efeito farmacológico (WANG *et al.*, 1996).

A FLA_{2sv} utilizada (seqüência de aminoácidos e estrutura secundária ilustradas na figura 14) é composta por 124 resíduos, com aproximadamente 14 kD, e possui pequena toxicidade e alta atividade enzimática, além de apresentar a habilidade de inibir a agregação plaquetária. Ela foi escolhida como modelo de FLA_{2sv} nesse trabalho por apresentar o íon cálcio internalizado no seu sítio ativo.

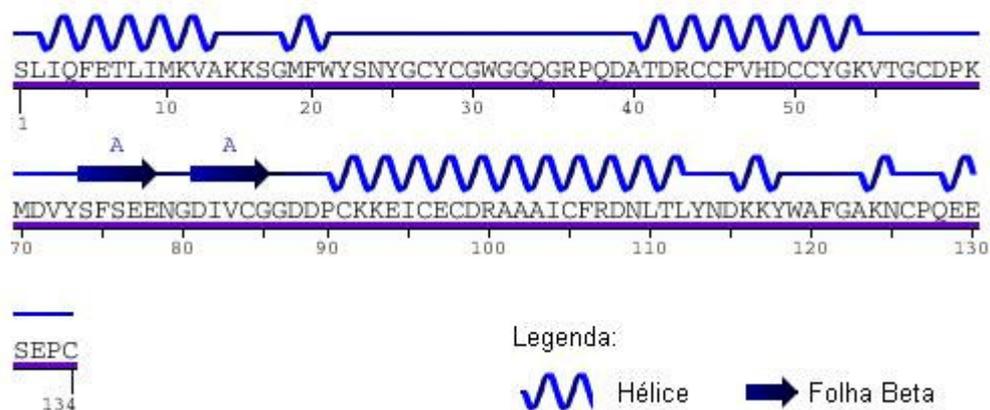


Figura 14. Seqüência de aminoácidos e estrutura secundária da fosfolipase A2 ácida de *Gloydius halys pallas*. Adaptada da figura gerada automaticamente pelo Protein Data Bank. A numeração dos aminoácidos é baseada no esquema comum proposto para todas as fosfolipases e não é consecutiva.

3.5 Geração das caixas de solvente

Os três ambientes utilizados como solvente, nesse trabalho foram obtidos de forma diferenciada, conforme descrito a seguir.

3.5.1 Simulações em meio aquoso

Nas simulações em ambiente aquoso, o modelo SPC de água foi utilizado. Para que ocorresse a neutralização das cargas do sistema, 3 átomos de sódio foram inseridos.

Diversas condições de aplicação de forças de restrição sobre o átomo de cálcio foram utilizadas. Nesses casos, construiu-se um arquivo próprio de restrição energética que matinha uma força aplicada sobre o íon (variando entre 500 e 2000 J mol⁻¹ nm⁻²) e uma força desprezível sobre o restante dos átomos da proteína (1 mJ mol⁻¹ nm⁻², o mínimo permitido pelo programa). Os detalhes particulares de cada simulação estão descritos no artigo em anexo no próximo capítulo.

3.5.2 Simulação em metanol

A caixa de metanol foi construída utilizando a topologia existente no pacote original do GROMACS (2006), já adaptada para o formato GROMOS96. Para neutralizar o sistema, três átomos de sódio foram inseridos.

3.5.3 Simulação em octanol

Os parâmetros para as moléculas de octanol, para o campo de forças utilizado, foram obtidos com o provedor PRODRG (van AALTEN *et al.*, 1996). A molécula gerada foi copiada repetidas vezes com o auxílio do programa Swis-PDB Viewer (GUEX & PEITSCH, 1997) até que fosse obtida uma caixa com 160 moléculas.

Essa caixa foi equilibrada através de uma simulação de dinâmica molecular de 4,5 ns. Após, as coordenadas finais da simulação foram utilizadas para solvatar a proteína. Como o sistema é pouco polar, não foram inseridos contra-íons.

3.6 Protocolo das simulações

Todos os sistemas foram simulados em condições de pressão constante (NPT) e com a utilização de condições periódicas de contorno (PBC). As dimensões da caixa central foram feitas de forma que sempre existisse uma distância mínima de 10 Å entre quaisquer átomos da proteína e a parede mais próxima, para as simulações em meio aquoso e metanol. Nas simulações em octanol a distância utilizada foi de 12 Å.

Após a conversão da estrutura cristalográfica obtida para o formato GROMACS, foi feita uma minimização, por mecânica molecular, de 200 passos com o objetivo de relaxar a proteína. Na sequência, para relaxar as fortes interações entre solvente-solvente e proteína-solvente foi realizado 1 ps de simulação de dinâmica molecular restringindo a estrutura da proteína. As velocidades iniciais foram obtidas de acordo com a distribuição de Maxwell.

O sistema foi aquecido gradualmente, de acordo com a rampa mostrada na figura 15. Após, o sistema foi ajustado para 310 K. As simulações foram realizadas com um tempo de integração de 2 fs. As temperaturas da proteína e do solvente foram independentemente acopladas com um banho térmico com um tempo de relaxação de 0,1 ps. A pressão do

sistema foi acoplada por um banho de pressão com escala isotrópica e tempo de relaxação de 0,5 ps para a água e o metanol. Para o octanol, o tempo de relaxação foi gradualmente decrescendo ao longo da simulação, partindo de 0,80 até chegar a 0,55 ps em 6 passos de 0,05 ps cada (0,0 a 1,0 ns, 1,0 a 1,2 ns, 1,2 a 1,4 ns, 1,4 a 1,6 ns, 1,6 a 1,8 ns e 1,8 a 2,0).

Termalização

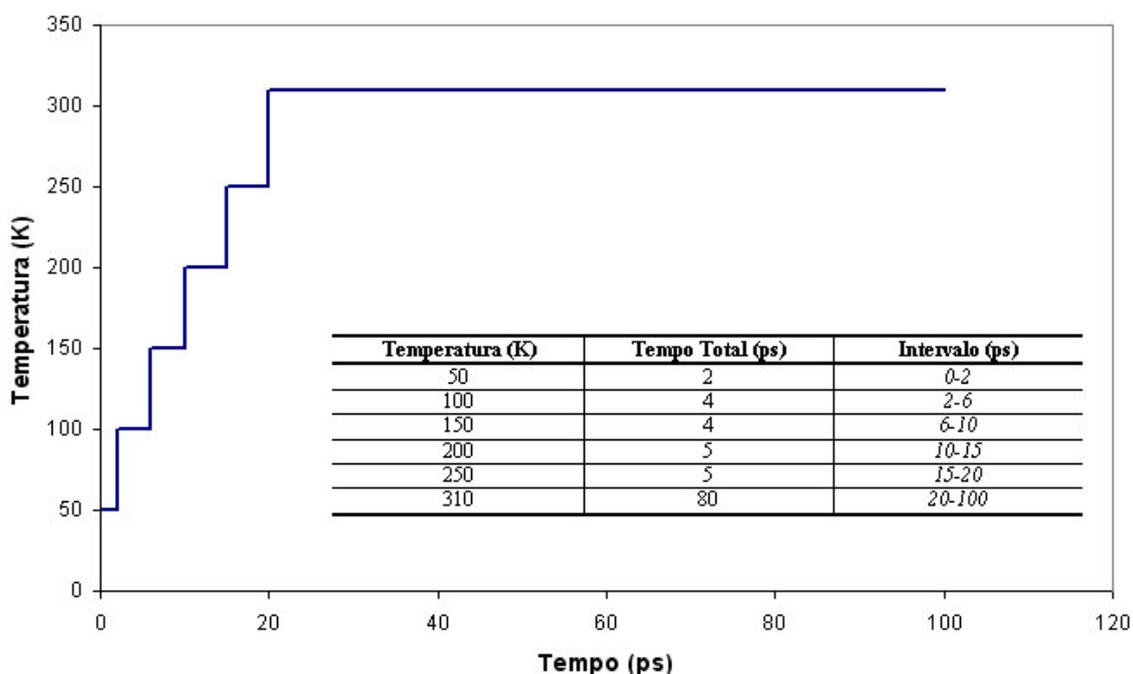


Figura 15. Rampa de termalização das simulações

As compressibilidades isotérmicas para a água e o metanol foram ajustadas em $4,5 \times 10^{-5}$ (bar^{-1}), e em $4,6 \times 10^{-5}$ para o octanol (bar^{-1}) (LIDE, 2004). Os comprimentos de ligação foram obtidos com o algoritmo LINCS (HESS, 1997) para uma expansão de ordem quatro.

As interações eletrostáticas entre átomos não-ligados foram validadas pelo método PME com um espaço de grade de carga de aproximadamente 1.0 \AA . A malha de carga foi interpolada como uma malha cúbica com uma tolerância de soma fixada em 4.0×10^{-6} . As interações do tipo Lennard-Jones foram validadas usando-se um corte de distância (cut-off) de 10 \AA , com uma lista de pares atualizada a cada 10 passos.

As análises estruturais e energéticas foram feitas considerando os últimos 4 ns das simulações.

4. Resultados

Os resultados obtidos nesse estudo foram utilizados para a redação de um artigo científico. A próxima página apresentará uma breve introdução a este, juntamente à sua condição atual. Após, nas páginas posteriores, o artigo é apresentado na íntegra.

4.1 Artigo I

Este trabalho investiga a conformação de uma estrutura de FLA_{2SV} sobre diferentes condições ambientais (meio aquoso, imersa em metanol ou octanol) utilizando nove simulações de dinâmica molecular que juntas possuem um tempo total de 45 ns. Devido à baixa afinidade do íon cálcio em sistemas aquosos, diferentes forças de restrição foram aplicadas no íon Ca²⁺.

Os resultados dessas simulações foram utilizados para propor um novo modelo de ativação interfacial para FLA_{2SV}, salientando a importância dos movimentos das cadeia laterais dos resíduos do sítio ativo dessas enzimas, assim como, dos resíduos pertencentes à face *i*.

Interfacial Activation of Snake Venom Phospholipases A2 (svPLA2) Probed by Molecular Dynamics Simulations

Tiago Charão de Oliveira, Hermes Luís Neubauer de Amorim e
Jorge Almeida Guimarães

Journal of Molecular Structure: THEOCHEM, 2006,
submetido em 13 de setembro de 2006

Interfacial Activation of Snake Venom Phospholipases A₂ (svPLA₂) Probed by Molecular Dynamics Simulations

Tiago Charão de Oliveira*, Hermes Luís Neubauer de Amorim[#] and Jorge Almeida Guimarães*,

* Laboratório de Bioquímica Farmacológica, Centro de Biotecnologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500. Bloco IV, Prédio 43421, Lab 202. Porto Alegre, RS, Brazil. P.O.Box 15.005.

Laboratório de Bioinformática Estrutural (LaBiE) - Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Av. Farroupilha 1001, Prédio 01, Sala 122 - Canoas, RS – Brazil. 92450-900. Tel.: +555134774000 ext 2774. FAX: +555134779239.

E-mail addresses:

TCO – tcharao@yahoo.com

JAG - guimar@cbiot.ufrgs.br

HLNDA - hamorim@cbiot.ufrgs.br

Address correspondence to: Hermes Luís Neubauer de Amorim, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Av. Farroupilha 1001, Prédio 01, Sala 122 - Canoas, RS – Brazil. 92450-900.

Tel.: +555134774000 ext 2774. FAX: +555134779239; E-mail: hamorim@cbiot.ufrgs.br

Keywords: molecular dynamics, molecular modeling, structural bioinformatics, svPLA₂.

ABSTRACT

Asp49 plays a key role in the coordination of calcium in the catalytic site of PLA₂, thus assisting the stabilization of the ES intermediary transition state, which induces the enzyme activation. In this work, a molecular dynamics simulations of a D49 *sv*PLA₂ from *Agkistrodon halys pallas* were performed in water, methanol and octanol. Because of the low affinity of *sv*PLA₂ for calcium ion in aqueous systems, different positional restraint forces were applied and the coordinates describing *sv*PLA₂-Ca²⁺ ligand properties were simulated and evaluated. The results of the simulations were utilized to propose an interfacial activation model for *sv*PLA₂. In this model, events related with *sv*PLA₂ activation involve: a) the reorganization of calcium binding loop at membrane proximity followed by the Ca²⁺ uptake; b) side chain reorientation of Trp31, which define a new specificity pocket for the phospholipid chain; c) reduction of the distance between His48 and Asp49, increasing the nucleophilicity of Ne-His48; d) side chain reorientation of Lys69 concomitant with projection of the 69-loop to solvent. These results, in addition with existing biochemical and crystallographic data, allow us to describe a more detailed model, which facilitate the understanding of the molecular mechanism associated with the interfacial activation of phospholipases A₂.

1. Introduction

Phospholipases A₂ (PLA₂; EC 3.1.1.4) belong to an enzyme family whose specificity is the Ca²⁺-dependent catalytic hydrolysis of the sn-2 ester bond of membrane phospholipids, thus releasing free fatty acids and lysophospholipids [1]. The proteins of PLA₂ family display high level of sequence similarity and structure conservation but, despite of such common structural pattern, they have presented a wide spectrum of biological functions. Mammalian PLA₂, for instance, play a key role in cellular proliferation, muscular contraction and inflammatory processes [2]. On the other hand, most secreted phospholipases A₂ are toxic proteins not always displaying enzymatic activity. Snake venom phospholipases (svPLA₂) constitute the main component of these venomous secretions. Besides the ability to hydrolyze phospholipids, these small proteins are also capable to induce a great diversity of pharmacological actions such as myotoxicity, neurotoxicity, as well as inflammatory and edematogenic response. They also affect platelet reactions (aggregation and secretion) and blood coagulation [3-7].

The catalytic mechanism of PLA₂-phospholipid reaction was proposed by Scott in 1990 [8]. The critical step of the phospholipid hydrolysis is the nucleophilic attack of a water molecule at the sn-2 ester bond of the phosphoglyceride substrate. The tetrahedral intermediate formed in this step is stabilized by a calcium ion, which is coordinated by Asp49, one water molecule and the backbone of the protein oxygen atoms of Gly30, Trp31 and Gly32. Most of the resolved svPLA₂ structures have an aspartate residue structurally conserved (Asp49), which exerts the function of assisting the stabilization of the tetrahedral intermediate during the catalytic cycle.

An interesting aspect of structure-function of these enzymes is the physiologic structure of the active site in presence of Ca²⁺. Most of the D49-svPLA₂ structures in Protein data Bank

- PDB do not have a calcium ion bound to the resolved crystallographic models. In cases where the ion is included the resolved structures were obtained in conditions with much higher ion concentration than that found under physiological conditions, i.e. 3.7 mM instead of 1.1 – 1.3 mM, which is the usual Ca^{2+} concentration of present in physiological condition [9,10]. In addition, some works report the presence of other ions (e.g. Na^+) replacing calcium in the protein-binding loop [11]. The reason for the absence of calcium ion in crystallographic structures is a consequence of the low affinity of this ion for secreted phospholipases A_2 [12]. It is then possible that the artifacts used to force the presence of calcium ion in crystallographic structures do not allow a realistic picture of the local protein conformation influenced by this ion. Although progress has been achieved in the understanding of structure-function relationships in phospholipases, there is still a gap in correlating the enzyme's activity and specificity to the interfacial binding properties of the enzyme with its phospholipidic substrate. As the enzyme approaches the substrate, phospholipid-enzyme interactions seem to play an important role in the activation process. This intermediate moment of the activation pathway, at present time, cannot be probed by experimental procedures, however computer simulations might provide essential information.

There are only few molecular dynamics (MD) studies of PLA_2 reported in the literature [13,14,15]. Moreover, it must be noted that these studies were carried out using short simulation times and, therefore, are not very effective to show slow conformational rearrangements. Indeed, in the cases, when larger simulation times were used the MD techniques have shown to be a very useful method to describe conformational events in other proteins [16,17]. To elucidate the mechanisms that govern the action of svPLA_2 upon their substrates, it is important to obtain detailed information about the structure of svPLA_2

in the membrane environment. Concerning to this subject, a hypothetic mechanism describing the interfacial activation of these enzymes has been proposed [18] and its importance for the enzyme activation has been proved. In fact, the hydrolytic activity of *svPLA₂* upon phospholipids is largely and abruptly increased (up to 10,000-fold) when monomeric phospholipids aggregate to form micelles at their critical micellar concentration [19]. It then seems that a critical micellar concentration of the substrate is necessary in order to create a suitable and apolar environment that induces conformational reorganization of the enzyme active site. Yet, the hydrolysis of bilayer vesicles can occur in two distinct modes. The hopping mode, when the binding and desorption occurs during each catalytic cycle and the scooting mode, when the enzyme remains bound to the interface during the several catalytic cycles [20]. Independent by of the mode of action, *PLA₂* catalysis occurs when its active site interacts with phospholipids present in the membrane interface and is accompanied by a series of structural changes in the protein-interface complex. Moreover, the overall process of *svPLA₂* activation depends on a conformational change in the enzyme, the reduction of the water shell around the phospholipid molecules and a better orientation of the scissile bond of the substrate.

In this work, we used Molecular Dynamics (MD) simulations to explore and discuss the possible mechanism of the interfacial activation of *svPLA₂*s at atomic level. Our work is justified by the fact that the current data obtained by in crystallographic and NMR studies are not capable to provide a real picture of the structure of *svPLA₂* in apolar environment, one of the requisites to increase the catalytic efficiency of *PLA₂*. In this sense, the information obtained here, allows a better understand of the conformational rearrangements that takes place at the time of the interfacial activation, leading to the proposition of an active site model that explains how *svPLA₂*s can discriminate between

different phospholipids. Finally, the proposed model provides new insights into existing mechanistic assumptions.

2. Methods

2.1 Molecular dynamics simulation

Eight simulations were performed, in different conditions, using as starting coordinates the crystallographic structure of an acidic phospholipase A₂ from *Agkistrodon halys pallas* [21], (entry 1PSJ of the Protein Data Bank (PDB)). The details of the simulations are summarized in table 1.

Molecular dynamics simulations were carried out using GROMOS96 43a2 force field [22,23] implemented in GROMACS version 3.1.4 [24,25,26,27]. All systems were simulated in NPT ensemble and periodic boundary conditions (PBC). The dimensions of the central box were chosen in such way that the minimum distance of any protein atom to the closest box wall was 10 Å for simulations in water and methanol and 12 Å for simulations in octanol. Initially, the protein structure was submitted to 200 steps of steepest descent energy minimization. To relax strong solvent-solvent and solvent-protein non-bonded interactions, 1 ps of MD simulation was performed restraining the protein structure. Initial velocities were assigned according to Maxwell distribution. The system was heated with gradual increments in the following temperatures: 50 K (2 ps), 100 K (4 ps), 150 K (4 ps), 200 K (5 ps) and 5ps at 250 K. Just after equilibration, the temperature of the system was adjusted to 310 K. All simulations were performed using an integration time step of 2 fs. The temperatures of solvent and samples were independently coupled to

the bath temperature with a relaxation time of 0.1 ps. The pressure in the system was weakly coupled to the bath pressure, applying an isotropic scaling and a relaxation time of 0.5 ps. Isothermal compressibility for water and methanol was estimated as 4.5×10^{-5} (bar^{-1}). Bond lengths were constrained using the LINCS algorithm [28] with 4th order expansion. Electrostatic interactions among non-ligand atoms were evaluated by the PME method with a charge grid spacing of approximately 1.0 Å. The charge grid was interpolated on a cubic grid with the direct sum tolerance set to 4.0×10^{-6} . Lennard-Jones interactions were evaluated using a 10 Å atom-based cutoff. The pair list was updated at each 10 steps. Structural and energetic analysis were made considering as the production time the last 4 ns of the simulations.

2.2 *sv*PLA₂ Simulations in Aqueous Environment

For the aqueous solvent simulations, the SPC model of water was used. Three sodium ions were added in the box to neutralize the charges. The components of the simulations were the protein, one calcium ion (except for D49M-WCA), three sodium ions and 6539 water molecules. For D49M-WCA, five sodium ions and 6538 water molecules constituted the simulated system. Since in the first simulation (D49M-Full) the calcium ion had moved apart from the active site, other simulations were carried out with the application of restraining forces on the ion. In order to maintain the calcium ion at the binding loop, the systems were evaluated by the application of position restraint forces of $500 \text{ J mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$, $1 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ and $2 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ (simulations D49M-PR0.5, D49M-PR1.0 and D49M-PR2.0, respectively) during the equilibration time (first 1 ns). In the D49M-PR0.5F

simulation the position restraint force of $500 \text{ J mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ applied on the calcium ion was kept during the simulation time.

2.3 *sv*PLA₂ Simulation in Methanol

The methanol box was constructed using the topology present in the original package of GROMACS [18]. The crystallographic water molecules were not used because in a previous simulation they lead to the unfolding of the proteins (not shown). Three sodium ions were used to neutralize the system. The protein, one calcium ion, three sodium ions and 4235 methanol molecules constituted the simulated system.

2.4 *sv*PLA₂ Simulation in Octanol

A box containing 160 molecules of octanol was generated and equilibrated in a 4.5 ns MD simulation. Octanol parameters for GROMOS96 43A2 force field were obtained from a single octanol molecule using the PRODRG server [29]. After, the protein was solvated using the genbox module of the GROMACS and the final coordinates of the equilibrated octanol box.

The system was simulated without crystallization water molecules and counter-ions, being constituted by the protein, one calcium ion, and 776 octanol molecules. The run parameters used in the simulation were the same as previously mentioned, except for the octanol compressibility (estimated as $4.6 \times 10^{-5} \text{ (bar}^{-1}\text{)}$), and for the pressure coupling relaxation time. The last one was gradually decreased along the simulation, from 0.80 to 0.55 ps, in 6

steps of 0.05 ps each (0.0 to 1.0 ns, 1.0 to 1.2ns, 1.2 to 1.4 ns, 1.4 to 1.6 ns, 1.6 to 1.8 ns and 1.8 to 2.0).

3. Results and discussion

The stability and convergence of each MD simulation is shown in table 2, where the average data of the following structural parameters (calculated considering the last 4 ns of the simulations) are shown: a) the atomic positional RMS (root mean square) with respect to the backbone atoms of initial crystallographic structure, b) the radius of gyration (Rg), c) the total number of hydrogen bonds (NHb), and d) the total solvent-accessible surface area (SASA). Except for D49M-MeOH, the RMS distance calculated between all protein atoms in the simulations and the crystal structure remained in accordance with the expected data for stable simulations. Probably, in D49M-MeOH, the protein was subjected to an initial denaturation process, as it can be observed by the concomitant increase of Rg and SASA and by decrease of NHb. For the remaining systems, the changes in the radius of gyration, number of hydrogen bonds and solvent-accessible surface area reflect the polarity of solvents. With the decrease of the polarity (water \rightarrow octanol), Rg decreases (e.g. D49M-PR0.5 = 1.42 \rightarrow D49M-OcOH = 1.40) while NHb increases (e.g. D49M-PR0.5 = 88.0 \rightarrow D49M-OcOH = 121.4). The visual analysis of the MD final structures indicates that the observed changes are resultant from a folding back process originated by charged and polar side chains into the protein surface in a nonpolar solvent. Interestingly, the SASA for simulation in octanol was greater than for the simulations in water (e.g. D49M-PR0.5 = 41.1 \rightarrow D49M-OcOH = 45.6). Despite the apparent “shrinking” of the protein in presence of octanol, the protein SASA in this solvent was larger than in the simulations performed

in water (Table 2). This is not surprising, since computationally the SASA is determined considering the surface generated by the center of a sphere (generally with radius of 1.4 Å) rolling on the protein molecular (van der Waals) surface [30]. As shown in Fig. 1, the shape of the svPLA₂ protein in water is topologically more irregular than the protein surface in octanol, resulting in a small area to be covered using the standard probe radius. The observed trend in SASA is the opposite of that one for the radius of gyration since in octanol the protein adopts a more spherical shape (Fig. 1 *a* and 1 *d*). It is well known that the radius of gyration is a good parameter to evaluate proteins that are globular in shape [31] and, probably in this case, it is not the best choice to analyze protein structures generated by simulations in aqueous solution.

Another point of interest concerns the presence of a cation at the calcium-binding loop. Some crystallographic structures deposited in PDB show the ion at the calcium-binding loop, but its kinetic data reveals that the affinity of the calcium to its binding loop is extremely low ($K_c = 350 \mu\text{M}$) [7]. To confirm this, svPLA₂ MD simulations in water were also performed with the application of position restraint forces (0.5, 1.0 and 2.0 kJ mol⁻¹ nm⁻²) on the calcium ion (see Table 1). The simulations showed that, none of the conditions used was able to reproduce the permanence of the cation at its binding loop.

As shown in Fig. 2, the distance between calcium ion and the C γ of Asp49 increases, in aqueous environment simulations (Figs. 2 *a* and 2 *b*), it can be observed, since the beginning of the production step, while in the simulation in octanol the calcium does not change significantly its distance from Asp49 as compared respect to the starting crystallographic position (figure 2 *d*). Other results can be visualized in Fig. 3, where the final structures of D49M-FULL, D49M-PR0.5, D49M-MeOH and D49M-OcOH simulations are presented in ribbon. The release of calcium from its binding loop for

D49M-FULL, D49M-PR0.5 and D49M-MeOH is clearly noted in Figs. 3 *a*, 3 *b* and 3 *c*, respectively, while the figure 3 *d* (D49M-OcOH) shows the calcium conserved at its binding site.

The results of the simulations support the hypothesis that, because the low specificity of calcium for secreted phospholipases A₂, the ion is positionally stable at the active site only when the phospholipase is closer to the i-face (i.e., in more apolar environment). Also, it is possible to propose a molecular mechanism for interfacial activation of *svPLA*₂s. The model mechanism is based in some critical rearrangements that occur in *svPLA*₂ during the approximation with the membrane interface. These conformational events are illustrated in Fig. 4, which shows the superposition of the 5 ns structures of the D49M-Full (Fig. 4 *a*) and D49M-OcOH (Fig. 4 *b*) simulations with the starting crystallographic structure. In D49M-Full (Fig. 4 *a*), the release of Ca²⁺ from the calcium-binding loop is accomplished by the reorientation of the side chain of Lys69, which results in a partial obstruction of the cavity of the active site. At the same time, Trp31 folds back to the bulk of the protein. However, in D49M-OcOH (Fig. 4 *b*), Ca²⁺ is kept coordinated in the calcium-binding loop, influencing the local structure of the active site. The presence of Ca²⁺ leads to a rotation of the Lys69 side chain, leaving it more distant from the residues of the catalytic dyad, while Trp31 is projected to the protein surface. These conformational changes cause a slight opening of the active site, which allows the reorganization of the site region to docking of phospholipid substrate.

To confirm these results, an additional simulation (D49M-OcOH(2)) was performed where the initial conformation was the latest structure of D49M-PR0.5 simulation, changing the solvent from water to octanol and performing it as the D49M-OcOH simulation during 5ns. Figure 5*a* presents the initial and final structures of this simulation. The results showed a

movement of 0.49 nm of the calcium ion between the initial (Fig.5*b*) and the final position (Fig.5*c*). Besides, at the beginning of the simulation, the calcium ion was situated at a distance of 0.44 nm from the Asp49 carbonyl, while at the end of the simulation, this distance was reduced to 0.32 nm. This shows the reestablishment of the ion coordination at the catalytic site. This event is accomplished with the approximation between Asp49 and His48 side chains and the favorable orientation of the calcium-binding loop (see figures 5*b* and 5*c* for details).

The trajectories of the χ_1 and χ_2 dihedral torsional angles of Trp31 are depicted in Fig. 6, where it can be seen the high degree of fluctuation experimented by Trp31 side chain in the simulation in water (D49M-FULL) (Fig. 6 *a*). In D49M-FULL, the χ_1 torsional angle of Trp31 rapidly changes from its initial value of -150° to -70° and stays around this value during most of the simulation time. The χ_2 torsional angle of Trp31 oscillate around your initial value (-100°) but with a large transitional grade after 4 ns of simulation. Both χ_1 and χ_2 of Trp31 show small amplitude fluctuations. In contrast, as shown in Fig. 6 *b*, in the simulation in octanol (D49M-OcOH), the χ_1 and χ_2 torsional angles of Trp31 revealed to be more stable, adopting new values after 1.0 ns (χ_1 , -170° to 50°) and 0.9 ns (χ_2 , -90° to -250°) of the simulation time. The χ_1 and χ_2 dihedral torsional angles of Lys69 side chain for D49M-FULL and D49M-OcOH simulations are plotted as a function of time in Fig. 7. The χ_1 value of Lys69 (Fig. 7 *a*) side chain for the simulation in water (D49M-FULL) rapidly oscillates through a series of 360° transitions while the χ_2 torsional angle oscillates from its initial value of -150° to -190° with sizable fluctuations. In apolar environment (D49M-OcOH), χ_1 torsional angle of Lys69 oscillates mainly between the initial value of -180° and -300° (Fig 7 *b*). The χ_1 torsional angle is mostly distributed between its value in crystallographic structure (-175°) and -280° .

Besides the need of geometrical and electrostatic complementarities between the phospholipase and the phospholipid, the catalytic dyad must be highly organized to guarantee an optimal catalytic efficiency. As can be seen in Fig. 8, where are depicted the time series for the Asp49(O γ)-His48(N δ) distance, during the simulation in water these residues have moved away from the initial crystallographic positions, while in D49M-OcOH simulation it is observed an slight approximation of the side chains of Asp49 and His48.

The observation of the structures generated from the trajectories of the MD simulations can be rationalized in a model for *svPLA₂* interfacial activation at membrane interface, as depicted in Fig. 9. In Fig. 9 *a*, the protein appears in an intracellular-like conformation, where the side chains of catalytically important residues partially obstruct the active site. Specifically, Lys69 side chain blocks the active site, Trp31 is disordered and the residues of the catalytic dyad are distant to for establish of an effective interaction. The enzyme surface (Fig. 9 *c*) shows the key residues dislocated of catalytically active positions, blocking the active site. During the activation, while the enzyme approaches to i-face, the key residues (Fig. 9 *b*) move to new positions, resulting in the opening of the active site and the creation of new binding pockets (Fig. 9 *d*).

Recently, another methodology has been used to study proteins at the membrane interface. This method called “anion-assisted dimer” complexes a monomeric protein in a dimeric form, and obligates that each monomer should plays to the other one the role of an interface, thus simulating protein-membrane interactions [32]. However, though being useful in certain cases, this method ignores the big difference between a protein and the complexity of a membrane surface. An alternative to this is a mechanistic molecular

approach where the protein is drowned in an apolar solvent [33], approach that we have used in this work.

4. Conclusions

We have investigated the conformation of a *svPLA₂* structure under different environmental conditions using MD simulations. In the simulations performed in water, different position restraint forces had been applied in order to keep the calcium ion positioned at the calcium-binding loop. We found that none of the conditions used was able to keep the cation in this position, supporting the observed low affinity of *svPLA₂* to Ca^{2+} in water. The results lead to the suggestion of a new interfacial model for *svPLA₂* activation at i-face. According to this, in aqueous environment the *svPLA₂* remains catalytically inactive because of the absence of Ca^{2+} ions in the active site. As the enzyme approaches the interface, a series of conformational changes occurs. These changes involve: a) the increase of solvent accessible surface area (probably caused by the opening of the pockets located in the active site region); b) a side chain reorientation of Asp49 residue that allows Ca^{2+} coordination; c) formation of the catalytically dyad His48-Asp49 interaction; d) reorganization of calcium binding loop; e) projection of Trp31 side chain to the solution and f) reorientation of Lys69 side chain allowing access to the active site.

Acknowledgements

This work was supported by the following Brazilian agencies through fellowships and grants: CNPq-MCT (Brasília, DF) and CAPES-MEC (Brasília-DF). Thanks are due to P. Netz for valuable discussion.

REFERENCES

- [1] R. M. Kini, in R. M. Kini (Ed), Venon Phospholipase A₂ Enzymes, John Wiley & Sons, England, 1997, Chapter 1.
- [2] E. Valentin and G. Lambeau, *Biochimie*, 82 (2000) 815.
- [3] D. Mebs, in F. Hucho, Y.A. Ouchinnikov, editors. *Toxins as tools in neurochemistry*. Walter de Gruyter, Berlin, 1983. p. 337-356.
- [4] B.S. Vishwanath, R.M. Kini and T.V. Gowda, *Toxicon*, 25 (1987) 501.
- [5] A. L. Fuly, A.L.P Miranda, R.B. Zingali, and J. A. Guimarães, *Biochemical Pharmacology*, 63 (2002) 1589.
- [6] A. L. Fuly, S. Calil-Elias, P. A. Melo and J. A. Guimarães, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 35 (2003) 1470.
- [7] A. L. Fuly, A. M. Soares, S. Marcussi, J.R. Giglio and J. A. Guimarães, *Biochimie* 86 (2004) 731.
- [8] D. L. Scott, S. P. White, Z. Otwinowski, W. Yuan, M. H. Gelb and P. B. Sigler, *Science*, 250 (1990) 1541.
- [9] N. Nagano and E. F. Nemeth, *J. Pharmacol Sci*, 97 (2005) 355.
- [10] K. Sekar, S. Eswaramoorthy, M. K. Jain and M. Sundaralingam, *Biochemistry*, 36 (1997) 14186.
- [11] G. Singh, S. Gourinath, S. Sharma, M. Paramasivam, A. Srinivasan and T. P. Singh, *J. Mol. Biol*, 307 (2001) 1049.
- [12] B. Z. Yu, J. Rogers, G. R. Nicol, K. H. Theopold, K. Seshadri, S. Vishweshwara and M. K. Jain, *Biochemistry*, 37 (1998) 12576.
- [13] J. Demaret and S. Brunie, *J. Mol. Graphics*. 10 (1992) 257.
- [14] S. T. Jones, P. Ahlström, H. J. C. Berendsen and R. W. Pickersgill, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1162 (1993) 135.
- [15] F. Zhou and K. Schulten, *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 25 (1996) 12.
- [16] G. M. De Mori, M. Meli, L. Monticelli, G. Colombo, *Mini Rev Med Chem*, 5 (2005) 353.
- [17] V. Daggett, A. Fersht, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4 (2003) 497.
- [18] Berg, O. G., M. H. Gelb, M. D. Tsai and M. K. Jain, *Chem. Rev.*, 101 (2001) 2613.
- [19] R. Verger, M. E. C. Mieras, G. H. DeHaas, *J. Biol. Chem.*, 248 (1973) 4023.
- [20] R. M. Kini, *Toxicon*, 42 (2003) 827.
- [21] X. Q. Wang, J. Yang, L. L. Gui, Z. H. Lin, Y. C. Chen and Y. C. Zhou, *J.Mol.Biol.*, 255 (1996) 669.
- [22] W. F. van Gunsteren, S. R. Billeter, A. A. Eising, P. H. Hünenberger, P. Krüger, A. E. Mark, W. R. P. Scott and I. G. Tironi. *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 manual and user guide*. Zürich, Switzerland: Hochschulverlag AG an der ETH Zürich, Groningen, 1996.
- [23] L. D. Schuler, X. Daura and W. F. van Gunsteren. *J. Comput. Chem*. 22 (2001) 1205.
- [24] GROMACS: the world's fastest molecular dynamics - and it's GPL! 2006. <http://www.gromacs.org/>.
- [25] D. van der Spoel, P. J. van Maaren and H. J. C. Berendsen, *J. Chem. Phys.*, 108 (1998) 10220.

- [26] H. J. C. Berendsen, D. van der Spoel and R. van Drunen, *Comp. Phys. Comm.* 91 (1995) 43.
- [27] E. Lindahl, B. Hess and D. van der Spoel., *J. Mol. Mod.*, 7 (2001) 306.
- [28] B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen, and J. G. E. M. Fraaije, *J. Comp. Chem.*, 18 (1997) 1463.
- [29] A. W. Schuettelkopf and D. M. F. van Aalten, *Acta Crystallographica*, 60 (2004) 1355.
- [30] B. Lee and F. M. Richards, *J. Mol. Biol.*, 55 (1971) 379.
- [31] J. M. Goodfellow, *Molecular Dynamics: An Overview of Applications in Molecular Biology*, CRC Press, Boca Raton, 1990.
- [32] B. J. Bahson, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 433 (2005) 96.
- [33] A. Glättli, I. Chandrasekhar and W. F. van Gunsteren, *Eur. Biophys. J.* 35 (2006) 255.

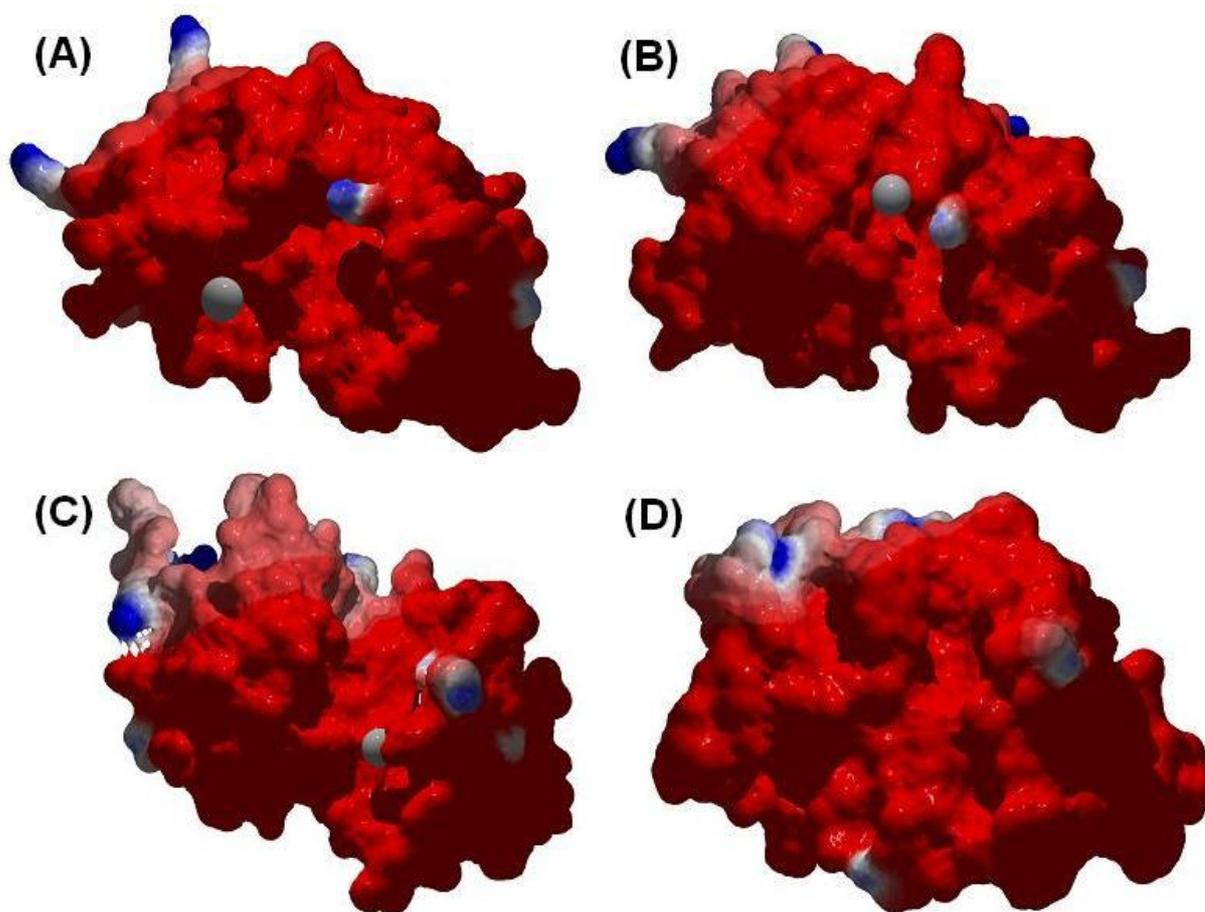


Fig. 1. The final SASA structures of the simulations (5 ns). (1 *a*) D49M-Full, (1 *b*) D49M-PR0.5, (1 *c*) D49M-MeOH and (1 *d*) D49M-OcOH

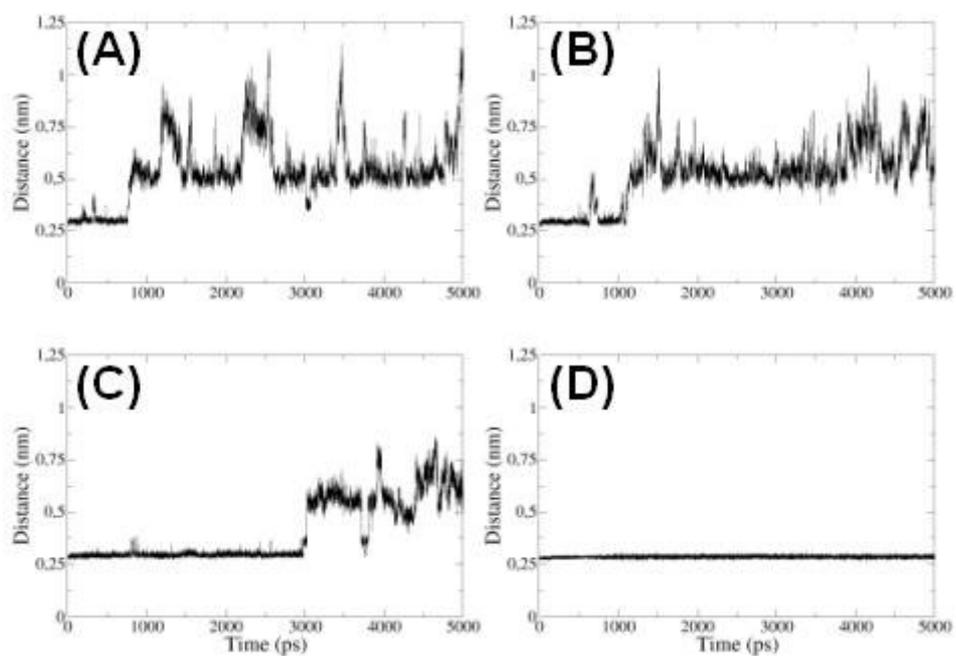


Fig. 2. Time series for the distance variation between Asp49(C γ) and Ca²⁺. D49M-Full (2 *a*), D49M-PR0.5 (2 *b*), D49M-MeOH (2 *c*) and D49M-OcOH (2 *d*).

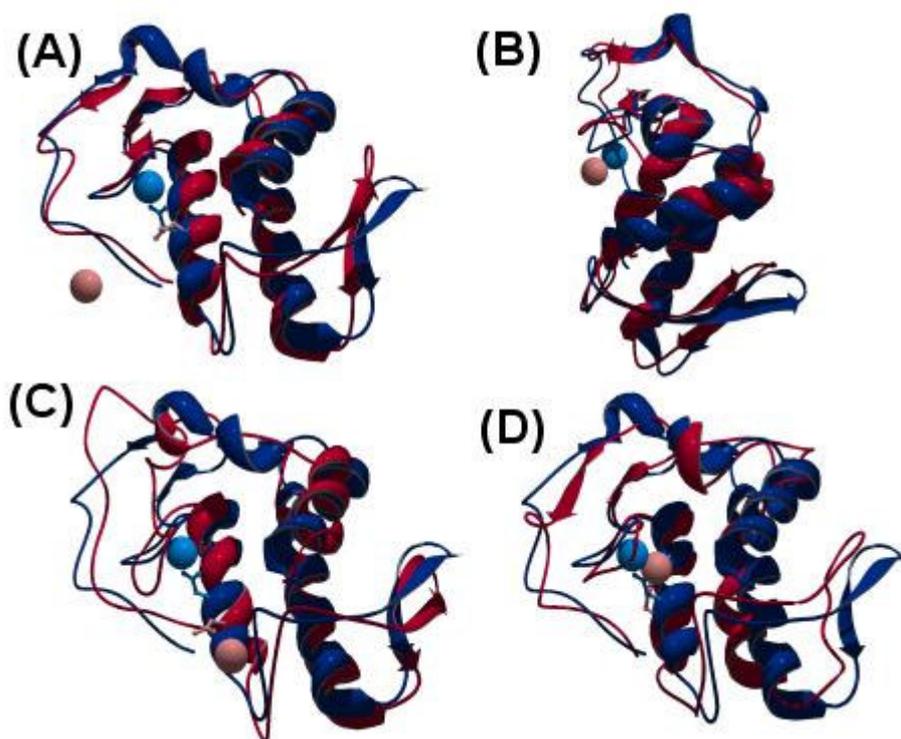


Fig. 3. Final ribbon structures of the simulations (5 ns). Crystal starting structure (blue) and the structures generated from the simulation (red). (3 *a*) D49M-Full, (3 *b*) D49M-PR0.5, (3 *c*) D49M-MeOH and (3 *d*) D49M-OcOH

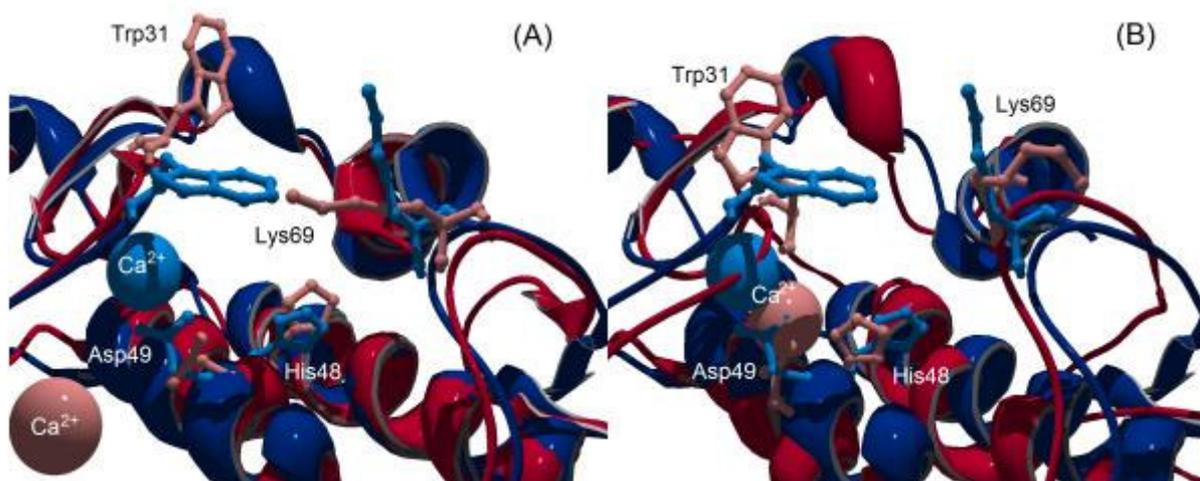


Fig. 4. View of the conformation of the active site lid in the crystal starting structure (blue) and the structures generated from the simulation (red). D49M-Full (4 *a*) and D49M-OcOH (4 *b*).

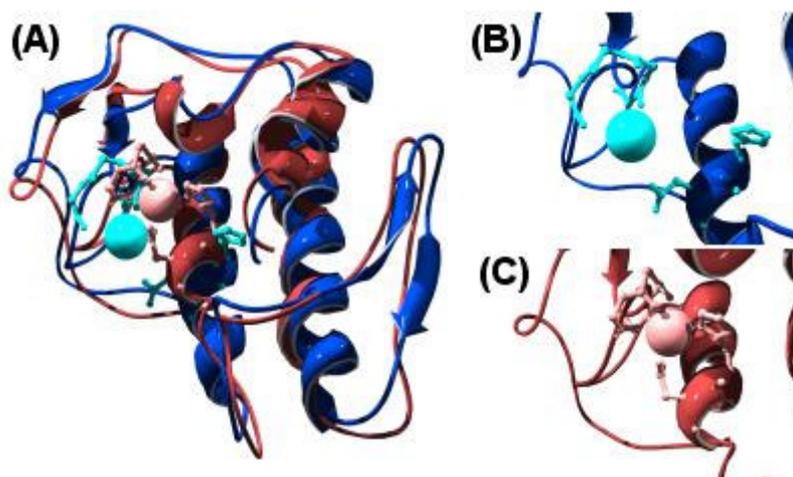


Fig. 5. (5 *a*) Initial (blue) and final (red) ribbon structures of the D49M-OcOH(2) simulation (5 ns). (5 *b*) Active site organization at simulation begin (water), (5 *c*) Active site at simulation end (octanol).

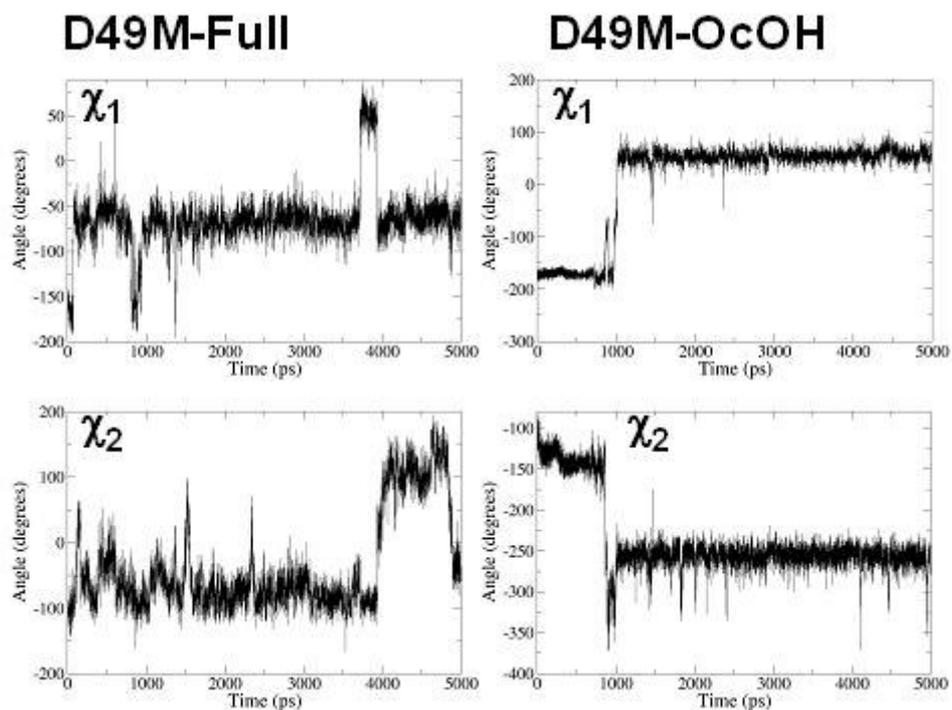


Fig. 6. The χ_1 and χ_2 torsional dihedral angles of Trp31 in D49M-Full and D49M-OcOH simulations.

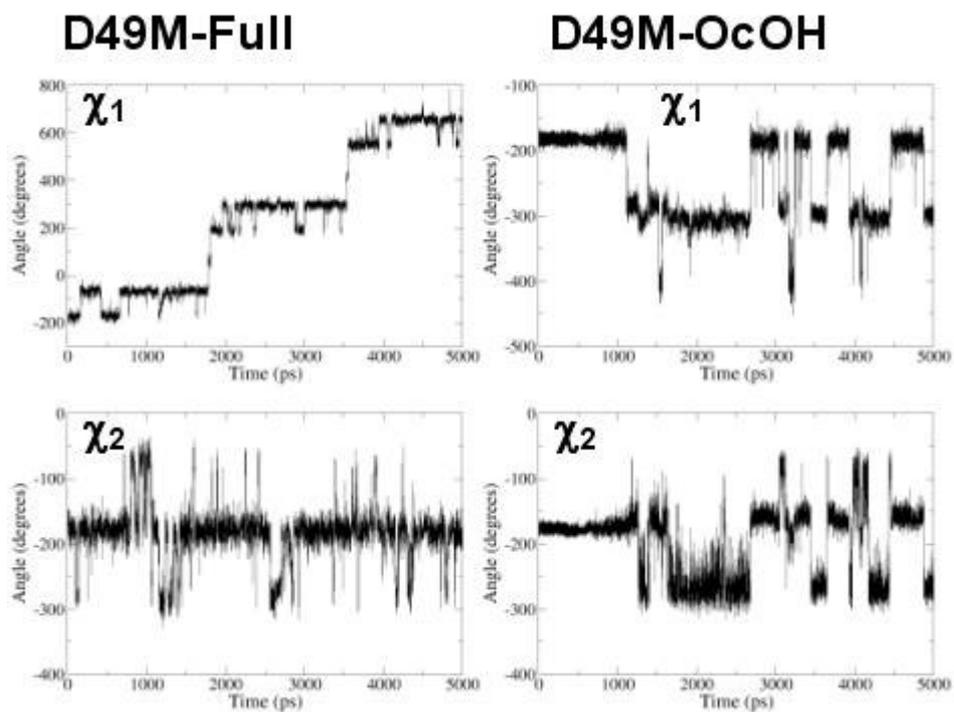


Fig. 7. The χ_1 and χ_2 torsional dihedral angles of Lys69 in D49M-Full and D49M-OcOH simulations.

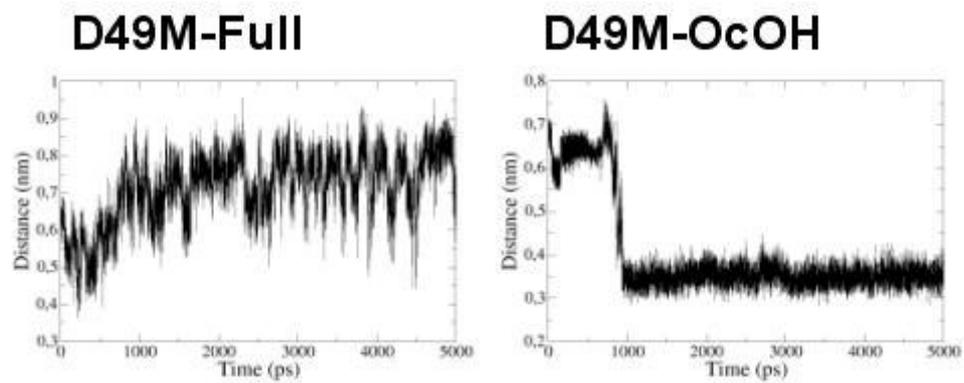


Fig. 8. Time series for the distance variation between Asp49(O γ) and His48(N δ) in D49M-Full and D49M-OcOH simulations.

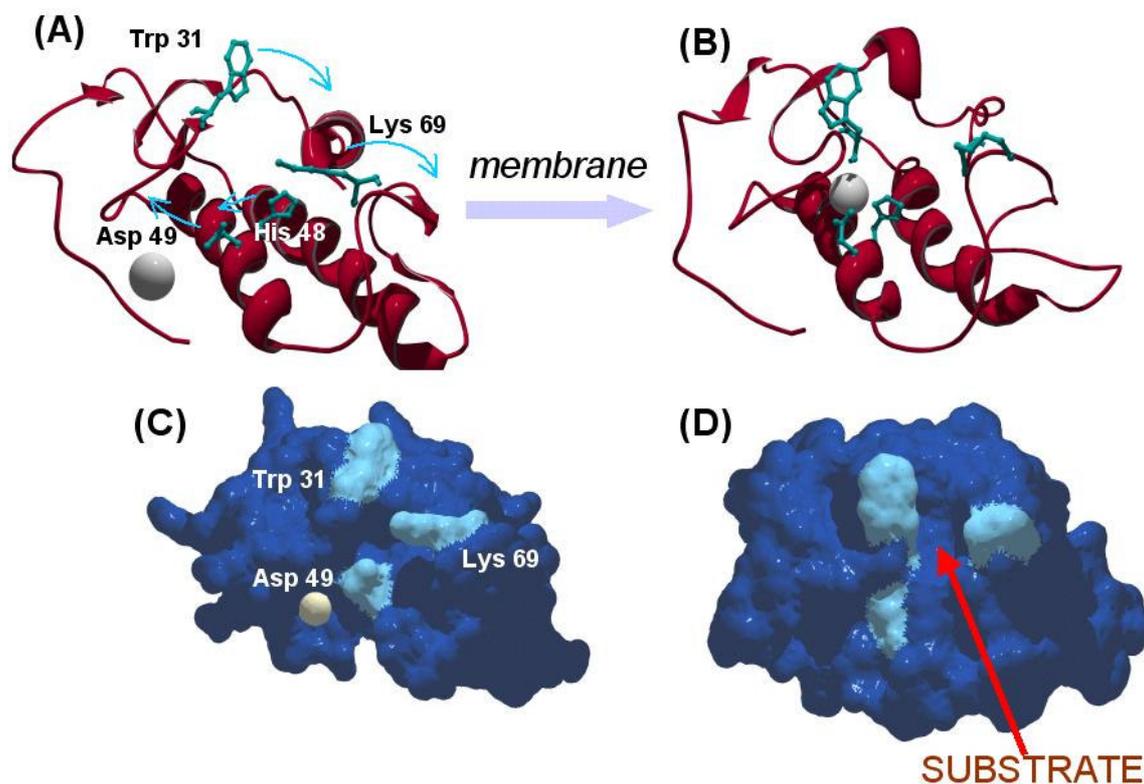


Fig. 9. Interfacial model proposal. All final structures of 5 ns simulations, where 9 *a* and 9 *c* are from D49M-Full and 9 *b* and 9 *d* are from D49M-OcOH. In Fig. 9 *a*, the protein appears in an intracellular-like conformation, where the side chains of catalytically important residues obstruct partially the active site. Specifically, Lys69 side chain blocks the active site, Trp31 is disordered and the residues of the catalytic diad are distant for the establishment of an effective interaction. The enzyme surface (Fig. 9 *c*) shows the key residues dislocated of catalytically active positions, blocking the active site. During the activation, while the enzyme approaches to i-face, the key residues (Fig. 9 *b*) move to new positions, resulting in the opening of the active site (Fig. 9 *d*). Note that in this last picture the calcium ion is internalized in the protein and ca not be seen.

Table 1
Identification and specific characteristics of the MD simulations

Simulation	Solvent	Observation
D49M-FULL	water	Simulation carried out with Ca^{2+} but without the application of any special forces during the simulation
D49M-PR2.0	water	Application of position restraints of $2.0 \text{ KJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ on the Ca^{2+} ion in the first 1 ns of the simulation
D49M-PR1.0	water	Application of position restraints of $1.0 \text{ KJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ on the Ca^{2+} ion in the first 1 ns of the simulation
D49M-PR0.5	water	Application of position restraints of $0.5 \text{ KJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ on the Ca^{2+} ion in the first 1 ns of the simulation
D49M-PR0.5F	water	Application of position restraints of $0.5 \text{ KJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ on the Ca^{2+} ion in the 5 ns of the simulation
D49-WCA	water	Simulation carried without Ca^{2+}
D49M-MeOH	methanol	-
D49M-OcOH	octanol	-
D49M-OcOH(2)	octanol	Simulation carried in octanol where the initial coordinates were taken from D49M-PR0.5 at 5ns

Table 2

Average of structural parameters calculated from the last 4 ns of the simulations

Simulation	RMS (nm) ^a	RG (nm ³) ^b	NHb-intra ^c	SASA (nm ²) ^d
D49M-FULL	0.19 ± 0.02	1.43 ± 0.02	85.8 ± 4.8	41.4 ± 1.1
D49M-PR2.0	0.19 ± 0.01	1.42 ± 0.01	85.5 ± 4.7	41.0 ± 1.0
D49M-PR1.0	0.19 ± 0.02	1.43 ± 0.02	85.7 ± 4.6	40.9 ± 1.3
D49M-PR0.5	0.18 ± 0.02	1.43 ± 0.01	86.9 ± 5.0	41.1 ± 0.9
D49M-PR0.5F	0.20 ± 0.02	1.42 ± 0.02	88.0 ± 4.8	41.2 ± 1.0
D49M-MeOH	0.34 ± 0.04	1.49 ± 0.04	79.5 ± 6.0	53.0 ± 2.5
D49M-OcOH	0.28 ± 0.02	1.40 ± 0.01	121.4 ± 5.4	45.6 ± 1.1
D49M-WCa	0.22 ± 0.04	1.44 ± 0.02	87.4 ± 5.3	41.7 ± 1.1
D49M- OcOH(2)	0.28 ± 0.02	1.38 ± 0.01	129.9 ± 5.7	42.5 ± 0.9

^aRoot mean square deviation from backbone starting coordinates; ^bRadius of gyration; ^cNumber of hydrogen bonds (intramolecular); ^dSolvent-accessible surface area.

5. Discussão geral

Embora a função do íon cálcio no mecanismo catalítico das FLA_{2S} já tenha sido elucidada, um aspecto que permanecia em aberto está relacionado com a dinâmica deste íon durante a ativação interfacial. Apesar de não possuir função estrutural, o íon cálcio é essencial para o mecanismo catalítico (BERG *et al.*, 2001), assim, uma das questões menos compreendidas está relacionada com o momento em que o íon é capturado e liberado do sítio ativo.

Outra questão, que necessita ser aprofundada, é sobre as mudanças conformacionais que ocorrem durante o processo de ativação interfacial. Em particular, no que concerne ao deslocamento de cadeias principais e a reorientação das cadeias laterais dos resíduos envolvidos na catálise.

O detalhamento dos processos mencionados poderá ser usado na criação de um modelo mecanístico para enzimas que operam de forma semelhante, bem como para o planejamento de fármacos mais eficientes, dirigidos para o tratamento de desordens provocadas por enzimas de ação interfacial.

A obtenção de elementos que possam ser usados no detalhamento de processos enzimáticos interfaciais está limitada, já que, atualmente, as técnicas de análise estrutural conhecidas (e.g. ressonância magnética nuclear, dicroísmo circular e cristalografia de raios-X) não possibilitam a visualização e a resolução temporal de eventos que ocorrem em escala atômico-molecular.

Tais dificuldades podem ser contornadas pela utilização de formas alternativas, geralmente computacionais, para o acompanhamento deste tipo de fenômeno. Assim, o uso de técnicas de simulação de dinâmica molecular (DM) possibilitam prover informações essenciais em um ambiente virtual.

Conforme visto no capítulo 1, os estudos computacionais prévios de FLA_{2S} foram realizados com curtos períodos de simulação (DEMARET & BRUNIE, 1992; JONES *et al.*, 1993; ZHOU & SCHULTEN, 1996), sendo pouco confiáveis para uma melhor interpretação dos fenômenos aqui mencionados.

Ademais, outra opção interessante que a dinâmica molecular oferece, ainda não usada no estudo de FLA_{2S}, é a observação do comportamento conformacional de proteínas em ambientes não aquosos, tais como solventes apolares (GLÄTTLI *et al.*, 2005). Simulações

em ambientes apolares têm sido usadas com sucesso no estudo de proteínas que exercem sua atividade em ambiente de membrana (NORIN *et al.*, 1994; PETERS *et al.*, 1996a e PETERS *et al.*, 1996b).

Membranas fosfolipídicas reais são estruturas muito complexas, que contém não somente um grande número de diferentes fosfolipídios, mas também outros elementos, tais como colesterol e proteínas associadas, entre outros.

Dessa forma, criar e validar um modelo de membrana realista seria demorado. Por outro lado, uma simulação em ambiente apolar pode se apresentar como uma técnica computacionalmente mais rápida e capaz de prever o comportamento acurado de proteínas com atividade em ambiente de membrana.

Protocolos para a simulação de membranas mais realistas já estão sendo desenvolvidos, (LEVISKI, 2006), devendo, após terem sido validados, ser utilizados em trabalhos futuros, que comparem os resultados das simulações em solvente pouco polar com simulações em membranas.

5.1 Discussão geral dos dados obtidos

Devido a grande semelhança dos dados obtidos para as diversas simulações realizadas com restrição de posição e ao fato desses resultados já terem sido discutidos no artigo presente no capítulo anterior, nesta seção serão discutidas as quatro simulações cujos dados apresentaram maior consistência⁹. São elas: D49M-FULL (simulação em água, sem aplicação de restrições); D49M-PR0.5 (simulação em água com a aplicação de uma força de restrição de $500 \text{ KJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ sobre o íon Ca^{2+} nos primeiros 1ns de simulação); D49M-MeOH (simulação em metanol) e D49M-OcOH (simulação em octanol).

Como pode ser observado nas figuras 16 e 17, as mudanças dos raios de giro e número de ligações de hidrogênio intramoleculares refletem a polaridade do solvente. Observa-se que, conforme ocorre a diminuição da polaridade (água \rightarrow octanol), o raio de giro diminui enquanto o número de ligações de hidrogênio aumenta. Apesar da estrutura da fosfolipase

⁹ Nas simulações D49M-PR1.0 e D49M-PR2.0, onde durante o primeiro 1ns de simulação foram aplicadas forças de restrição posicional para o íon Ca^{2+} , respectivamente, de $1 \text{ KJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ e $2 \text{ KJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$, o íon deixa o sítio catalítico antes do início do período de produção. Já na simulação D49M-PR05F, que foi realizada com aplicação de forças de restrição posicional para o íon Ca^{2+} de $500 \text{ J mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ durante o período de 5 ns, foi observada a distorção do sítio-ativo da FLA₂. A simulação D49M-WCA foi realizada na ausência o íon cálcio.

A₂ simulada não ser perfeitamente globular, as trajetórias do raio de giro mostram a maior compactação da estrutura da fosfolipase quando simulada em octanol. Esse resultado é condizente com o aumento do número de ligações de hidrogênio intramoleculares, pois se os resíduos da proteína estão mais próximos, eles interagirão mais entre si.

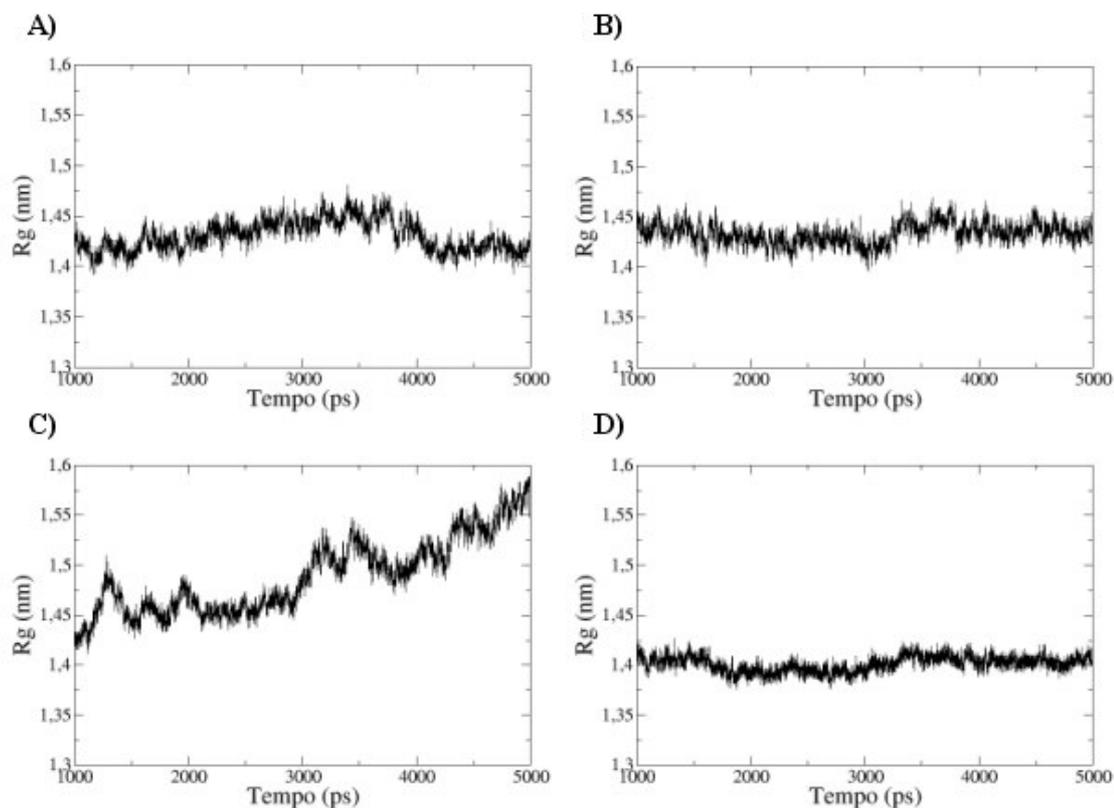


Figura 16. Raios de giro das simulações. A) D49M-FULL; B) D49M-PR0.5; C) D49M-MeOH e D) D49M-OcOH.

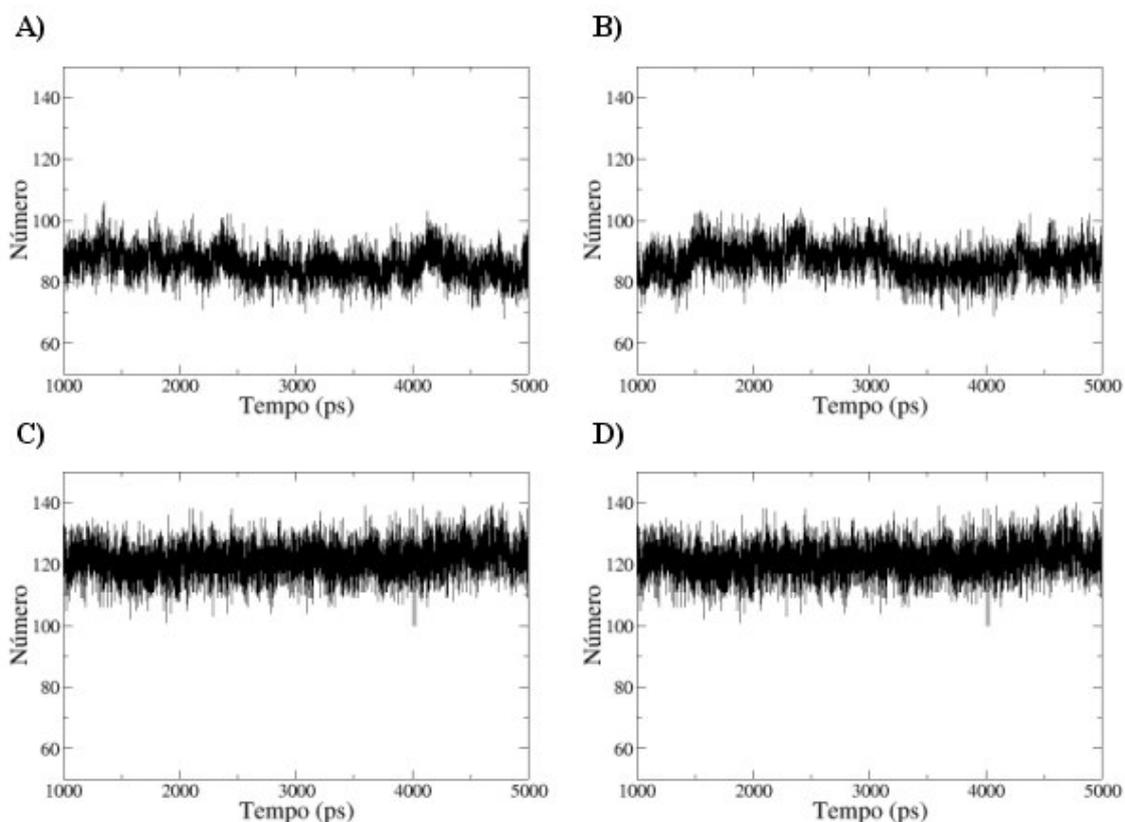


Figura 17. Número de ligações de hidrogênio das simulações. A) D49M-FULL; B) D49M-PR0.5; C) D49M-MeOH e D) D49M-OcOH

Na figura 18, são apresentados as trajetórias dos desvios médios das posições atômicas (RMSD) da cadeia principal, tendo como referência a estrutura cristalográfica de partida. Observa-se que o maior desvio ocorre na simulação em metanol, causado provavelmente pelo início do processo de desnaturação da proteína neste solvente. Curiosamente, quando GLÄTTLI *et al.* (2005), fizeram simulações da melitina neste mesmo solvente, também foi observado perda de estrutura secundária. No entanto, os autores não vincularam esse fenômeno ao efeito desnaturante do metanol, que por possuir um tamanho relativamente pequeno (quando comparado a aminoácidos) pode adentrar facilmente nas diversas cavidades da proteína e formar “bolsões” de baixa polaridade que desestabilizariam a estrutura enzimática. Esse fenômeno não ocorre com o octanol, pois se trata de uma molécula com um tamanho muito maior. De fato, é conhecido que o octanol é largamente empregado em experimentos de bancada com o objetivo de mimetizar o ambiente de membrana.

Em octanol, verifica-se que o RMSD é maior que nas simulações em água, resultado que possivelmente está relacionado com a transição da estrutura do meio aquoso (cristal)

para um meio apolar.

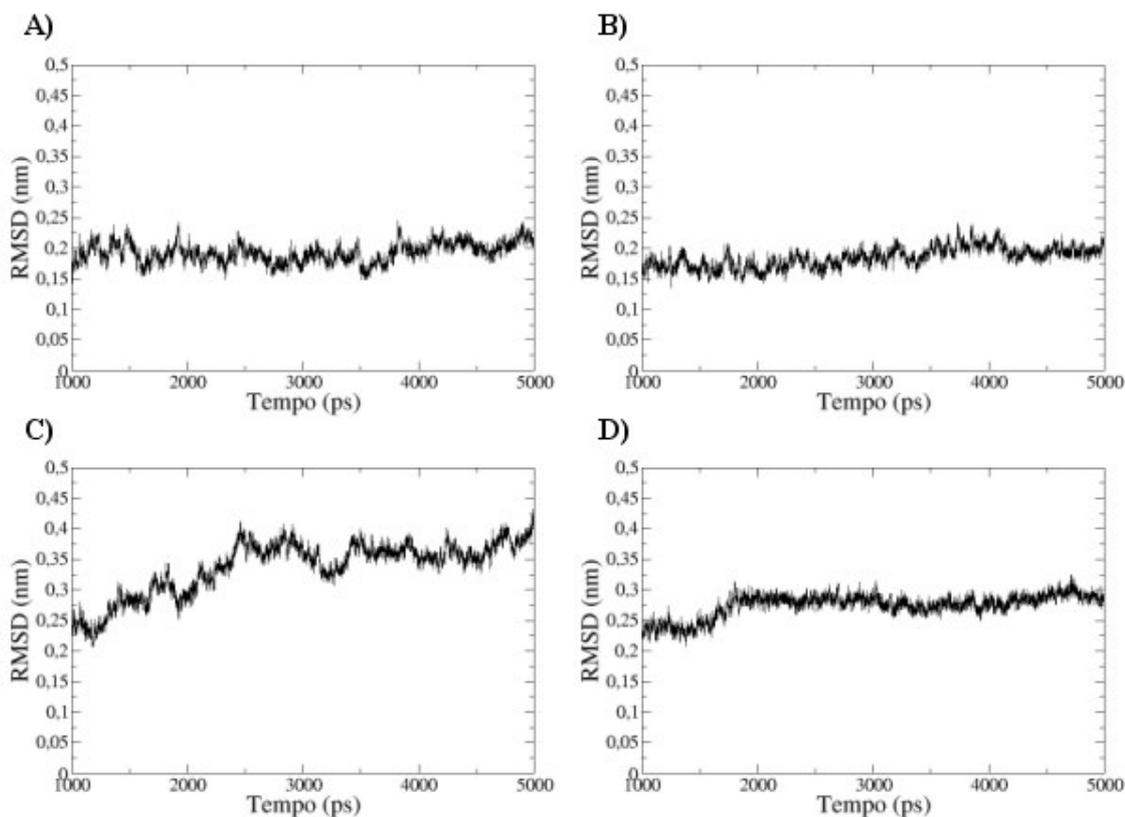


Figura 18. RMS do esqueleto protéico das simulações. A) D49M-FULL; B) D49M-PR0.5; C) D49M-MeOH e D) D49M-OcOH.

Apesar da estrutura protéica na simulação com octanol ter se compactado, essa apresentou um aumento da área acessível ao solvente (SAS) (figura 19). Esse resultado pode ser interpretado como uma reorganização estrutural sofrida pela enzima, a qual permitiria uma maior acessibilidade do substrato/solvente aos resíduos da região do sítio ativo.

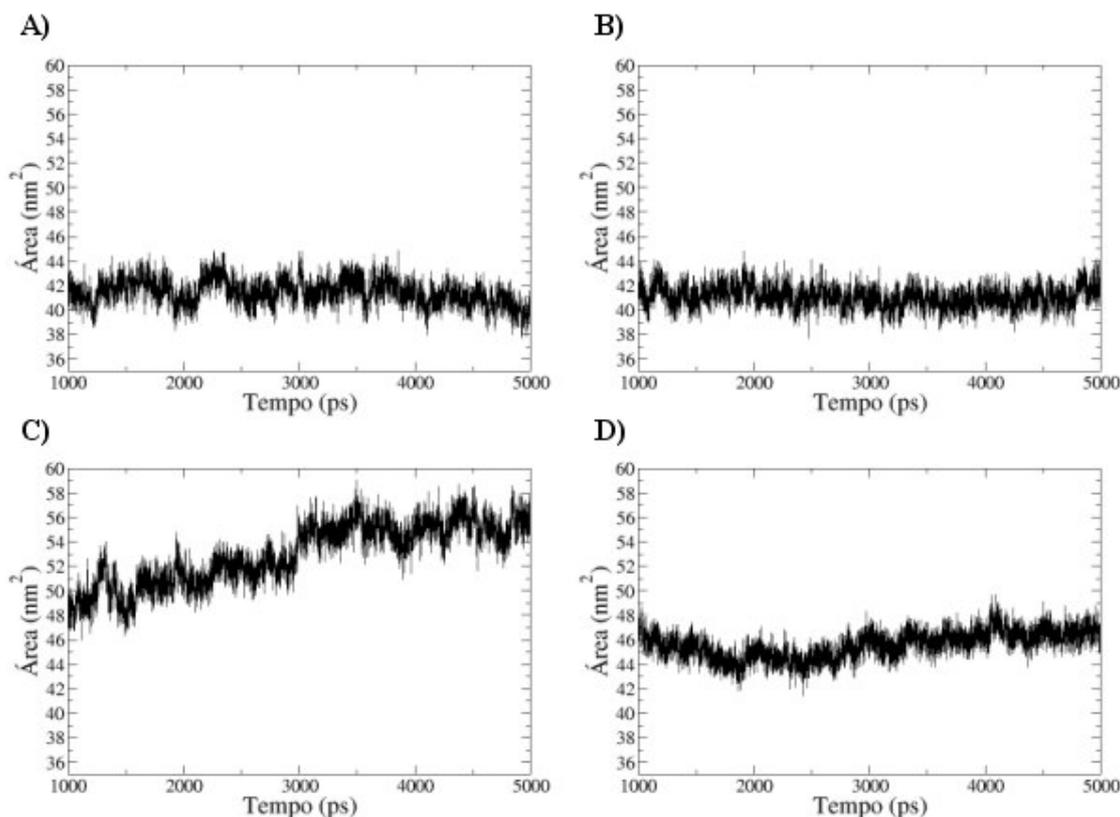


Figura 19. Superfície acessível ao solvente das simulações. A) D49M-FULL; B) D49M-PR0.5; C) D49M-MeOH e D) D49M-OcOH.

A figura 20, resume as observações até aqui descritas, apresentando as estruturas finais das simulações D49M-PR0.5 (água) e D49M-OcOH (octanol), coloridas em função do fator de temperatura (fator B)¹⁰. Nela se pode observar mudanças conformacionais importantes, tais como a compactação da estrutura em octanol e a mudança conformacional da alça pancreática, tornando-a mais acessível ao solvente. É notável, a importância da função do cálcio, que mantém o sítio ativo organizado para a hidrólise, enquanto que a alça pancreática permite um maior acesso ao mesmo.

¹⁰ O fator de temperatura reflete o grau de flexibilidade de cada resíduo.

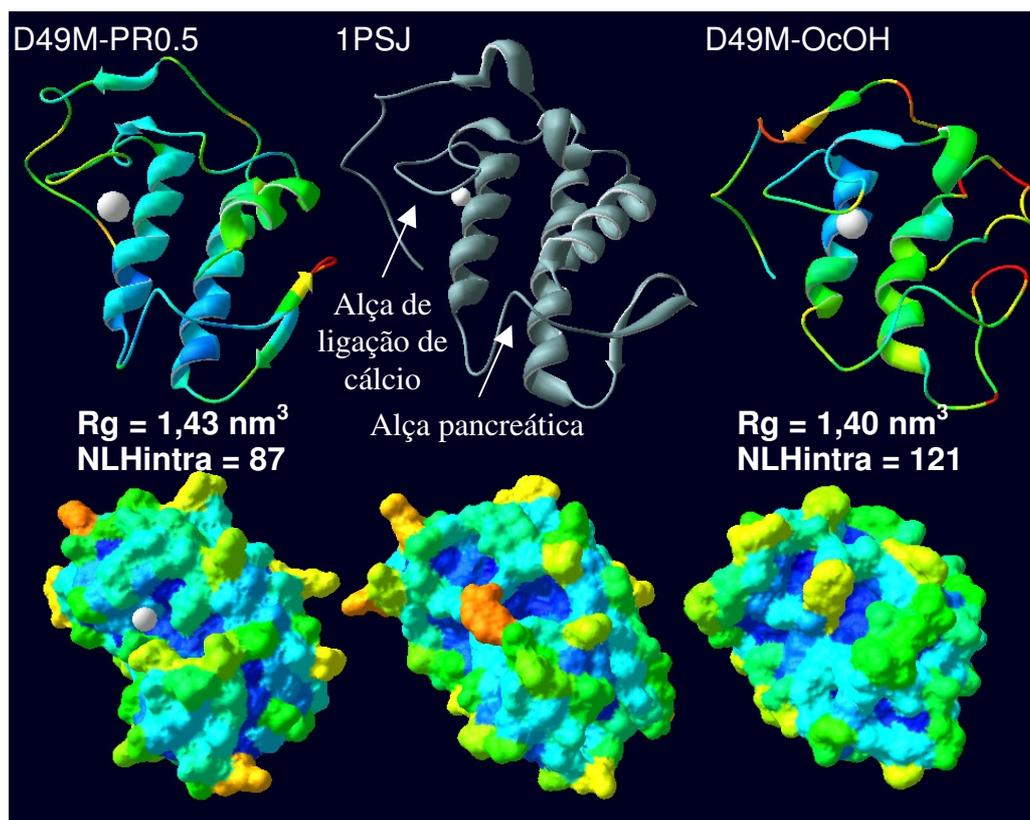


Figura 20. Estruturas finais (5 ns) das simulações D49M-PR0.5 e D49M-OcOH comparadas com a estrutura cristalográfica (1PSJ). Cor: fator de temperatura, o qual é uma medida da mobilidade (flutuação isotrópica) de cada resíduo durante a simulação, variando do azul (menor flutuação) ao vermelho (maior flutuação).

5.1.1 Flutuações das cadeias laterais de importância para a interação interfacial

Outro ponto importante observado nestes resultados foi o deslocamento das cadeias laterais de resíduos diretamente relacionados com a interação interfacial, tais como Trp31 e Lys69 (SIX & DENNIS, 2000).

Em um ambiente aquoso, a cadeia lateral do Trp31 está internalizada na proteína. Quando ocorre a mudança da polaridade do meio, essa cadeia projeta-se para a solução, aparentemente auxiliando a formação de um pequeno segmento de alfa-hélice, o qual pode contribuir para o encaixe de uma das cadeias do substrato fosfolipídico (figura 20). Outra observação relacionada a esses resíduos é que a posição das cadeias laterais de Trp31 e Lys69 diferem, em ambas as condições de simulação, daquelas encontradas na estrutura cristalográfica, a qual pode estar distorcida como consequência de efeitos do empacotamento cristalino.

Por sua vez, em ambiente aquoso, o resíduo Lys69 posiciona a sua cadeia lateral de

forma a bloquear a entrada do substrato no sítio-ativo. No momento em que a proteína aproxima-se da superfície da membrana (mais apolar), essa cadeia reorienta-se, permitindo uma maior exposição do sítio ativo (figura 21).

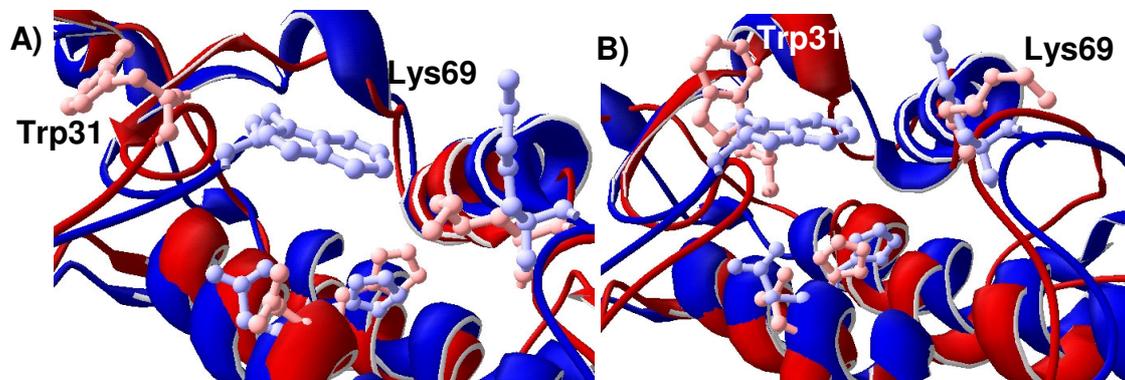


Figura 21. Movimentação de resíduos de importância interfacial. A) Simulação D49M-PR0.5; em azul: estrutura inicial da simulação, em vermelho: estrutura final. B) Simulação D49M-OcOH; em azul: estrutura inicial da simulação, em vermelho: estrutura final.

Dessa forma, a aproximação com a membrana induz a mudanças conformacionais importantes no sítio ativo, conduzindo a uma nova organização deste, a qual pode ser determinante para as características de especificidade da enzima. Estas observações estão de acordo com as propostas de modelo de chave fechadura flexíveis (ou ajuste induzido) (VERLI & BARREIRO, 2005).

5.1.2 Estabilidade de cátions no sítio ativo de FLA₂

Devido à baixa tendência do íon cálcio em abandonar o sítio ativo, permanecendo desassociado da alça de ligação de cálcio, mesmo com a aplicação de fortes forças de restrição nas simulações em meio aquoso, pode-se supor que este íon não permanece ligado à enzima enquanto esta encontra-se afastada da interface. Essa interpretação dos resultados das simulações está de acordo com YU *et al.* (1998), que demonstrou, em fosfolipases A₂ secretadas, que estas enzimas possuem baixa afinidade por metais divalentes (tabela 3).

Tabela 3: constantes de estabilidade de íons divalentes no sítio ativo de fosfolipases

Cátion	Raio (Å)	Kc^a (µM)	Kc^{*b} (µM)
Ca (II)	1,20	350	250
Mg (II)	0,95	>2000	
Mn (II)	1,04	>500	
Fe (II)	1,00		
Co (II)	0,96	500	300
Ni (II)	0,90	>1000	1000
Cu (II)	0,94	1,5	1,5
Zn (II)	0,96	1	0,6
Cd (II)	1,07	160	65
Sr (II)	1,35	100	100
Ba (II)	1,52	300	300

^a Constante catalítica em meio aquoso;

^b Constante catalítica na fase Enzima-Metal + Substrato, ou seja, no momento que a enzima começa a aproximar-se da superfície lipídica.

Tabela parcialmente adaptada de YU *et al.* (1998)

Para confirmar esses resultados, e garantir que a saída do cálcio e a perda do seu arranjo no sítio catalítico não é um artefato de simulação, foi realizado um experimento adicional, D49M-OcOH(2). Na simulação D49M-OcOH(2), realizada em octanol, foi usada como estrutura de partida as coordenadas finais do cálcio e da fosfolipase na simulação D49M-PR0.5. No início da simulação D49M-OcOH(2), o íon cálcio encontrava-se 0,49 nm distante da sua posição original no sítio ativo (catalítica). Verificou-se que, durante a simulação, o íon Ca²⁺ retorna à sua posição de origem, associando-se à cadeia lateral de Asp49, o que corrobora os resultados anteriores.

Dessa forma, os resultados das simulações sustentam a hipótese proposta neste trabalho, segundo a qual, devido à baixa afinidade das fosfolipases A₂ secretadas pelo íon cálcio (ver a tabela 3), esse íon só permanece ligado ao sítio ativo enquanto a enzima encontra-se próxima à superfície fosfolipídica. Assim, na ausência de membrana ou agregado de substrato, a baixa atividade observada nas fosfolipases pode ser uma consequência da carência deste íon divalente.

No momento em que a face *i* da fosfolipase aproxima-se da bicamada, ocorre a captação do cálcio, tornando a enzima ativa. A presença do íon cálcio na interface é facilitada pelos grupos fosfatos dos fosfolipídios, os quais geram uma carga negativa que se projeta para o exterior da membrana, formando uma superfície de adsorção de cargas positivas.

6 Conclusões

A partir das metas previstas, as simulações desenvolvidas nesse trabalho permitiram observar que:

1. Em meio aquoso puro, FLA_{2SV} tendem a permanecer cataliticamente inativas devido à ausência de íons Ca²⁺ no sítio-ativo (equilíbrio deslocado para este estado);
2. A captação de Ca²⁺ possivelmente ocorre próxima à interface fosfolipídica, possivelmente facilitado pela presença de componentes de membrana carregados negativamente;
3. Em ambiente apolar, a estrutura de FLA_{2SV} sofre importantes mudanças conformacionais, sendo que os principais eventos associados com a ativação de FLA_{2SV} incluem:
 - aumento da superfície acessível ao solvente (provavelmente decorrente da maior exposição da região do sítio ativo);
 - formação dos sub-sítios de especificidade para interação com o substrato;
 - reorientação da cadeia lateral de Asp49 e coordenação com o Ca²⁺;
 - formação da interação entre os resíduos da díade catalítica His48-Asp49;
 - reorganização da alça de ligação de Ca²⁺;
 - projeção da cadeia lateral de Trp31 para a solução;
 - reorientação da cadeia lateral de Lys69;

Dessa forma, os resultados aqui mostrados agregam-se ao conhecimento obtido por outras metodologias, possibilitando a obtenção de um panorama mais detalhado e realista da ação dessas enzimas.

7 Perspectivas

1. Simulação de FLA₂ cataliticamente inativas (FLA₂ K49), com o objetivo de estudar como o controle alostérico regula a função destas enzimas.
2. Mapear os resíduos determinantes das características de especificidade das FLA₂-D49 tóxicas e não-tóxicas, realizando simulações destas enzimas na presença de:
 - substrato (fosfolípídeo);
 - inibidor;
 - análogo de estado de transição;
3. Simulação em meios bifásicos.
4. Construção de membranas estabilizadas com colesterol e análise da interação com FLA₂s.
5. Desenho de novos inibidores de fosfolipases com potencial farmacológico.

8 Referências bibliográficas

- AOKI, J.; NAGAI, Y.; HOSONO, H.; INOUE, K. & ARAI, H. Structure and function of phosphatidylserine-specific phospholipase A₁. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1582: 26-32, 2002.
- BALSINDE, J.; BALBOA, M. A.; INSEL, P. A. & DENNIS, E. A. Regulation and inhibition of phospholipase A₂. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39: 175-189, 1999.
- BALSINDE, J.; WINSTEAD, M. V. & DENNIS, E. A. Phospholipase A₂ regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Letters*, 531: 2-6, 2002.
- BANHSON, B. J. Structure, function and interfacial allostereism in phospholipase A₂: insight from the anion-assited dimmer. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 433: 96-106, 2005.
- BERENDSEN, H. J. C.; van der SPOEL, D. & van DRUNEN, R. GROMACS – a message-passing parallel molecular-dynamics implementation. *Computer physics communications*, 91: 43-56, 1995.
- BERG, O. G.; CAJAL, Y.; BUTTERFOSS, G. L.; GREY, R. L.; ALSINA, M. A.; YU B. & JAIN, M. K. Interfacial activation of triglyceride lipase from *Thermomyces (Humicola) lanuginose*: Kinetic Parameters and a basis for control of the lid. *Biochemistry*, 37(19): 6615-6627, 1998.
- BERG, O. G.; GELB, M. H.; TSAI, M. & JAIN, M. K. Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A₂-paradigm. *Chemical Reviews*, 101: 2613-2653, 2001.
- CANAAN, S.; ZÁDORI, Z.; GHOMASHCHI, F.; BOLLINGER, J.; SADILEK, M.; MOREAU, M. E.; TIJSSEN, P. & GELB M. H. Interfacial enzymology of parvovirus phospholipases A₂. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(15): 14502-14508, 2004.
- CHEN, S. C. A.; WRIGHT, L. C.; GOLDING, J. C & SORREL, T. C. Purification and characterization of secretory phospholipase B, lysophospholipase and lysophospholipase/transacylase from a virulent strain of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *The Biochemical journal*, 347: 431-439, 2000.
- COCKCROFT, S. The latest phospholipase C, PLC η , is implicated in neuronal function. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(1): 4-7, 2006.
- COSTA, V. E. U. & AMORIM, H. L. N. O emprego de lípases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. *Química Nova*, 22(6): 863-873, 1999.
- DEMARET, J. & BRUNIE, S. A unique structural feature of a phospholipase A₂ is probed by molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*, 10: 257-260, 1992.
- DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(18): 13057-13060, 1994.
- DENNIS, E. A. The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. *Trends in biochemical sciences*, 22: 1-2, 1997.
- DESSEN, A.; TANG, J.; SCHMIDT, H.; STAHL, M.; CLARK, J. D.; SEEHRA, J. & SOMERS, W. S. Crystal structure of human cytosolic phospholipase A₂ reveals a novel topology and catalytic mechanism. *Cell*, 97(3): 349-360, 1999.
- DIRAVIYAM, K. & MURRAY, D. Computacional analysis of the membrane association of group IIA secreted phospholipases A₂: a differential role for electrostatics. *Biochemistry*, 45(8): 2584-2598, 2005.

- FLORES, T. P. & MOSS, D. S. Simulating the dynamics of macromolecules. In: GOODFELLOW, J. M. *Molecular Dynamics*. CRC Press, Cap. 1, p. 1-26, 1990.
- GANENDREN, R.; CARTER, E.; SORRELL, T.; WILMER, F. & WRIGHT, L. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. *Microbes and Infection*, 8: 1006-1015, 2006.
- GLÄTTLI, A.; CHANDRASEKHAR, I.; GUNSTEREN, W. F. A molecular dynamics study of the bee venom melittin in aqueous solution, in methanol, and inserted in a phospholipid bilayer. *European Biophysics Journal*, 35(3): 255-267, 2005.
- GUEX, N. & PEITSCH, M. C. Swiss-Model and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18: 2714-2723, 1997. <http://www.expasy.org/spdbv>.
- GROMACS: the world's fastest molecular dynamics - and it's GLP! <http://www.gromacs.org/>. Acessado em 08 de agosto de 2006.
- HARDEN, T. K. & SONDEK, J. Regulation of phospholipase C isozymes by ras superfamily GTPases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 46: 355-379, 2006.
- HESS, B.; BEKKER, H.; BERENDSEN, H. J. C. & FRAAIJE, J. G. E. M.: LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of computational chemistry*, 18(12): 1463-1472, 1997.
- HIRABAYASHI, T.; MURAYAMA, T. & SHIMIZY, T. Diversity of phospholipase A₂ enzymes: regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A₂. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27(8): 1168-1173 2004.
- HO, I.; ARM, J. P.; BINGHAM III, C. O.; CHOI, A.; AUSTEN, K. F. & GLIMCHER, L. H. A novel group of phospholipase A₂s preferentially expressed in type 2 helper T cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(21): 18321-18326, 2001.
- HYVÖNEN, M. T.; ÖÖRNI, K.; KOVANEN, P. T. & ALA-KORPELA M. Changes in a phospholipid bilayer induced by the hydrolysis of a phospholipase A₂ enzyme: a molecular dynamics simulation study. *Biophysical Journal*, 80: 565-578, 2001.
- JENKINS, G. M. & FROHMAN, M. A. Phospholipase D: a lipid centric review. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, 62: 2305-2316, 2005.
- JONES, S. T.; AHLSTRÖM, P.; BERENDSEN, H. J. C. & PICKERSGILL, R. W. Molecular Dynamics simulation of a phospholipase A₂-substrate complex. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1162: 135-142, 1993.
- KATAN, M. New insights into the families of PLC enzymes: looking back and going forward. *The Biochemical journal*, 391: e7-e9, 2005.
- KINI, R. M. & EVANS H. J. Structure-function relationships of phospholipases: the anticoagulant region of phospholipases A₂. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(30): 14402-14407, 1987.
- KINI, R. M. Phospholipase A₂ – A complex multifunctional protein puzzle. In: Kini, R. M. *Venom Phospholipase A₂ Enzymes*. John Wiley & Sons England, Cap. 1, p. 1-28, 1997.
- KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon*, 42: 827-840, 2003.
- KUDO, I. Diversity of phospholipase A₂ enzymes: foreword. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27(8): 1157, 2004.
- LEE, B. & RICHARDS, F. M. The interpretation of protein structures: Estimation of static accessibility. *Journal of Molecular Biology*, 55(3): 379-380, 1971.

- LEVISKI, R. S. Estudo Computacional da Interação entre Bicamada Lipídica Aniônica e Moricina. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- LIDE, D. R. (Ed.). *Handbook of Chemistry and Physics*. 84. ed. CRC: [s/l], 2004.
- LINDAHL, E.; HESS, B. & van der SPOEL. Gromacs 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *Journal of Molecular Modeling*, 7(8): 306-317, 2001.
- McINTOSH, J. M.; GHOMASHCHI, F.; GELB, M. H.; DOOLEY, D. H.; STOEHR, S. J.; GIORDANI, A. B.; NAISBITT, S. R. & OLIVEIRA, B. M. Conodipine-M, a novel phospholipase A₂ isolated from the venom of the marine snail *Conus magus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(8): 3518-3526, 1995.
- MURAKAMI, M. Hot topics in phospholipase A₂ field. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27(8): 1179-1182, 2004.
- MURAKAMI, M & KUDO I. Diversity of phospholipase A₂ enzymes: secretory phospholipase A₂. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27(8): 1158-1164, 2004.
- NAGANO, N. & NEMETH, E. F. Functional proteins involved in regulation of intracellular Ca²⁺ for drug development: the extracellular calcium receptor and an innovative medical approach to control secondary hyperparathyroidism by calcimimetics. *Journal of Pharmacological Sciences*, 97: 355-360, 2005.
- NORIN, M.; Haeffner, F; HULT, K. & ODHOLM, O. Molecular dynamics simulations of an enzyme surrounded by vacuum, water, or a hydrophobic solvent. *Biophysical Journal*, 67: 548-559, 1994.
- PETERS, G. H.; OLSEN, O. H.; SVENDSEN, A. & WADE, R. C. Theoretical investigation of the dynamics of the active site lid in *Rhizomucor miehei* lipase. *Biophysical Journal*, 71: 119-129, 1996a.
- PETERS, G. H.; van AALTEN, D. M. F.; EDHOLM, O. TOXVAERD, S. & BYWATER, R. Dynamics of proteins in different solvent systems: analysis of essential motion in lipases. *Biophysical Journal*, 71: 2245-2255, 1996b.
- POV-RAY: the persistence of vision raytracer. <http://www.povray.org/>. Acessado em 08 de agosto de 2006.
- RCSB Protein Data Bank. <http://www.rcsb.org>. Acessado em 08 de agosto de 2006.
- REBECCHI, M. J. & PENTYALA, S. N. Structure, Function, and Control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiological Reviews*, 80(4): 1291-1335, 2000.
- ROUAULT, M.; BOLLINGER, J. G.; LAZDUNSKI, M.; GELB, M. H. & LAMBEAU, G. Novel mammalian group XII secreted phospholipase A₂ lacking enzymatic activity. *Biochemistry*, 42(39): 11494-11503, 2003.
- SHEFFIELD, P. J.; McMULLEN, T. W.; LI, J.; HO, Y. S.; GARRARD, S. M.; DEREWENDA, U. & DEREWENDA, Z. S. Preparation and crystal structure of the recombinant alpha(1)/alpha(2) catalytic heterodimer of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase Ib. *Protein engineering*, 14(7): 513-519, 2001.
- SCHULER, L. D.; DAURA, X. & van GUSTEREN, W. F. An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase. *Journal of Computational Chemistry*, 22(11): 1205-1218, 2001.
- SCOTT, D. L.; WHITE, S. P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M. H. & SIGLER, P. B. Interfacial Catalysis: The Mechanism of Phospholipase A₂. *Science*, 250: 1541-1546, 1990.

- SCOTT, D. L. Phospholipase A₂: structure and catalytic properties. In: Kini, R. M. *Venom Phospholipase A₂ Enzymes*. John Wiley & Sons England, Cap. 4, p. 97-128, 1997.
- SEKAR, K.; ESWARAMOORTHY, S.; JAIN, M. K. & SUNDARALINGAM, M. Crystal structure of the complex of bovine pancreatic phospholipase A₂ with the inhibitor 1-hexadecyl-3(trifluoroethyl)-*sn*-glycero-2-phosphomethanol. *Biochemistry*, 36(46): 14186-14191, 1997.
- SHEN, D.; NOODEH, A. D.; KAZEMI, A.; GRILLOT, R.; ROBSON, G. & BRUGÈRE, J. Characterisation and expression of phospholipases B from opportunistic fungus *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiology Letters*, 229: 87-93, 2004.
- SINGH, G.; GOURINATH, S.; SHARMA, S.; PARAMASIVAM, M.; SRINIVASAN, A. & SINGH, T. P. Sequence and crystal structure determination of a basic phospholipase A₂ from common krait (*Bungarus caeruleus*) at 2.4 Å resolution: identification and characterization of its pharmacological sites. *Journal of Molecular Biology*, 307(4): 1049-1059, 2001.
- SIX, D. A. & DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1488: 1-19, 2000.
- SONG, J. K & RHEE J. S. Enhancement of stability and activity of phospholipase A₁ in organic solvents by directed evolution. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1547: 370-378, 2001.
- SORAGNI, E.; BOLCHI, A.; BALESTRINI, R.; GAMBARETTO, C.; PERCUDANI, R.; BONFANTE, P. & OTTONELLO, S. A nutrient-regulated, dual localization phospholipase A₂ in the symbiotic fungus *Tuber borchii*. *The EMBO Journal*, 20(18): 5079-5090, 2001.
- TATULIAN, S. A.; BILTONEN, R. L. & TAMM, L. K. Structural changes in a secretory phospholipase A₂ induced by membrane binding: a clue to interfacial activation? *Journal of Molecular Biology*, 268(5): 809-815, 1997.
- TATULIAN, S. A. Toward understanding interfacial activation of secretory phospholipase A₂ (PLA₂): membrane surface properties and membrane-induced structural changes in the enzyme contribute synergistically to PLA₂ activation. *Biophysical Journal*, 80(2): 789-800, 2001.
- ULBRICH-HOFMANN, R.; LERCHNER, A.; OBLOZINSKY, M. & BEZAKOVA L. Phospholipase D and its application in biocatalysis. *Biotechnology Letters*, 27: 535-543, 2005.
- VALENTIN, E. & LAMBEAY, G. What can venom phospholipases A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipase A₂? *Biochimie*, 82: 815-831. 2000.
- van AALTEN, D. M. F.; BYWATER, B.; FINDLAY, J. B. C.; HENDLICH, M.; HOOFT, R. W. W. & VRIEND, G. PRODRG: a program for generating molecular topologies and unique molecular descriptors from coordinates of small molecules. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 10(3): 255-262, 1996.
- van der SPOEL, D.; van BUUREN, A. R.; APOL, E.; MEULENHOF, P. J.; TIELEMAN, D. P.; SIJBERS, A. L. T. M.; HESS, B.; FEENSTRA, K. A.; LINDAHL, E.; van DRUNEN, R. & BERENDSEN, H. J. C. *GROMACS user manual version 3.1.1*, Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands, 2002.

- van GUNSTEREN, W. F. & MARK, A. E. Validation of molecular dynamics simulation. *Journal of Chemical Physics*, 108(15): 6109-6116, 1998.
- van GUNSTEREN, W. F.; BILLETER, S. R.; EISING, A. A.; HÜNENBERGER, P. H.; KRÜGER, P.; MARK, A. E.; SCOTT, W. R. P. & TIRONI, I. G. *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 manual and user guide*. Zürich, Switzerland: Hochschulverlag AG an der ETH Züürich, Groningen, 1996.
- VERGER, R.; MIERAS, M. C. E. & HAAS, G. H. Actino of phospholipase A at interfaces. *The Journal of Biological Chemistry*, 248(11): 4023-4034, 1973.
- VERLI, H. & BARREIRO, E. J. Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. *Química Nova*, 28(1): 95-102, 2005.
- VOLKOV, A. G. Interfacial catalysis at oil/water interfaces. In: Volkov, A. G. *Interfacial Catalysis*. CRC, Cap 1. P. 1-22, 2002.
- WANG, X.Q.; YANG, J.; GUI, L.L.; LIN, Z.J.; CHEN, Y.C. & ZHOU, Y.C. Crystal structure of an acidic phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon halys pallas* at 2.0 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*,. 255(5): 669-676, 1996.
- YU, B.; ROGERS, J.; NICOL, G. R.; THEOPOLD, K. H.; SESHADRI, K.; VISHWESHWARA, S. & JAIN, M. K. Catalytic significance of the specificity of divalent cations as K_s^* and k_{cat}^* cofactors for secreted phospholipase A₂. *Biochemistry*, 37(36): 12576-12587, 1998.
- ZHOU, F. & SCHULTEN, K. Molecular dynamics study of phospholipase A₂ on a membrane surface. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 25: 12-27, 1996.

9 CURRICULUM VITÆ resumido

OLIVEIRA, T. C.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Tiago Charão de Oliveira

Local e data de nascimento: Triunfo, Rio Grande do Sul, Brasil, 09 de novembro de 1979.

Endereço Profissional: Av. Bento Gonçalves, 9500, Campus do Vale, CEP 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Telefone Profissional: (51) 3316-7770

E-mail: tcharao@yahoo.com

2. FORMAÇÃO

Curso Profissionalizante Técnico em Química

Período: 03/1994 – 12/1998

(cursado concomitante ao ensino médio)

Escola Municipal de 2º Grau Farroupilha

Triunfo/RS – Brasil

Graduação em Ciências Habilitação Química Licenciatura Plena

Período: 08/1997 – 07/2002

Orientador: José Vicente Lima Robaína

Título: Relatório Final de Estágio

Universidade Luterana do Brasil – ULBRA

Canoas/RS – Brasil

Graduação em Ciências Habilitação Química Bacharelado

Período: 08/2002 – 07/2004

Orientador: Luiz Antônio Mazzini Fontoura

Título: Determinação da Barreira Rotacional de Acilanilinas por Modelagem Molecular

Universidade Luterana do Brasil – ULBRA

Canoas/RS – Brasil

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Período: 09/2004 – 10/2006

Orientador: Jorge Almeida Guimarães

Título: Mudanças Conformacionais Envolvidas na Ativação Interfacial de Fosfolipases A₂ – Uma Análise Computacional.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Porto Alegre/RS – Brasil

3. ESTÁGIOS:

Refinaria Alberto Pasqualini - Refap S/A

Estágio do curso profissionalizante Técnico em Química

Período: 23/04/1998 a 31/07/1998

Resumo das Atividades: análises químicas de águas e poluição ambiental.

Petroquímica Triunfo S. A.

Estágio do curso profissionalizante Técnico em Química

Período: 03/08/1998 a 02/02/1999**Resumo das Atividades:** análises químicas e físicas de materiais poliméricos**Núcleo de Ensino de Ciências – NEC, Universidade Luterana do Brasil - ULBRA**

Monitoria acadêmica

Período: 03/1999 a 07/2000**Resumo das Atividades:** confecção de material pedagógico para o ensino de química**4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES:****2003** Destaque XV Salão de Iniciação Científica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul**2002** Prêmio CRQ V Região, Conselho Regional de Química V Região**5. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL****Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS****Período:** 08/2005 – 05/2005**Vínculo Institucional / Enquadramento Funcional:** Servidor Público / Professor Substituto**Carga Horária:** 40 horas

Atividades

- | | |
|-------------------|---|
| 07/2005 – 05/2006 | Disciplinas Lecionadas em Cursos de Graduação |
| | 1. Química Orgânica Experimental (cursos de farmácia e engenharia de alimentos) |
| | 2. Introdução à Química Orgânica (cursos de biologia e física) |
| | 3. Química Orgânica Fundamental (cursos de biomedicina e nutrição) |

Escola Técnica Municipal Farroupilha - ETMF**Período:** 03/2003 – 07/2005**Vínculo Institucional / Enquadramento Funcional:** Servidor Público / Professor Área 4**Carga Horária:** 20 horas

Atividades

- | | |
|-------------------|--|
| 03/2004 - 12/2004 | Disciplinas Lecionadas em Curso Profissionalizante |
| | 1. Introdução à Química (curso técnico em segurança do trabalho) |
| 03/2004 - 06/2005 | Disciplinas Lecionadas em Curso Profissionalizante |
| | 1. Físico-Química (curso técnico em química) |
| | 2. Introdução ao Laboratório de Química (curso técnico em química) |

- 03/2003 – 07/2005
3. Química Analítica Instrumental (curso técnico em química)
 4. Corrosão (curso técnico em química)
- Disciplinas Lecionadas no Ensino Médio
1. Química

Fundação de Ciência e Tecnologia - CIENTEC

Período: 03/2001 – 03/2003

Vínculo Institucional / Enquadramento Funcional: Servidor Público / Assistente de Pesquisa

Carga Horária: 40 horas

Atividades

- | | |
|-------------------|-------------------------------|
| 03/2001 - 03/2003 | Atividades Técnico-Científica |
| | 1. Análises Químicas |
| 07/2002 – 02/2003 | Atividades Técnico-Científica |
| | 1. Coleta de Afluentes |

6. PUBLICAÇÕES EM REVISTAS NÃO-INDEXADAS – MAGAZINES

Oliveira, Tiago Charão; Robaina, José Vicente Lima. **Utilização de Detergente**. *Revista do Professor* (64): 21-23

7. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. OLIVEIRA, T. C.; GUIMARÃES, J. A. & AMORIM, H. L. *Computational Study of the Structure-Function Relationships of Venon Secreted Phospholipases A₂ D49*. In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, 2006, Águas de Lindóia. Livro de resumos, 2006.
2. OLIVEIRA, Tiago Charão de; AMORIM, Hermes Luís Neubauer; GUIMARÃES, Jorge Almeida. *Structure-Activity Relationships of D49 and K49 Phospholipases A₂ from Molecular Dynamics Simulations*. In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, 2005, Águas de Lindóia. Livro de resumos, 2005.
3. GRASEL, Fábio dos Santos; OLIVEIRA, Tiago Charão de; RIGOTTI, Italo José da Cruz; FONTOURA, Luiz Antonio Mazzini. *Efeito do Substituente sobre a Barreira Rotacional de Amidas e Carbamatos Aromáticos por Cálculo ab initio*. In: XXVI Congresso Latinoamericano de Química, 2004, Salvador. Livro de resumos, 2004.
4. OLIVEIRA, Tiago Charão de; GRASEL, Fábio dos Santos; RIGOTTI, Italo José da Cruz; FONTOURA, Luiz Antonio Mazzini. *Estudo Computacional do processo Rotacional da Ligação N-CO em Amidas e Carbamatos Derivados da Anilina*. In: XV Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003, Porto Alegre, 2003.

5. GRASEL, Fábio dos Santos ; OLIVEIRA, Tiago Charão de; RIGOTTI, Italo José da Cruz; FONTOURA, Luiz Antonio Mazzini. *Estudo Comparativo das Barreiras Rotacionais N-arilamidas e N-arilcarbamatos por Modelagem Molecular*. In: XI Encontro de Química da Região Sul, 2003, Pelotas. Livro de Resumos, 2003.
6. OLIVEIRA, Tiago Charão de; RIGOTTI, Italo José da Cruz; FONTOURA, Luiz Antonio Mazzini. *Estudo Computacional da Barreira Rotacional de N-acilanilinas*. In: 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2001, Poços de Caldas. Livro de Resumos, 2001.
7. OLIVEIRA, Tiago Charão de; RIGOTTI, Italo José da Cruz; FONTOURA, Luiz Antonio Mazzini. *Análise Estrutural dos Rotâmeros de N-acilanilinas por Modelagem Molecular*. In: XLI Congresso Brasileiro de Química, Porto Alegre, 2001.
8. OLIVEIRA, Tiago Charão de; RIGOTTI, Italo José da Cruz; FONTOURA, Luiz Antonio Mazzini. *Equilíbrio Rotacional de N-acilanilinas*. In: I Fórum de Pesquisa Científica e Tecnológica, Canoas, 2000.
9. OLIVEIRA, Tiago Charão de; Robaina, José Vicente Lima. *Mapeamento de Sites e Softwares para o Ensino de Química*. In: III Mostra de Iniciação Científica da ULBRA – Campus Cachoeira do Sul, 2000.