



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS
NATURAIS

ANA VIRGINIA FROTA GUIMARÃES

SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR DE L-ASPARAGINASES: ESTUDO
COMPARATIVO ENTRE UMA L-ASPARAGINASE HUMANA, BACTERIANA E DO
PORQUINHO DA ÍNDIA

FORTALEZA

2019

ANA VIRGINIA FROTA GUIMARÃES

SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR DE L-ASPARAGINASES: ESTUDO
COMPARATIVO ENTRE UMA L-ASPARAGINASE HUMANA, BACTERIANA E DO
PORQUINHO DA ÍNDIA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Marcos Roberto Lourenzoni

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- G976s Guimarães, Ana Virgínia Frota.
Simulações de Dinâmica Molecular de L-Asparaginases: Estudo Comparativo entre uma L-Asparaginase Humana, Bacteriana e do Porquinho da Índia / Ana Virgínia Frota Guimarães.
– 2019.
182 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Marcos Lourenzoni.
1. Dinâmica Molecular. 2. L-asparaginase humana. 3. L-asparaginase de *Cavia porcellus*..
4. L-asparaginase de *Escherichia coli*. 5. Leucemia Linfóide Aguda. I. Título.

CDD 660.6

ANA VIRGINIA FROTA GUIMARÃES

SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR DE L-ASPARAGINASES: ESTUDO
COMPARATIVO ENTRE UMA L-ASPARAGINASE HUMANA, BACTERIANA E DO
PORQUINHO DA ÍNDIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Marcos Roberto Lourenzoni (Orientador)
Fundação Oswaldo Cruz/CE (Fiocruz/CE)

Dr. Gilvan Pessoa Furtado
Fundação Oswaldo Cruz/CE (Fiocruz/CE)

Dr. Raphael Trevizani Roque de Oliveira
Fundação Oswaldo Cruz/CE (Fiocruz/CE)

A Deus.

Aos meus pais, Ana Claudia e Marcos, e ao meu orientador Marcos Lourenzoni.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a **Deus**, pelo dom da vida, por iluminar meu caminho e dar-me forças para superar obstáculos diários.

À **Funcap**, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À **Fundação Oswaldo Cruz/CE** pelos recursos cedidos.

À **Universidade Federal de Ceará** pela infraestrutura, pela geração de conhecimento através de aulas enriquecedoras e pela realização da Pós Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais.

À **Pós Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais** pela excelente grade curricular que possibilitou conhecimentos necessários ao engrandecimento intelectual.

Ao Prof. Dr. **Marcos Roberto Lourenzoni**, pela paciência, pelos inestimáveis ensinamentos e excelente orientação e por toda a dedicação ao trabalho. Obrigada por ser mais que um orientador e por ajudar, não só com o trabalho, mas também com problemas pessoais.

Aos professores participantes da banca examinadora, **Gilvan Pessoa Furtado** e **Raphael Trevizani**, pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos meus pais, **Ana Claudia** e **Marcos Guimarães**, por todo o incentivo, apoio e por sempre acreditarem que eu era capaz.

Ao meu namorado, **João Campelo**, pelo carinho, amor e apoio moral nas horas mais difíceis.

Aos **meus colegas de trabalho** por deixarem o ambiente de trabalho mais descontraído e pela disponibilidade em ajudar quando requisitados.

Ao coordenador, **Bartolomeu Warlene Silva de Souza**, e vice coordenador, **André Luis Coelho da Silva**, por serem bastante acessíveis, pela atenção aos alunos, pela ajuda em situações adversas e pelas contribuições dadas ao Programa de Pós.

Aos **professores do programa de Pós** por serem acessíveis, por transmitirem o conhecimento de forma didática e pela dedicação às aulas ministradas.

Ao **Renato Farias Ferreira Gomes** por sempre ser muito prestativo, pela prontidão em responder *e-mails* e por ajudar nas mais diversas situações que apareceram durante o caminho

Aos **funcionários da Fundação Oswaldo Cruz/CE**, pelo suporte, pela simpatia e por terem ajudado em tudo que estivesse ao alcance.

A **todos os meus familiares e amigos**, que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“O sucesso não deve ser medido pelo que
você conquistou, mas sim pelas dificuldades
que superou no caminho”

Booker T. Washington

RESUMO

A L-asparaginase é uma enzima que atua na hidrólise de L-Asn em L-Asp e amônia. Essa enzima é utilizada no tratamento de alguns tipos de câncer, principalmente LLA, em conjunto com outros fármacos. As enzimas comerciais são provenientes de bactéria, por exemplo a *EcII* de *Escherichia coli*, e causam reações adversas durante o tratamento. Uma enzima humana poderia ser um substituto não imunogênico, entretanto, suas propriedades cinéticas não são tão eficientes. A enzima humana estudada neste trabalho é a hASNase1, que reside no domínio N-terminal da proteína 60kDa-lisofosfolipase, e que possui alosterismo. Não há estrutura 3D determinada experimentalmente e a hASNase1 possui elevada identidade estrutural (>70%) com a gpASNase1, proveniente de *Cavia porcellus*, mas não compartilham a mesma eficiência catalítica. Contudo, a gpASNase1 possui propriedades cinéticas semelhantes à *EcII*. O trabalho visou modelar a hASNase1 e comparar sua estrutura com a da gpASNase1 e *EcII*, utilizando Dinâmica Molecular (DM), a fim de entender diferenças estruturais em solução que possam explicar as diferentes propriedades cinéticas. A hASNase1 foi submetida à DM, assim como a gpASNase1 (cód. PDB: 4R8K) e *EcII* (cód. PDB: 3ECA), em meio aquoso, contendo Asn inseridas ou não, nos sítios catalíticos e/ou alostéricos. As propriedades estruturais e termodinâmicas foram avaliadas através de análise da trajetória. Os resultados da DM mostraram que a hASNase1 é um dímero de dímeros e sua estrutura possui uma fenda no centro entre os monômeros, assim como na gpASNase1. O potencial de interação entre Asn e resíduos do sítio catalítico mostrou maior liberdade de orientação do substrato em hASNase1 e gpASNase1 que em *EcII*. A Alça1 na hASNase1 possui uma constituição de resíduos que faz com que ela esteja mais susceptível a deformações e movimentações. Já a Alça2, possui uma parte em α -hélice na hASNase1, que deixa a posição da Tyr308 mais fixa no sítio que na gpASNase1 e isso pode implicar em diferença de eficiência catalítica. O monitoramento da Lys188 mostrou o efeito da cooperatividade positiva da hASNase1 e foi verificado que a presença de Asn no sítio alostérico estabiliza a Lys188 para a manutenção da tríade, assim como ajuda a estabilizar a movimentação da Alça1. Conclui-se que apesar da semelhança estrutural entre a hASNase1 e a

gpASNase1 há dissimilaridades, além do alosterismo, que podem explicar as diferentes propriedades cinéticas.

Palavras-chave: Dinâmica Molecular; L-asparaginase humana; L-asparaginase de *Cavia porcellus*; L-asparaginase de *Escherichia coli*; Leucemia Linfóide Aguda.

ABSTRACT

L-Asparaginase is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of L-Asn to L-Asp and ammonia. This enzyme is used in the treatment of some types of cancer, especially ALL, along with other drugs. Commercial enzymes are derived from bacteria, for example, *Escherichia coli* (*EclI*), and they cause adverse reactions during treatment. A human enzyme could be a non-immunogenic substitute; however, its kinetic properties are not as efficient. The human enzyme studied in this work is hASNase1, which belongs in the N-terminal domain of the 60kDa-lysophospholipase protein, and exhibits allostereism. There is no 3D structure available for it and, although hASNase1 displays a high structural identity (>70%) with gpASNase1 from *Cavia porcellus*, they do not share the same catalytic efficiency. However, gpASNase1 has similar kinetic properties to *EclI*. The aim of this study was to model hASNase1 and compare its structure with that of gpASNase1 and *EclI* using Molecular Dynamics (MD) in order to understand structural differences in solution that may explain the different kinetic properties. hASNase1 was submitted to MD, as well as gpASNase1 (PDB code: 4R8K) and *EclI* (PDB code: 3ECA), in aqueous medium, containing Asn bound or not, to the catalytic and/or allosteric sites. The structural and thermodynamic properties were evaluated by analysis of the trajectory. The results of MD revealed that hASNase1 is a dimer of dimers and its structure has a gap in the center between the monomers as well as gpASNase1. The interaction potential between Asn and catalytic site residues showed greater freedom of substrate orientation in hASNase1 and gpASNase1 than in *EclI*. The loop1 in hASNase1 has a constitution of residues that makes it more susceptible to deformations and movements. Loop2, on the other hand, has an α -helix in hASNase1, which leaves the position of Tyr308 more fixed at the site than in gpASNase1 and it may cause a difference in catalytic efficiency. Analysis of Lys188 movement showed the effect of positive cooperativity of hASNase1 and it was found that the presence of Asn at the allosteric site stabilizes Lys188 for the maintenance of the triad. It also helps to stabilize the movement of the Loop1. In conclusion, despite the structural similarity between hASNase1 and gpASNase1, there are dissimilarities, besides allostereism, which may explain the different kinetic properties.

Keywords: Molecular Dynamics; Human L-asparaginase; *Cavia porcellus* L-asparaginase; *Escherichia coli* L-asparaginase; Acute Lymphoid Leukemia.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação esquemática do mecanismo de ação da L-asparaginase em duas etapas, com formação de um intermediário covalente após ataque nucleofílico pela enzima. Setas vermelhas representam o ataque nucleofílico. 39
- Figura 2 - Mecanismo de deslocamento direto proposto por Schalk e colaboradores, 2016..... 39
- Figura 3 - Representação esquemática da estrutura da 60-kDa-lisofosfolipase, mostrando o domínio N-terminal que possui atividade asparaginásica (resíduos 1-369) e domínio C-terminal composto de várias repetições de ankyrin (resíduos 370-573)..... 42
- Figura 4 - Alinhamento entre EclI, Ecl, gpASNase1 e hASNase1. Setas vermelhas indicam resíduos do sítio catalítico. Setas verdes indicam resíduos do sítio alostéricos em Ecl e hASNase1. Asterisco (*) identifica aminoácidos conservados nas quatro sequências; dois pontos (:) indicam substituições conservativas (mesmo grupo de aminoácidos); um ponto final (.) identifica substituições semi-conservativas (formas semelhantes)..... 46
- Figura 5 - Representação da ligação peptídica e dos ângulos diédricos de rotação Phi e Psi. 49
- Figura 6 - Análise da qualidade geométrica dos modelos pelo programa MolProbity. A) Modeller, B) Phyre2, C) Swiss-model, D) Robetta..... 68
- Figura 7 - Gráfico Ramachandran gerado pelo programa MolProbity para cada modelo analisado..... 70
- Figura 8 - Gráfico do valor da função de erro versus posição gerada pelo ERRAT para os modelos gerados por diferentes programas..... 75
- Figura 9 - Sobreposição do modelo de hASNase1 (verde) no molde gpASNase1 (cinza)..... 78
- Figura 10 - A) Representação em fita da estrutura inicial do Monômero de hASNase1, os domínios 1 e 2 estão indicados, B) Configuração final de Monômero

de hASNase1 com prolongamentos de folha β . C) Estruturas sobrepostas do Monômero de hASNase1 inicial (em azul) e final (em cinza), com indicação da Alça1.....	80
Figura 11 - A) Representação em fita da estrutura inicial do Dímero de hASNase1. B) Configuração final de Dímero de hASNase1. C) Estruturas do Dímero de hASNase1 sobrepostas inicial (em azul) e final (em cinza).....	82
Figura 12 - Curva de RMSD entre as configurações estruturais da hASNase1 em água, ao longo do tempo de simulação, comparadas com a estrutura de referência inicial, para A) Monômero, B) Dímero e C) Tetrâmero.	84
Figura 13 - Representação em fita da estrutura da hASNase1, na última configuração da DM do sistema Tetrâmero, evidenciando os resíduos do sítio catalítico do monômero B (em fita e vermelho) em bastão e a Alça1 em amarelo. Os monômeros A e C que formam a interface estão em preto e verde respectivamente.....	86
Figura 14 - Curvas de PII intramolecular para Dímero e Tetrâmero da hASNase1 durante o tempo de DM.....	87
Figura 15 - Curvas de PII intermolecular entre Dímero e Tetrâmero da hASNase1 e a água durante o tempo de DM.....	88
Figura 16 - Raio de giro calculado para a estrutura de tetrâmero de hASNase1 ao longo da simulação.....	89
Figura 17 - Curva do PII intramolecular entre os pares de monômeros A, B, C e D na estrutura de Tetrâmero da hASNase1 ao longo do tempo de simulação...	90
Figura 18 - A) Representação em fita das estruturas do Tetrâmero de hASNase1 sobrepostas inicial (em azul) e final (em cinza). B) Estruturas sobrepostas rotacionadas 90o sentido horário. C) Estruturas sobrepostas rotacionadas 90o sentido anti-horário.....	91
Figura 19 - Representação esquemática do Tetrâmero, válida para hASNase1 e gpASNase1, evidenciando as posições dos domínios e os contatos que cada um faz. Os monômeros A e C estão indicados como preto e verde e estão sobrepondo os monômeros B e D em cores vermelho e azul,	

	respectivamente. A localização dos Sítios Catalíticos (SC), dos monômeros A, B, C e D são denominadas SCA, SCB, SCC, SCD.....	95
Figura 20 -	Representação em fita da estrutura final de Tetrâmero de hASNase1. Monômero A (preto), monômero B (vermelho), monômero C (verde), monômero D (azul). A) Visualização frontal; B) Rotação 90° sentido anti-horário; C) Rotação 180° sentido anti-horário.	96
Figura 21 -	Curvas de PII entre os resíduos de cada sítios catalítico, em cada um dos monômeros (A, B, C, D), no Tetrâmero da hASNase1, ao longo do tempo de simulação.....	99
Figura 22 -	Representação dos sítios catalíticos alostéricos em esferas na estrutura final de Tetrâmero de hASNase1 representada em fita. A) Os sítios catalíticos estão representados em esferas e cor amarelo e alostéricos em esferas em azul e vermelho. B) Estruturas dos monômeros B e C rotacionadas 90° e destacadas para visualização das posições relativas de sítios alostéricos e catalíticos (em amarelo o sítio catalítico e em verde os átomos de carbono dos resíduos do sítio alostérico).	100
Figura 23 -	Representação dos resíduos (em bastão) do sítio catalítico da hASNase1 sobrepostos ao da gpASNase1 (cód. pdb: 5DND e 4R8L) (estrutura secundária em fita) co-cristalizada com Asn (em amarelo). RMSD da sobreposição: 0,03 nm.	102
Figura 24 -	Sobreposição dos resíduos do sítio alostérico da hASNase1 (verde) no sítio catalítico da Ecl (azul) (cód. pdb: 2HIM) co-cristalizada com Asn (amarelo). RMSD da sobreposição: 0,04 nm.....	103
Figura 25 -	Curva de RMSD entre as configurações estruturais da hASNase1, comparadas com a estrutura de referência inicial, em cada sistema, ao longo da simulação de DM.	104
Figura 26 -	Curvas de PII entre os sítios catalíticos nos monômeros (A, B, C, D) e a Asn residente nos sítios, no sistema ASPG-ASN-CAT, durante toda a simulação.	106

Figura 27 - Representação em bastão do sítio catalítico do monômero A, na estrutura secundária representada em fita, nos tempos A) 4ns, B) 8 ns e C) 28ns de DM.....	107
Figura 28 - Representação em bastão do sítio catalítico do monômero D, na estrutura secundária representada em fita, nos tempos A) 4ns, B) 8 ns, C) 28ns e D) 156 ns na DM.....	107
Figura 29 - PII médio e desvio entre os resíduos do sítio catalítico dos quatro monômeros A, B, C, e D e as Asn em cada monômero, durante o tempo de residência no sítio, no sistema ASPG-ASN-CAT.	108
Figura 30 - Curvas de PII entre os sítios alostéricos e Asn em cada monômero (A, B, C, D), no sistema ASPG-ASN-ALO ao longo do tempo de simulação.	109
Figura 31 - Representação dos sítios alostéricos (bastão), catalíticos (esferas) e as Asn inseridas no sítio (bastão com átomos de carbono em amarelo). A) A representação do sitio catalítico do lado direito da figura corresponde ao Monômero A e do esquerdo o D, os resíduos alostéricos acima dos sítios catalíticos são referentes ao Monômero D e os abaixo são do Monômero A. No centro as duas Asn inseridas nos sítios alostérico. B) Representação ampliada, com os nomes dos resíduos do sítio catalítico e alostérico.....	110
Figura 32 - Representação dos sítios alostéricos (bastão), catalíticos (esferas) e as Asn inseridas no sítio (bastão com átomos de carbono em amarelo). A) A representação do sitio catalítico do lado direito da figura corresponde ao Monômero B e do esquerdo o C, os resíduos alostéricos acima dos sítios catalíticos são referentes ao Monômero B e os abaixo são do Monômero D. No centro as duas Asn inseridas nos sítios alostérico. B) Representação ampliada, com os nomes dos resíduos do sítio catalítico e alostérico.....	111
Figura 33 - Curvas de PII entre os sítios alostéricos nos monômeros (A, B, C e D) e as Asn nos sítios adjacentes, no sistema ASPG-ASN-ALO ao longo do tempo de simulação.....	113

Figura 34 - Curvas de PII entre os sítios catalíticos dos monômeros (A, B, C e D) e as Asn nos sítios, no sistema ASPG-ASN-CAT-ALO ao longo do tempo de simulação.....	115
Figura 35 - PII médio e desvio entre os resíduos do sítio catalítico dos quatro monômeros A, B, C, e D e as Asn em cada monômero, durante o tempo de residência no sítio, no sistema ASPG-ASN-CAT-ALO.....	116
Figura 36 - Curvas de PII entre os sítios alostéricos dos monômeros (A, B, C e D) e Asn nos sítios locais, no sistema ASPG-ASN-CAT-ALO ao longo do tempo de simulação.....	117
Figura 37 - Curvas de PII entre os sítios alostéricos e Asn nos sítios adjacentes, no sistema ASPG-ASN-CAT-ALO ao longo do tempo de simulação.	118
Figura 38 - Curva de RMSD entre as configurações estruturais gpASNase1, comparadas com a estrutura inicial, de referência, ao longo do tempo de simulação, no sistema GPIG.	119
Figura 39 - Raio de giro calculado para a estrutura da gpASNase1 no sistema GPIG, ao longo da simulação.....	120
Figura 40 - Curvas de PII entre pares de monômeros (A, B, C e D) da gpASNase1, ao longo do tempo de simulação, no sistema GPIG.	121
Figura 41 - Representação em fita da estrutura final gpASNase1. Monômero A (preto), monômero B (vermelho), monômero C (verde), monômero D (azul). A) Visualização frontal; B) Rotação 90° sentido anti-horário.....	122
Figura 42 - Curva de RMSD entre as configurações estruturais da gpASNase1 em água, comparadas com a estrutura inicial, de referência, ao longo do tempo de simulação, sistema GPIG-ASN.....	124
Figura 43 - Curva do PII entre os resíduos do sítio catalítico, de cada monômero (A, B, C, D) e as Asn, no sistema GPIG-ASN ao longo do tempo de simulação.....	126
Figura 44 - Representação em bastão da Asn dos resíduos do sítio catalítico do monômero C de gpASNase1 nos tempos A) 0 ns, B) 120 ns da DM.....	127

Figura 45 - Representação em bastão da Asn dos resíduos do sítio catalítico do monômero D de gpASNase1 nos tempos A) 0 ns, B) 120 ns e C) 246 ns da DM, com indicação da Alça1.....	128
Figura 46 - Representação em bastão do sítio catalítico do monômero B de gpASNase1 nos tempos A) 0 ns, B) 120 ns e C) 246 ns da DM, com indicação da Alça1.....	129
Figura 47 - PII médio de cada um dos resíduos do sítio catalítico, de cada monômero (A, B, C, D) e as Asn, no sistema GPIG-ASN ao longo do tempo de simulação.....	130
Figura 48 - Curva de RMSD entre as configurações estruturais da EclI, em água, ao longo do tempo de simulação, comparadas com a estrutura de início, sistema ECOLI.....	131
Figura 49 - Raio de giro da estrutura da EclI ao longo da simulação no sistema ECOLI.....	132
Figura 50 - Curva do PII entre pares de monômeros A, B, C e D da EclI, no sistema ECOLI, ao longo do tempo de simulação.	133
Figura 51 - Representação em cartoon da estrutura final da DM, EclI. Monômero A (preto), monômero B (vermelho), monômero C (verde), monômero D (azul), sendo que a Asn estão alocadas nos sítios e representadas em bastão, com coloração dos átomos de carbono em amarelo. A) Visualização frontal, as setas indicam também os sítios representados em esferas.; B) Rotação 90° sentido anti-horário.....	134
Figura 52 - Curva de RMSD entre as configurações estruturais da EclI, ao longo do tempo de simulação, comparadas com a estrutura de inicial de referência.	136
Figura 53 - Curva do PII entre os resíduos do sítio catalítico da EclI de cada monômero (A, B, C, D) e Asn, ao longo do tempo de simulação.	138
Figura 54 - Representação em bastão da Asn dos resíduos do sítio catalítico do monômero A de EclI nos tempos A) 0 ns, B) 252 ns da DM.	139

Figura 55 - Representação em bastão da Asn dos resíduos do sítio catalítico do monômero B de EclI nos tempos A) 0 ns, B) 159 ns e C) 252 ns da DM.	140
Figura 56 - Representação em bastão da Asn dos resíduos do sítio catalítico do monômero C de EclI nos tempos A) 0 ns, B) 252 ns da DM.	141
Figura 57 - Representação em bastão da Asn dos resíduos do sítio catalítico do monômero D de EclI nos tempos A) 0 ns, B) 136 ns e C) 159 ns da DM.	142
Figura 58 - PII médio de cada um dos resíduos do sítio catalítico, de cada monômero (A, B, C, D) e as Asn, no sistema ECOLI-ASN ao longo do tempo de simulação.	143
Figura 59 - Representação em esferas das estruturas de tetrâmero de A) hASNase1, B) gpASNase1 e C) EclI. Os monômeros são representados por diferentes cores: A, em cinza; B, em vermelho; C, em verde e D, em azul.	146
Figura 60 – Representação da estrutura em fita da hASNase1 no sistema Tetrâmero, com destaque para a Alça1 em amarelo, sendo que os resíduos estão destacados em bastão. Na cor verde os resíduos hidrofóbicos e os elementos como Carbono colorido em azul claro representando resíduos carregados e polares. Os resíduos do sítio catalítico estão em cor de carbono branco.	147
Figura 61 - Orientação da Asn no sítio catalítico. A) Orientação da Asn na hASNase (PII foi $-27,07 \pm 4,69$ kcal mol ⁻¹) diferente da orientação em B) na EclI (PII foi $-43,14 \pm 7,00$ kcal mol ⁻¹). C) Orientação correta da Asn no sítio descrita na literatura. Figura retirada do artigo (SCHALK et al., 2016). ...	148
Figura 62 - Representação da Asn no sítio catalítico da hASNase1, no sistema ASPG-ASN-ALO, com estrutura em fita, evidenciando a Alça1 em amarelo, Alça2 do monômero C em laranja e a Tyr308, configurações coletadas na DM nos tempos: A) 0 ns, B) 62 ns e C) 205 ns.	149
Figura 63 - Representação em cartoon dos monômeros de EclI, gpASNase1 e hASNase1 sobrepostos evidenciando o posicionamento das Alças 1 e 2,	

- em cores rosa para Ecll, amarela para gpASNase1 e em verde para hASNase1, bem como a posição da Tyr25 na Ecll e da Tyr308 na gpASNase1 e hASNase1. 150
- Figura 64 - Recorte do alinhamento entre Ecll, hASNase1, gpASNase1. A) Em evidência, circundado em vermelho, a região que corresponde a Alça1 e a seta azul indica a posição da Tyr25. B) Em evidência alinhamento dos resíduos da Alça2, circundado em vermelho, em hASNase1 e gpASNase1. A seta azul indica posição da Tyr308 e as preta indicam a posição de inserção de dois resíduos na Alça1 da gpASNase1 em relação a hASNase1. 151
- Figura 65 - Representação da estrutura em fita da A) e B) hASNase1 (ASPG-ASN), C) e D) da gpASNase1 (GPIG-ASN) e E) e F) da ECII (ECOLI-ASN), com destaque para a Alça1 em amarelo, sendo que os resíduos estão destacados em bastão. Na cor verde os resíduos hidrofóbicos e os que estão com átomos coloridos, possui Carbono em azul claro representando resíduos carregados e polares. Os resíduos do sítio catalítico estão em cor branco de carbono. Na Figura E e F está destacado a Tyr25 na Alça1. 153
- Figura 66 - Sobreposição de oito configurações escolhidas ao longo da DM, do Monômero D (Mo-D). Sobreposição dos carbonos ($C\alpha$) do Domínio1, com exceção dos $C\alpha$ da Alça1 (Lo-D). As estruturas de Mo-D estão representadas em fita e em cinza, enquanto Lo-D estão indicadas cada uma com uma cor diferente. A distância entre as configurações extremas é de 3,2 nm indicada entre Lo-D azul e ciano. A direita a curva de RMSD de Lo-D ~ 1,2 nm, sendo que o RMSD do Mo-D ~ 0,4 nm. 156
- Figura 67 - RMSD da Alça1 nos diferentes sistemas simulados para os quatro monômeros (A, B, C e D). A Alça1 de cada monômero é denominada Lo-A, Lo-B, Lo-C, Lo-D e os respectivos monômeros de cada Alça1, sem constar a região da Alça1, é denominado como Mo-A, Mo-B, Mo-C, Mo-D. As médias e desvios estão indicados nos gráficos aos pares de Lo e

Mo. Os cálculos consideram situações antes e depois do tempo de residência (TR) e teq para os sistemas que não possuem Asn nos sítios catalíticos e alostéricos.....	156
Figura 68 - gpASNase1 com exemplo da interação da Tyr308 do monômero A com sítio catalítico do monômero D, em A) figura com visão completa evidenciando a fenda para passagem de água, substrato e produto e B) visão ampliada de A com detalhes dos nomes dos resíduos e a distância Tyr - Asn no sítio.....	159
Figura 69 - Representação da estrutura em fita da gpASNase1 e dos resíduos do sítio catalítico do monômero D e da Tyr308 do monômero A (Tyr308-A), representados em bastão. São apresentadas três configurações em tempos A) 0 ns, B) 12 ns e C) 246 ns.....	160
Figura 70 - Representação da estrutura em fita da hASNase1 e dos resíduos do sítio catalítico do monômero D e da Tyr308 do monômero A (TYR308-A), representados em bastão. São apresentadas três configurações em tempos A) 0 ns, B) 62 ns e C) 205 ns.....	161
Figura 71 - Distâncias mínimas entre átomos da Thr19 (T19) e Tyr308 (Y308), considerando o primeiro resíduo a esquerda da legenda, T19, de um monômero X (X= A, B, C e D) e a T308Y (Y = D, C, B e A) de outro monômero. Figuras A) e B) para monômeros da hASNase1, sistema ASPG-ASN-CAT; Figuras C) e D) para monômeros da gpASNase1, sistema GPIG-ASN. Figuras E) e F) PII entre resíduos do sítio catalítico e ASN em cada sítio.....	163
Figura 72 - Representação em forma de bastão da sobreposição dos resíduos do sítio alostérico da hASNase1 (verde) na gpASNase1 (amarelo).....	166
Figura 73 - Representação em fita da estrutura dos monômeros A e D (preto e azul) da hASNase1, a região que mostra os resíduos em bastão representa a interface entre os monômeros e os dois sítios alostéricos com as duas Asn (carbono em amarelo) no centro. Os resíduos representado em esfera são os resíduos do sítio catalítico.....	167

Figura 74 - Distâncias mínimas médias entre Lys188 aos resíduos Asp117 e Thr116, obtida pelo programa gmx mindist, durante o tempo de DM para cada sistema e cada monômero do tetrâmero (MoA, MoB, MoC e MoD)..... 168

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Valores de cinética enzimática para as L-asparaginases analisadas.	44
Quadro 2 - Similaridade entre as sequências de aminoácidos das L-asparaginases de <i>C. porcellus</i> e <i>E. coli</i> com a hASNase1.	47
Quadro 3 - Resíduos que formam os sítios catalíticos e alostéricos em L-asparaginases de diferentes espécies. hASNase1: L-asparaginase humana; Ecl: L-asparaginase de <i>Escherichia coli</i> tipo I; EclI: L-asparaginase de <i>Escherichia coli</i> tipo II; gpASNase1: L-asparaginase de <i>Cavia porcellus</i>	47
Quadro 4 - Sequência de aminoácidos da proteína lisofosfolipase dividida em domínio N-terminal (resíduos 1-369: L-asparaginase hASNase1) e domínio C-terminal (resíduos 370-573: repetição ankyrin).	57
Quadro 5 - Características dos sistemas submetidos à simulação de DM.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Esquema de cores e notas gerado pelo PROSESS para o modelo obtido pelo programa Modeller.....	71
Tabela 2 - Valores de Z-scores obtidos para os modelos de hASNase1 modelados em diferentes programas de modelagem.	72
Tabela 3 - Compatibilidade do modelo 3D com a sua própria sequência de aminoácidos mostrado em porcentagem de resíduos que marcaram $\geq 0,2$ no perfil 3D/1D. Valores obtidos pelo programa Verify-3D para os modelos de hASNase1 modelados em diferentes programas de modelagem.	73
Tabela 4 - Fatores de qualidade geral gerados pelo programa ERRAT para os modelos de hASNase1 obtidos em diferentes programas de modelagem.	76
Tabela 5 - Porcentagem de átomos enterrados analisados pelo programa Prove para os modelos de hASNase1 obtidos em diferentes programas de modelagem.	77
Tabela 6 - Médias e desvios de RMSD calculados para as estruturas de hASNase1, após atingir teq.	85
Tabela 7 - Médias e desvios dos PII da hASNase1, Intramolecular e Intermolecular após atingir teq.....	88
Tabela 8 - PII intermolecular inicial e médias, entre pares de monômeros A, B, C e D da hASNase1 após atingir teq = 200 ns.	94
Tabela 9 - Médias e desvios observados para o PII dos resíduos Thr19, Thr116, Asp117, Lys188, em cada monômero (A, B, C, D) no Tetrâmero da hASNase1.	99
Tabela 10 - Médias e desvios de RMSD calculados para as estruturas de hASNase1 com Asn nos sítios, após atingir o teq.	104

Tabela 11 - PII Médio entre os sítios catalíticos dos monômeros (A, B, C e D) e as Asn nos sítios residentes nesses monômeros, no sistema ASPG-ASN-CAT, durante o tempo de residência no sítio.....	106
Tabela 12 - Médias do PII entre os sítios alostéricos, de cada monômero (A, B, C, D), e os Asn locais e nos monômeros adjacentes, no sistema ASPG-ASN-ALO, após teq.	114
Tabela 13 - PII Médio entre os sítios catalíticos dos monômeros (A, B, C e D) e as Asn nos sítios residentes nesses monômeros, no sistema ASPG-ASN-CAT-ALO, durante o tempo de residência das Asn no sítio.....	116
Tabela 14 - Médias do PII entre os sítios alostéricos, de cada monômero (A, B, C, D), e os Asn locais e nos monômeros adjacentes, no sistema ASPG-ASN-CAT-ALO, após teq.....	118
Tabela 15 - Médias e desvios dos PII entre pares de monômeros da gpASNase1 após teq = 125 ns.	121
Tabela 16 - PII Médio entre os sítios catalíticos dos monômeros (A, B, C e D) e as Asn nos sítios residentes nesses monômeros, no sistema GPIG-ASN, durante o tempo de residência no sítio	126
Tabela 17 - Médias e desvios dos PII entre os monômeros da EclI ao longo do tempo de simulação, após teq = 75 ns.....	133
Tabela 18 - Médias e desvios para o PII entre os resíduos do sítio catalítico, de cada monômero (A, B, C, D), e o substrato Asn.	138
Tabela 19 - Médias e desvios observados entre as distâncias da T19 de um monômero com a Y308 do monômero vizinho nos sistemas ASPG-ASN-CAT e GPIG-ASN.	164

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Tridimensional
ANVISA	Agência Nacional da Vigilância Sanitária
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C _α	Carbono alpha
Co.	Companhia
cód.	Código
DM	Dinâmica Molecular
E.C.	Enzyme Commission – Comissão de Enzimas
<i>Ecl</i>	L-asparaginase de <i>Escherichia coli</i> tipo I
<i>EclII</i>	L-asparaginase de <i>Escherichia coli</i> tipo II
<i>elet</i>	Eletrostáticas
ENaC	Canal epitelial de sódio
<i>eq</i>	Equilíbrio
Erw	L-asparaginase de <i>Erwinia chrysanthemi</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
gpSNase1	L-asparaginase de <i>Cavia porcellus</i> 1
GROMACS	Groningen MACHine for Chemical Simulation
hAGA	Aspartilglicosaminidase humana
hASNase1	L-asparaginase humana 1
hASNase3	L-asparaginase humana 3
kcal	Quilocaria
<i>k_{cat}</i>	Constante de <i>turnover</i>
kDa	Quilodalton
<i>K_m</i>	Constante de Michaelis-Menten
LLA	Leucemia Linfoide Aguda
Ltd.	Limitado ou sociedade anônima de responsabilidade limitada
M	Molar
μM	Micromolar

<i>n</i>	Coeficiente de Hill
nm	nanômetro
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
NPT	<i>Ensemble</i> isotérmico-isobárico - Número de partículas, Pressão e Temperatura
ns	nanossegundo
NVT	<i>Ensemble</i> canônico - Número de partículas, Volume e Temperatura
PAF	Fator ativador de plaquetas
PAF-AH	Acetil-hidrolase do fator ativador de plaquetas
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial Hidrogeniônico
Phyre	Protein Homology/analogY Recognition Engine
PII	Potencial de Interação Interatômico
ProSA	Protein Structure Analysis
PROSESS	Protein Structure Evaluation Suite & Server
ps	Picossegundos
rcut	Raio de corte
RG	Raio de giro (giração)
RMSD	Root Mean Square Deviation – Desvio Quadrático Médio
s	Segundo
SGK1	Quinase regulada por soro e glicocorticóide
teq	Tempo de equilíbrio
vdW	<i>van der Waals</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alpha
Å	Angstrom
β	Beta
δ	Delta
ϵ	Épsilon
γ	Gama
\pm	Mais-menos
μ	Mi
Φ	Phi
%	Porcentagem
Ψ	Psi
σ	Sigma
θ	Teta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	32
1.1	Problemática: Leucemia Linfoide Aguda e tratamentos	32
1.2	Enzimas	34
1.3	Enzimas L-asparaginases	36
1.4	L-asparaginase como biofármaco	39
1.5	L-asparaginase humana	41
1.6	Modelagem Molecular	47
1.7	Dinâmica Molecular	49
1.8	Justificativa	53
2	OBJETIVOS	55
2.1	Objetivo geral	55
2.2	Objetivos específicos	55
3	MATERIAIS E MÉTODOS	56
3.1	Modelagem da hASNase1	56
3.2	Procedimento experimental para Minimização de Energia e Dinâmica Molecular	59
3.2.1	<i>Minimização de energia e preparação para DM</i>	59
3.2.2	<i>Dinâmica Molecular - fase de aquisição de trajetória</i>	60
3.3	Definição dos sistemas submetidos a simulação de Dinâmica Molecular	61
3.3.1	<i>Sistemas como monômero e dímero e tetrâmero da hASNase1 em água</i>	61
3.3.2	<i>Sistema com tetrâmero de hASNase1 e asparagina nos sítios catalíticos e alostéricos</i>	62
3.3.3	<i>Sistemas gpASNase1 em água com e sem asparagina</i>	62
3.3.4	<i>Sistemas EclI em água com e sem asparagina</i>	63
3.4	Análises das trajetórias obtidas na Dinâmica Molecular	64
3.4.1	<i>Root Mean Square Deviation</i>	64

3.4.2	<i>Potencial de Interação Interatômico</i>	65
3.4.3	<i>Ligações de Hidrogênio</i>	66
3.4.4	<i>Raio de Giro</i>	66
4	RESULTADOS	67
4.1	Modelagem comparativa da hASNase1	67
4.2	Validação do modelo de hASNase1	67
4.2.1	<i>Análise geométrica utilizando o programa MolProbity</i>	67
4.2.2	<i>Análise geométrica pelo programa PROSESS</i>	70
4.2.3	<i>Análise gerada pelo programa ProSA-web</i>	72
4.2.4	<i>Análise gerada pelo programa SAVES</i>	73
4.3	DM das estruturas monomérica, dimérica e tetramérica da hASNase1 em solução aquosa	79
4.4	DM dos sistemas de hASNase1 com Asn nos sítios catalíticos e alostéricos	101
4.4.1	<i>PII entre os sítios catalíticos e a Asn inserida no sítio, no sistema ASPG-ASN-CAT</i>	105
4.4.2	<i>PII entre os sítios alostéricos e a Asn inserida no sítio, no sistema ASPG-ASN-ALO</i>	109
4.4.3	<i>PII entre sítios catalíticos e alostéricos e as Asn presentes no mesmo sítio do monômero ou no adjacente, no sistema ASPG-ASN-CAT-ALO</i>	114
4.5	DM da gpASNase1 em água	119
4.6	DM da gpASNase1 em água e com Asn nos sítios	123
4.7	DM da EcII em água	130
4.8	DM da EcII em água e com Asn nos sítios	135
5	DISCUSSÃO	143
5.1	Estrutura	143
5.2	A organização dos monômeros como dímeros	144
5.3	Estrutura e função dos resíduos no sítio	146
5.4	Estrutura e função da Alça1	149

5.5	Movimentação da Alça1	154
5.6	Função das Tyr25 em EclI e Tyr308 em hASNase1 e gpASNase1	158
5.7	Alosterismo na hASNase1	164
6	CONCLUSÕES E OBSERVAÇÕES	168
7	PERSPECTIVAS	170
	REFERÊNCIAS	171

1 INTRODUÇÃO

1.1 Problemática: Leucemia Linfóide Aguda e tratamentos

Câncer é um conjunto de centenas de doenças, que apresentam como característica comum a rápida e anormal multiplicação de células (INCA, 2018). Essas células podem entrar num processo denominado metástase, no qual, além da rápida multiplicação, há a invasão de tecidos adjacentes bem como de outros órgãos, o que torna a metástase a principal causa de morte por câncer (CHAMBERS; GROOM; MACDONALD, 2002).

A leucemia é um tipo de câncer, originado na medula óssea. Nesse tipo de câncer, as células sanguíneas que não atingem a maturidade não morrem e, também, não funcionam de forma apropriada, assim sendo, elas são chamadas de células cancerígenas e substituem células sanguíneas saudáveis da medula óssea (HOWLADER et al., 2017; INCA; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Um indivíduo com leucemia, apresenta maior vulnerabilidade, não só à doenças infectocontagiosas, mas também anemia e hemorragia. Essas estão entre as principais consequências da leucemia. Além disso, através da circulação, células leucêmicas podem facilmente adentrar em outros tecidos, portanto, sem uma intervenção terapêutica eficaz, a leucemia é fatal (AVRAMIS, 2012; ROSE-INMAN; KUEHL, 2014). Foram estimados, aproximadamente, 352 mil casos novos de leucemia no mundo em 2012, ocupando a 11ª posição entre todos os cânceres. Já para a mortalidade, foram estimados 265 mil óbitos no mundo nesse mesmo ano (FERLAY et al., 2015). No Brasil, estimam-se que teremos 4.860 novas ocorrências de leucemia em mulheres e 5.940 em homens em 2019 (INCA; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

A Leucemia pode ser dividida em grupos dependendo do tempo de progressão da doença e do tipo celular de origem. Com relação ao tempo de desenvolvimento, pode-se dividir em aguda ou crônica. Na forma aguda da doença a medula é incapaz de produzir células sanguíneas saudáveis, uma vez que há uma rápida multiplicação de células imaturas no sangue. Já na forma crônica, há um aumento na formação de células maduras anormais, o que faz com que a doença leve meses ou anos

para progredir. Com relação ao tipo celular de origem, a leucemia pode ser subdividida em mieloide, quando o câncer acomete células da medula óssea, ou linfoide (ou linfoblástica), quando a mutação cancerígena ocorre nos linfócitos ou nos linfoblastos, que são células precursoras dos linfócitos. Os quatro principais tipos de leucemia são: Leucemia linfoide aguda, Leucemia mieloide aguda, Leucemia linfocítica crônica, Leucemia mieloide crônica (INCA; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Ainda não se sabe muito sobre as causas para o desenvolvimento desse tipo de câncer, porém, existem evidências para alguns fatores de risco, como exposição à medicamentos utilizados em quimioterapia e à radiação ionizante e exposição ao benzeno, além de fatores genéticos (INCA; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

A Leucemia Linfoide Aguda (LLA) é um tipo agressivo de leucemia que pode se espalhar para os gânglios linfáticos, baço, fígado, sistema nervoso e outros órgãos, devido à existência de muitos linfócitos na medula óssea e no sangue (INCA; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). A LLA é, em geral, mais comum em crianças e é o tipo de câncer mais frequente nesse grupo, sendo responsável por, aproximadamente 80% de todas as leucemias agudas da infância. Apesar da LLA acometer crianças com maior frequência, a maioria dos óbitos ocorre em adultos. Isso se deve às particularidades da própria doença nessas faixas etárias e ao tipo de tratamento, visto que o organismo das crianças, muitas vezes, pode responder melhor do que o de adultos, a um tratamento mais agressivo (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

Os principais tipos de tratamento para LLA são: quimioterapia, terapia direcionada e transplante de células tronco. A quimioterapia é feita, principalmente, com a administração de cinco fármacos bastante antigos (Prednisona, Vincristina, Daunoblastina, Metotrexato e L-Asparaginase) nas quatro primeiras semanas da terapia de indução (PERINI, 2016). Os quatro primeiros fármacos citados são quimioterápicos que não atacam somente células cancerosas, mas também células normais do organismo, o que pode ocasionar efeitos colaterais. Tais efeitos variam em função da dose administrada, do tipo de medicamento e da duração do tratamento. Em conjunto com os quimioterápicos citados, o biofármaco, enzima, L-Asparaginase é essencial para a remissão e cura dos pacientes, com eficiência descrita desde a década de 60 (BROOME, 1963; OLD et al., 1963).

1.2 Enzimas

As enzimas são, na sua maioria, proteínas altamente especializadas em realizar a catálise das reações químicas dos sistemas biológicos. Elas têm um papel fundamental nos seres vivos, já que, sem a realização da catálise biológica, as reações bioquímicas não aconteceriam em um tempo adequado para a ocorrência da vida. Ao contrário dos catalisadores químicos, as enzimas possuem um enorme poder catalítico, alta especificidade aos seus respectivos substratos e atuam em soluções aquosas sob condições brandas de temperatura e pH (ARYA; KUMAR; JHA, 2018).

A nomenclatura das enzimas obedece a uma classificação que as divide em sete classes, cada uma com subclasses, e lhes fornecem um número de classificação da Comissão de Enzimas (número E.C.) e um nome sistemático, que identifica o tipo de reação que catalisam (IUBMB; IUPAC, 2018)

Nas enzimas há um ambiente molecular favorável para que a reação ocorra mais rapidamente. Esse ambiente é localizado em uma região da estrutura da proteína denominada sítio ativo. Nesse sítio da enzima, a molécula, que é um substrato, é transformada quimicamente em um produto. Enzimas também podem conter sítios alostéricos de regulação. O termo “alostérico” deriva do grego *allos*, “outro”, e *stereos*, “sólido” ou “forma”, indicando que a interação em sítios alostéricos também causa mudança conformacional na enzima, que interconverte formas mais ativas e menos ativas da proteína. Os moduladores das enzimas alostéricas podem ser inibidores ou ativadores. A interação com um ligante (modulador) no sítio ativo ou no alostérico afeta as propriedades de ligação de outro sítio na mesma enzima. (NELSON; COX, 2016; WILSON; WALKER, 2010).

Partindo da hipótese de que o estado estacionário, momento em que a concentração dos intermediários da reação enzimática permanece constante, é a etapa limitante da velocidade da reação, Michaelis e Menten deduziram uma equação que relaciona velocidade inicial (V_0) e máxima ($V_{máx}$) da reação com o consumo de substrato (S) (Equação 1).

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

onde K_m é a constante de Michaelis-Menten, que é correspondente à concentração de substrato para o qual a velocidade inicial é igual à metade da velocidade máxima da enzima (ROBINSON, 2015).

K_m é um parâmetro utilizado para se comparar a eficiência cinética das enzimas. Uma enzima com um pequeno K_m atuaria sobre um substrato encontrado em baixas concentrações, ou seja, possivelmente apresentaria afinidade maior a esse substrato em comparação a outra enzima com um K_m maior (NELSON; COX, 2016; ROBINSON, 2015).

Para enzimas que não seguem a cinética de Michaelis-Menten, como enzimas alostéricas, o termo K_m não é utilizado, sendo recomendado os termos análogos $[S]_{0.5}$ ou $K_{0.5}$. O $[S]_{0.5}$ pode ser calculado através da Equação 2:

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]^n}{[S]_{0.5}^n + [S]^n} \quad (2)$$

Aonde V é a velocidade inicial da reação enzimática, $V_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima, $[S]$ é a concentração de substrato, $[S]_{0.5}$ é a concentração de substrato que produz metade da velocidade, e n é o coeficiente de Hill, que indica o grau de cooperatividade da enzima não-michaeliana (HILL, 1910). Cooperatividade é um termo utilizado para enzimas alostéricas e significa que a ligação do substrato a um sítio ativo, pode favorecer ou desfavorecer a ligação do substrato em outro sítio ativo, visto que enzimas alostéricas frequentemente possuem mais de um sítio ativo (PINTO; MENEZES, 2009). A cooperatividade pode ser positiva se $n > 1$ ou negativa se $n < 1$ (NELSON; COX, 2016). Quando $n = 1$, a Equação 2 é simplificada e se torna igual à equação de Michaelis-Menten (ausência de cooperatividade) (Equação 1).

Outra constante importante em enzimologia é k_{cat} . Essa é uma constante de velocidade, também chamada de número de renovação (“turnover”), e é equivalente ao

número de moléculas de substrato convertidas em produto por unidade de tempo, por uma única molécula de enzima e quando a quantidade de enzima estiver saturada com o substrato. Essa constante pode ser calculada de acordo com a Equação 3.

$$k_{cat} = \frac{V_{m\acute{a}x}}{[E_t]} \quad (3)$$

Relacionando k_{cat} com K_m conseguimos obter um parâmetro de especificidade. Trata-se de uma constante alternativa, chamada de constante de especificidade, definida como k_{cat}/K_m , que corresponde a uma medida de quão eficientemente uma enzima converte substrato em produto em baixas concentrações de substrato (unidade $M^{-1}s^{-1}$) (BISSWANGER, 2017).

1.3 Enzimas L-asparaginases

As enzimas com ação específica para o aminoácido asparagina têm a denominação de asparaginases (E.C. 3.5.1.1). Também existe aquelas que catalisam a hidrólise, com mesma eficiência, tanto de asparagina (Asn) quanto de glutamina (Gln), sendo denominadas de asparaginase-glutaminases (E.C. 3.5.1.38). A hidrólise da Asn resulta em ácido aspártico e amônia, enquanto que a hidrólise da Gln resulta em ácido glutâmico e amônia. As L-asparaginases pertencem a classe das Hidrolases (E.C. 3), que são enzimas que utilizam água para promover a clivagem de um material orgânico (IUBMB; IUPAC, 2018).

As L-asparaginases são utilizadas, na quimioterapia, para o tratamento da LLA. A sua caracterização estrutural e funcional é de primordial relevância, visto que estas enzimas possuem um grande potencial como biofármacos proteicos antileucêmicos (OLD et al., 1963). A asparagina é um aminoácido não-essencial indispensável para a síntese proteica, não só de células saudáveis, mas também de células cancerígenas, portanto, a depleção de asparagina afeta a proliferação celular. O uso da L-asparaginase no tratamento do câncer decorre da baixa eficiência das células leucêmicas em expressar a asparagina sintase, enzima que converte aspartato em asparagina, quando comparada

com as células normais, ou seja, células saudáveis produzem sua própria asparagina, enquanto células leucêmicas necessitam de fontes externas do aminoácido. (HALEY; FISCHER; WELCH, 1961; SWAIN et al., 1993). Quando administrada a L-asparaginase, por injeção intramuscular ou intravenosa, há uma rápida diminuição do aminoácido no plasma, de 50 μM para 3 μM ou menos, o que leva à redução do metabolismo das células leucêmicas, provocando a morte seletiva dessas células por apoptose e impedindo sua posterior proliferação (AVRAMIS, 2012).

Em produtos farmacêuticos, além da LLA, a L-asparaginase é usada para tratar outros tipos de câncer, tais como linfoma não-Hodgkin (KOBINSKY et al., 2001) e leucemia mieloide aguda (EMADI et al., 2018) e mostrou potencial terapêutico em doenças como de câncer de próstata (SIRCAR et al., 2012), câncer cerebral (PANOSYAN et al., 2014), adenocarcinoma pulmonar (ZHANG et al., 2016), sarcomas (BANSAL et al., 2019) e há estudos da aplicação da enzima no tratamento da Leishmaniose (SINGH et al., 2015). Na fabricação de alimentos é usada para reduzir a formação de acrilamida, que é um agente carcinógeno formado quando o alimento é frito, sendo submetido à altas temperaturas. (PEDRESCHI; KAACK; GRANBY, 2008; PEDRESCHI; MARIOTTI; GRANBY, 2014).

As L-asparaginases, geralmente, apresentam por volta de 145 kDa de massa e, com relação à estrutura, a forma mais comumente observada é de tetrâmero, podendo ser homotetrâmero, constituídas por quatro monômeros idênticos, ou dímero de dímeros (MICHALSKA; JASKOLSKI, 2006; POLA et al., 2018; SAEED et al., 2018; SWAIN et al., 1993; WIKMAN et al., 2005).

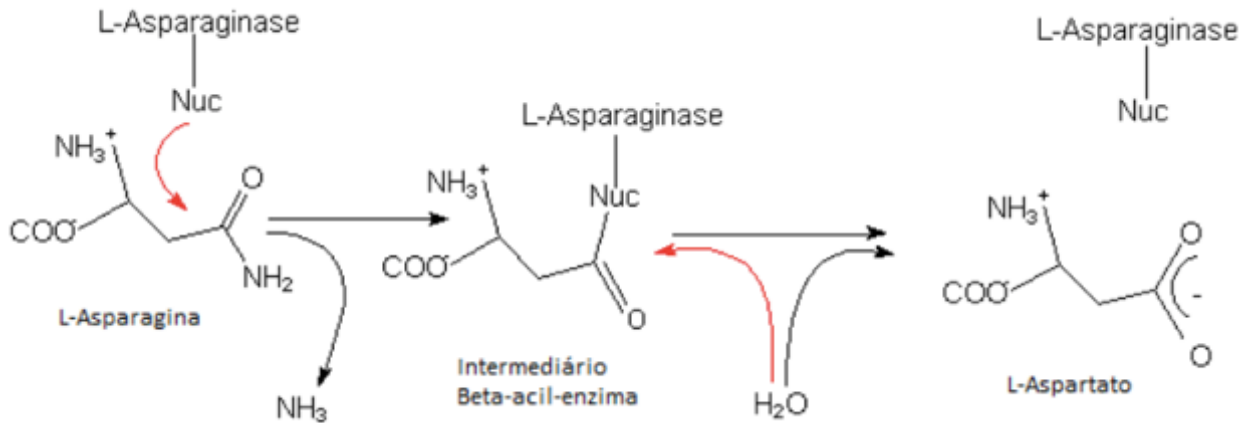
As L-asparaginases podem ser classificadas em duas famílias distintas: *bacterial-type* ou *plant-type*, que apresentam diferentes características estruturais e bioquímicas (MICHALSKA; JASKOLSKI, 2006). As L-asparaginases *bacterial-type* dividem-se ainda em tipo I e tipo II, dependendo de sua localização celular. As do tipo I são encontradas no citosol e exibem baixa afinidade (K_m de ordem milimolar) para Asn, enquanto que as enzimas do tipo II estão localizadas no periplasma e apresentam afinidade consideravelmente maior para Asn (K_m de ordem micromolar) (KARAMITROS; KONRAD, 2014; SRIKHANTA et al., 2013). Duas das isoformas tipo II (L-ASNases de *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* codificadas pelos genes ansB) têm sido

estudadas por anos e são usadas como medicamento em tratamento terapêutico da LLA (DUVAL et al., 2002).

O mecanismo de catálise da L-asparaginase não é totalmente elucidado, porém, sabe-se que ocorre em duas etapas com a formação de um composto intermediário, como mostrado na Figura 1. Na primeira etapa ocorreria um ataque nucleofílico da enzima ao substrato L-asparagina, ocorrendo a liberação de amônia e a formação do intermediário chamado de beta-acil-enzima. Na segunda etapa, o beta-acil-enzima reagiria com a água regenerando, assim, a enzima e liberando o produto L-aspartato (MICHALSKA; JASKOLSKI, 2006). Em 2016, Schalk e colaboradores provaram que a enzima segue um mecanismo de deslocamento direto, como o modelo descrito na Figura 2. Nesse mecanismo, em uma reação $A + B$ produzindo $M + N$, a reação pode seguir uma ordem, por exemplo, A deve se ligar antes de B e M deve ser liberado antes de N, ou a sequência pode ser aleatória, por exemplo, A ou B pode se ligar primeiro e M ou N pode ser liberado primeiro. Até então, acreditava-se que o mecanismo envolvido era de deslocamento duplo, também chamado de ping-pong. Nessa proposta, o substrato Asn formaria uma ligação covalente com a enzima, liberando a amônia, o que representaria o primeiro deslocamento. Num segundo passo, de deslocamento, uma molécula de água atacaria a enzima, liberando, assim, o produto final de Asp e regenerando a enzima livre.

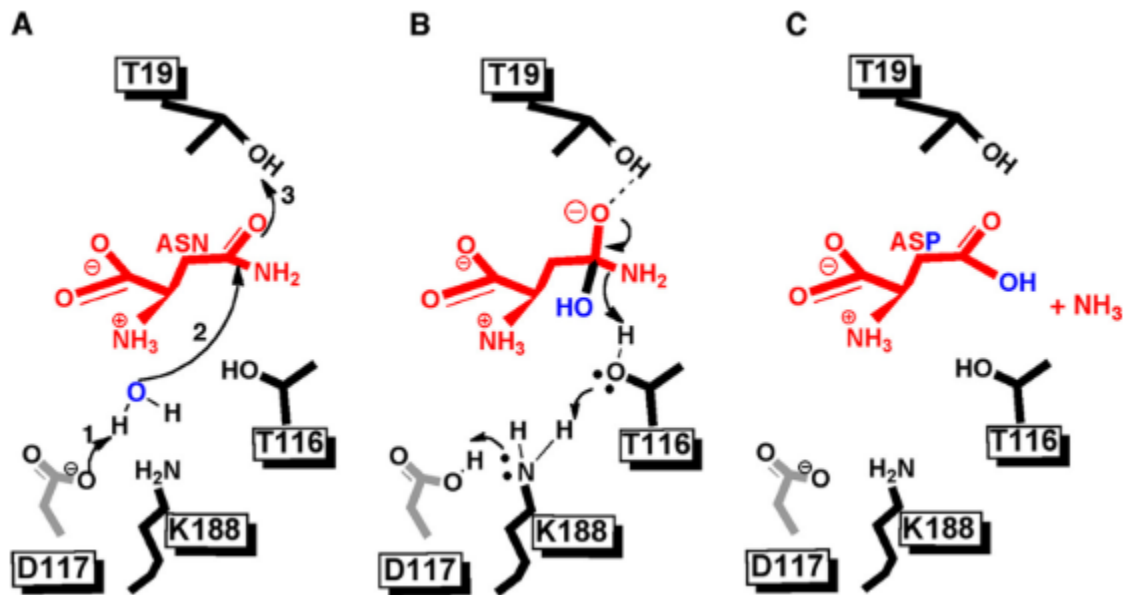
No mecanismo de deslocamento direto (Figura 2), a água W2 é ativada pelo resíduo Asp117 e é, então, levada até a cadeia lateral Asn do substrato pela Lys188 (Figura 2, A). O resíduo Thr19 atua na estabilização do complexo nesse estado de transição (Figura 2, B). A protonação do grupamento amino que se desliga da Thr116 é responsável pelo desmanche do estado de transição. Prótons do Asp117 movimentam-se através da Lys188 para que ocorra a reprotonação da Thr116 e, assim, os produtos Asp e amônia saem do site ativo (Figura 2, C) (SCHALK et al., 2016). Esse mecanismo foi proposto para a L-asparaginase de *Cavia porcellus*, porém, devido a alta conservação dos sítios catalíticos nestas enzimas, acredita-se que o mesmo mecanismo ocorra para L-asparaginases de diferentes espécies (SCHALK et al., 2016).

Figura 1 - Representação esquemática do mecanismo de ação da L-asparaginase em duas etapas, com formação de um intermediário covalente após ataque nucleofílico pela enzima. Setas vermelhas representam o ataque nucleofílico.



Fonte: Adaptado de WARANGKAR et al., 2009.

Figura 2 - Mecanismo de deslocamento direto proposto por Schalk e colaboradores, 2016.



Fonte: SCHALK et al., 2016.

1.4 L-asparaginase como biofármaco

A L-asparaginase de *E. coli* tipo II (*Ecll*) foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de LLA em 1978, sob a marca Elspar de propriedade da Merck & Co. Em 2009, a Lundbeck herdou Elspar pela compra da Ovation Pharmaceuticals 2009, que havia adquirido a Elspar da Merck & Co. há vários anos. Em dezembro de 2012 a Lundbeck suspendeu a venda de Elspar e anunciou a venda de vários produtos, incluindo Elspar para a empresa italiana Recordati. No entanto, a empresa, no início de 2013, tomou a decisão de não prosseguir com a fabricação do medicamento, pois o mesmo apresentou efeitos adversos e outras complicações (GESTEC et al., 2017). Vários biofármacos similares foram desenvolvidos e são comercializados no mundo, por exemplo, Aginasa, Asginase, Aspanase, Asparaginasa, Asparget, Bionase, Celginase, Leucoginase, Leuginase, Leunase, Oncoginase, Paronal e Spectrila. Todos são L-asparaginase isolada de *E. coli*, produzidas e exportadas por diferentes empresas farmacêuticas para diversos países.

Embora a L-asparaginase de *E. coli* seja amplamente utilizada no tratamento da LLA, é necessário um controle em sua administração para a manutenção do bem-estar do paciente, visto que há vários efeitos colaterais associados ao seu uso. A *Ecll* apresenta dificuldade de se difundir no plasma após a aplicação, com isso, a enzima é prontamente reconhecida pelas células de defesa e, uma vez reconhecida, inicia-se o processo de inativação e neutralização da mesma. Essa inativação ocasiona uma reação de hipersensibilidade em, aproximadamente, 60% dos pacientes (AVRAMIS, 2012; PIETERS et al., 2011; RYTTING, 2012). Alguns dos efeitos relatados são: dificuldade para respirar, erupção cutânea, febre, dores, vermelhidão e inchaço na região da injeção. Esses sintomas são relacionados às reações alérgicas. Há também casos de pancreatite (dores estomacais), sintomas de problemas no fígado, como escurecimento da urina, náuseas e perda de apetite (ERVA et al., 2016). Além dos efeitos colaterais associados à resposta imunológica, há uma alta toxicidade associada ao uso da enzima. Essa alta toxicidade está associada à atividade inespecífica pela glutamina, que é convertida em glutamato e amônia pela enzima, levando, assim, a diminuição da concentração de glutamina no plasma (AVRAMIS, 2012; MULLER; BOOS, 1998).

Em 2006, foi desenvolvida e aprovada uma versão peguilada da L-asparaginase de *E.coli*, chamada de Oncospar (AVRAMIS, 2002; DINNDORF et al.,

2007; SOARES et al., 2002). Essa nova versão foi desenvolvida com a tecnologia de peguilação, que visa permitir ou melhorar o desempenho de produtos farmacêuticos com limitações de entrega, possibilitado pelo anexo químico de Polietilenoglicol (PEG) (PASUT; SERGI; VERONESE, 2008). O PEG possibilita uma vida média, significativamente, maior ao biofármaco no sangue, permitindo a administração a cada duas semanas, causando menos reações alérgicas em comparação à L-asparaginase não modificada (MISHRA; NAYAK; DEY, 2016).

Em 2011, a L-asparaginase de *Erwinia chrysanthemi* (Erw) foi aprovada pelo FDA com o nome de Erwinaze e, também, foi desenvolvido uma forma peguilada dessa L-asparaginase pela Jazz Pharmaceuticals e Alize Pharma, denominado Asparec (pegcrisantaspase) (SALZER et al., 2014). Essa enzima é a indicada em casos de alergia ou sensibilidade à *Ecll*, pois ela é menos imunogênica, entretanto, ela apresenta um tempo de meia-vida menor e o número de pacientes que alcançam remissão completa é consideravelmente menor, segundo estudos (AVRAMIS, 2012; PIETERS et al., 2011; RYTTING, 2012). Além disso, apesar dessas novas preparações de L-asparaginase apresentarem um perfil imunogênico diferente de *Ecll* original, os efeitos colaterais persistem (NOMME et al., 2012; SCHALK et al., 2014).

No Brasil, a preparação da enzima utilizada é a de L-asparaginase tipo II de *E. coli*, mais especificamente, o biofármaco Leuginase, produzido pela empresa chinesa Beijing SL Pharmaceutical Co., Ltd (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

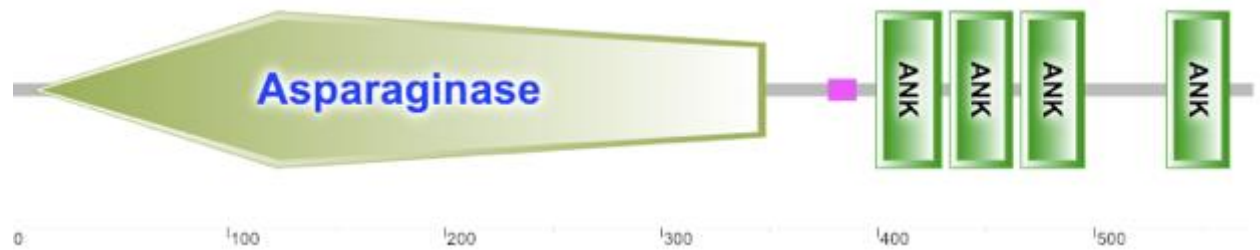
1.5 L-asparaginase humana

A substituição de L-asparaginases bacterianas, por uma similar a de seres humanos, pode ser uma solução para os efeitos adversos causados pelos medicamentos, atualmente, em circulação. O genoma humano codifica pelo menos três enzimas que podem atuar na degradação da asparagina (NOMME et al., 2012). Uma delas é a aspartilglicosaminidase (hAGA), uma enzima lisossomal que tem como função a degradação de glicoproteínas da superfície celular através da remoção dos grupos carboidratos ligados à asparagina (OININEN et al., 1995). Essa enzima degrada apenas asparaginas que estão ligadas a oligossacarídeos, portanto não hidrolisa L-Asn livre e,

então, não pode ser usada em todo o tratamento. A segunda L-asparaginase humana citada, é conhecida como hASRGL1, ALP4, CRASH5 ou hASNase3 e é foco da maioria dos estudos. Além de hidrolisar Asn, a hASNase3 pode hidrolisar peptídeos isoaspartil, que estão associados à sinalização para proteólise (CANTOR et al., 2009; MORAIS, 2017).

A terceira, e foco deste estudo, é uma enzima, pouco estudada, denominada hASNase1 que reside no domínio N-terminal de uma proteína maior, denominada 60-kDa-lisofosfolipase, uma enzima de 60 kDa. (SUGIMOTO; ODANI; YAMASHITA, 1998). A 60-kDa-lisofosfolipase possui domínio N-terminal similar às asparaginases de *Escherichia coli* tipo I e II, seguido por várias repetições de *ankyrin* de função desconhecida, como mostrado na Figura 3 (MENNITI et al., 2010; SUGIMOTO; ODANI; YAMASHITA, 1998). Ela está depositada no Uniprot sob o código Q86U10, anotada como LPP60_HUMAN, entretanto ainda não há estrutura tridimensional resolvida para a enzima. O gene que a codifica é *ASPG*, disponível no NCBI sob a referência NM_001080464, e no GenBank com o número de acesso BC035836.

Figura 3 - Representação esquemática da estrutura da 60-kDa-lisofosfolipase, mostrando o domínio N-terminal que possui atividade asparaginásica (resíduos 1-369) e domínio C-terminal composto de várias repetições de *ankyrin* (resíduos 370-573).



Fonte: Adaptado de LETUNIC; BORK, 2018; LETUNIC; DOERKS; BORK, 2015

<https://smart.embl.de/smart/show_motifs.pl?ID=Q86U10>

A 60-kDa-lisofosfolipase pode apresentar, além da atividade de asparaginase e lisofosfolipase, atividades de transacilase e acetil-hidrolase do fator ativador de plaquetas (PAF-AH) (BELVISO et al., 2017).

A atividade de PAF-AH pode ser um fator importante que atua em conjunto com a atividade asparaginásica para inibir o crescimento e induzir apoptose em células leucêmicas (BELVISO et al., 2017). O PAF é um mediador químico, que atua na sinalização entre células vizinhas, e que, por estar envolvido em funções como agregação plaquetária, inflamação e anafilaxia, pode desencadear cascatas inflamatórias e trombóticas ou amplificar essas cascatas (PRESCOTT et al., 2000; ZIMMERMAN et al., 2002). Sabe-se que o PAF pode atuar como agente tumorigênico por aumentar a expressão de genes antiapoptóticos, estimular a proliferação celular e induzir a migração celular (BUSSOLATI et al., 2000; FEUERHERM et al., 2013; KIM et al., 2011). A produção desse mediador é controlada pela PAF-AH, que catalisa a conversão bioquímica do PAF no liso-PAF, biologicamente inativo. Portanto, os PAF-AHs podem funcionar como supressores de tumor, por converterem o PAF em uma forma biologicamente inativa (STAFFORINI, 2015).

Há alguns relatos na literatura sobre a atividade da 60-kDa-lisofosfolipase em células eucarióticas, por exemplo a regulação *down* da atividade do canal epitelial de sódio (ENaC), característica essa que estaria associada a redução de malignidade celular (KAPOOR et al., 2009). Além disso, essa enzima também atua como parceiro molecular da serina-treonina quinase SGK1 (MENNITI et al., 2010). Outra atividade que estaria ligada à função de lisofosfolipase da enzima, teria papel fundamental no controle da proliferação celular através da mediação da conversão de lisofosfatidilinositol, em um importante mensageiro intracelular derivado da via RAS, o glicerofosfosinositol (MENNITI et al., 2010). Esses achados revelam a importância que a enzima apresenta na inibição do crescimento tumoral.

O domínio N-terminal de 60-kDa-lisofosfolipase foi denominado hASNase1 pela similaridade das propriedades cinéticas com a *Ecl*, visto que as duas são enzimas alostéricas e apresentam baixo k_{cat} e K_m na ordem de milimolar (Quadro 1). Em ensaios, essa enzima apresentou regulação alostérica positiva e coeficiente de Hill de 2,5 a 3,9 (KARAMITROS; KONRAD, 2014; SCHALK et al., 2014), sendo, assim, uma cooperação também positiva. A hASNase1 é uma L-asparaginase citoplasmática, definida pela porção que está localizada no subdomínio N-terminal (resíduos 1-369) da proteína maior, a 60-kDa-lisofosfolipase, a qual possui 573 resíduos (KARAMITROS; KONRAD, 2014).

Os mecanismos de catálise e regulação alostérica da hASNase1, bem como sua estrutura tridimensional, ainda não foram elucidados. Além disso, a enzima humana apresenta pouca afinidade pelo substrato (SCHALK *et al.*, 2014). O Quadro 1 mostra algumas constantes obtidas para as L-asparaginases de diferentes espécies.

Quadro 1 - Valores de cinética enzimática para as L-asparaginases analisadas.

Nome da Enzima	Origem	N. de resíduos	k_{cat} s^{-1}	K_m μM	k_{cat} / K_m $s^{-1}\mu M^{-1}$	Hill (n)
<i>Ecll</i>	<i>E. coli</i>	326	$48,9 \pm 0,6$	$14,9 \pm 1,3$	4,4	na**
<i>Ecl</i>	<i>E. coli</i>	338	$7,4 \pm 0,3$	$400 \pm 50^*$	0,028	3.5 ± 0.3
<i>Erw</i>	<i>E. chrysanthemi</i>	327	$207,5 \pm 3,6$	$47,5 \pm 3,5$	4,4	na
gpASNase1	<i>C. porcellus</i>	565	$38,6 \pm 1,4$	$57,7 \pm 6,4$	0,8	na
hASNase1	<i>H. sapiens</i>	573	$14,4 \pm 0,4$	$2960 \pm 131^*$	0,005	2.5 ± 0.2

Fonte: Adaptado de SCHALK *et al.*, 2014 e KARAMITROS; KONRAD, 2014.

*: Para enzimas que não seguem a cinética de Michaelis-Menten, o K_m é chamado de $[S]_{0.5}$ ou $K_{0.5}$.

** : na – não aplicável.

Para uma L-asparaginase ser eficiente na hidrólise de Asn extracelular, que no sangue humano apresenta concentração de $50 \mu M$ (COONEY; CAPIZZI; HANDSCHUMACHER, 1970), o K_m deve estar no intervalo micromolar (SCHALK *et al.*, 2014). Quanto menor o K_m , maior é a afinidade pelo substrato (ARYA; KUMAR; JHA, 2018). A *Ecll* tem uma afinidade alta para a asparagina ($K_m = 11,5 \mu M$, segundo SWAIN *et al.*, 1993 e $14.9 \pm 1.3 \mu M$, segundo SCHALK *et al.*, 2014), sendo que o K_m para hASNase1 foi avaliada em $2.960 \pm 131 \mu M$ (SCHALK *et al.*, 2014). Portanto, a hASNase1 tem K_m , aproximadamente, duzentas vezes maior que a da *E. coli*, a qual é utilizada clinicamente (SCHALK *et al.*, 2014). O k_{cat} é o número máximo de mols de substrato que pode ser convertido em produto por mol de enzima em uma unidade de tempo, o que estabelece a atividade enzimática. O k_{cat} da hASNase1 é $14,4 \pm 0.4 s^{-1}$ é abaixo do observado para *Ecll* é $48,9 \pm 0.6 s^{-1}$, portanto, a enzima humana converte menos mols

de substrato em produto por mol de enzima. A constante de especificidade (k_{cat}/K_m) indica quão eficientemente uma enzima converte substrato em produto em baixas concentrações de substrato (unidade $M^{-1}s^{-1}$). O k_{cat}/K_m da *EclI* é $4.4 s^{-1}.\mu M^{-1}$, já o da *hASNase1* é $0.005 s^{-1}.\mu M^{-1}$, sendo, portanto, menos específica que a *EclI*. Portanto, a *hASNase1*, na sua forma selvagem, pode não ser um substituto eficaz para a *EclI* como biofármaco.

A *hASNase1* possui alta identidade estrutural (mais de 70%), com a L-asparaginase de *Cavia porcellus* (*gpASNase1*), ou, popularmente conhecido como porquinho da Índia (**G**uinea **p**ig), conforme busca no programa, disponível em servidor online, BLASTP 2.8.1 (ALTSCHUL et al., 1990, 1997, 2005) apresentada no Quadro 2. Essa enzima, anotada como H0W0T5_CAVPO, mostrou boa afinidade por asparagina e de fato possui a propriedade K_m micromolar requerida com Asn (SCHALK et al., 2014). As estruturas cristalográficas para a *gpASNase1* já foram determinadas para o complexo com e sem ligante e permitem uma comparação direta com as enzimas bacterianas (SCHALK et al., 2014, 2016). Adicionalmente, a *gpASNase1* não apresenta atividade da L-glutaminase. Entretanto, apesar de uma identidade estrutural elevada essas enzimas possuem propriedades cinéticas muito diferentes, como mostrado no Quadro 1. Os resíduos correspondentes aos sítios catalítico e alostéricos em L-asparaginase humana, de *E. coli* e de *C. porcellus* estão descritos no Quadro 3.

Figura 4 - Alinhamento entre *EcII*, *EcI*, *gpASNase1* e *hASNase1*. Setas vermelhas indicam resíduos do sítio catalítico. Setas verdes indicam resíduos do sítio alostéricos em *EcI* e *hASNase1*. Asterisco (*) identifica aminoácidos conservados nas quatro sequências; dois pontos (:) indicam substituições conservativas (mesmo grupo de aminoácidos); um ponto final (.) identifica substituições semi-conservativas (formas semelhantes).

<i>EcII</i>	-----LPNITILATGCTIAGGGDSATKSNYTVGKVGVENLVNAVPLKDIA-----	46
<i>EcI</i>	-----MQKKSIIYVAYTGCTIGMRSE---QGYIPVSGHLQRQLALMPEFHRP-----	44
<i>hASNase1</i>	MARAVGPERLLAVYTGCTIGMRSEL---GVLVPGTGL-AAILRTLPMFHDEEHARARGL	56
<i>gpASNase1</i>	MARAGSERHLLLIYTGCTLGMQSKG---GVLVPGPGL-VTLLRTLPMFHDKFAQAQGL	56
	: ****: . : : * : :	
<i>EcII</i>	-----NVKGEQVVNIGSQDMNDNVWLTAKKINTDCDKTDFGVITHGT	89
<i>EcI</i>	-----EMPDFTIHEYTPLMDSDDMTPEWQHIAEDIKAHYDDYDGFVILHGT	91
<i>hASNase1</i>	SEDTLVLPASRNQRILYTVLEQCPLFDSSDMTIAEWVCLAQTIKRHYEQYHGFFVVIHGT	116
<i>gpASNase1</i>	PDHALALPPASHGPRVLYTVLEQCPLDSSDMTIDDWIRIAKIIERHYEQYQGFVVIHGT	116
	. * :.*.*. * :*: * : . : . :****: ***	
<i>EcII</i>	DTMEETAYFLDLTV-KCDKPVVMVGAMRPSTMSADGPFNLNAVVTAAADKASANRGLV	148
<i>EcI</i>	DTMAYTASALSFMLENLGKPVIVTGSQIPLAELRSDGQINLLNALYVAANYPI--NEVTL	149
<i>hASNase1</i>	DTMAFAASMLSFMLENLQKTIVILTGAQVPIHALWSDGRENLLGALLMACQYVI--PEVCL	174
<i>gpASNase1</i>	DTMASGASMLSFMLENLHKPVILTGAQVPIRVLWNDARENLLGALLVAGQYII--PEVCL	174
	*** * *.: : : * *.:*: * : * . ** .*: *.: * : *	
<i>EcII</i>	VMNDTVLDGRDVTITNTTDVATFKSVNYGPLYIHNGKIDYQRTPARKHTSDTPFDVSKL	208
<i>EcI</i>	FFNNRLYRGNRTTKAHADGFDAFASPNLPLLEAGIHIRRL--NTPPAPHGEGELIVHPI	207
<i>hASNase1</i>	FFQNQLFRGNRATKVDARRFAAFCSPNLLPLATVGADITIN-RELVRKVDGKAGLVVHSS	233
<i>gpASNase1</i>	FMNSQLFRGNRVTKVDSQKFEAFCSPNLSPLATVGADVTIA-WDLVRKVKWKDPLVVHSN	233
	... : * . **.: : . :* * * * *	
<i>EcII</i>	NELPKVGIYVNYANASDLPAKALVDAGYDGIV--SAGVGNGLYKSVFDTLATAAKTGT	266
<i>EcI</i>	-TPQPIGVVTTIYPGISADVVRNFLRQPVKALILRSYGVGNAPQNKAFLQELQEASDRGIV	266
<i>hASNase1</i>	-MEQDVGLLRLLYPCIPAAALVRAFLQPPLKGVVNETFGSGNGPTKPDLLQELRVATERGLV	292
<i>gpASNase1</i>	-MEHDVALLRLLYPCIPASLVRAFLQPPLKGVVLETFGSGNGPSPKPDLLQELRAAAQRGLI	292
	:.: * . .: : : . : : : * * . . : : * * . *	
<i>EcII</i>	VVRSSRVPTGATTQDAEVD---DAKYGFVASGTLNPKARVLLQLALTQT-KDPQQIQQI	322
<i>EcI</i>	VVNLTCMSGKVNMGYATGNALAHAGVIGGADMTVEATLTKLHYLLSQE-LDTETIRKA	325
<i>hASNase1</i>	IVNCTHCLQGAVT-TDYAAGMAMAGAGVISGFDMTSEAAALAKLSYVLGQPGLSLDVRKEL	351
<i>gpASNase1</i>	MVNCQCLRGSVT-PGYATS--LAGANIVSGLDMTSEAAALAKLSYVLGLPELSLERRQEL	349
	:* . : : * . . . * : : : . * * . . : : :	
<i>EcII</i>	FNQY-----	326
<i>EcI</i>	MSQNLRGELTPDD----	338
<i>hASNase1</i>	LTKDLRGEMTPPSVEERR	369
<i>gpASNase1</i>	LAKDLRGEMTLPT----	362
	: :	

Fonte: O autor. Alinhamento feito no Clustal O (1.2.4) (LI et al., 2015; MCWILLIAM et al., 2013; SIEVERS et al., 2011).

Quadro 2 - Similaridade entre as sequências de aminoácidos das L-asparaginases de *C. porcellus* e *E. coli* com a hASNase1.

Nome Enzima	Origem	Cód. PDB	Cobertura	Identidade
gpSNase1	<i>Cavia porcellus</i>	4R8K	98%	73,35%
<i>Ecl</i>	<i>Escherichia coli</i>	2P2D	96%	46,09%
<i>EclI</i>	<i>Escherichia coli</i>	3ECA	60%	27,75%

Fonte: O autor. Dados obtidos no BLASTP 2.8.1 (ALTSCHUL et al., 1990, 1997, 2005).

Quadro 3 - Resíduos que formam os sítios catalíticos e alostéricos em L-asparaginases de diferentes espécies. hASNase1: L-asparaginase humana; *Ecl*: L-asparaginase de *Escherichia coli* tipo I; *EclI*: L-asparaginase de *Escherichia coli* tipo II; gpASNase1: L-asparaginase de *Cavia porcellus*.

Sítios Asparaginase					
Catalítico				Alostérico	
hASNase1	<i>Ecl</i>	<i>EclI</i>	gpASNase1	hASNase1	<i>Ecl</i>
Thr19	Thr14	Thr12	Thr19	Thr187	Thr161
Tyr308	Tyr24	Tyr25	Tyr308	Glu266	Arg240
Thr116	Thr91	Thr89	Thr116	Cys299	Cys273
Asp117	Asp92	Asp90	Asp117	Ser327	Val302
Lys188	Lys163	Lys162	Lys188	Glu328	Glu303

Fonte: Adaptado de KARAMITROS; KONRAD, 2014; SCHALK et al., 2016.

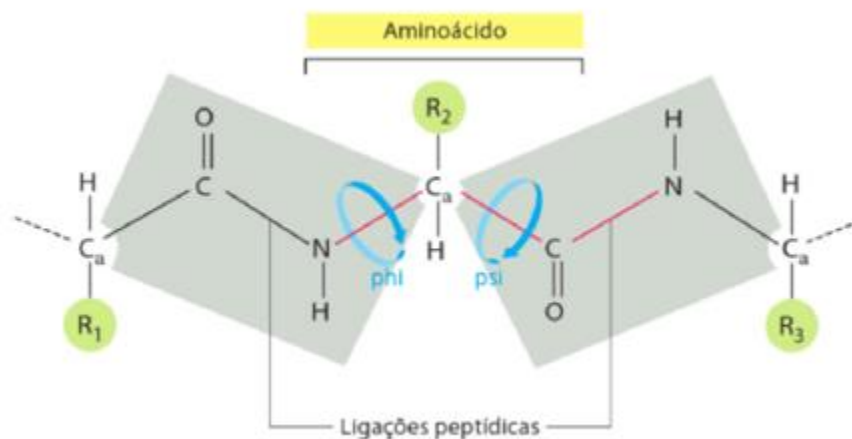
1.6 Modelagem Molecular

A estrutura tridimensional (3D) de uma proteína pode ser determinada experimentalmente, duas técnicas se destacam: Difração de raios X e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Essas técnicas possuem limitações, por exemplo, a obtenção de amostras em quantidade suficiente para os ensaios necessários ou a dificuldade de se conseguir bons cristais para difração (FILHO; ALENCASTRO, 2003). Apesar da grande evolução nesse campo, a obtenção de estruturas tridimensionais por esses métodos ainda é um processo demorado sem sucesso garantido. Com o aumento do número de projetos de sequenciamento de genoma e tais limitações da predição experimental de estruturas proteicas, surgiu a necessidade de aumentar o uso de técnicas de predição teórica (WATERHOUSE et al., 2018). Sabe-se, ainda, que um gene

pode codificar várias proteínas diferentes e, desta forma, obter a estrutura tridimensional de todas elas por meio de métodos experimentais, torna-se um trabalho inviável. Porém, conhecendo-se a sequência de aminoácidos de uma proteína de interesse, e de posse de uma estrutura já resolvida, que possua certa identidade estrutural, que é utilizada como molde, pode-se prever a estrutura 3D de uma proteína ainda não resolvida. A essa técnica dá-se o nome de modelagem comparativa ou modelagem por homologia. Essa técnica utiliza parâmetros observados durante a evolução, como a semelhança estrutural e funcional observada quando há alta similaridade entre sequências, a presença de regiões conservadas em proteínas homólogas (principalmente estrutura secundária) e as os “loops” ou regiões de alça que se ocasionam as principais diferenças estruturais entre proteínas homólogas (FILHO; ALENCASTRO, 2003).

A avaliação da qualidade dos modelos é uma importante etapa no processo de modelagem por homologia. Quando um modelo é predito através dessa abordagem, é necessário avaliar diferentes propriedades de organização estrutural, por exemplo estereoquímica, confiabilidade do enovelamento conforme os ambientes químicos em que os resíduos se encontram e empacotamento de resíduos (FILHO; ALENCASTRO, 2003; SILVA; SILVA, 2007). A qualidade estereoquímica dos modelos é verificada através de parâmetros como comprimento das ligações, ângulos entre ligações, ângulos torcionais (Φ , Ψ e Ψ) que estão representados na Figura 5 e são avaliados ao assumirem conformações permitidas no diagrama de Ramachandran (RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN; SASISEKHARAN, 1963, 1990). São verificados maus contatos (ou impedimentos estéricos), quiralidade dos aminoácidos, planaridade das ligações peptídicas, desvios em relação à geometria tetraédrica dos carbonos- α (C_α), dentre outros (HÖLTJE et al., 2003). Existem vários softwares que analisam os parâmetros citados e alguns foram utilizados nesse trabalho para checar a qualidade dos modelos.

Figura 5 - Representação da ligação peptídica e dos ângulos diédricos de rotação Phi e Psi.



Fonte: ALBERTS et al., 2009.

A modelagem molecular tem sido um recurso utilizado no estudo das L-asparaginases de diferentes espécies. Através dessa técnica, foi possível inferir maiores informações sobre a enzima, por exemplo, mecanismo de ação e comparação estrutural entre L-asparaginases de diferentes espécies (GUNDA et al., 2016; KARAMITROS; KONRAD, 2014; POLA et al., 2018; SAEED et al., 2018).

1.7 Dinâmica Molecular

É importante entender como ocorrem a aproximação e clivagem entre enzima e substrato e as mudanças conformacionais envolvidas nessa interação. Na simulação de Dinâmica Molecular (DM), cada átomo ou molécula interage entre si por interações de curto e de longo alcance. A DM é uma técnica computacional que simula a dinâmica (movimento) de átomos e moléculas em solução e permite o estudo desse movimento ao longo de determinado tempo (ALLEN; TILDESLEY, 2017; FRENKEL; SMIT, 2002). A DM permite acessar detalhes atomísticos e descrever movimentos moleculares que as técnicas de difração de raios-X em cristal, RMN, espalhamento de nêutrons e espectroscopia de fluorescência não alcançam e é, ainda, capaz de gerar informações por vezes inacessíveis experimentalmente corroborando, assim, dados e/ou teorias (SOARES, 2009). A partir dos detalhes atomísticos fornecidos pela simulação de DM,

pode-se acessar informações detalhadas sobre a estrutura tridimensional de uma proteína em equilíbrio com o solvente, interagindo com um substrato ou facilitando o entendimento de sua interação (STAVRAKLOUDIS, 2010). Portanto, uma vez que as movimentações na estrutura proteica podem ser essenciais para a atividade, o estudo de DM possibilita estudar esses movimentos em detalhes.

Os dados obtidos pela DM incluem uma coleção de configurações (chamado *ensemble*) que podem ser analisados e extrapolados para propriedades mensuráveis experimentalmente (pressão, volume, entropia, temperatura, energia interna, energia livre) com o uso da mecânica estatística (BURKERT; ALLINGER, 1982; VAN GUNSTEREN; DOLENC; MARK, 2008).

Na DM, as moléculas são representadas como modelos descritos por funções matemáticas, por exemplo, como uma coleção de átomos que se mantêm unidos por forças elásticas ou harmônicas. Tanto as forças quanto os potenciais envolvidos são representados por equações matemáticas que incluem parâmetros de forças para modelar, por exemplo, deformações de ligações e ângulos entre os átomos. Átomos não ligados também interagem e um potencial precisa ser utilizado para modelar a interação entre eles. Nesse sentido, o conjunto de parâmetros que descreve as interações entre átomos, ligados ou não, definem um campo de força. Como observado na Equação 4, através das equações de potencial que utilizam os diferentes parâmetros do campo de força é possível conhecer a energia potencial total, V , do sistema a partir de uma estrutura 3D do sistema, ou seja das coordenadas cartesianas dos átomos (ALLEN; TILDESLEY, 2017; FRENKEL; SMIT, 2002).

O potencial total sobre um átomo (Equação 4) é definido como a soma de vários componentes de potenciais que o átomo está envolvido, tanto na interação entre átomos ligados ou não ligados. Os potenciais entre átomos não ligados são resultantes de interações eletrostática e de van der Waals (mesmo das Equações 5 e 6), enquanto que para átomos ligados os potenciais são resultantes de potenciais que modelam comprimentos de ligação química, ângulos, e diedrais torcionais (FORSTER, 2002).

$$\begin{aligned}
V = & \frac{1}{2} \sum_{\text{ligações}} K_b (b_{eq} - b)^2 + \frac{1}{2} \sum_{\text{ângulos}} K_\theta (\theta_{eq} - \theta)^2 + \\
& \frac{1}{2} \sum_{\text{torções}} K_\phi [(1 + \cos(n\phi))] + \\
& \sum_{\text{pares não-ligados } i-j} \left[\frac{A}{r_{ij}^{12}} - \frac{B}{r_{ij}^6} + \frac{q_i \cdot q_j}{Dr_{ij}} \right]
\end{aligned} \quad (4)$$

Em um determinado momento (t), b é o comprimento de ligação (instantâneo) que representa o desvio em relação ao comprimento de equilíbrio b_{eq} da ligação; θ é o ângulo instantâneo entre duas ligações químicas consecutivas que descreve o desvio em relação ao ângulo de equilíbrio θ_{eq} entre as duas ligações químicas; K_b é a constante de Hooke associada à deformação da ligação química específica, e K_θ é a constante de Hooke para a restituição do ângulo de equilíbrio (θ_{eq}) entre as duas ligações químicas, visto que as distâncias de ligações e as amplitudes dos ângulos podem oscilar, considerando um modelo de oscilador harmônico, entre as posições de deformação máxima e a posição de equilíbrio; ϕ representa o ângulo de torção, e n é a multiplicidade do ângulo quando este passa por 360. A e B representam os parâmetros de van der Waals, q representa as cargas parciais; r_{ij} é a distância entre os átomos i e j (ALLEN; TILDESLEY, 2017; FRENKEL; SMIT, 2002).

O potencial de Lennard-Jones, descrito na Equação 5, modela a interação de *van der Waals* (*vdW*), responsável por interações de curto alcance. Interações eletrostáticas, consideradas a longo alcance, são modeladas pelo potencial de Coulomb, descrito na Equação 6.

$$V_{vdW} = 4 \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (5)$$

$$V_{elet} = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon_r r_{ij}} \quad (6)$$

Na Equação 5, σ_{ij} é a distância finita entre os átomos i e j , distância em que o potencial entre átomos é zero, sendo que ϵ_{ij} é a profundidade do potencial entre a barreira repulsiva e atrativa entre os átomos i e j . Esses são parâmetros ajustados por cálculos teóricos ou experimentalmente. Na Equação 6, V_{elet} é referente às interações eletrostáticas, r_{ij} corresponde à distância entre os átomos i e j com as cargas, q_i e q_j pontuais, ϵ_r é a constante dielétrica relativa do meio e ϵ_o a permissividade do espaço livre.

Na Equação 7, através da energia potencial (Equação 4), é possível encontrar as forças (\mathbf{F}) que atuam sobre cada átomo i , calculando-se a derivada do potencial (V), em relação à posição (r) de cada átomo.

$$\mathbf{F}_i = - \frac{\partial V(r_1, r_2, r_3, \dots, r_N)}{\partial r_i} \quad (7)$$

Na simulação de DM, o método utilizado para aquisição de trajetória, envolve a solução das equações de movimento de Newton, passo a passo (em intervalos de tempo – dt), para o sistema molecular. Dada uma configuração inicial do sistema (posições nos eixos x , y e z), as forças exercidas para cada átomo podem ser resolvidas pela derivada primeira do potencial (V), obtida do campo de força, (Equação 4) em relação às posições desses átomos (Equação 7).

Ao obtermos essas forças que atuam sobre cada átomo, utiliza-se o princípio fundamental da dinâmica (Segunda Lei de Newton) para obter os valores de aceleração (ABRAHAM et al., 2014). A equação de Newton é, então, resolvida para cada um dos átomos, seguindo a Equação 8:

$$\mathbf{F}_i(t) = m_i \mathbf{a}_i = m_i \cdot \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} \quad (8)$$

Aonde \mathbf{F}_i é a força exercida em cada átomo i , \mathbf{a}_i é a aceleração para o átomo i que possui massa m_i e dt é o intervalo de tempo para evoluir o sistema temporalmente.

Dessa forma, as relações descritas na equação 8 permitem encontrar a aceleração de cada átomo do sistema.

A partir da aceleração, \mathbf{a}_i , integrando-se as equações de movimento através de algoritmos como o de Verlet (VERLET, 1967), obtém-se as velocidades, cuja integral, por sua vez, fornece a mudança de posição do átomo (Equação 9).

$$\mathbf{r}(t + dt) = 2\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(t - dt) + \mathbf{a}(t)dt^2 \quad (9)$$

Aonde as posições e acelerações dos átomos no tempo t são utilizadas para calcular $\mathbf{r}(t - dt)$, posição no tempo anterior e $(t + dt)$, a nova posição, sendo dt o intervalo temporal para evoluir o sistema. Portanto, conhecendo-se as velocidades iniciais e as posições iniciais para cada átomo, as novas velocidades e posições podem ser calculadas após um intervalo dt de tempo. Novas velocidades e posições são obtidas em sucessivos intervalos de tempo dt , até atingir um intervalo de tempo total. As posições nos intervalos dt são armazenadas, configurando uma trajetória molecular ao longo de um tempo total de simulação.

A partir da trajetória de simulação, várias informações podem ser extraídas, por exemplo, informações sobre a interação entre duas moléculas e energias intra e intermoleculares entre átomos, grupos de átomos e moléculas. Propriedades estruturais e energéticas podem ser acessadas e comparadas com resultados experimentais.

1.8 Justificativa

O medicamento L-asparaginase é um tema essencial para o governo brasileiro, no enfrentamento do problema de desabastecimento e têm tentado ao longo dos anos encontrar fornecedores do produto. No entanto, há um grande desinteresse na produção desse medicamento pelas grandes empresas internacionais, em decorrência do baixo preço de mercado e vários concorrentes, com produtos similares (biossimilares). Por outro lado, muitas empresas menores não têm condições de satisfazer as exigências da ANVISA para receber o registro de comercialização do

medicamento no Brasil. Desta forma, o Ministério da Saúde decidiu intervir para desenvolver e produzir a L-asparaginase no Brasil (Portaria nº 704/GM/MS) pensando resolver o desabastecimento a curto prazo e ao mesmo tempo pensar num produto inovador com uso de enzimas L-asparaginase que seja produzido em laboratório nacional e seja competitivo no mercado externo. Assim, um novo medicamento L-asparaginase deve ter como resposta, soluções para os efeitos colaterais relacionados à falta de especificidade e imunogenicidade, e ser de baixo custo no mercado. Dessa forma, qualquer tecnologia a ser desenvolvida necessita de maior competitividade em relação à efetividade da L-asparaginase (atividade intrínseca de enzima L-asparaginase e solução dos problemas de imunogenicidade) e a sua produção. Ou seja, quanto mais eficiente a enzima L-asparaginase e quanto mais se produzir num mesmo volume, menor será o custo e mais competitivo será o medicamento. Essa abordagem é a mesma usada para enzimas industriais, que devem ser de baixo custo.

Dado que as enzimas bacterianas, frequentemente, apresentam efeitos colaterais imunogênicos e outros efeitos colaterais tóxicos, sugere-se que uma enzima humana não seria imunogênica e, portanto, poderia ser um substituto superior para o desenvolvimento de novo medicamento (SCHALK et al., 2014). Contudo, enzimas humanas com atividade para L-asparagina apresentam pouca afinidade pelo substrato (SCHALK et al., 2014), característica esta que pode ser melhorada através da mutação de resíduos específicos que realcem a interação enzima-substrato. Portanto, a L-asparaginase humana deve ter sua atividade realçada a patamares similares às das comerciais. Nesse sentido é necessário um melhor entendimento do mecanismo de ação e catálise.

Uma vez que os mecanismos de catálise e regulação alostérica da hASNase1, e sua estrutura tridimensional, ainda não foram elucidados, será necessário modelar sua estrutura tridimensional para o estudo do mecanismo. A obtenção somente do modelo estrutural ainda não é suficiente para explicar a baixa atividade da hASNase1 e entender a relação entre os sítios alostérico e catalítico, necessitando de uma técnica que consiga acessar informações estruturais e energéticas detalhadas da estrutura da hASNase1, visando o entendimento de como ocorrem as interações para a estabilidade da enzima e as interações com o substrato nos sítios. Simulação de Dinâmica Molecular

pode acessar essas informações, possibilitando comparações entre estruturas da hASNase1 e as L-asparaginases de *E. coli* e *C. porcellus*, que apresentam boa atividade catalítica já detectada. Pretende-se entender as diferenças estruturais e energéticas entre elas a fim de inferir diferenças nas propriedades cinéticas. Desta forma, espera-se que o estudo contribua para o desenvolvimento e produção de L-asparaginases inovadoras visando a redução dos efeitos colaterais do tratamento realizado atualmente nos pacientes com LLA.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Modelar a estrutura tridimensional da hASNase1 e submetê-la a simulação molecular, para possibilitar estudos sobre determinantes estruturais e energéticos que expliquem a baixa atividade, em comparação as L-asparaginases de *E. coli* e de *C. porcellus*, criando a possibilidade de proposição de mutações para realçar a atividade da hASNase1.

2.2 Objetivos específicos

- I. Modelar a estrutura tridimensional da L-asparaginase humana, gene hASNase1;
- II. Validar modelo obtido;
- III. Montar sistemas contendo o modelo obtido de hASNase1 em suas formas monomérica, dimérica e tetramérica contendo e não contendo o ligante nos sítios, e submetê-los à Dinâmica Molecular;
- IV. Montar sistema contendo estruturas tridimensionais, a partir de dados cristalográficos, da L-asparaginase de *C. porcellus*, contendo e não contendo o ligante nos sítios, e submetê-los à Dinâmica Molecular;

V. Montar sistema contendo estruturas tridimensionais, a partir de dados cristalográficos, L-asparaginase comercial de *E. coli*, contendo e não contendo o ligante nos sítios, e submetê-los à Dinâmica Molecular;

VI. Realizar análises estruturais e energéticas a partir das trajetórias obtidas pelas simulações de DM de cada um dos sistemas;

VII. Comparação das análises estruturais e energéticas entre as L-asparaginases e comparação dos resultados com os da literatura.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelagem da hASNase1

Visto que não há estrutura tridimensional disponível para a hASNase1, foram construídos modelos baseados em estruturas tridimensionais já resolvidas e depositadas em banco no banco de dados Protein Data Bank (BERMAN, 2000), através da técnica de modelagem comparativa.

Vários programas para modelagem molecular foram utilizados a fim de se obter o melhor modelo de monômero de L-asparaginase humana, com base em parâmetros geométricos. Os programas utilizados para a modelagem foram MODELLER (FISER; DO; ŠALI, 2000; MARTÍ-RENOM et al., 2000; ŠALI; BLUNDELL, 1993; WEBB; SALI, 2016), Phyre2 (KELLEY et al., 2015), SWISS-MODEL (WATERHOUSE et al., 2018) e Robetta (KIM; CHIVIAN; BAKER, 2004). A sequência de aminoácidos do monômero da hASNase1 está descrita no Quadro 4.

Quadro 4 - Sequência de aminoácidos da proteína lisofosfolipase dividida em domínio N-terminal (resíduos 1-369: L-asparaginase hASNase1) e domínio C-terminal (resíduos 370-573: repetição *ankyrin*).

Resíduos	Identificação	Sequência de aminoácidos
1-369	Asparaginase	MARAVGPERLLAVYTGGTIGMRSELGVLVPGTGLAA ILRTLPMFHDEEHARARGLSEDTLVLPASRNQRILYT VLECQPLFDSSDMTIAEWVCLAQTIKRHYEQYHGFVVI HGTDTMAFAASMLSFMLENLQKTIVLTGAQVPIHALW SDGRENLLGALLMAGQYVIPEVCLFFQNQLFRGNRAT KVDARRFAAFCSPNLLPLATVGADITINRELVRKVDGK AGLVVHSSMEQDVGLLRLYPGIPAALVRAFLQPPLKG VVMETFGSGNGPTKPDLLQELRVATERGLVIVNCTHC LQGAVTTDYAAGMAMAGAGVISGFDMTSEAAKLSY VLGQPGLSLDVRKELLTKDLRGEMTPPSVEERR
370-573	<i>Ankyrin repeat</i>	PSLQGNTLGGGVSWLLSLSGSQEADALRNALVPSLA CAAHAGDVEALQALVELGSDLGLVDFNGQTPLHAAA RGGHTEAVTMLLQRGVDVNTRDTDGFSPLLLAVRGR HPGVIGLLREAGASLSTQELEEAGTELCRLAYRADLE GLQVWWQAGADLGQPGYDGHSALHVAEAAGNLAVV AFLQSLEGAVGAQAPCPEVLPGV

Fonte: O autor.

Em todos os programas, a estrutura cristalográfica da gpASNase1 (cód. PDB: 4R8K) foi utilizada como molde para a modelagem, por apresentar maior porcentagem de identidade a sequência de aminoácidos da hASNase1 (73,35% de identidade e 98% de cobertura). Os programas Phyre2, SWISS-MODEL e Robetta são disponíveis em servidores online e são totalmente automatizados. O MODELLER é um programa disponível para download que necessita da interação do usuário através do uso de *scripts*.

O programa MODELLER utiliza um método de modelagem comparativa pela satisfação de restrições espaciais com base no alinhamento da sequência a ser modelada com sequências de estruturas já conhecidas (ŠALI; BLUNDELL, 1993). O algoritmo de programação dinâmica local é utilizado para identificar sequências relacionadas (SMITH; WATERMAN, 1981). O melhor modelo é selecionado através valor da função objetivo MODELLER, DOPE score (SHEN; SALI, 2006) ou SOAP (DONG et al., 2013). Então, informações geométricas e de restrições são extraídas do molde e as restrições estereoquímicas são obtidas do campo de força de mecânica molecular de

CHARMM-22 (MACKERELL et al., 1998). A seleção das melhores informações acerca da geometria da sequência *query* são baseadas em análises estatísticas de um conjunto representativo de todas as estruturas de proteínas conhecidas (WEBB; SALI, 2014). O modelo construído é otimizado, para minimização das violações das restrições espaciais, utilizando o algoritmo de gradiente conjugado (HESTENES; STIEFEL, 1952) e dinâmica molecular.

O programa Phyre2 utiliza o método HHblits (REMMERT et al., 2012) para determinar um perfil evolutivo, que identifica as preferências de resíduos em cada posição ao longo da sequência, e o método PSIPRED (JONES, 1999) para previsão de estrutura secundária. O perfil evolutivo, combinado com a estrutura secundária prevista, é convertido em um Modelo Oculto de Markov (HMM). O HMM é então analisado contra uma biblioteca de *foldings* e o algoritmo HHsearch (SODING, 2005) é usado para fazer o alinhamento. O melhor alinhamento é utilizado para gerar um modelo de backbone bruto que será aprimorado através do algoritmo descida coordenada cíclica (CANUTESCU; DUNBRACK, 2003) e termos de energia empírica.

O SWISS-MODEL se baseia em um mecanismo de modelagem comparativa chamado de ProMod3, que utiliza o OpenStructure (BIASINI et al., 2013) para extrair informações estruturais iniciais da estrutura do molde. O algoritmo TreePack (XU; JIAO; BERGER, 2005) é utilizado para aprimoramento de rotâmeros minimizando a função de energia SCWRL4 (KRIVOV; SHAPOVALOV; DUNBRACK, 2009). Como etapa final, o modelo tem pequenas distorções estruturais e interações desfavoráveis ou choques corrigidos por minimização da energia. Para tal, o ProMod3 usa a biblioteca OpenMM (EASTMAN et al., 2017) para realizar os cálculos e o campo de força CHARMM27 (MACKERELL; FEIG; BROOKS, 2004) para parametrização.

O Robetta divide a sequência de interesse em domínios e constrói modelos para esses domínios, usando modelagem comparativa. Quando não há similaridade de sequência suficiente para o domínio, o modelo é construído usando o método de predição de estrutura de Rosetta *de novo* (BRADLEY, 2005; SIMONS et al., 1997). No passo inicial, o método *Ginzu* (CHIVIAN et al., 2003) de predição de domínios é utilizado pelo Robetta, e, então, é feito o alinhamento de múltiplas sequências. Porções da sequência com mais de 50 resíduos que não são alinhadas com estruturas conhecidas,

são submetidas como entrada em uma nova filtragem. O método para alinhamento do Robetta é chamado K* Sync (CHIVIAN; BAKER, 2006). É um método aprimorado que combina a comparação de perfil a perfil, evolutivo, de resíduo com previsão de estrutura secundária e dados sobre dobramento proteico para produzir um único alinhamento (SMITH; WATERMAN, 1981). As regiões não alinhadas são consideradas loops e modeladas usando o método de inserção de fragmentos do Rosetta (ROHL et al., 2004). Por fim, os domínios modelados são montados formando o modelo completo. As cadeias laterais do modelo final são refinadas usando um algoritmo Monte Carlo (KUHLMAN; BAKER, 2000) com uma biblioteca de rotâmeros de cadeia lateral (DUNBRACK; COHEN, 1997).

Os modelos de monômeros de hASNase1 gerados foram validados pelos programas MolProbity (CHEN et al., 2010; DAVIS et al., 2007), PROSESS (BERJANSKII et al., 2010), ProSA-web (SIPPL, 1993; WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007), Verify 3D (BOWIE; LUTHY; EISENBERG, 1991; LÜTHY; BOWIE; EISENBERG, 1992), ERRAT (COLOVOS; YEATES, 1993), Prove (PONTIUS; RICHELLE; WODAK, 1996), PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993, 1996; LASKOWSKI; MACARTHUR; THORNTON, 2012; MORRIS et al., 1992) e WHATCHECK (HOOFT et al., 1996).

Após validação do monômero, o melhor modelo foi selecionado e o dímero e tetrâmero de hASNase1 foram montados utilizando o programa GalaxyHomomer (GalaxyWEB) (BAEK et al., 2017). Esse programa, disponível em servidor online, prediz a estrutura homo-oligomérica de uma proteína alvo a partir da estrutura monomérica. A predição é baseada em *template*, que o próprio programa busca em banco de dados, e *docking ab initio*. O usuário pode informar qual o estado oligomérico desejado para a replicação dos monômeros (BAEK et al., 2017; SHIN et al., 2014).

3.2 Procedimento experimental para Minimização de Energia e Dinâmica Molecular

3.2.1 Minimização de energia e preparação para DM

Inicialmente, todas as estruturas (monômero, dímero e tetrâmero de hASNase1, gpASNase1 e EclI) foram submetidas ao programa H++

(ANANDAKRISHNAN; AGUILAR; ONUFRIEV, 2012; GORDON et al., 2005; MYERS et al., 2006) para verificar a protonação das histidinas. Os terminais de todas as proteínas foram determinados como carregados.

O pacote GROMACS (Groningen MACHine for Chemical Simulation) (ABRAHAM et al., 2015; BERENDSEN; VAN DER SPOEL; VAN DRUNEN, 1995; HESS et al., 2008; LINDAHL; HESS, 2001; PALL et al., 2015; PRONK et al., 2013; VAN DER SPOEL et al., 2005), versão 5.1.3, foi utilizado para minimização, simulações de DM, e análises. As simulações seguiram os protocolos que incluem etapas de minimização de energia, termalização e fase de aquisição da trajetória da DM.

A minimização de energia foi realizada utilizando o algoritmo *steepest descent* (ARFKEN; WEBER, 1985; MENZEL, 1960; MORSE; FESHACH, 1953), visando melhorar a geometria da proteína e reduzir a energia potencial total da proteína.

A etapa de termalização foi realizada empregando simulações curtas e sucessivas, em *ensemble* (conjunto) canônico (NVT), representado por número de partículas e volume fixos e temperatura controlada, e em *ensemble* isotérmico-isobárico (NPT), no qual o número de partículas é constante e a pressão e temperatura são controladas para convergir com os parâmetros de referência. O protocolo de termalização, no *ensemble* NVT, inicia com DM com as posições atômicas da proteína “congeladas”, para permitir a ordenação das moléculas de água ao redor da proteína. Em seguida três etapas em *ensemble* NVT foram realizadas, desta vez restrição de posições atômicas na proteína. Posteriormente, mais três etapas em NPT foram realizadas, tendo ainda a restrição de posição na proteína. Para cada *ensemble*, foram usados 5 mil passos, sendo que cada passo foi realizado em 0,0005 ps (dt) na primeira simulação; 10 mil, dt = 0,001 ps na segunda e 10 mil passos e dt = 0,002 ps na terceira. Posteriormente, foi executada a etapa de aquisição da trajetória em *ensemble* NPT. Os parâmetros utilizados nas etapas de termalização foram os mesmos para a fase de aquisição de trajetória e estão descritos na próxima seção.

3.2.2 Dinâmica Molecular - fase de aquisição de trajetória

O programa GROMACS foi utilizado e os parâmetros para termalização e etapas de aquisição da trajetória dos sistemas incluem temperatura controlada em 310K

pelo algoritmo V-rescale (BUSSI; DONADIO; PARRINELLO, 2007) e pressão em 1atm usando o algoritmo de Berendsen (52) controle de pressão: Berendsen (BERENDSEN et al., 1984); integrador: Leap-frog (HOCKNEY; GOEL; EASTWOOD, 1974); raio de corte (rcut): 1,3 nm; campo de força: GROMOS53a6 (OOSTENBRINK et al., 2004). Algoritmos de restrição foram usados para manter a geometria da proteína (LINCS) (HESS, 2008; HESS et al., 1997) e moléculas de água (SHAKE) (VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1977). Condições periódicas de contorno foram aplicadas ao sistema. As correções para interações eletrostáticas foram calculadas utilizando o método PME (ESSMANN et al., 1995). As moléculas de água utilizadas foram do tipo SPC (BERENDSEN et al., 1981). As trajetórias foram coletadas a cada 1000 passos. A caixa de simulação é dodecaédrica com 1,2 nm de distância entre as bordas da proteína e as arestas da caixa em todos os eixos. A caixa foi preenchida com água em modelo explícito. Os sistemas foram termalizados e subseqüentemente, submetidos à simulação de DM para aquisição de trajetória. As características e componentes dos sistemas submetidos à DM estão resumidos no Quadro 5.

3.3 Definição dos sistemas submetidos a simulação de Dinâmica Molecular

Cada sistema de simulação recebe um nome, que estão descritos nas subseções posteriores. O Quadro 5 resume as características dos sistemas submetidos à simulação de DM.

3.3.1 Sistemas como monômero e dímero e tetrâmero da hASNase1 em água

Com o intuito de conhecer o comportamento estrutural de monômero e dímero de hASNase1 em água, foram montados dois sistemas para simulação, eletricamente neutros com a adição de 1 íon Na⁺ para DM do monômero e 2 íons Na⁺ para o dímero. Os sistemas resultaram em 33236 e 51398 moléculas de água respectivamente. O sistema com monômero possui 103259 átomos, o dímero 161296 átomos, sendo que o tempo total de DM foi de 200 ns para cada sistema. No caso do tetrâmero, foram usados 51144 moléculas de água explícita e 4 íons NA⁺ para neutralização do sistema e o tempo total de DM de 250 ns.

3.3.2 Sistema com tetrâmero de hASNase1 e asparagina nos sítios catalíticos e alostéricos

Asparaginas foram adicionadas nos sítios catalíticos e alostéricos da hASNase1. O sistema ASPG-ASN-CAT foi configurado adicionando 4 asparaginas nos sítios catalíticos (um em cada monômero) da hASNase1. O sistema que contém quatro asparaginas nos 4 sítios alostéricos da enzima (um em cada monômero) é denominado ASP-ASN-ALO. Um terceiro sistema montado, inclui asparagina nos 4 sítios catalíticos e alostéricos, totalizando 8 asparaginas, denominado ASPG-ASN-CAT-ALO.

As asparaginas foram adicionadas ao sítio catalítico sobrepondo posições desses resíduos (Thr19, Asp117, Lys188), que são conservados, aos dos sítios da gpASNase1 (RMSD 0,03 nm), pois essa L-asparaginase foi co-cristalizada com o substrato no sítio (cód. PDB: 5DND). Já as asparaginas do sítio alostérico foram adicionadas sobrepondo os resíduos conservados dos sítios alostéricos da hASNase1 (Thr187, Cys299, Glu328) nos resíduos conservados dos sítios alostéricos da *Ecl* (cód. PDB: 2HIM) (Thr161, Cys273, Glu303) (RMSD 0,04 nm), conforme feito por Karamitros e colaboradores, 2014. Assume-se que essa estratégia de sobreposição, no modelo tridimensional, resolvido por difração de raio-X em cristal seja correta, pois, além de os sítios serem conservados e o RMSD para as sobreposições serem baixos, o resultado computacional sempre deve ser validado pelo experimental, neste caso, a estrutura cristalográfica já obtida.

Os sistemas foram compostos por 50774, 50777 e 50757 moléculas de água explícita para ASPG-ASN-CAT, ASPG-ASN-ALO e ASPG-ASN-CAT-ALO, respectivamente. A quantidade de íons Na⁺ e Cl⁻ foi a necessária para manter a concentração iônica fisiológica de 0,15M e tempo de DM total de até 300 ns para cada sistema.

3.3.3 Sistemas gpASNase1 em água com e sem asparagina

A gpASNase1 foi submetida à DM a fim de comparação de resultados com a hASNase1. Dois sistemas foram montados, o que possui somente a gpASNase1 em

solução (cód. PDB: 4R8K) é denominado GPIG e o que contém 4 asparaginas, uma em cada sítio catalítico é denominado GPIG-ASN. Os dados de posicionamento de Asn no sítio e as coordenadas cartesianas atômicas da proteína foram aproveitados de dados cristalográficos para os dois sistemas.

Foram adicionadas 55197 moléculas de água no sistema GPIG e 55181 para o sistema GPIG-ASN. A quantidade de íons Na^+ e Cl^- adicionados foi a necessárias para manter a concentração iônica fisiológica de 0,15M, para um tempo total de DM de 300 ns para cada sistema.

3.3.4 Sistemas *EcII* em água com e sem asparagina

A *EcII* foi submetida à DM a fim de comparação de resultados com a hASNase1. A *EcII* foi simulada com posições atômicas de (cód PDB: 3ECA) em água, e esse sistema é denominado ECOLI. A mesma configuração, com posições atômicas, foi usada para simular *EcII* com 4 asparaginas, uma em cada sítio catalítico, e o sistema foi denominado ECOLI-ASN. As coordenadas das asparaginas foram aproveitadas dos dados cristalográficos.

O sistema ECOLI foi preenchido com 47063 moléculas de água e o ECOLI-ASN com 42461. Os íons Na^+ e Cl^- adicionados foram o necessário para manter a concentração iônica fisiológica de 0,15M e neutra para um tempo total de DM de 300 ns.

Quadro 5 - Características dos sistemas submetidos à simulação de DM.

Organismo	Sistema	Componentes	Número de Asn	Duração da simulação (ns)
Humana	Monômero	1 monômero de hASNase1	0	200
	Dímero	1 dímero de hASNase1	0	200
	Tetrâmero	1 tetrâmero de hASNase1	0	250
	ASPG-ASN-CAT	Tetrâmero + Asn nos sítios catalíticos	4	300
	ASP-ASN-ALO	Tetrâmero + Asn nos sítios alostéricos	4	300
	ASPG-ASN-CAT-ALO	Tetrâmero + Asn nos sítios catalíticos e alostéricos	8	300
<i>Cavia porcellus</i>	GPIG	tetrâmero de gpASNase1	0	300
	GPIG-ASN	tetrâmero de gpASNase1 + Asn	4	300
<i>Escherichia coli</i>	ECOLI	tetrâmero de EclI	0	300
	ECOLI-ASN	tetrâmero de EclI + Asn	4	300

Fonte: O autor.

3.4 Análises das trajetórias obtidas na Dinâmica Molecular

Os gráficos apresentados foram gerados usando o programa OriginPro 8.0 (ORIGINLAB CORPORATION, 2007). As figuras que representam estruturas foram geradas usando o software Pymol 1.7.4.5 (DeLano Scientific) (DELANO, 2002).

3.4.1 Root Mean Square Deviation

A estabilidade das estruturas foi avaliada pelo programa gmx rms, que calcula o desvio quadrático médio (DQMD ou RMSD – do inglês Root Mean Square Deviation)

entre estruturas ao longo da simulação comparando-as a uma de referência. Nas análises, foi usada a primeira configuração da simulação como referência. O RMSD é calculado após a maximização da sobreposição entre o conjunto de átomos que forma a molécula no tempo (t_2) com a de referência (t_1). Podem ser escolhidos todos os átomos para essa maximização ou apenas alguns tipos de átomos, os átomos de carbonos alfa foram escolhidos para análise. Dessa forma, o RMSD dimensiona o desvio entre estruturas proteicas, considerando as posições dos átomos carbono alfa. Cada uma das estruturas configuracionais amostradas ao longo da DM são comparadas com a de referência resultando em RMSDs ao longo do tempo, seguindo a Equação 10:

$$\text{RMSD}(t_1, t_2) = \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \| \mathbf{r}_i(t_1) - \mathbf{r}_i(t_2) \|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (10)$$

Aonde $M = \sum_{i=1}^N m_i$, m_i corresponde à massa do átomo i , $\mathbf{r}_i(t)$ é a posição do átomo i no tempo t de referência, t_1 , e nos tempos posteriores, t_2 .

As curvas de RMSD representam o quanto a estrutura da proteína difere em relação a referência ao longo da simulação, nesse trabalho foi sempre usada a primeira estrutura da trajetória. O momento que a estrutura entra em equilíbrio com a solução aquosa é denominado t_{eq} , após esse momento as propriedades estruturais são calculadas. Médias e desvios são calculados após a determinação de t_{eq} .

3.4.2 Potencial de Interação Interatômico

O programa do pacote GROMACS *gmx energy* foi utilizado para calcular o Potencial de Interação Interatômico (PII) entre os átomos do sistema ao longo do tempo de simulação dentro do raio de corte de 1.3 nm. O potencial é medido entre dois grupos de átomos e, então, o PII total é calculado somando-se o potencial de Lennard-Jones e eletrostático (Equações 5 e 6). Os PII podem ser agrupados para representar potenciais intermoleculares, por exemplo proteína-água ou proteína-proteína, onde os potenciais atômicos são somados para resultar no potencial de interação entre dois grupos de

átomos, no caso a molécula proteína e moléculas de água. Da mesma forma, pode ser caracterizado o potencial intramolecular, ou seja, o somatório dos potenciais de interação entre átomos dentro de uma mesma molécula.

3.4.3 Ligações de Hidrogênio

As Ligações de Hidrogênio (LH) foram detectadas seguindo um critério geométrico para sua definição. Um programa desenvolvido no grupo é capaz de mapear todas as Lhs de todos os dipolos de átomos envolvidos na LH. Considerando um dipolo entre átomos ligados X—H e Y—Z, onde uma LH é formada X—H····Y—Z, em que X—H representa o dipolo doador, sendo X um átomo mais eletronegativo que H. Já Y—Z representa o aceptor e Y é um átomo mais eletronegativo que Z (ARUNAN et al., 2011a). Os critérios geométricos para definição de uma ligação de hidrogênio foram determinados de acordo com as recomendações da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (ARUNAN et al., 2011b). O programa monitora durante a trajetória todas as possíveis LHs formadas, entre todos os possíveis dipolos, obedecendo o critério geométrico.

3.4.4 Raio de Giro

O Raio de giro (ou giração - RG) foi usado para analisar como se comportou o empacotamento estrutural da hASNase1, com relação a posição relativa entre os quatro monômeros que formam a estrutura quaternária tetramérica, a partir do modelo concebido e submetido a simulação de DM em meio aquoso.

$$RG = \left(\frac{\sum_i ||\mathbf{r}_i||^2 m_i}{\sum_i m_i} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (10)$$

Onde m_i é a massa do átomo, i e \mathbf{r}_i é a posição do átomo i com respeito ao centro de massa da molécula.

4 RESULTADOS

4.1 Modelagem comparativa da hASNase1

Após alinhamento e busca por sequência de proteína similares, utilizando o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), verificou-se que a hASNase1 possui elevada identidade de sequência (73,35% de identidade e 98% de cobertura) com a gpASNase1. Além da semelhança estrutural, a hASNase1 e a gpASNase1 (cód. PDB: 4R8K) possuem sítios catalíticos conservados, assim como a L-asparaginase de *Escherichia coli*.

A hASNase1 e a *Ecl* apresentam apenas 46% (cód. PDB: 2P2D) de identidade de sequência. Já a hASNase1 e a *EclI*, a asparaginase comercial de *E.coli* (Elspar) apresentam apenas 28% de identidade (cód. PDB: 3eca). Além disso, somente a hASNase1 e a *Ecl* apresentam alosterismo regulado por L-asparagina, enquanto que a gpASNase1 e a *EclI* não apresentam alosterismo.

O domínio N-terminal hASNase1 está localizado entre os resíduos 1-369 de uma proteína maior, que é denominada lisofosfolipase, a qual possui 60 kDa e 573 resíduos de aminoácido. Esse domínio N-terminal apresenta alta porcentagem de identidade com a gpASNase1 (cód. PDB: 4r8k), já o domínio C-terminal, que vai do resíduo 370 ao 573 trata-se de uma repetição conhecida como repetição *ankyrin* com função desconhecida. Esse último domínio não foi modelado neste trabalho.

4.2 Validação do modelo de hASNase1

4.2.1 Análise geométrica utilizando o programa MolProbity

Os modelos foram submetidos ao MolProbity (Duke Biochemistry), que proporciona uma análise detalhada de contato de todos os átomos em qualquer impedimento estérico (CHEN et al., 2010; DAVIS et al., 2007), e os resultados podem ser observados na Figura 6.

Na Figura 6, os valores são fornecidos em contagem bruta e em porcentagem. O *clash score* é o número de sobreposições estéricas graves por 1000 átomos. Esse

valor é dado em percentil, que é uma medida utilizada para dividir uma amostra de valores, ordenados de forma crescente, em cem partes, assim, o centésimo percentil é o melhor entre estruturas de resolução comparável e o percentil 0 é o pior. O MolProbity score combina as avaliações de clashscore, rotâmeros e Ramachandran em uma única pontuação, normalizada para estar na mesma escala da resolução de raios-X.

Figura 6 - Análise da qualidade geométrica, obtida pelo programa MolProbity, para os programas Modeller, Phyre2, Swiss-model, Robetta.

Análise MolProbity		Desejado	MODELLER	Phyre2	Swiss-model	Robetta
		%	%	%	%	%
Contato all-atoms	Clash score	100 ^o	4 ^o	34 ^o	99 ^o	99 ^o
	Rotâmeros ruins	<0,3	1,67	0	0	0
Geometria da proteína	Rotâmeros favoráveis	>98	92,31	98,27	98,62	99,67
	Ramachandran outliers	<0,05	1,09	0,28	0	0
	Ramachandran regiões permitidas	>98	97,55	96,88	96,62	98,37
	MolProbity score	100 ^o	51 ^o	77 ^o	99 ^o	100 ^o
	Ligações ruins	0	0	0,07	0	0
	Ângulos ruins	<0,1	0,95	1,26	0,51	0,05

Fonte: O autor. Dados obtidos no MolProbity.

A partir da análise dos resultados gerados pelo programa MolProbity, mostrados na Figura 6, verifica-se que o modelo desenvolvido pelo programa Modeller, possui *clash score* no 4^o percentil. Há 4 aminoácidos (Asn 69, Asp 307, Ala 313, Met 314) fora de regiões permitidas no gráfico de Ramachandran, 5 rotâmeros e 37 ângulos em conformações não desejadas e o MolProbity score foi de 2,43, representando o 51^o percentil. Os aminoácidos com ângulos fora de regiões favoráveis pelo gráfico de Ramachandran podem ser analisados na Figura 7A.

Já o resultado da análise geométrica para o modelo do programa Phyre2, mostra que o *clash score* para o modelo está representado no 34^o percentil. Há 1

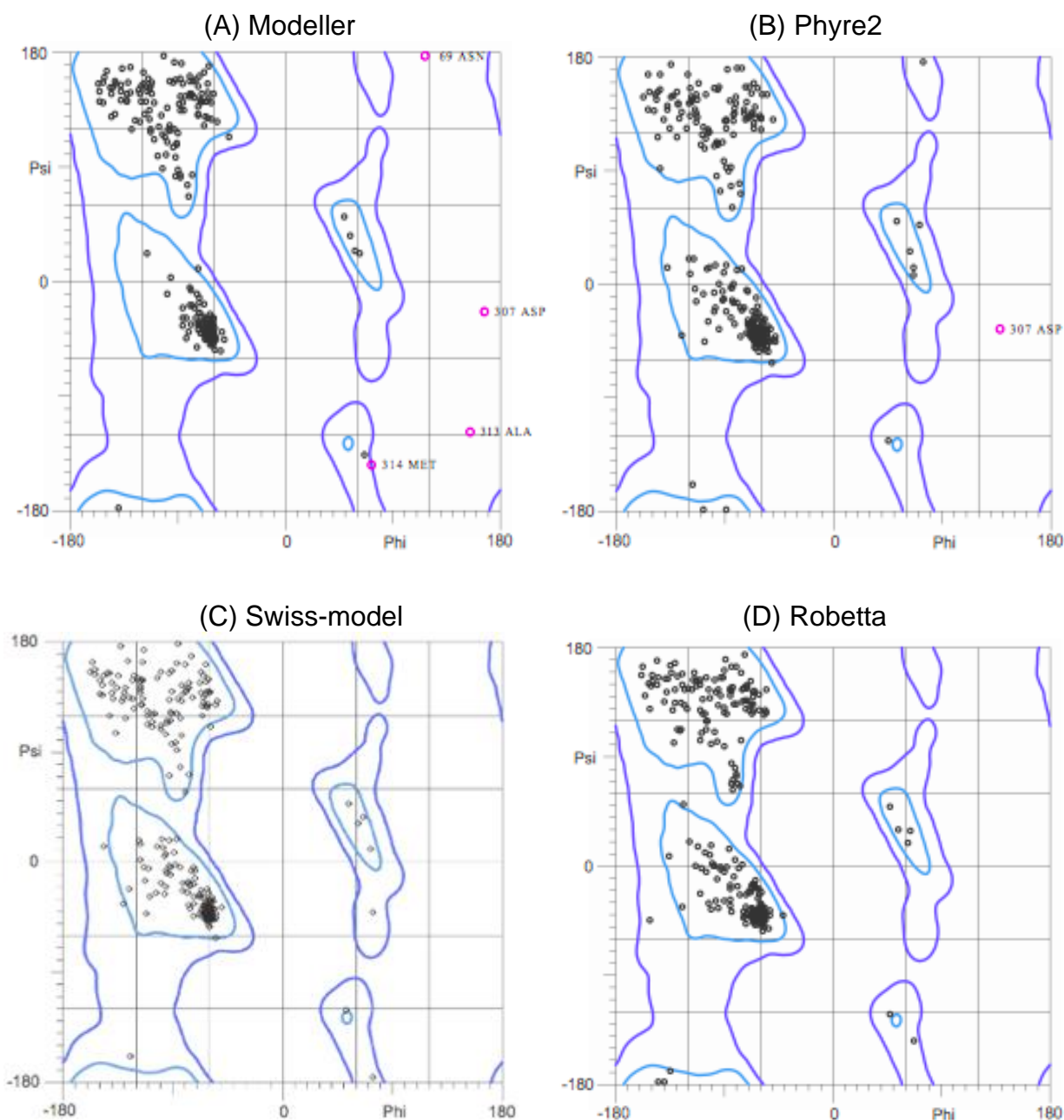
aminoácido (Asp 307) fora de regiões permitidas no gráfico de Ramachandran, 47 ângulos e 2 ligações em conformações não desejadas, o MolProbity score foi de 1,98, representando 77° percentil e não há rotâmeros ruins. Os aminoácidos com ângulos fora de regiões favoráveis pelo gráfico de Ramachandran podem ser analisados na Figura 7B.

Observando o resultado da análise para o modelo do programa Swiss-model, verifica-se que o *clash score* para o modelo está no 99° percentil. Não há aminoácidos fora de regiões permitidas no gráfico de Ramachandran, há somente 19 ângulos em conformações não desejadas, não há rotâmeros nem ligações em conformações não desejadas e o MolProbity score foi de 1,13, representando 99° percentil. O gráfico de Ramachandran para esse modelo pode ser observado na Figura 7C.

O resultado da análise do modelo gerado pelo programa Robetta mostra que o *clash score* para o modelo está representado no 99° percentil. Não há aminoácidos fora de regiões permitidas no gráfico de Ramachandran, há somente 2 ângulos em conformações não desejadas, não há rotâmeros nem ligações em conformações não desejadas e o MolProbity score foi de 0.73, representando 100° percentil. Todos os parâmetros analisados pelo MolProbity encontram-se em verde, ou seja, estão dentro do desejável para uma boa estrutura de proteína. O gráfico de Ramachandran para esse modelo pode ser observado na Figura 7D.

A partir da análise geométrica realizada pelo programa MolProbity para os modelos de hASNase1 gerados por diferentes programas, nota-se que o modelo gerado pelo programa Robetta apresenta parâmetros mais próximos dos desejáveis em comparação aos modelos dos demais programas.

Figura 7 - Gráfico Ramachandran gerado pelo programa MolProbity para cada modelo analisado.



Fonte: MolProbity

4.2.2 Análise geométrica pelo programa PROSESS

O programa PROSESS (*Protein Structure Evaluation Suite & Server*) avalia parâmetros de resíduos como: qualidade de ligação covalente e de geometria; qualidade de ligação não ligada; qualidade de ângulo de torção. (BERJANSKII et al., 2010) e

fornece um quadro (Tabela 1) atribuindo notas a esses parâmetros avaliados, sendo nota 10 atribuída a uma melhor qualidade e 0 a qualidade ruim.

Tabela 1 - Esquema de cores e notas gerado pelo PROSESS para o modelo obtido pelo programa Modeller.

Programa	Avaliação da qualidade			
	Geral	Ligações covalentes	Ligações não covalentes / empacotamento	Ângulos torsionais
MODELLER	4,5	7,5	4,5	5,5
Phyre2	6,5	7,5	6,5	7,5
SWISS-MODEL	6,5	7,5	6,5	5,5
Robetta	6,5	6,5	6,5	6,5

Fonte: O autor. Valores fornecidos pelo PROSESS.

Na Tabela 1, observa-se a análise do modelo gerado pelo programa Modeller. A nota para a qualidade geral do modelo foi 4,5. A qualidade de ligações covalentes obteve nota 7,5; ligações não covalentes e enovelamento, 4,5 e a qualidade dos ângulos de torção alcançou nota 5,5.

O PROSESS atribuiu nota 6,5 para a qualidade geral do modelo gerado pelo programa Phyre2. A qualidade de ligações covalentes obteve nota 7,5; ligações não covalentes e enovelamento nota 6,5 e a qualidade dos ângulos de torção alcançou nota 7,5.

Para o modelo do SWISS-MODEL, o programa PROSESS atribuiu nota 6,5 para a qualidade geral do modelo. A qualidade de ligações covalentes obteve nota 7,5; ligações não covalentes e enovelamento nota 6,5 e a qualidade dos ângulos de torção alcançou nota 5,5.

Já para o modelo do programa Robetta, o PROSESS atribuiu nota 6,5 para a qualidade geral do modelo. A qualidade de ligações covalentes, ligações não covalentes e enovelamento e a qualidade dos ângulos de torção todos alcançaram nota 6,5.

A partir dessa análise nota-se que os programas, com exceção do Modeller, geraram modelos com qualidade geral nota 6,5, sendo que o modelo apresentado pelo programa Phyre2 obteve nota maior em alguns parâmetros, são eles: qualidade de ligação covalente e qualidade de ângulo torcional

4.2.3 Análise gerada pelo programa ProSA-web

Outro programa utilizado para validação de modelo proteico gerado por preditores estruturais é o ProSA-web (**Protein Structure Analysis**) que calcula uma pontuação de qualidade geral para a estrutura submetida. Se essa pontuação estiver fora de um intervalo característico para proteínas nativas, a estrutura provavelmente contém erros. O programa também gera um gráfico de scores de qualidade locais que aponta as partes problemáticas do modelo (SIPPL, 1993; WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007).

A pontuação de qualidade geral do modelo é apontada na forma de *Z-score*. Seu valor é comparado com os *Z-scores* de todas as cadeias proteicas determinadas experimentalmente no PDB atual através de diferentes fontes (raios-X, RMN). Assim, verifica-se se o *Z-score* da estrutura modelada está dentro da faixa de escores tradicionalmente encontrados para proteínas nativas de tamanho similar. O *Z-score*, propriamente dito, indica quanto um valor se afasta da média em termos de desvio-padrão (quanto mais negativo melhor) (VAN ZUNDERT et al., 2015). O *Z-score* para o modelo obtido no Modeller foi -8,87, para o modelo do Phyre2 foi -9,32, -9,04 para o modelo obtido no Swiss-model e -9,02 para o modelo obtido no Robetta. Os valores podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de Z-scores obtidos para os modelos de hASNase1 modelados em diferentes programas de modelagem.

Programa de modelagem	Z-score
Modeller	-8,87
Phyre2	-9,32
Swiss-model	-9,04
Robetta	-9,02

Fonte: O autor. Valores fornecidos pelo programa ProSA-web.

Através da análise da Tabela 2, verifica-se que o modelo fornecido pelo programa Phyre2 apresentou Z-score mais negativo, sendo, portanto o mais bem avaliado nesse quesito.

4.2.4 Análise gerada pelo programa SAVES

O programa SAVES v5.0 (UCLA-DOE Institute), agrupa vários programas de análise de estruturas proteicas, são eles: Verify 3D, ERRAT, PROCHECK e WHATCHECK. Esses programas foram utilizados para verificação da qualidade das estruturas preditas pelos programas de modelagem por homologia.

O Verify-3D determina a compatibilidade de um modelo submetido (3D) com sua própria sequência de aminoácidos (1D). Ele atribui uma classe estrutural baseada na localização e ambiente dos resíduos (alfa, beta, loop, polar, não polar, etc.) e compara os resultados a estruturas de boa resolução já resolvidas (BOWIE; LUTHY; EISENBERG, 1991; LÜTHY; BOWIE; EISENBERG, 1992). Todos os modelos foram considerados aprovados, pois pelo menos 80% dos aminoácidos marcaram $\geq 0,2$ no perfil 3D/1D. No modelo do programa Modeller 89,43% dos aminoácidos marcaram $\geq 0,2$ no perfil 3D/1D. No modelo Phyre2, foram 97,56% dos resíduos. No modelo gerado pelo Swiss-model, 92,16% de resíduos que marcaram $\geq 0,2$ no perfil 3D/1D, já no modelo do Robetta, foram 98,37% dos resíduos. Os valores podem ser melhor observados na Tabela 3.

Tabela 3 - Compatibilidade do modelo 3D com a sua própria sequência de aminoácidos mostrado em porcentagem de resíduos que marcaram $\geq 0,2$ no perfil 3D/1D. Valores obtidos pelo programa Verify-3D para os modelos de hASNase1 modelados em diferentes programas de modelagem.

Programa de modelagem	% de resíduos $\geq 0,2$ no perfil 3D/1D
Modeller	89,43
Phyre2	97,56
Swiss-model	92,16
Robetta	98,37

Fonte: O autor. Valores fornecidos pelo programa Verify-3D.

Através da análise da Tabela 3, verifica-se que o modelo do programa Robetta é o que mais apresenta compatibilidade entre a estrutura 3D modelada e a sua sequência de aminoácidos, com percentagem de 98,37.

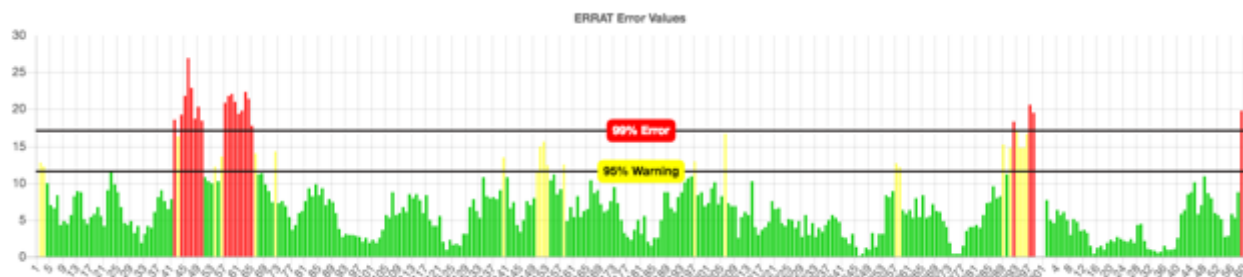
Após comparação da sequência de aminoácidos fornecida e estrutura 3D modelada, percebeu-se que o programa Phyre2 modelou somente dos resíduos 8 ao 364, falhando em modelar N e C terminais, e o programa Swiss-model modelou somente dos resíduos 7 ao 364, igualmente falhando em modelar N e C terminais. Os modelos obtidos pelos programas Modeller e Robetta continham todos os aminoácidos (1 ao 369) da sequência de interesse.

O ERRAT analisa a estatística de interações entre diferentes tipos de átomos não ligados e lança em gráfico o valor da função de erro versus posição, de uma janela de 9 resíduos, calculada com base em cristais de alta resolução. O programa retorna um gráfico com os valores de erro e um número de fator de qualidade geral. No gráfico, no eixo de erro, duas linhas são desenhadas para indicar a confiança com qual é possível rejeitar regiões que excedam esse valor de erro (Figura 8). O fator de qualidade geral é expresso como a percentagem da proteína para a qual o valor de erro calculado cai abaixo do limite de 95% de rejeição. Boas estruturas geralmente produzem valores em torno de 95% ou mais (COLOVOS; YEATES, 1993).

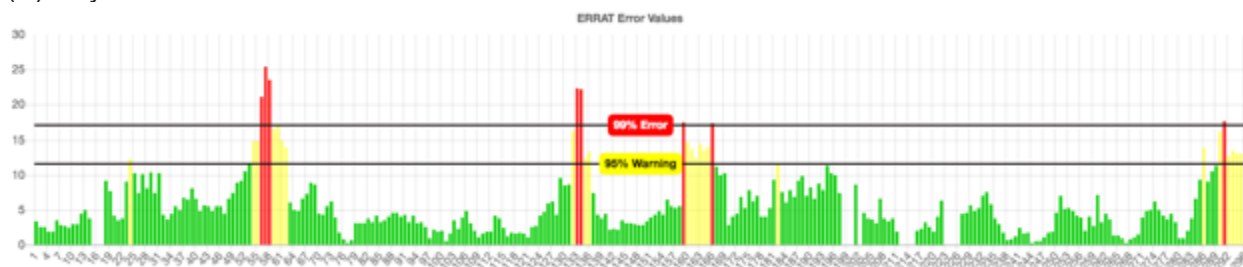
O modelo do Modeller obteve fator de qualidade geral de 87,6404% e o gráfico ERRAT para o modelo mostra vários resíduos que excedem o valor de erro (colunas vermelhas) (Figura 8A). a Figura 8B mostra o resultado obtido pelo programa ERRAT para o modelo do Phyre2 e nela observa-se que alguns resíduos desse modelo excedem o valor de erro (colunas vermelhas) e o fator de qualidade geral para o modelo foi 88,9286%. Na Figura 8C o resultado ERRAT para o modelo do Swiss pode ser observado. Nela nota-se que somente 2 resíduos desse modelo excedem o valor de erro (colunas vermelhas) e o fator de qualidade geral foi 92.8571%. Os resultados para o modelo do Robetta podem ser analisados na Figura 8D. Nela observa-se que nenhum resíduo desse modelo excede o valor de erro e, ainda, há poucos resíduos necessitando atenção (linhas amarelas). O fator de qualidade geral foi 98.0282%. Os fatores de qualidade geral fornecidos pelo ERRAT para cada modelo, podem ser melhor observados na Tabela 4.

Figura 8 - Gráfico do valor da função de erro versus posição gerada pelo ERRAT para os modelos gerados por diferentes programas.

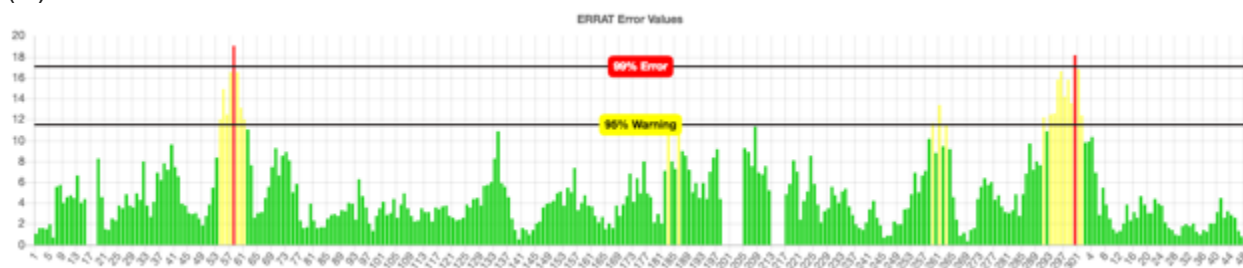
(A) Modeller



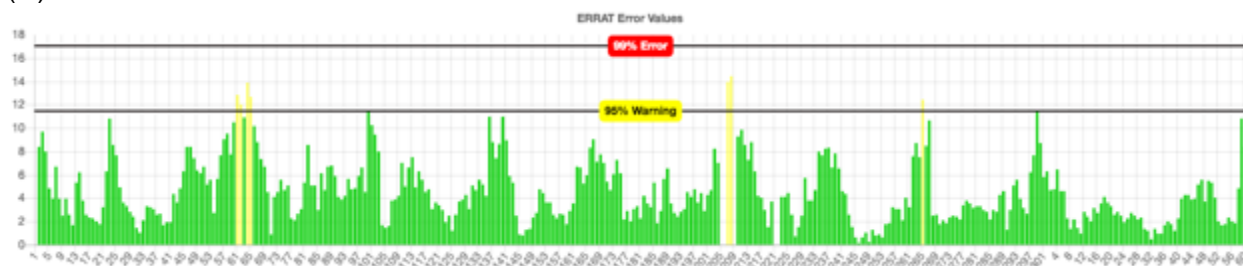
(B) Phyre2



(C) Swiss-model



(D) Robetta



Fonte: ERRAT

Tabela 4 - Fatores de qualidade geral gerados pelo programa ERRAT para os modelos de hASNase1 obtidos em diferentes programas de modelagem.

Programa de modelagem	Qualidade geral (%)
Modeller	87,6404
Phyre2	88,9286
Swiss-model	92,8571
Robetta	98,0282

Fonte: O autor. Valores fornecidos pelo programa ERRAT.

Comparando os resultados da Figura 8 e os da Tabela 4, verifica-se que o modelo do programa Robetta apresentou melhores resultados não possuindo nenhum resíduo excedendo o valor de erro no programa ERRAT o que indicou um fator de qualidade geral de 98.0282%.

O Prove calcula o volume de átomos, em macromoléculas, usando um algoritmo que trata os átomos como esferas rígidas e calcula o Z-score do modelo com base em cristais de alta resolução. Os critérios de avaliação levam em conta a porcentagem de átomos enterrados. Se a porcentagem é maior que 5%, significa erro; se é entre 1 e 5%, significa alerta; e se é menor que 1% a estrutura é considerada aceita. O modelo do Modeller obteve 72 átomos de proteína enterrados, representando 5,5%, e, portanto, erro. O modelo Phyre2 mostrou 56 átomos de proteína enterrados, representando 4,3%. Esse resultado não indica erro, mas também não é o desejável, significando, portanto, atenção. O modelo Swiss-model mostrou 58 átomos de proteína enterrados, representando 4,4%. Esse resultado também não indica erro, entretanto não é o desejável, significando, portanto, atenção. Já o modelo Robetta mostrou 39 átomos de proteína enterrados, representando 3,1%. Esse resultado também não indica erro, porém ainda não é o desejável, significando, portanto, atenção. Os resultados podem ser melhor comparados na Tabela 5.

Tabela 5 - Porcentagem de átomos enterrados analisados pelo programa Prove para os modelos de hASNase1 obtidos em diferentes programas de modelagem.

Programa de modelagem	% de átomos enterrados	Avaliação do Prove
Modeller	5,5 (72 átomos)	ERRO
Phyre2	4,3 (56 átomos)	ATENÇÃO
Swiss-model	4,4 (58 átomos)	ATENÇÃO
Robetta	3,1 (39 átomos)	ATENÇÃO

Fonte: O autor. Valores fornecidos pelo programa Prove.

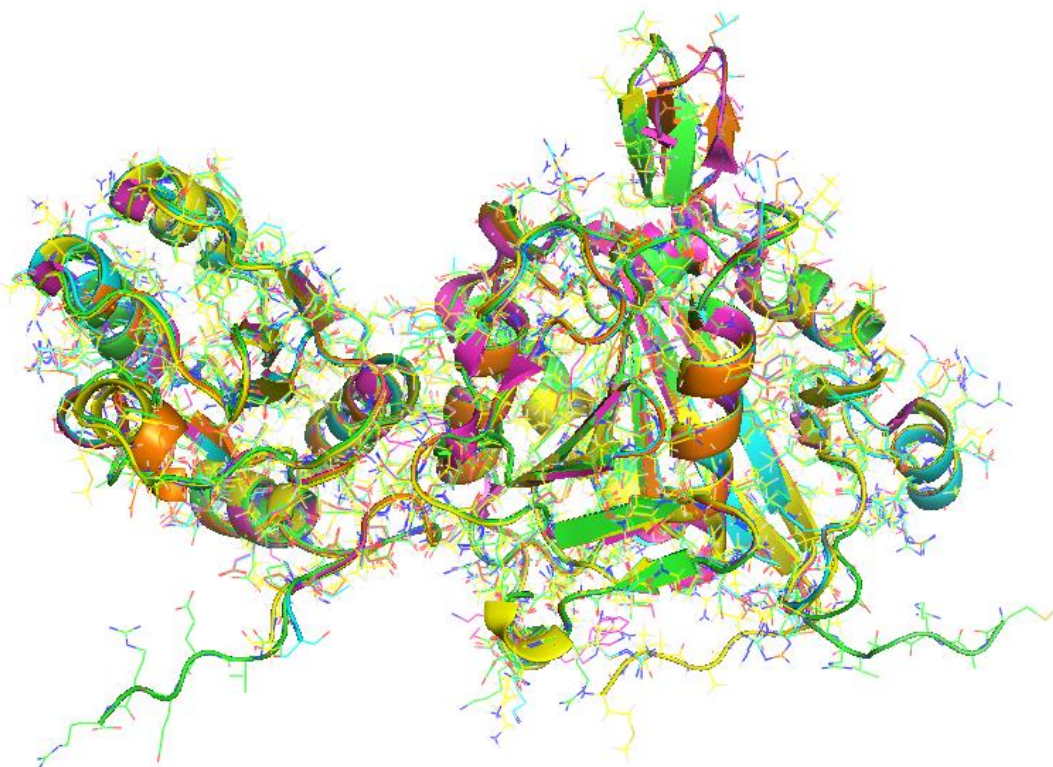
Comparando os resultados gerados pelo programa Prove, nota-se, mais uma vez, que o modelo gerado pelo programa Robetta obteve melhor avaliação, apresentando menor porcentagem de átomos enterrados.

Após análise de todos os modelos, concluiu-se que o modelo de hASNase1, obtido através do programa Robetta, foi o que apresentou melhor estrutura modelada. Esse, foi, portanto, o modelo selecionado para ser submetido à DM e dar sequência às análises do trabalho.

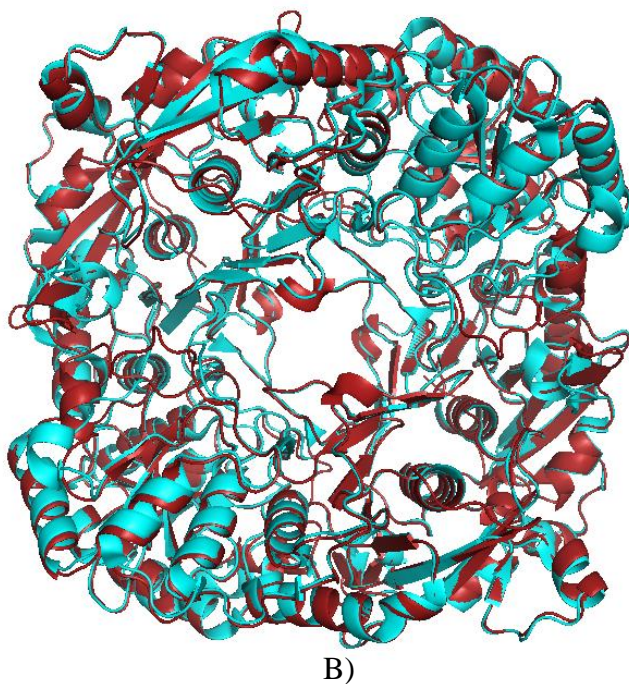
É importante ressaltar que não foi feita análise estatística para observar se a diferença dos resultados obtidos nos programas de validação aqui utilizados é significativa, entretanto, muito provavelmente não são. Além disso, todos os modelos são bastante parecidos (Figura 9A), como pode ser observado através da sobreposição da cadeia principal dos modelos com o molde selecionado. Outro fator a ser considerado é que, quando a estrutura modelada é submetida à DM, vários critérios analisados para a validação da estrutura mudam, pois as análises são feitas para a estrutura rígida e quando a estrutura está em solução, possibilitando o movimento de seus ângulos e ligações, o resultado pode ser outro. Por exemplo, alguns parâmetros que foram considerados como erro podem ser corrigidos e alguns que foram considerados dentro do esperado, como ângulos Ramachandran e ligações, podem apresentar resultados diferentes. Os resultados aqui apresentados de validação do modelo, provam que o modelo escolhido, proveniente do programa Robetta, é um modelo muito bom dentre modelos também muito bons.

O tetrâmero, obtido pelo programa GalaxyHomomer (GalaxyWEB) (BAEK et al., 2017), foi sobreposto com gpASNase1 e foi verificado que o padrão de replicação de monômeros era a mesma (RMSD: 0,05 nm) (Figura 9B).

Figura 9 – A) Representação em *cartoon* e linhas da sobreposição dos modelos obtidos pelos programas MODELLER (carbonos em verde), Phyre2 (carbonos em azul), Swiss-model (carbonos em laranja) e Robetta (carbonos em amarelo) no molde gpASNase1 (carbonos em rosa). B) Sobreposição do modelo de hASNase1 (vermelho) no molde gpASNase1 (azul).



A)



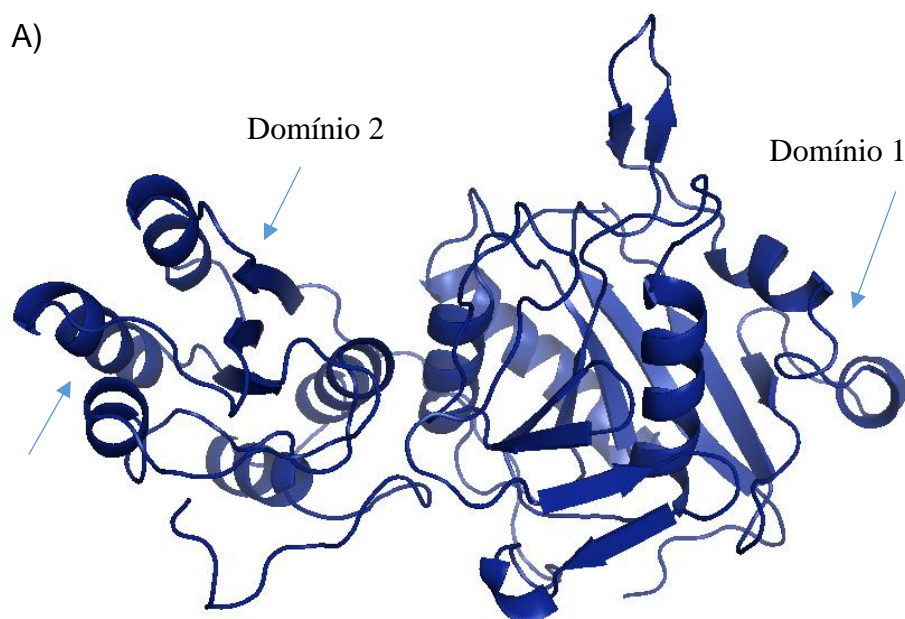
Fonte: O autor.

4.3 DM das estruturas monomérica, dimérica e tetramérica da hASNase1 em solução aquosa

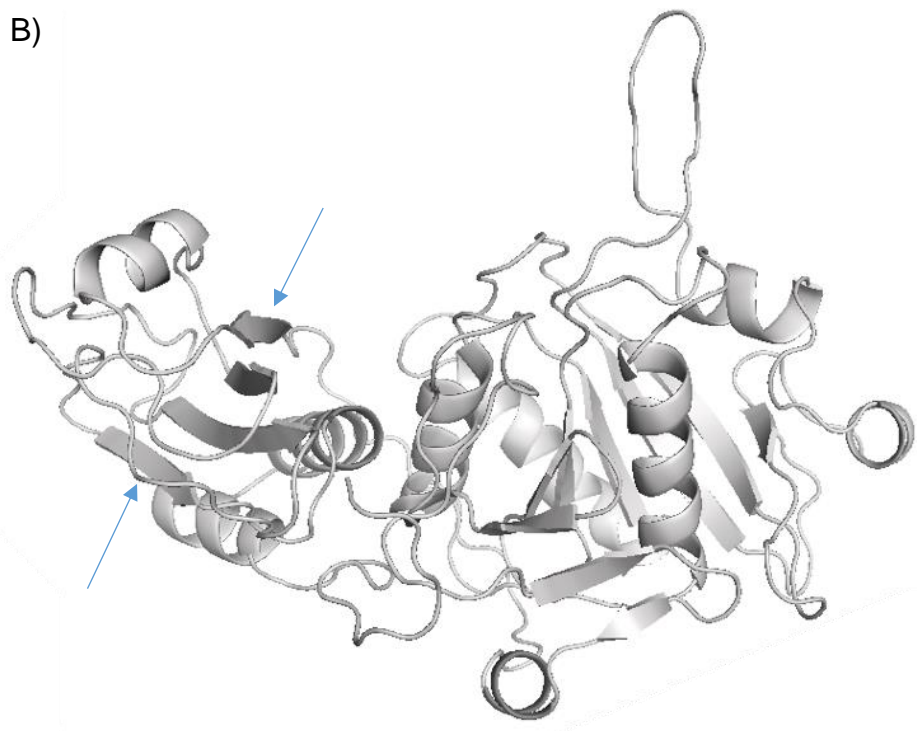
A estrutura obtida através de modelagem por homologia da hasnase1 foi submetida a DM em solução aquosa. Durante a simulação foram monitoradas as variações nas estruturas através de perfis de RMSDs, como descrito na Figura 12. A estrutura do Monômero alcança equilíbrio no tempo (t_{eq}) ~ 100 ns e permanece flutuando ao redor da média de $0,50 \pm 0,02$ nm, sendo que 0,02 o que resulta em $\sim 4\%$ do RMSD médio o que mostra que o monômero é estável em água e mantém sua estrutura. Como observado na Figura 10A, considera-se que o monômero possui uma estrutura com dois domínios, o Domínio 1 é o maior e abriga a região N-terminal e o sítio catalítico, sendo que o Domínio 2 abriga o C-terminal. A Figura 10A, B e C mostra as configurações estruturais inicial (início da DM), final (última da DM) e a sobreposição dessas estruturas. Nota-se nitidamente houve mudanças na estrutura secundária, perda de algumas hélices do lado esquerdo do Monômero (Domínio 1) e ampliação de folhas- β (indicadas pelas

setas). Também chama atenção uma estrutura em Laço que está localizada perpendicularmente em relação a estrutura do Monômero e denominado Alça1. Esse Laço está localizado bem acima da região do sítio catalítico.

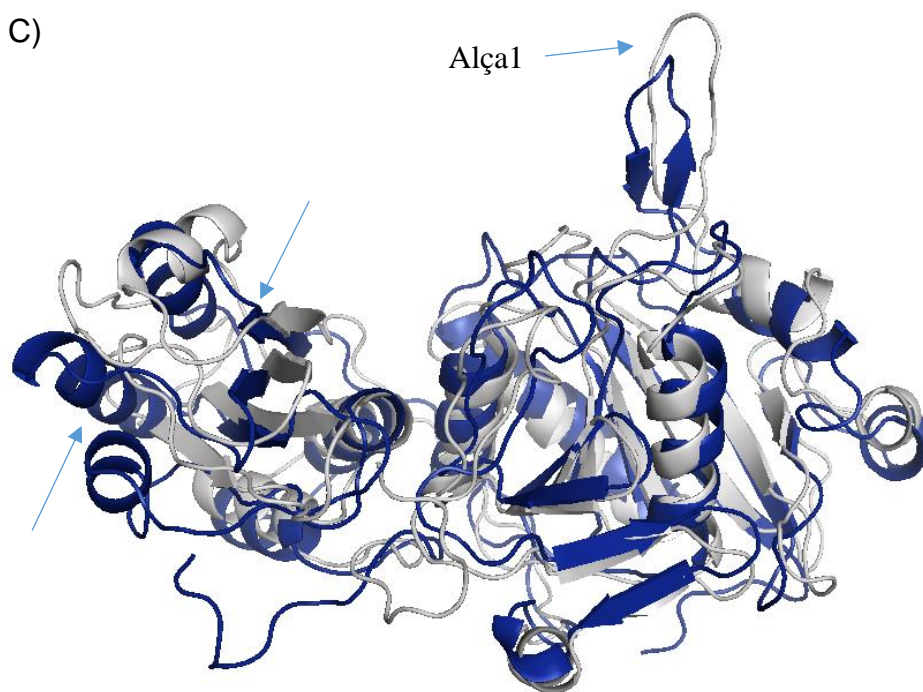
Figura 10 - A) Representação em fita da estrutura inicial do Monômero de hASNase1, os domínios 1 e 2 estão indicados, B) Configuração final de Monômero de hASNase1 com prolongamentos de folha β . C) Estruturas sobrepostas do Monômero de hASNase1 inicial (em azul) e final (em cinza), com indicação da Alça1.



B)



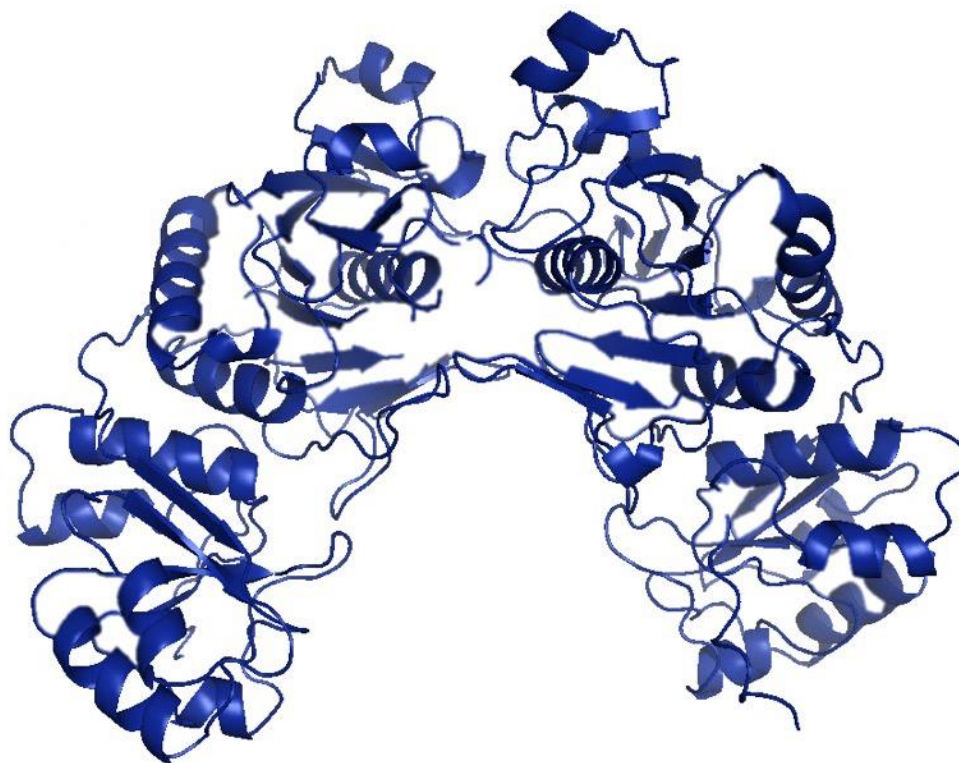
C)



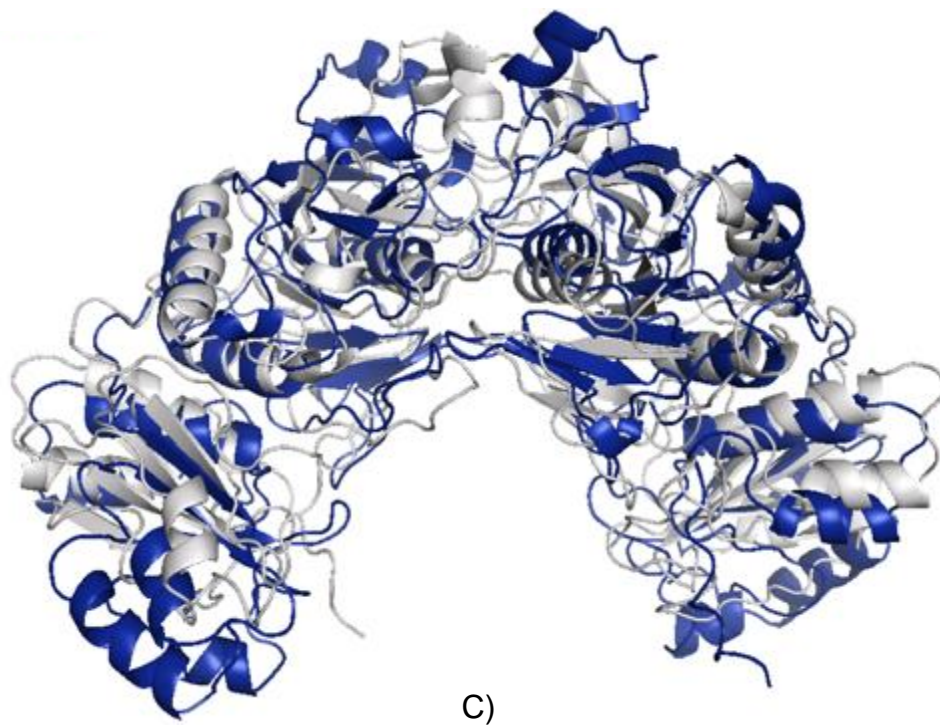
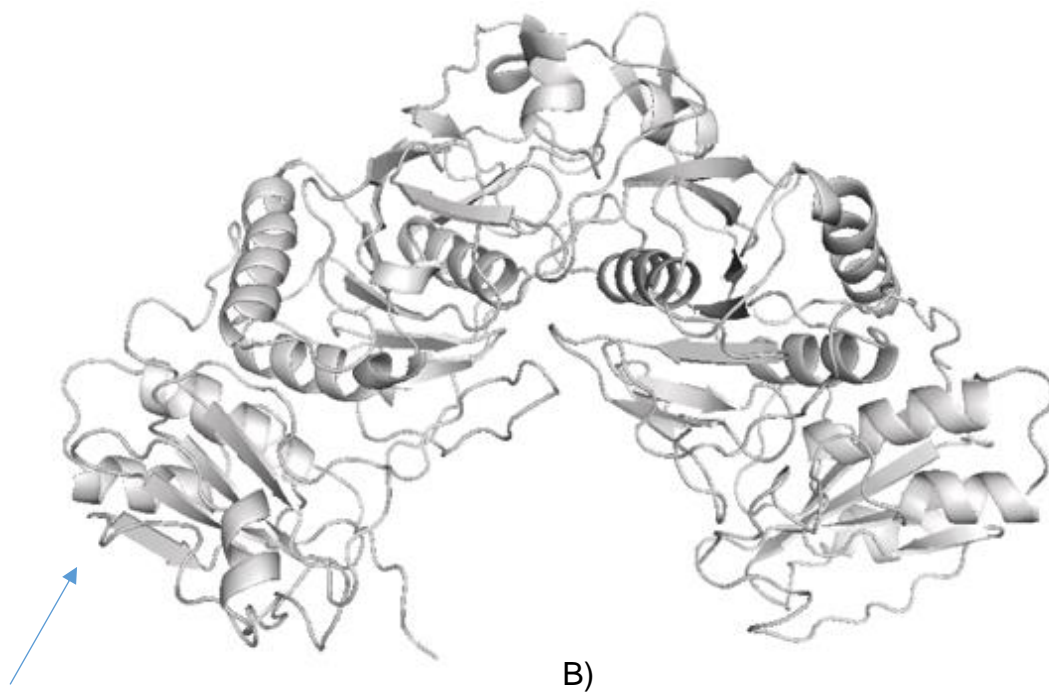
Fonte: O autor.

A estrutura do Dímero alcança a equilíbrio em torno de 50 ns de simulação e após esse momento possui RMSD de $0,61 \pm 0,03$ nm, como mostrado na Figura 12B. Nota-se que a modificação estrutural ocorrida é muito em função de aumento da interface entre os monômeros, observando as Figuras 11A e B. As mudanças estruturais no Domínio 2, observadas para o monômero, também são vistas na estrutura em Dímero, tornando-se bem evidentes na sobreposição, representada na Figura 11C. O par de monômeros simulados foi o A - B, e neles a interface do Dímero é formada pelos Domínios 1 dos Monômeros, que inclui contatos da Alça1 de um dos monômero com o outro monômero (dados não mostrados). No Dímero a Alça1 está com conformação mais fechada que no Monômero.

Figura 11 - A) Representação em fita da estrutura inicial do Dímero de hASNase1. B) Configuração final de Dímero de hASNase1. C) Estruturas do Dímero de hASNase1 sobrepostas inicial (em azul) e final (em cinza).

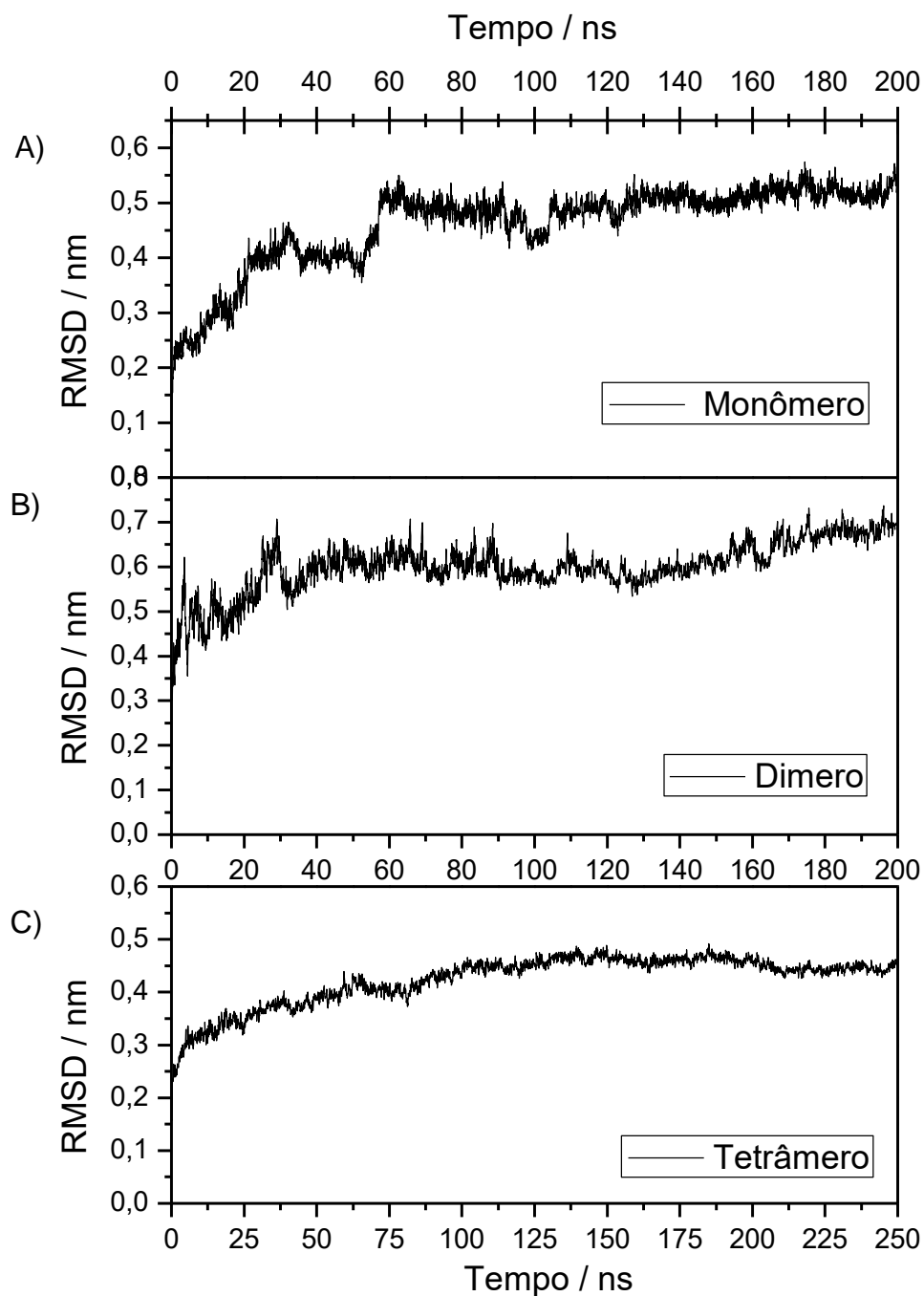


A)



Fonte: O autor.

Figura 12 - Curva de RMSD entre as configurações estruturais da hASNase1 em água, ao longo do tempo de simulação, comparadas com a estrutura de referência inicial, para A) Monômero, B) Dímero e C) Tetrâmero.



Fonte: O autor.

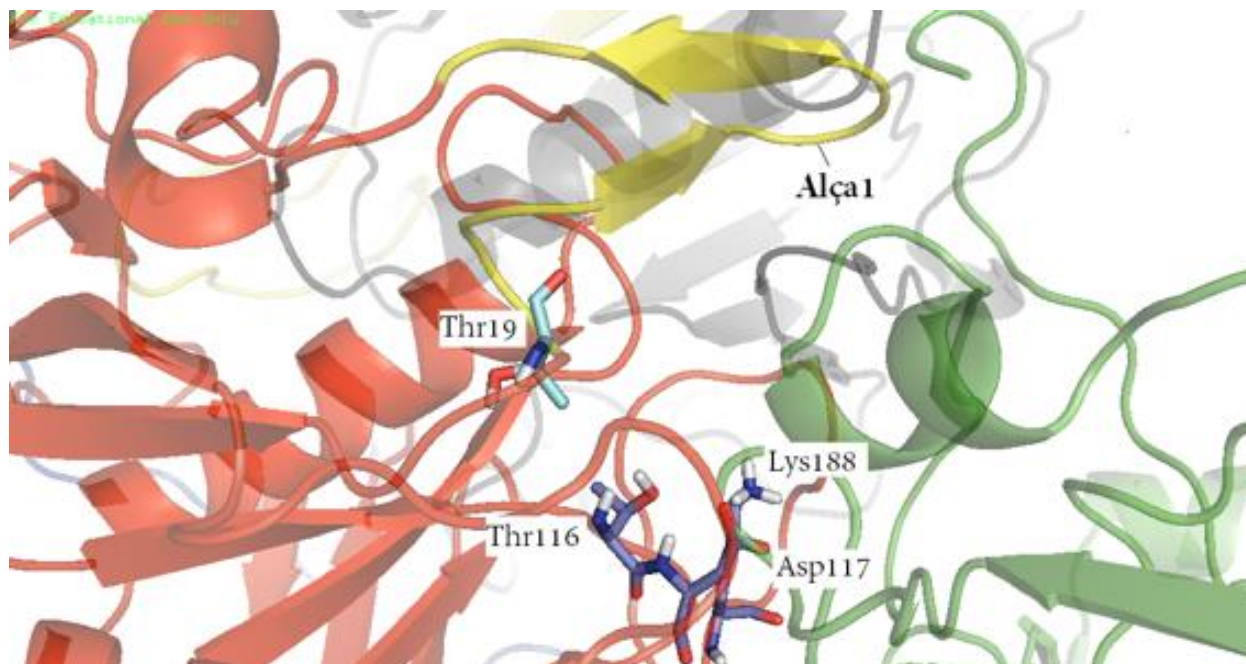
Tabela 6 - Médias e desvios de RMSD calculados para as estruturas de hASNase1, após atingir *teq*.

Estrutura	Sistema	RMSD (nm)	<i>teq</i> (ns)
hASNase1	Monômero	0,50 ± 0,02	100
	Dímero	0,61 ± 0,03	50
	Tetrâmero	0,46 ± 0,01	200

Fonte: O autor

A estrutura do Tetrâmero em água alcançou *teq* ~ 200 ns com RMSD médio de 0,46 ± 0,01 nm. É o menor RMSD entre os obtidos para Mônomo e Dímero, isso indica a preferência pela estrutura em Tetrâmero em água da hASNase1. Nos quatro monômeros, as Alça1, diferentemente das conformações no Mônomo e no Dímero, estão orientadas lateralmente sobre os sítios catalíticos de cada um dos monômeros, definindo assim uma conformação mais fechada que a do Dímero, como mostrado na Figura 13.

Figura 13 - Representação em fita da estrutura da hASNase1, na última configuração da DM do sistema Tetrâmero, evidenciando os resíduos do sítio catalítico do monômero B (em fita e vermelho) em bastão e a Alça1 em amarelo. Os monômeros A e C que formam a interface estão em preto e verde respectivamente.



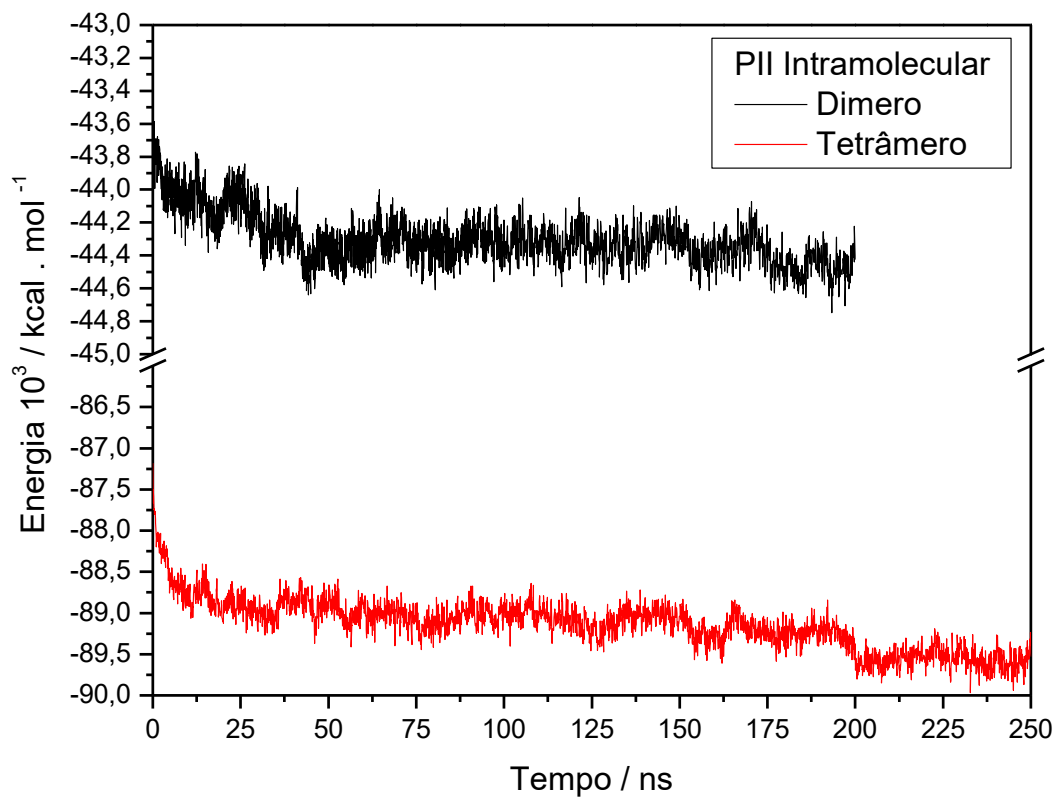
Fonte: O autor.

Os perfis de PII intramoleculares, entre todos os átomos do Dímero e Tetrâmero, são mostrados na Figura 14, e PII intermolecular, com a água, na Figura 15. Os PII médios, são apresentados na Tabela 7. Nota-se que PII entre os átomos de Dímero e Tetrâmero reduzem ao longo do tempo de DM, implicando a interação atrativa realçada ao longo do tempo. Um mínimo para essa interação é alcançado para o Dímero (~ 50 ns) e para o Tetrâmero nos últimos 50 ns de DM. Por outro lado, o PII entre as proteínas e a água mostram um aumento do potencial, o que define uma redução da interação atrativa com a água. A curva para o Monômero não foi apresentada, mas os dados de PII médio foram tabulados na Tabela 7.

O PII intramolecular médio para o Monômero foi de $(-57,34 \pm 0,07) 10^3 \text{ kcal mol}^{-1}$, e o intermolecular, com a água foi de $(6,05 \pm 0,01) 10^3 \text{ kcal mol}^{-1}$. Os PII intra e intermolecular para o Dímero são de $(-44,35 \pm 0,01) 10^3 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $(-11,71 \pm 0,02) 10^3 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectivamente, ambos configurando interações atrativas e estáveis. No

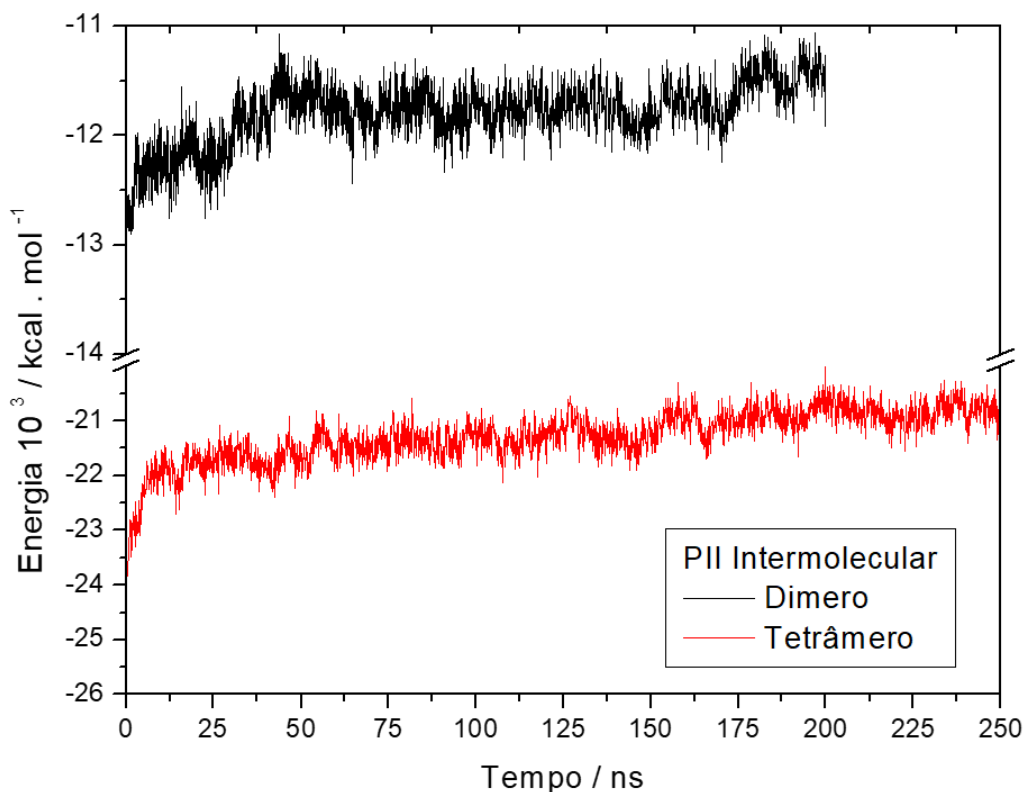
caso do Tetrâmero, o PII intra é de $(-89,56 \pm 0,01) 10^3 \text{ kcal mol}^{-1}$ e o inter de $(-20,82 \pm 0,22) 10^3 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Figura 14 - Curvas de PII intramolecular para Dímero e Tetrâmero da hASNase1 durante o tempo de DM.



Fonte: O autor.

Figura 15 - Curvas de PII intermolecular entre Dímero e Tetrâmero da hASNase1 e a água durante o tempo de DM.



Fonte: O autor.

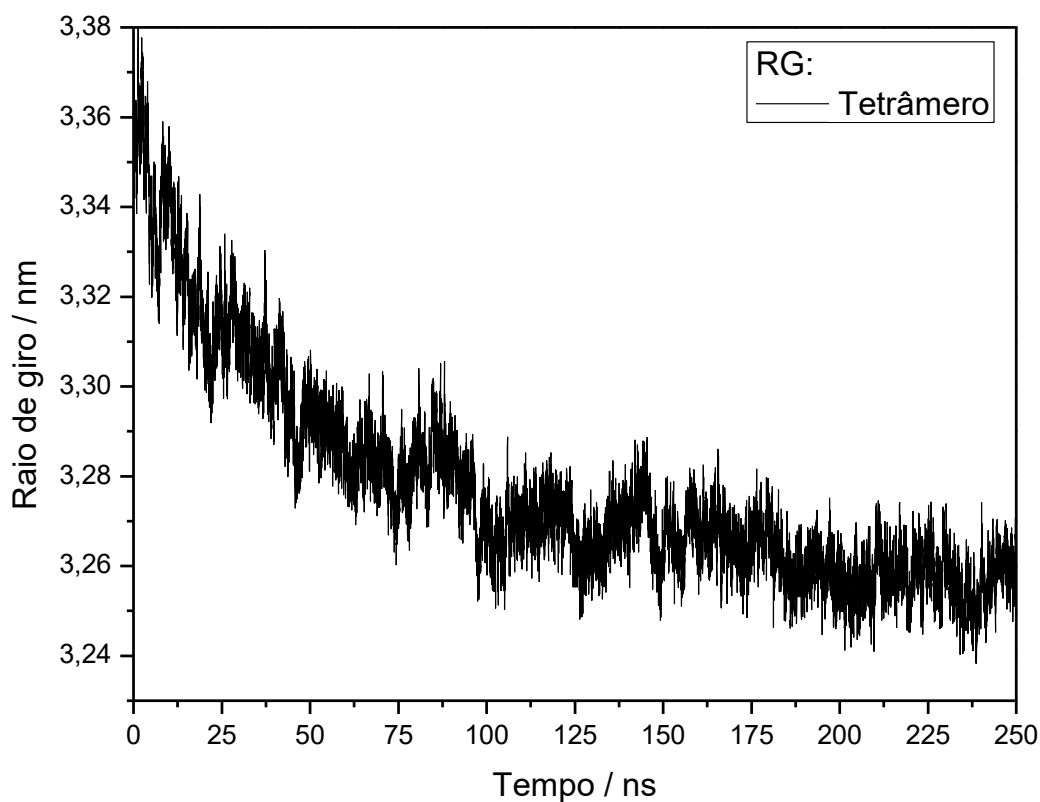
Tabela 7 - Médias e desvios dos PII da hASNase1, Intramolecular e Intermolecular após atingir teq

Sistema	Tipo de Interação	PII 10^3 (kcal mol ⁻¹)	teq (ns)
Monômero	Intramolecular	$-57,31 \pm 0,06$	100
	Intermolecular proteína-água	$-6,01 \pm 0,12$	100
Dímero	Intramolecular	$-44,35 \pm 0,01$	50
	Intermolecular proteína-água	$-11,71 \pm 0,02$	50
Tetrâmero	Intramolecular	$-89,56 \pm 0,01$	200
	Intermolecular proteína-água	$-20,82 \pm 0,02$	200

Fonte: O autor.

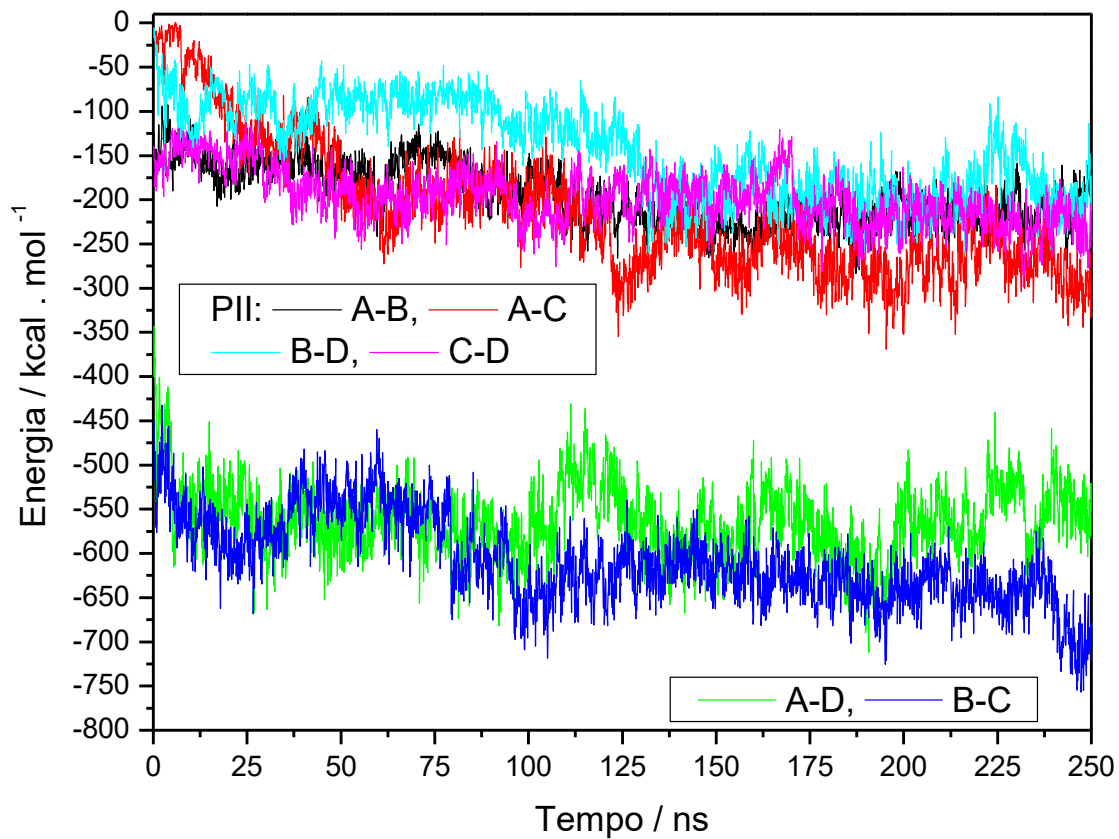
O comportamento da curva de PII intramolecular do Tetrâmero, em que a interação intramolecular atrativa é realçada ao longo da DM, indica uma aproximação entre os 4 monômeros. A Figura 16 mostra a curva de raio de giro do Tetrâmero ao longo da DM. Nota-se que raio reduz até ~ 200 ns, passando de 3,38 nm a $3,26 \pm 0,01$ nm. A Figura 18 mostra a sobreposição das estruturas inicial do Tetrâmero e final. Nota-se que a cor em azul (inicial) é predominante nas superfícies e a cor em cinza é predominante no centro (Figura 18A), indicando que os 4 monômeros, provenientes de modelagem, se aproximaram com a evolução do tempo de DM. Portanto o conjunto de dados permite concluir que a partir da estrutura de início, usando os monômeros modelados, ocorreu uma atração entre os monômeros, para a formação das interfaces, reduzindo o raio de giro da estrutura, tornando-a mais compacta no decorrer da simulação.

Figura 16 - Raio de giro calculado para a estrutura de tetrâmero de hASNase1 ao longo da simulação.



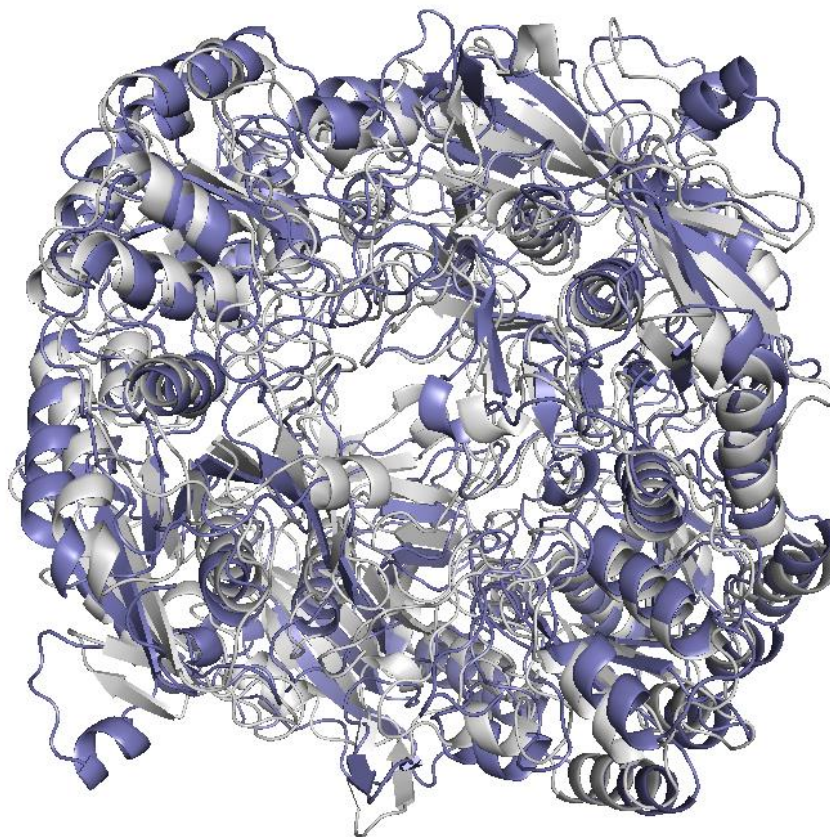
Fonte: O autor.

Figura 17 - Curva do PII intramolecular entre os pares de monômeros A, B, C e D na estrutura de Tetrâmero da hASNase1 ao longo do tempo de simulação.

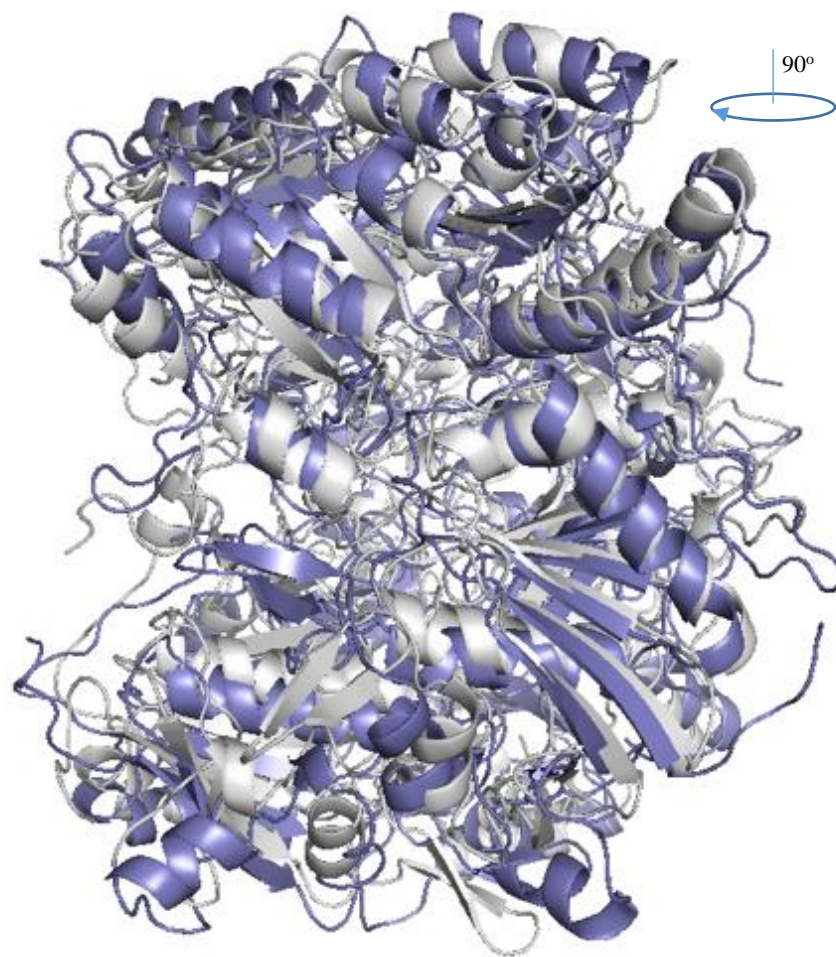


Fonte: O autor.

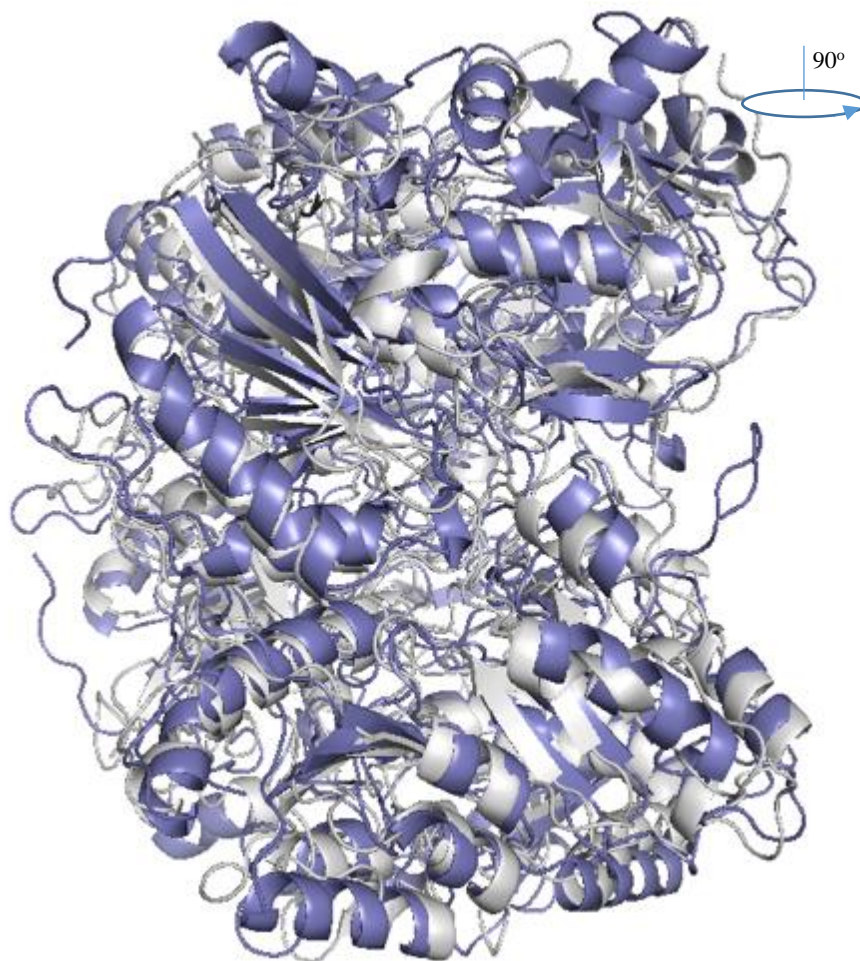
Figura 18 - A) Representação em fita das estruturas do Tetrâmero de hASNase1 sobrepostas inicial (em azul) e final (em cinza). B) Estruturas sobrepostas rotacionadas 90o sentido horário. C) Estruturas sobrepostas rotacionadas 90o sentido anti-horário



A)



B)



C)

Fonte: O autor.

Os PIIs intermoleculares, entre monômeros do Tetrâmero, foram obtidos e lançados em gráfico, como mostrado na Figura 17. Nota-se que as curvas de PII entre monômeros A-D e entre B-C alcançam valores menores que para os demais pares, evidenciando que há maior atratividade entre os monômeros desses dois pares. O PII média entre A-D é de $-135,81 \pm 9,29 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $-153,36 \pm 7,38 \text{ kcal mol}^{-1}$ para entre B-C, dados apresentados na Tabela 8. Esse resultado mostra uma maior interação atrativa entre A-D e B-C e a interação atrativa entre os monômeros desses pares são menores, sugerindo que a estrutura em tetrâmero, em água, é mantida pela interação entre esses pares A-D e B-C, ou seja, a estrutura da hASNase1 é formada por dímero de dímeros.

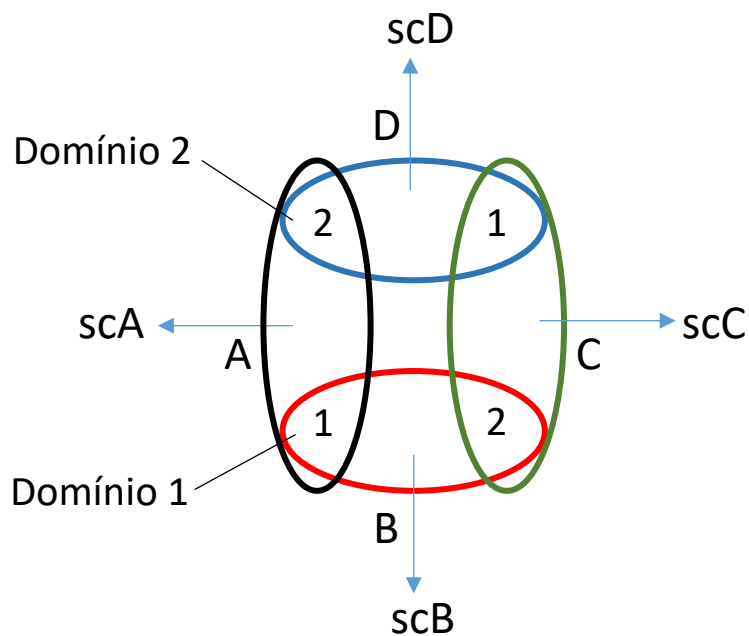
Tabela 8 - PII intermolecular inicial e médias, entre pares de monômeros A, B, C e D da hASNase1 após atingir $t_{eq} = 200$ ns.

Pares de Monômeros	PII entre monômeros (kcal mol ⁻¹)	
	Inicial (0 ns)	Após 200 ns
A - B	-130,05	- 217,70 ± 19,50
A - C	-10,31	- 269,57 ± 29,64
A - D	-397,00	- 568,23 ± 38,88
B - C	-460,52	- 641,67 ± 30,88
B - D	-11,59	- 188,06 ± 28,42
C - D	-150,28	- 212,28 ± 26,34

Fonte: O autor.

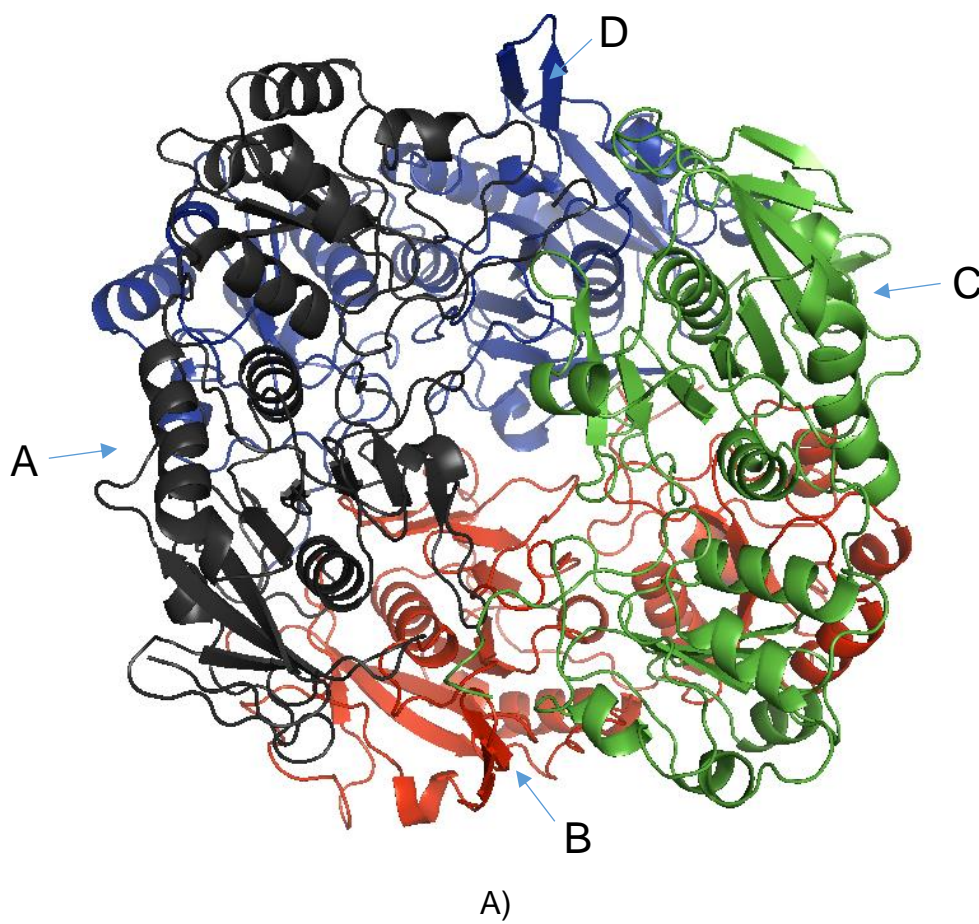
A Figura 19 mostra a representação esquemática da configuração estrutural do tetrâmero da hASNase1. Os Monômeros estão representados por cores (A – Preto, B- Vermelho, C – Verde e D – Azul). A Figura 20 representa a estrutura da hASNase1, usando a última configuração da DM em 250 ns, em fita e por monômero e em cores diferentes, associadas ao esquema da Figura 19. Observa-se que os pares de monômeros A e D estão alinhados de forma antiparalela, assim como B e C. Esses pares estão sobrepostos de forma que as extremidades que fazem contato sejam de mesmos domínios, como representado na Figura 19 e Figura 20. Dessa forma, observou-se três curvas de PII distintas de interação, para os três tipos de pares formados, como visto na Figura 17 e Tabela 8. Nota-se que os menores PII para os pares A – D (Preto e Azul) e B – C (Vermelho e Verde) estão representados pelos contatos entre os Domínios 2. Os PII para A – C são bem menores que B – D, indicando haver uma distorção na estrutura, fato que pode ser comprovado comparando os lados esquerdo e direito da estrutura representada na Figura 20B. As cores, por monômero, representadas na Figura 19 são as mesmas nas estruturas representadas nas figuras a frente, assim como representam as curvas de PII, quando indicam sítios catalíticos ou alostéricos de cada um dos monômeros.

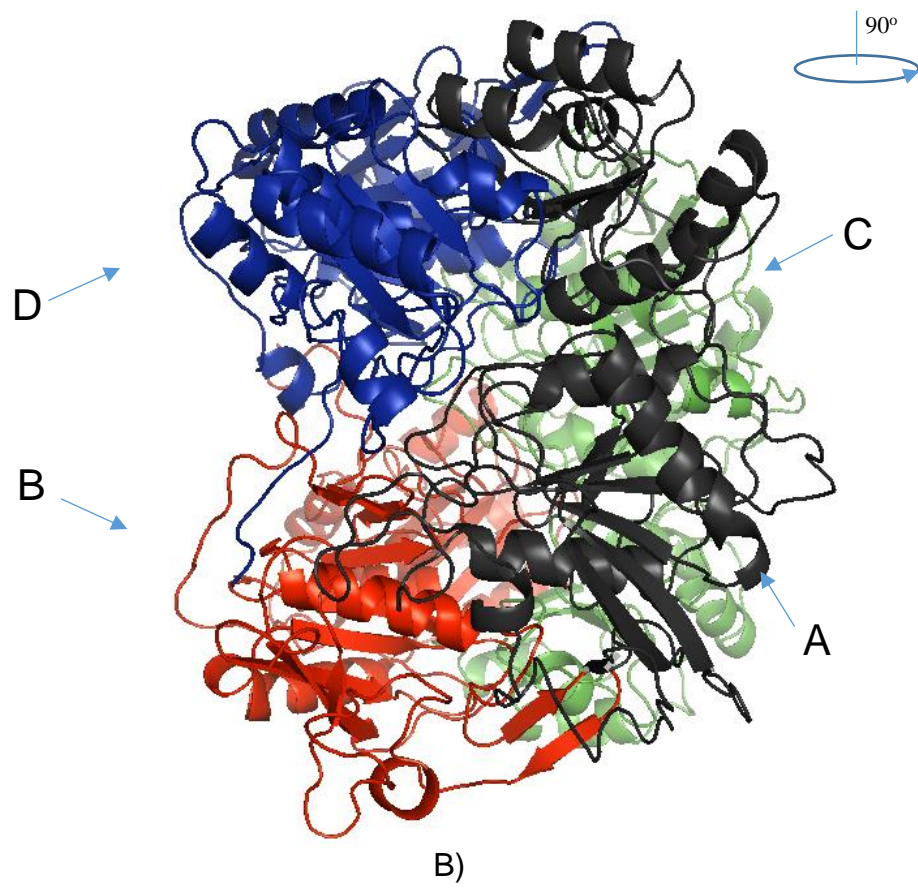
Figura 19 - Representação esquemática do Tetrâmero, válida para hASNase1 e gpASNase1, evidenciando as posições dos domínios e os contatos que cada um faz. Os monômeros A e C estão indicados como preto e verde e estão sobrepondo os monômeros B e D em cores vermelho e azul, respectivamente. A localização dos Sítios Catalíticos (sc), dos monômeros A, B, C e D são denominadas scA, scB, scC, scD.

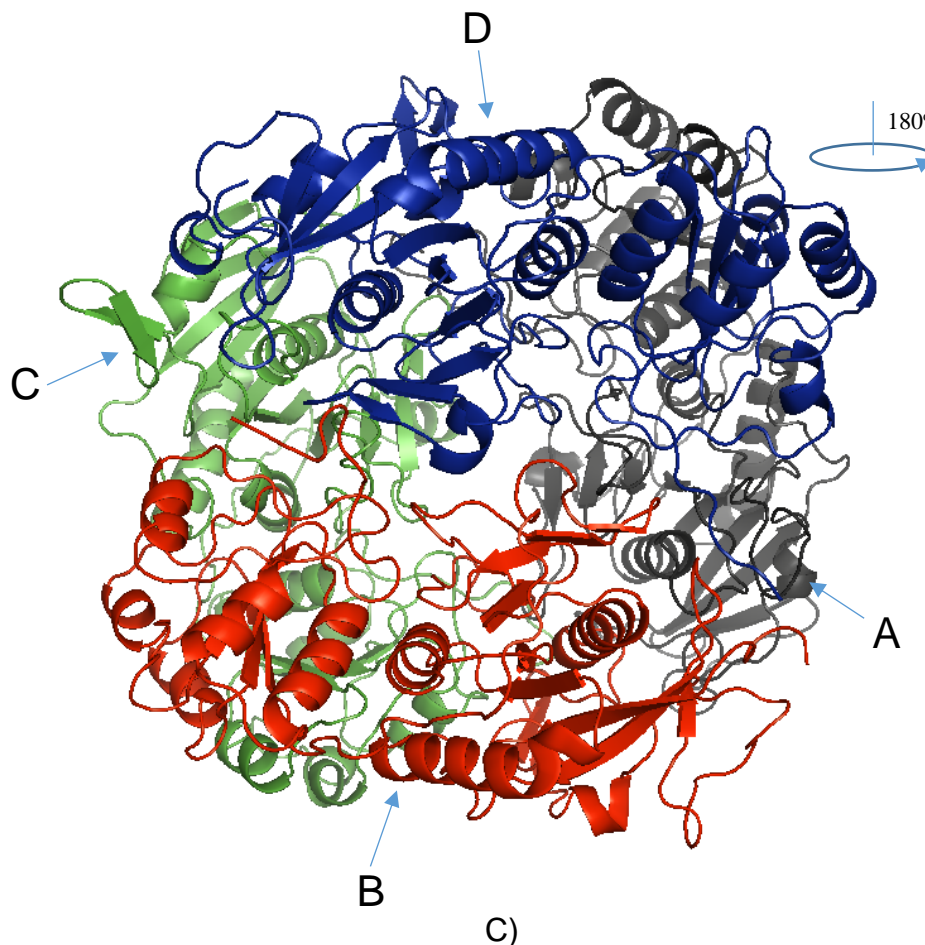


Fonte: O autor.

Figura 20 - Representação em fita da estrutura final de Tetrâmero de hASNase1. Monômero A (preto), monômero B (vermelho), monômero C (verde), monômero D (azul). A) Visualização frontal; B) Rotação 90° sentido anti-horário; C) Rotação 180° sentido anti-horário.





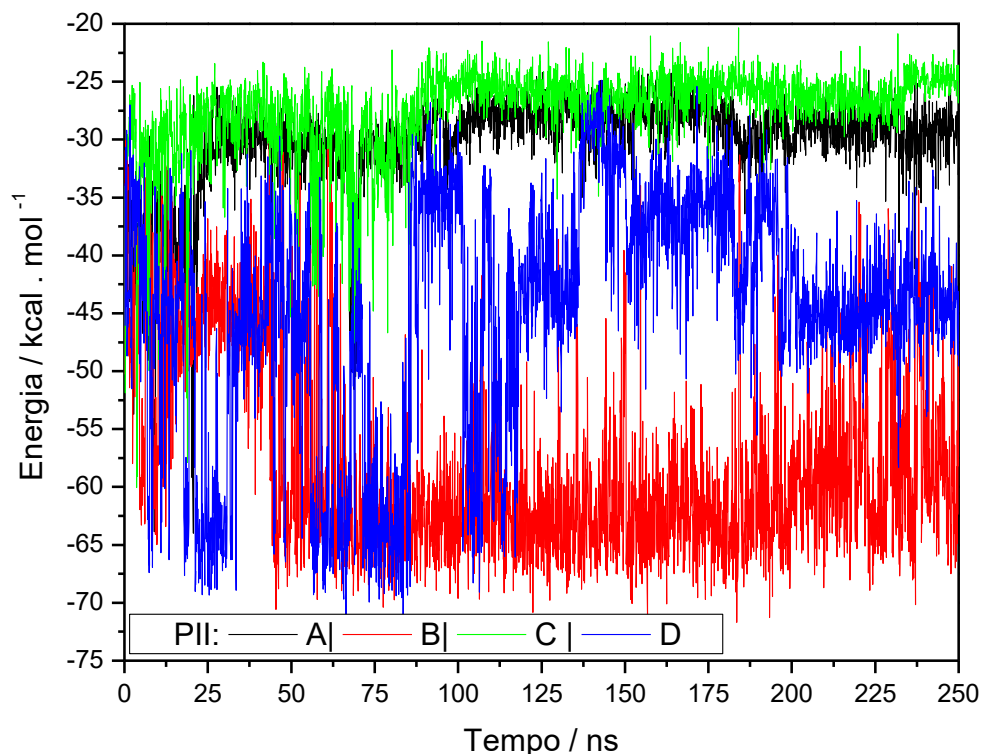


Fonte: O autor.

Os PII entre os átomos dos resíduos Thr19, Thr116, Asp117, Lys188, que formam os sítios catalíticos, dos 4 monômeros foram avaliados durante o tempo de simulação (Figura 21). Pela análise das curvas, o PII varia com amplitude aproximada de - 70 a - 25 kcal mol⁻¹ isso indica que os resíduos podem se movimentar, apresentando, assim, maior ou menor atração entre eles ao longo da DM. Nos monômeros A e C, as curvas de PII são semelhantes, a energia varia em torno de - 29,21 ± 1,87 kcal mol⁻¹ no monômero A e - 25,96 ± 1,46 kcal mol⁻¹ no monômero C (Tabela 9). Já no monômero B, esses resíduos interagem com energia mais atrativa, com PII médio de - 58,02 ± 6,28 kcal mol⁻¹. No monômero D, a interação entre os resíduos variam muito durante a DM, ~ -25 a ~ - 65 kcal mol⁻¹, representado pelo alto desvio de PII, indicando que é permitido que resíduos se movimentem bastante na região do sítio. Portanto os PII sugerem que a interação entre os resíduos do sítio em A e C são similares, assim como em B e D e

diferentes entre esses pares. Isso sugere comportamentos distintos entre os sítios na estrutura.

Figura 21 - Curvas de PII entre os resíduos de cada sítio catalítico, em cada um dos monômeros (A, B, C, D), no Tetrâmero da hASNase1, ao longo do tempo de simulação.



Fonte: O autor.

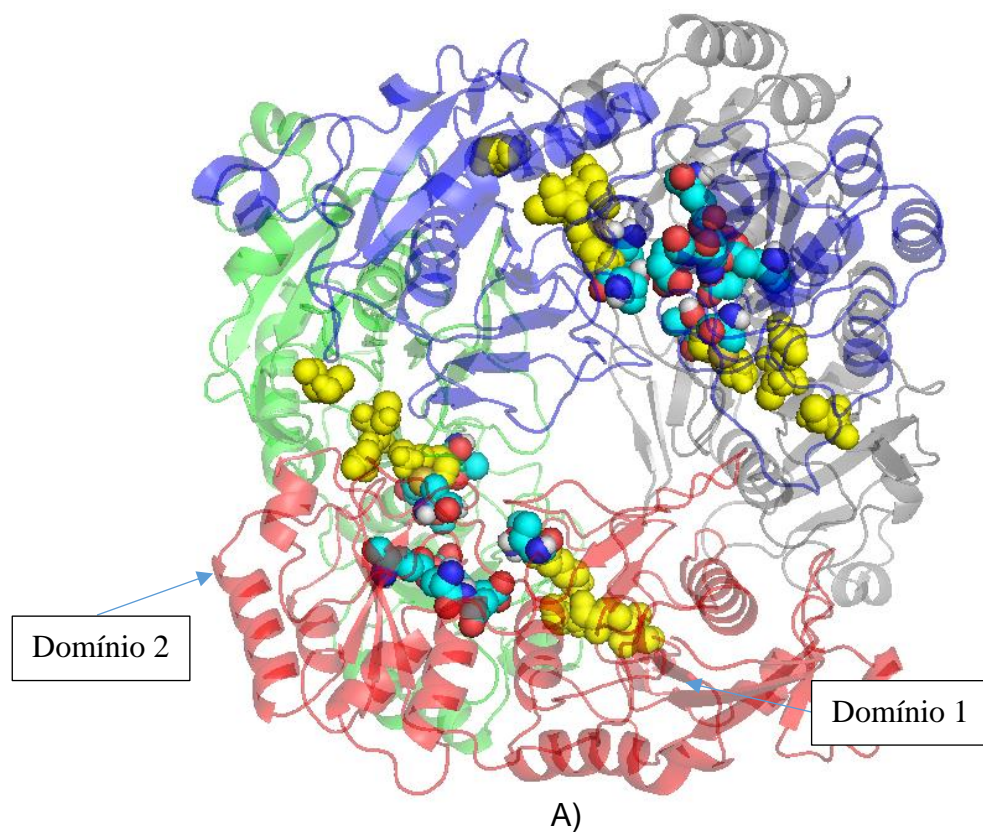
Tabela 9 - Médias e desvios observados para o PII dos resíduos Thr19, Thr116, Asp117, Lys188, em cada monômero (A, B, C, D) no Tetrâmero da hASNase1.

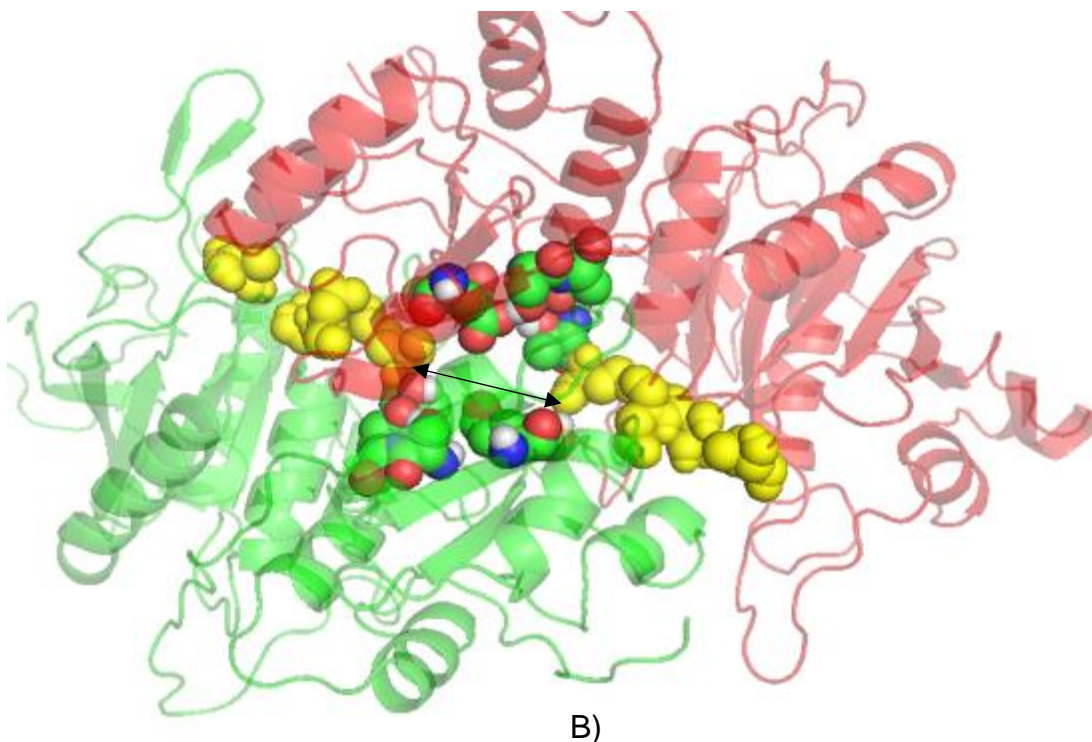
Monômeros	PII médio (kcal mol ⁻¹)	teq (ns)
A	- 29,21 ± 1,87	200
B	- 58,02 ± 6,28	200
C	- 25,96 ± 1,46	200
D	- 44,36 ± 3,24	200

Fonte: O autor.

A estrutura do Tetrâmero da hASNase1, que destaca os resíduos dos sítios catalíticos e alostéricos, é mostrada na Figura 22. O sítio alostérico fica localizado no domínio 2, na interface com o domínio 2 em cada monômero. Nota-se que os sítios alostéricos e catalíticos estão muito próximos entre pares de monômeros, no caso os pares A-D e B-C. Dessa forma, os resíduos dos sítios estão mais localizados nas regiões de interface entre domínios 1 e 2, como representado na Figura 19. Um giro de 90° dos monômeros B e C (Figura 22B) evidenciam que os sítios catalíticos estão localizados frontalmente (seta dupla em preto) de um monômero ao outro e os sítios alostéricos ficam localizados ao lado de cada um dos sítios catalíticos (acima e abaixo).

Figura 22 - Representação dos sítios catalíticos alostéricos em esferas na estrutura final de Tetrâmero de hASNase1 representada em fita. A) Os sítios catalíticos estão representados em esferas e cor amarelo e alostéricos em esferas em azul e vermelho. B) Estruturas dos monômeros B e C rotacionadas 90° e destacadas para visualização das posições relativas de sítios alostéricos e catalíticos (em amarelo o sítio catalítico e em verde os átomos de carbono dos resíduos do sítio alostérico).





Fonte: O autor.

A partir dessas análises de caracterização estrutural e energética do Tetrâmero, o estudo seguiu para analisar o comportamento da hASNase1 quando interage com a L-asparagina.

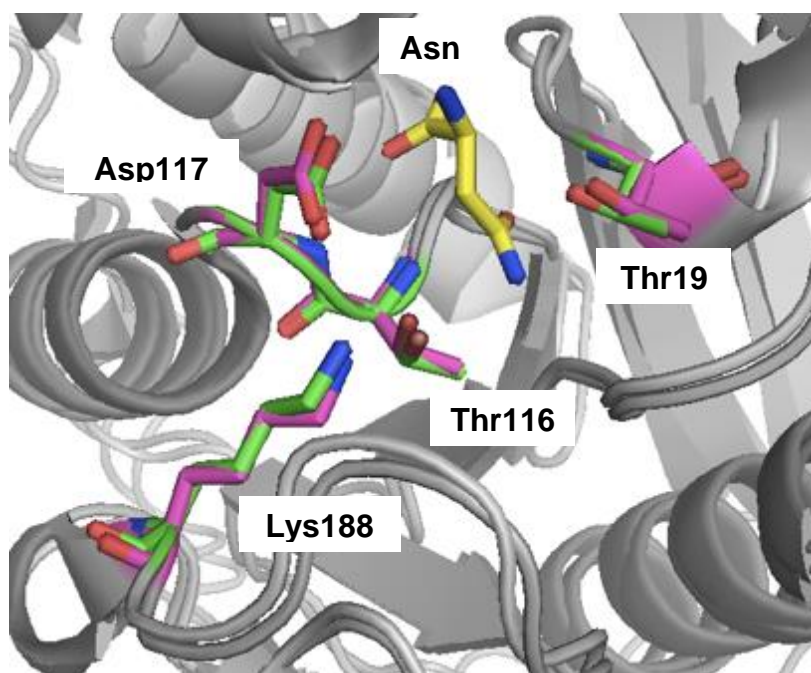
4.4 DM dos sistemas de hASNase1 com Asn nos sítios catalíticos e alostéricos

Nessa seção serão apresentados os resultados de simulação por DM da hASNase1 em três situações que definem os sistemas: hASNase1 em solução aquosa e o aminoácido Asn no sítio catalítico (ASPG-ASN-CAT), hASNase1 em solução aquosa e o aminoácido Asn no sítio alostérico (ASPG-ASN-ALO) e hASNase1 em solução aquosa e o aminoácido Asn no sítio catalítico e alostérico (ASPG-ASN-CAT-ALO).

As asparaginas foram posicionadas nos sítios através da sobreposição das cadeias laterais de resíduos de estrutura do modelo com os resíduos da estrutura que Asn foi co-cristalizada, no caso a da gpASNase1 (cód. pdb: 5DND e 4R8L), sendo que para Asn no sítio alostérico foi usado da *Ecl* (cód. pdb: 2HIM), como molde. A Figura 23 mostra a sobreposição dos resíduos do sítio catalítico, Thr19, Asp117, Lys188 da

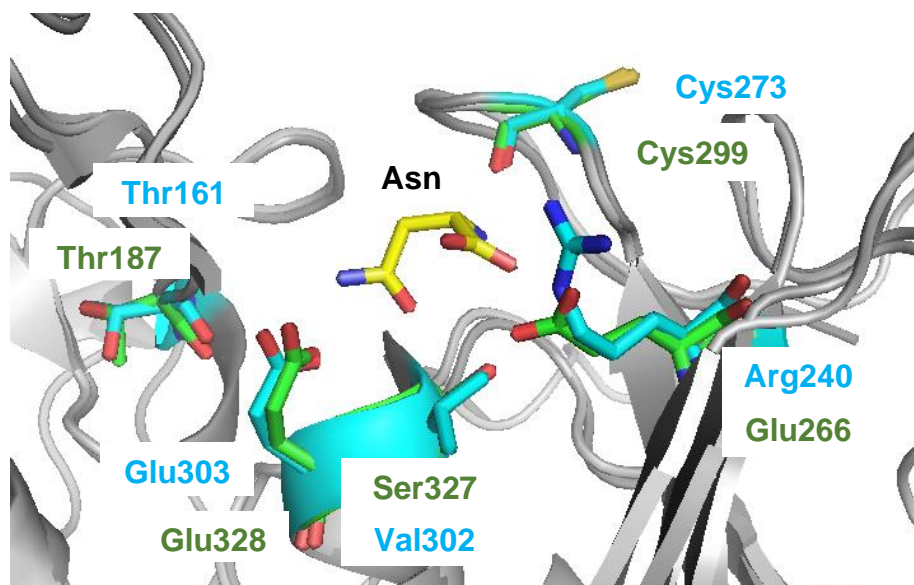
hASNase1 a da gpASNase1 (RMSD 0,03 nm), essa construção foi usada para definir os sistemas ASPG-ASN-CAT e ASPG-ASN-CAT-ALO. Na Figura 24 pode-se observar a sobreposição dos resíduos Thr187, Cys299, Glu328, do sítio alostérico da hASNase1 aos da *Ecl*, Thr161, Cys273, Glu303, (RMSD 0,04 nm), usado para definir os sistemas ASPG-ASN-ALO e ASPG-ASN-CAT-ALO.

Figura 23 - Representação dos resíduos (em bastão) do sítio catalítico da hASNase1 sobrepostos ao da gpASNase1 (cód. pdb: 5DND e 4R8L) (estrutura secundária em fita) co-cristalizada com Asn (em amarelo). RMSD da sobreposição: 0,03 nm.



Fonte: O autor.

Figura 24 - Sobreposição dos resíduos do sítio alostérico da hASNase1 (verde) no sítio catalítico da *Ecl* (azul) (cód. pdb: 2HIM) co-cristalizada com Asn (amarelo). RMSD da sobreposição: 0,04 nm



Fonte: O autor.

Os RMSD das estruturas da hASNase1 foram monitorados durante a simulação, nos três sistemas, como visto na Figura 25. As estruturas nos três sistemas alcançam equilíbrio em $t_{eq} \sim 200$ ns e permanecem estáveis até 300 ns com RMSD médio de $0,49 \pm 0,01$ nm para ASPG-ASN-CAT e para ASPG-ASN-CAT-ALO, e $0,47 \pm 0,01$ nm para ASPG-ASN-ALO (Tabela 10). Isso demonstra que a inserção de Asn nos sítios não modifica a estrutura da hASNase1, mantendo a estrutura de tetrâmero em solução aquosa.

Figura 25 - Curva de RMSD entre as configurações estruturais da hASNase1, comparadas com a estrutura de referência inicial, em cada sistema, ao longo da simulação de DM.

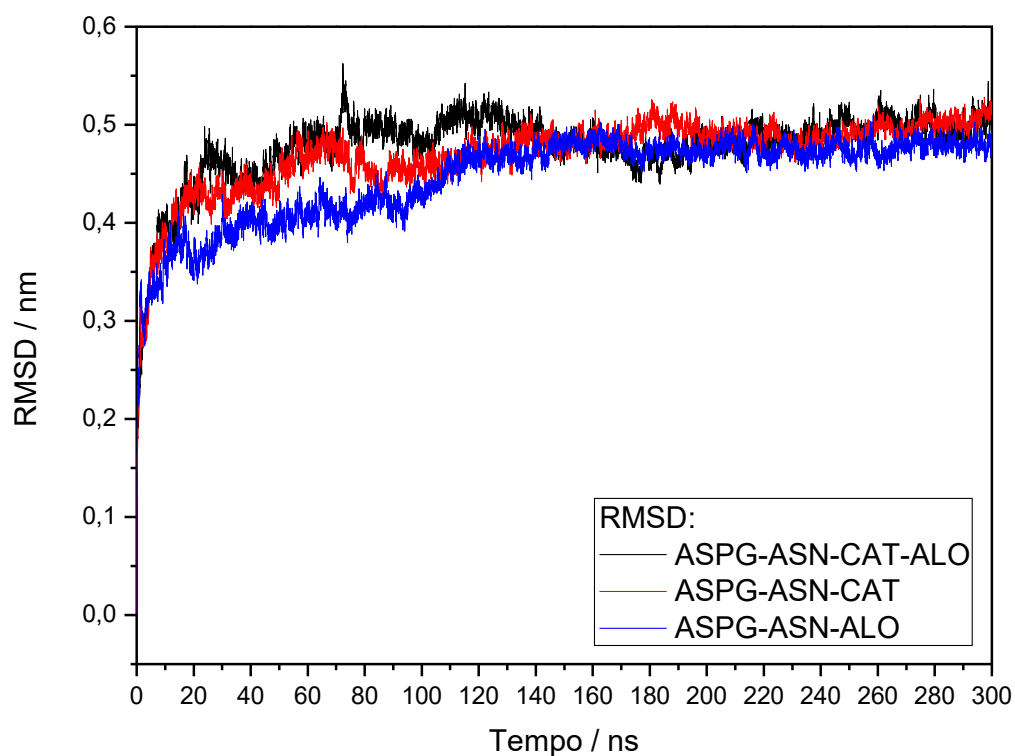


Tabela 10 - Médias e desvios de RMSD calculados para as estruturas de hASNase1 com Asn nos sítios, após atingir o teq .

Estrutura	Sistema	RMSD Médio (nm)	teq (ns)
hASNase1	ASPG-ASN-CAT	$0,49 \pm 0,01$	200
	ASPG-ASN-ALO	$0,47 \pm 0,01$	200
	ASPG-ASN-CAT-ALO	$0,49 \pm 0,01$	200

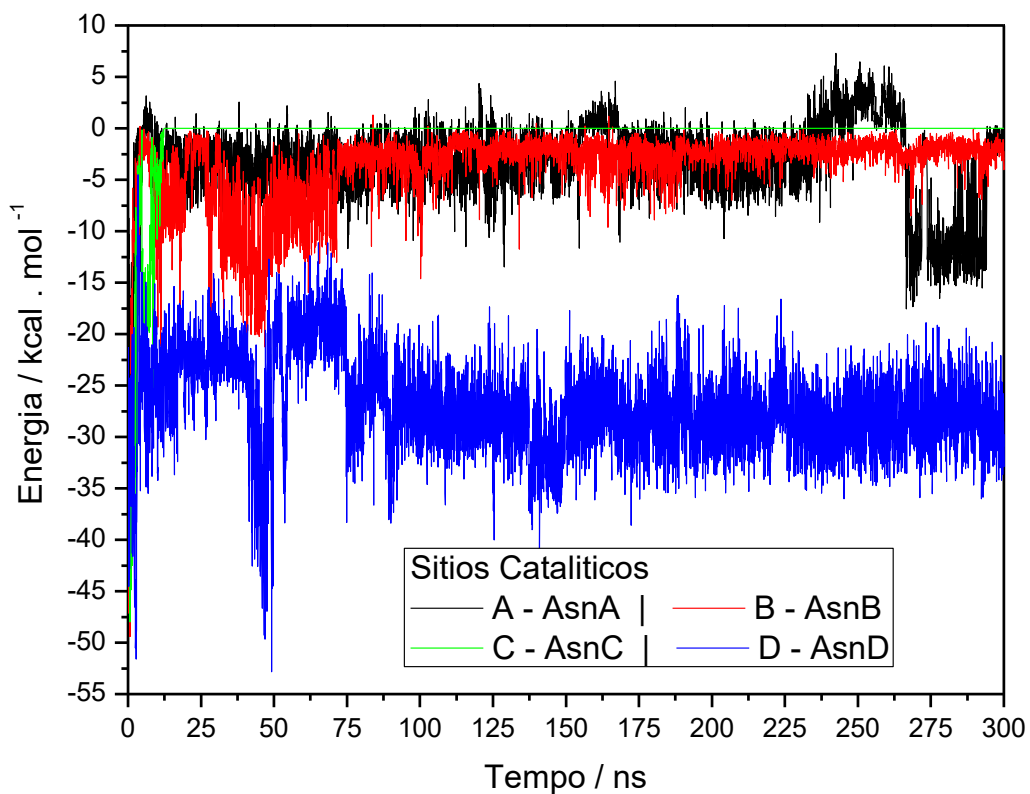
Fonte: O autor

4.4.1 PII entre os sítios catalíticos e a Asn inserida no sítio, no sistema ASPG-ASN-CAT

Os PII entre sítios catalíticos (Thr19, Thr116, Asp117, Lys188) e Asn de cada monômero (A, B, C, D) foram monitorados durante o tempo de DM e lançados em gráfico, como demonstrado na Figura 26. Percebe-se que, em torno de 1 ns de simulação as curvas de PII para as Asn, nos sítios A, B e C, oscilam próximo de zero, sendo que a Asn no Sítio C se torna nula após 12 ns, inferindo que ela deixou o sítio. Os PII indicam que as AsnA e AsnB podem ficar próximas aos sítios A e B, mas não estão localizadas nos sítios. Ao contrário dos outros sítios, a Asn no sítioD possui baixo PII até o final da simulação, com uma interação atrativa proeminente, chegando a $\sim -52 \text{ kcal mol}^{-1}$, e isso indica inserção no sítio, dados de PII médio estão na Tabela 11.

A Figura 27 mostra a representação do sítio catalítico do monômero A, em diferentes tempos, 4, 8 e 28 ns. Nota-se que a Asn está próxima ao sítio, mas não está situada entre os resíduos Thr19 e Thr116. Dessa forma, mesmo apresentando energia atrativa (como mostrado na Figura 26), a Asn não está inserida no sítio. Isso também ocorre na Asn no sítio B. Já na Figura 28, observa-se os sítios catalíticos no monômero D, nos tempos 4, 8, 28 e 156 ns. Nesse monômero, a Asn permaneceu no sítio durante todo o tempo de simulação e o PII apresentou energia proeminente atrativa, chegando a $-52,81 \text{ kcal mol}^{-1}$ (PII em 50 ns Figura 26). Para que a interação entre Asn e resíduos do sítio catalítico seja efetiva, a Asn precisa estar em orientação apropriada, como no caso da representação na Figura 28A e B, estando entre Thr19 e Thr116 e orientada horizontalmente, nesse caso foi observado PII $\sim -30 \text{ kcal mol}^{-1}$ ou menores. Quando está entre esses sítios, mas na vertical, os PII são $\sim -25 \text{ kcal mol}^{-1}$ como observado na curva de PII (Figura 26 e Figura 28C e D). Na situação em que a Asn está fora do sítio, mas nas adjacências, os PII estão acima de $-20 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Figura 26 - Curvas de PII entre os sítios catalíticos nos monômeros (A, B, C, D) e a Asn residente nos sítios, no sistema ASPG-ASN-CAT, durante toda a simulação.



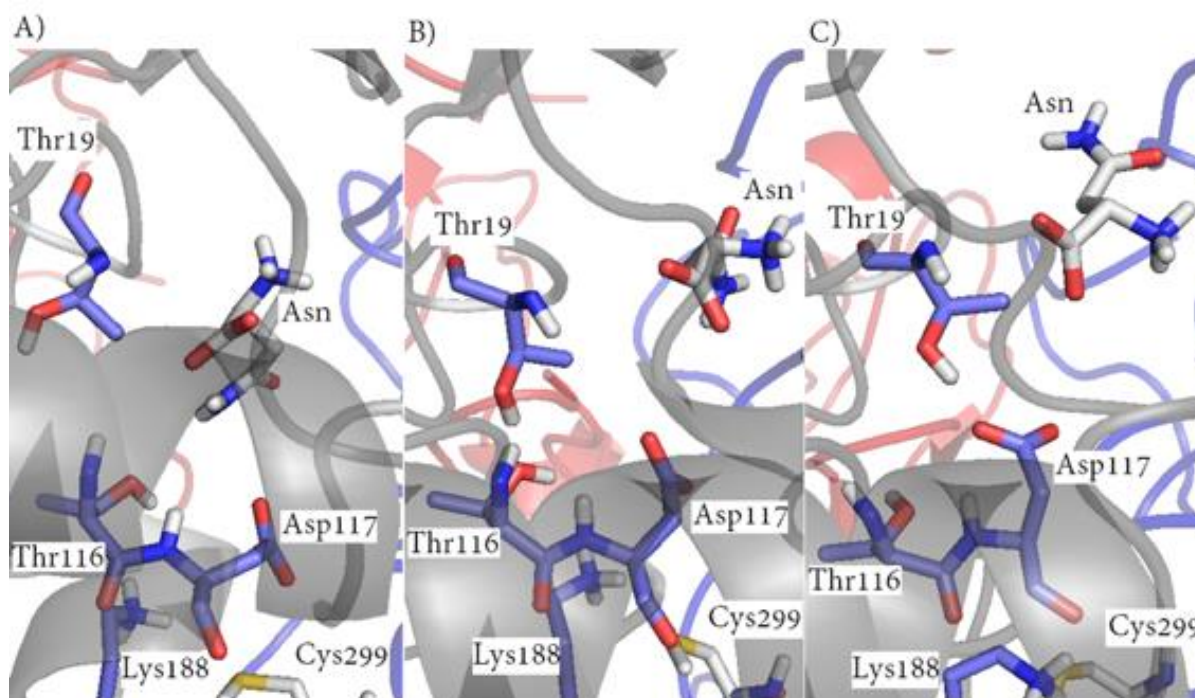
Fonte: O autor.

Tabela 11 - PII Médio entre os sítios catalíticos dos monômeros (A, B, C e D) e as Asn nos sítios residentes nesses monômeros, no sistema ASPG-ASN-CAT, durante o tempo de residência no sítio

Sítios-Asn(sítios)	PII mínimo (kcal.mol ⁻¹)	PII médio (kcal.mol ⁻¹)	Tempo de Residência (ns)
A - AsnA	-31,83	-19,05 ± 6,64	1
B - AsnB	-49,38	-39,62 ± 4,93	1
C - AsnC	-47,97	-38,33 ± 4,83	1
D - AsnD	-52,81	-27,07 ± 4,69	300

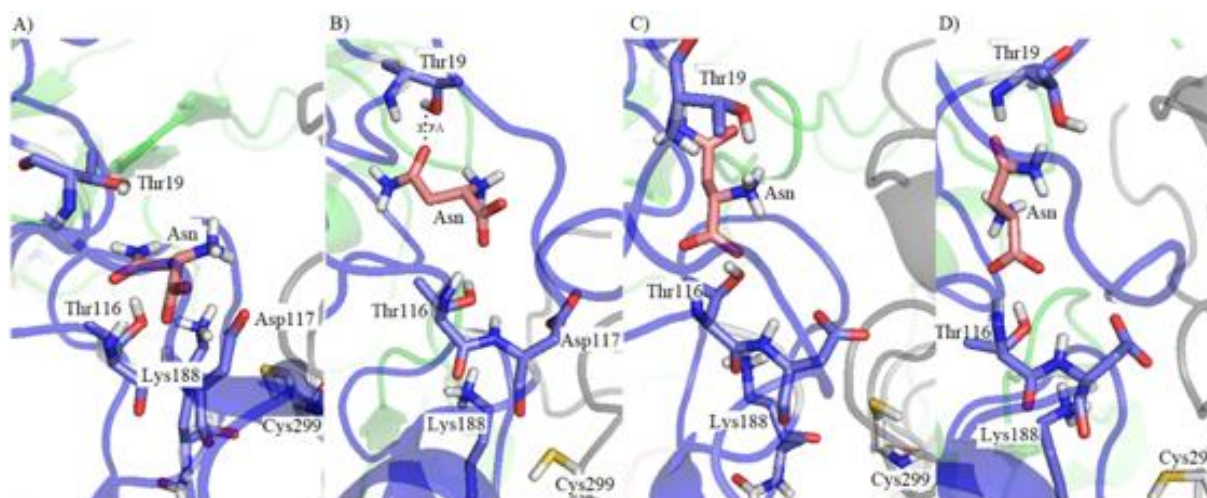
Fonte: O autor.

Figura 27 - Representação em bastão do sítio catalítico do monômero A, na estrutura secundária representada em fita, nos tempos A) 4ns, B) 8 ns e C) 28ns de DM.



Fonte: O autor.

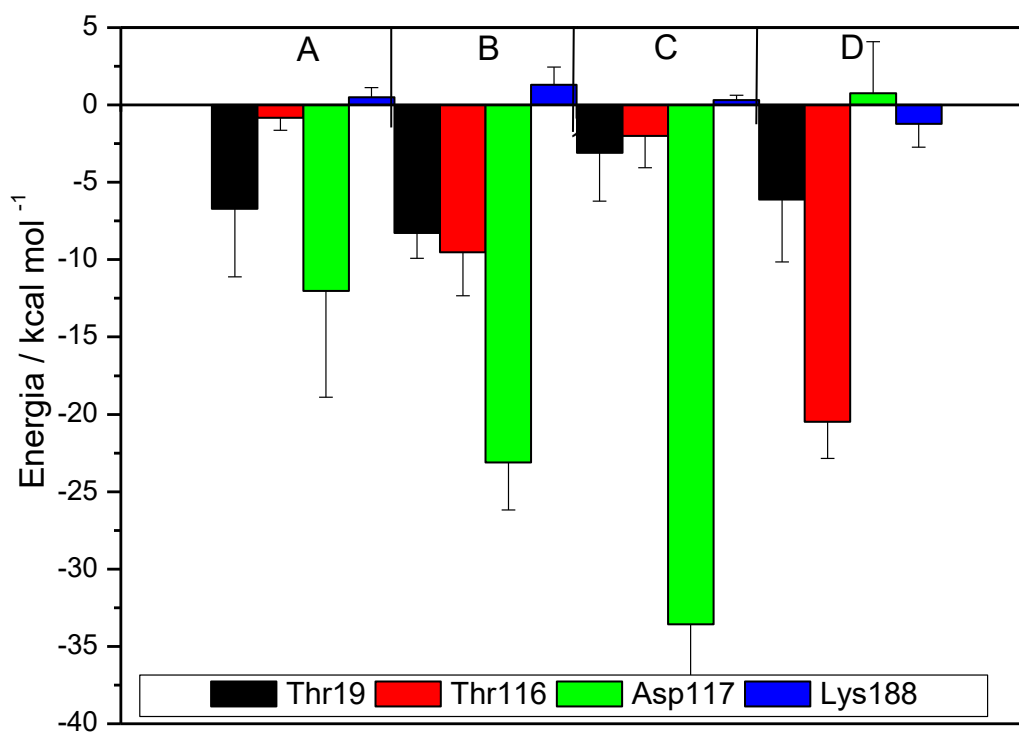
Figura 28 - Representação em bastão do sítio catalítico do monômero D, na estrutura secundária representada em fita, nos tempos A) 4ns, B) 8 ns, C) 28ns e D) 156 ns na DM.



Fonte: O autor.

A Figura 29 mostra a interação de cada resíduo do sítio catalítico com a Asn, durante o tempo em que ela esteve presente no sítio. Nota-se que os resíduos Thr19 e Asp117 são os que mais exercem atração pela Asn nos monômeros A, B e C. Entretanto, nesses monômeros, a Asn não está orientada da melhor forma para a interação (Figura 27). Já no monômero D, os resíduos que exercem maior atração são Thr19 e Thr116, além disso, nota-se que o resíduo Asp117 mostra energia positiva, ou seja, exerce pequena repulsão pela Asn. Isso se dá devido à má orientação da asparagina, quando o grupo aspartato ($-\text{COO}^-$) da Asn, orientada para baixo, (Figura 28), fica mais próximo de Asp117, causando repulsão. Nessa posição o grupo amônio da Asn ($-\text{NH}_3^+$) deveria estar orientado para a Asp117, ocorrendo uma atração, e conseqüente potencial negativo. Portanto, a única Asn que se mantém no sítio, Sítio D, nesse sistema está em conformação não apropriada para a catálise, sendo que se espera PII mais negativos para uma orientação adequada.

Figura 29 - PII médio e desvio entre os resíduos do sítio catalítico dos quatro monômeros A, B, C, e D e as Asn em cada monômero, durante o tempo de residência no sítio, no sistema ASPG-ASN-CAT.

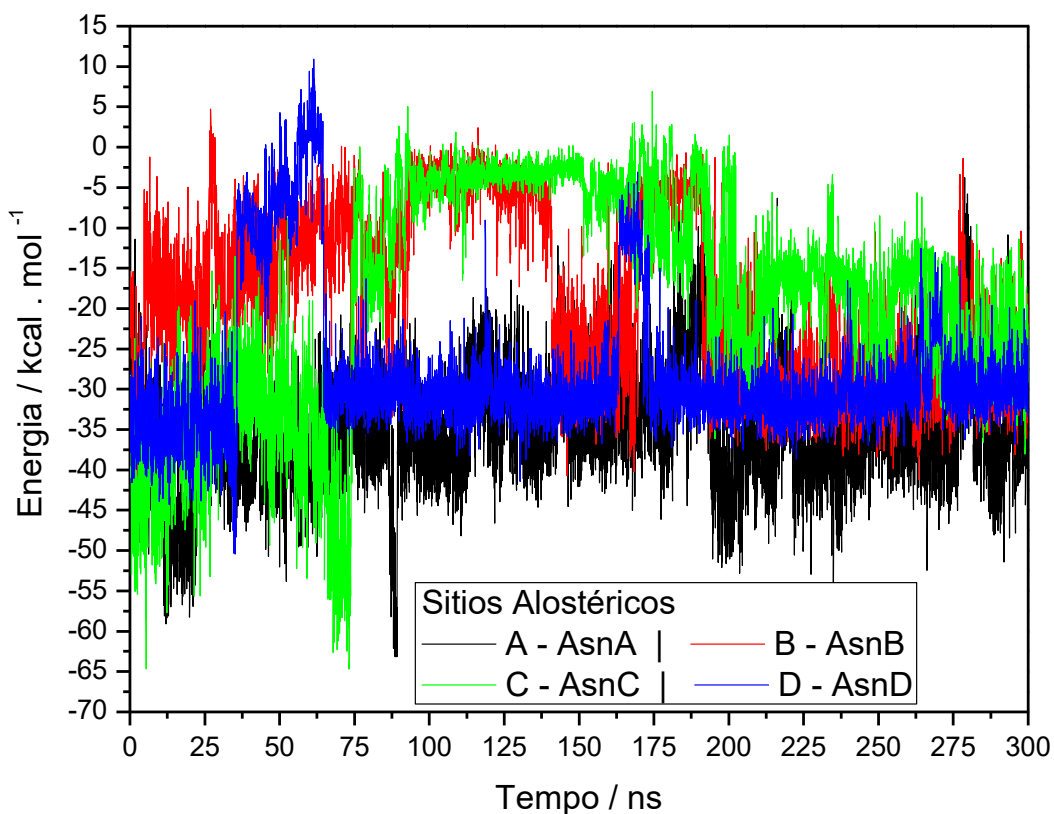


Fonte: O autor.

4.4.2 PII entre os sítios alostéricos e a Asn inserida no sítio, no sistema ASPG-ASN-ALO

O sítio alostérico é composto por (Thr187, Glu266, Ser327, Glu328, Cys299). O PII entre os sítios alostéricos, nos quatro monômeros da hASNase1, e as Asn nos quatro sítios (A, B, C, D) foi monitorado durante o tempo de simulação de DM, no sistema ASPG-ASN-ALO, como mostrado na Figura 30. As curvas mostram PII não nulo durante toda a DM, o que demonstra que as Asn permaneceram nos sítios. Os PII médios, após 200 ns foram avaliados e estão disponíveis na Tabela 12. Os PII médios variam entre ~ -20 a -35 kcal mol⁻¹, mas podem oscilar entre -65 e -20 kcal mol⁻¹ durante a DM, o que denota muita movimentação entre resíduos do sítio e Asn.

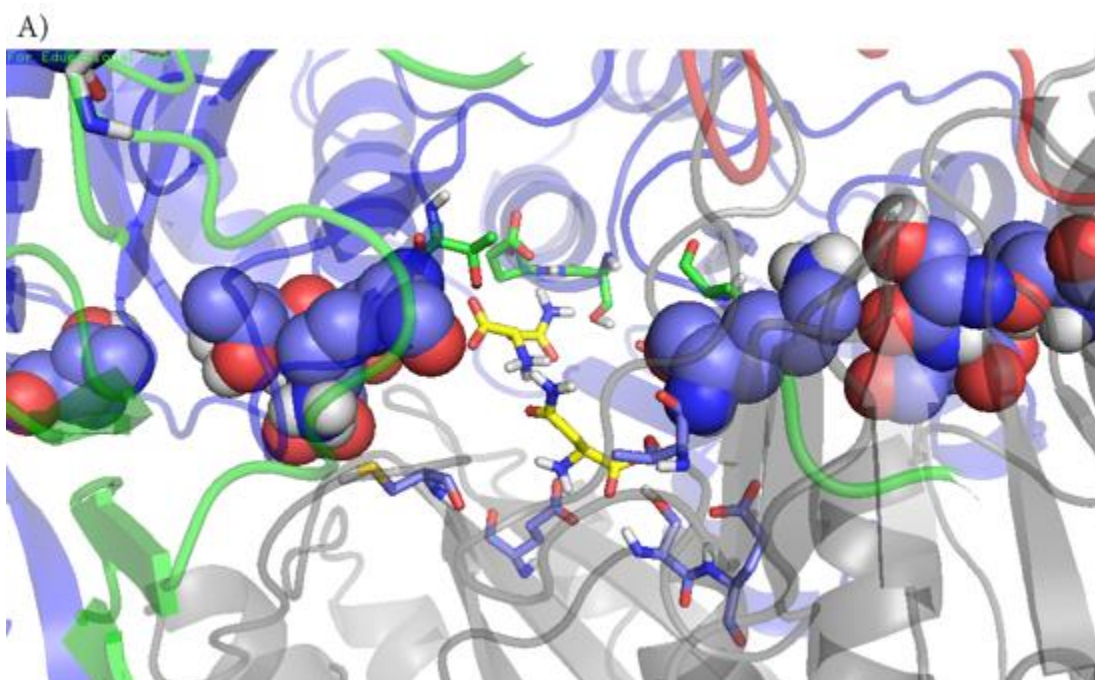
Figura 30 - Curvas de PII entre os sítios alostéricos e Asn em cada monômero (A, B, C, D), no sistema ASPG-ASN-ALO ao longo do tempo de simulação.

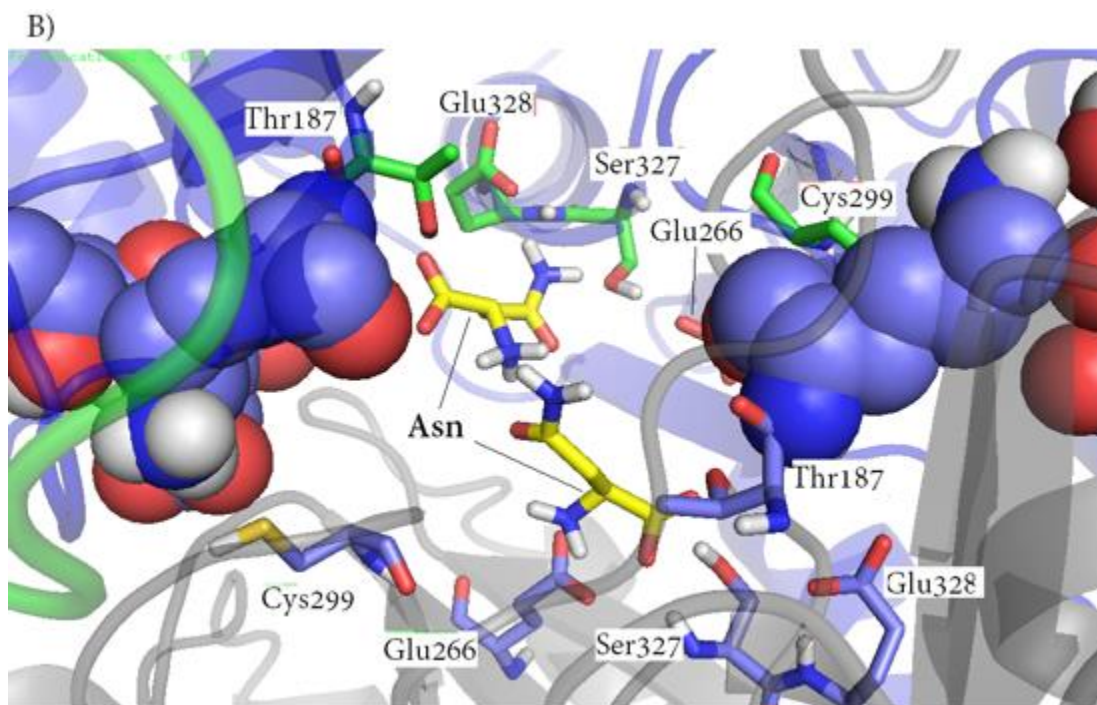


Fonte: O autor.

As Figuras 31 e 32 mostram a região aonde os pares de monômeros A-D e B-C formam interface (região de contatos entre os Domínios 2, Figura 19, seção 4.2). Nota-se a formação de uma região estruturada de dois sítios catalíticos e dois alostéricos que interagem também, indiretamente, pelas duas Asn.

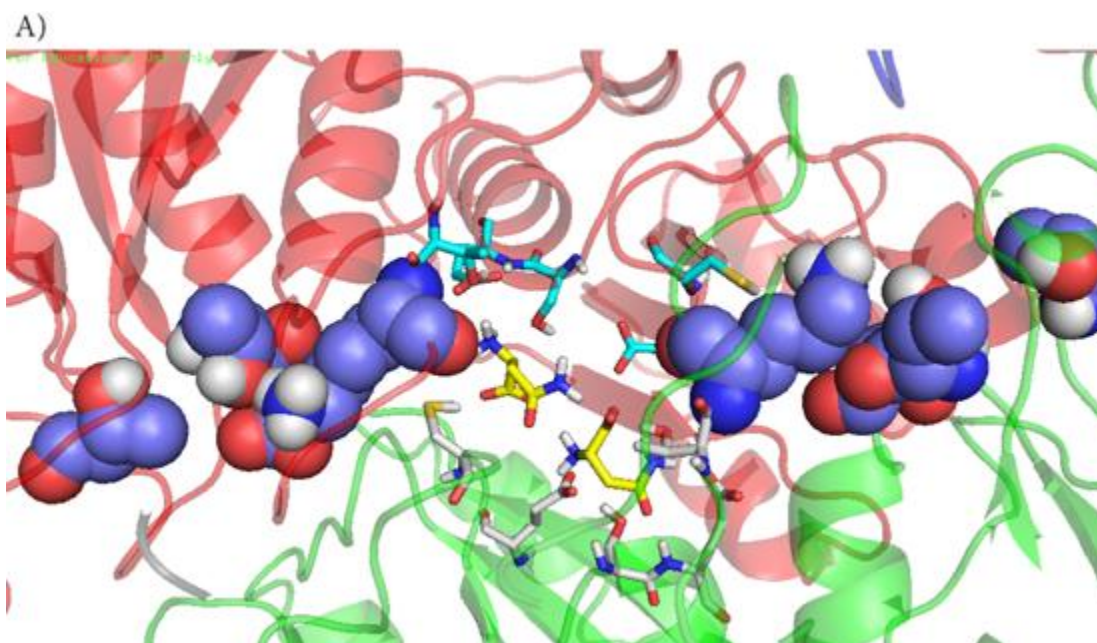
Figura 31 - Representação dos sítios alostéricos (bastão), catalíticos (esferas) e as Asn inseridas no sítio (bastão com átomos de carbono em amarelo). A) A representação do sítio catalítico do lado direito da figura corresponde ao Monômero A e do esquerdo o D, os resíduos alostéricos acima dos sítios catalíticos são referentes ao Monômero D e os abaixo são do Monômero A. No centro as duas Asn inseridas nos sítios alostérico. B) Representação ampliada, com os nomes dos resíduos do sítio catalítico e alostérico.

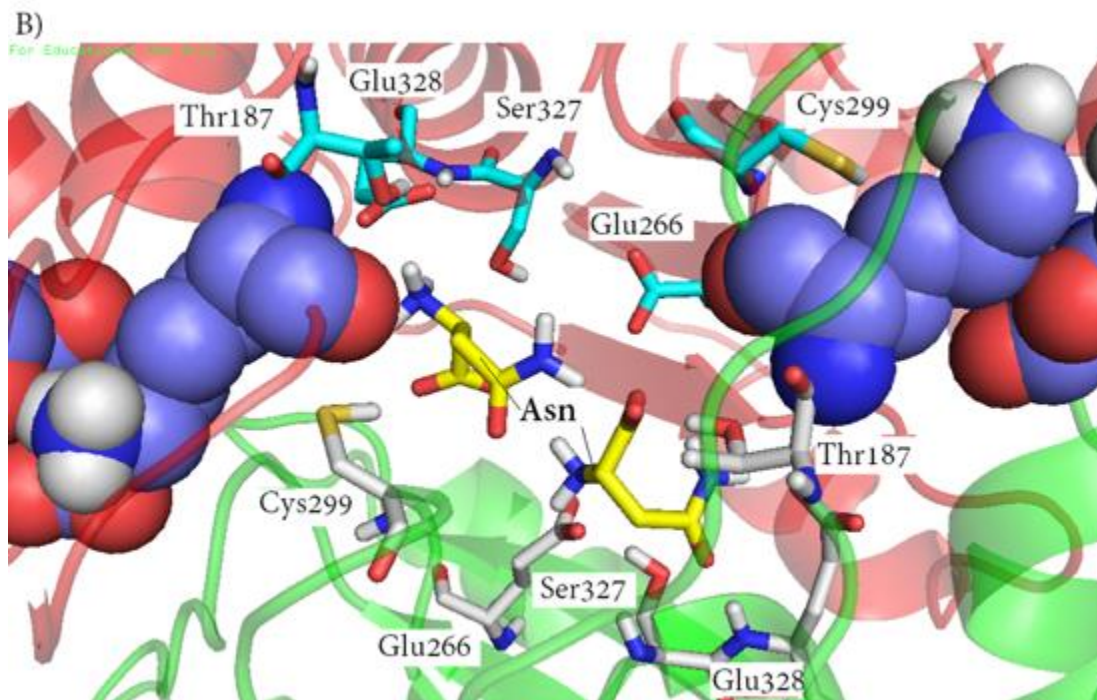




Fonte: O autor.

Figura 32 - Representação dos sítios alostéricos (bastão), catalíticos (esferas) e as Asn inseridas no sítio (bastão com átomos de carbono em amarelo). A) A representação do sítio catalítico do lado direito da figura corresponde ao Monômero B e do esquerdo o C, os resíduos alostéricos acima dos sítios catalíticos são referentes ao Monômero B e os abaixo são do Monômero D. No centro as duas Asn inseridas nos sítios alostérico. B) Representação ampliada, com os nomes dos resíduos do sítio catalítico e alostérico.



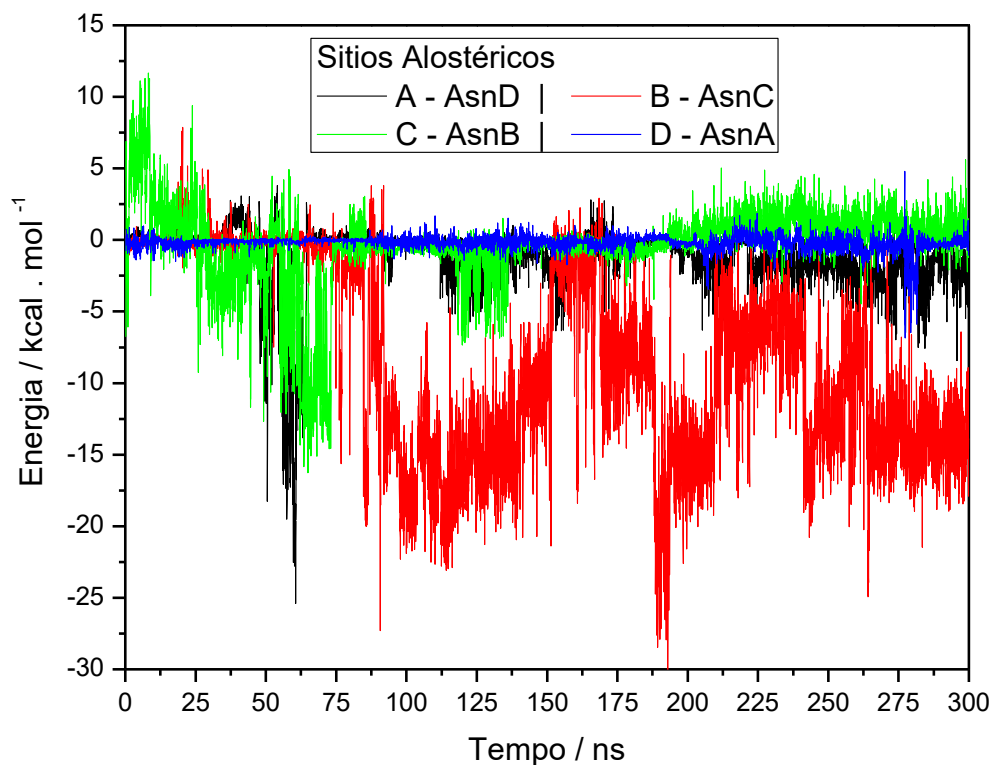


Fonte: O autor.

Devido à proximidade dos sítios alostéricos entre os monômeros A e D e entre B e C (mostrado na Figura 22 da seção 4.2), foi feita uma análise de PII entre o sítio alostérico de um determinado monômero e a Asn que está inserida no sítio alostérico vizinho, resultando nos pares: SítioA e Asn no SítioD (AsnD), SítioB e Asn no SítioC (AsnC), SítioC e Asn no SítioB (AsnB), SítioD e Asn no SítioA (AsnA). A Figura 33 mostra as curvas de PII entre esses pares, considerando a simulação do sistema ASPG-ASN-ALO. Nota-se que há interação atrativa de sítios alostéricos por Asn no sítio vizinho. O PII chega, por exemplo, no caso de SítioB-AsnC $\sim -30 \text{ kcal mol}^{-1}$. Na Tabela 12 os PII médios revelam que após 100 ns essa atratividade varia entre os pares, sendo que o PII médio para SítioB - AsnC é o menor e o que apresenta maior desvio ($-11,34 \pm 5,50 \text{ kcal mol}^{-1}$) entre os demais. As interações alternam entre atrativas e repulsivas ao longo da DM, como mostrado nas curvas presentes em regiões de PII positivo, mas que atinge PII mais expressivos na região negativa. Uma vez que cada sítio alostérico possui dois ácidos glutâmicos (Glu266 e Glu328), as Asn no sítio interagem atrativamente e repulsivamente com esses resíduos pois podem aproximar os grupos amônio e ácido aspártico alternadamente, que estão ionizados. A complexidade de interações ainda aumenta se contar que a região é composta por dois sítios e mais dois ácidos glutâmicos.

Portanto, há quatro cargas negativas de 4 ácidos glutâmicos, mais duas negativas e positivas das Asn ionizadas. Mesmo com essa alta densidade de carga nos sítios, o par de monômeros A e D mostraram que as Asn estão bem acomodadas, diferentemente de C e B que variam em PII.

Figura 33 - Curvas de PII entre os sítios alostéricos nos monômeros (A, B, C e D) e as Asn nos sítios adjacentes, no sistema ASPG-ASN-ALO ao longo do tempo de simulação.



Fonte: O autor.

Tabela 12 - Médias do PII entre os sítios alostéricos, de cada monômero (A, B, C, D), e os Asn locais e nos monômeros adjacentes, no sistema ASPG-ASN-ALO, após teq.

ASPG-ASN-ALO	Sítios – Asn(sítios)	PII médio (kcal.mol ⁻¹)
Asn locais	A - AsnA	- 35,52 ± 6,79
	B - AsnB	- 27,78 ± 5,27
	C - AsnC	- 20,09 ± 5,82
	D - AsnD	- 30,29 ± 3,38
Asn no sítio Adjacente	A - AsnD	- 1,90 ± 1,24
	B - AsnC	- 11,02 ± 4,65
	C – AsnB	0,97 ± 0,99
	D - AsnA	- 0,34 ± 0,72

Fonte: O autor.

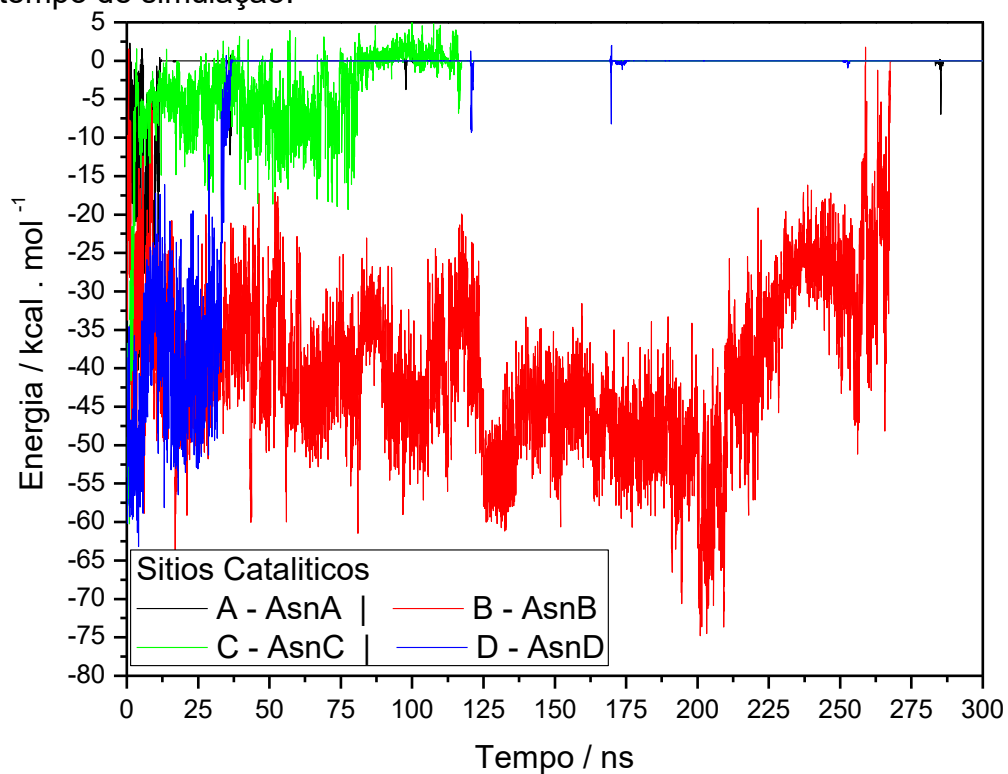
4.4.3 PII entre sítios catalíticos e alostéricos e as Asn presentes no mesmo sítio do monômero ou no adjacente, no sistema ASPG-ASN-CAT-ALO

O PII entre os sítios catalíticos e a Asn, no sistema ASPG-ASN-CAT-ALO, foi obtido ao longo da DM e as curvas resultantes são apresentadas na Figura 34. Percebe-se que todos os PII se tornam nulos, ao longo do tempo, e quando estão interagindo com os sítios os PII são, majoritariamente, negativos, alcançando, por exemplo, no caso de SítioB-AsnB ~ 75 kcal mol⁻¹. A Asn que permaneceu mais tempo no sítio (270 ns) está localizada no SítioB. A Asn do SítioA saiu após 36 ns, e a do SítioC após 120 ns e a do SítioD após 39 ns.

Os PII médio entre Asn e sítios catalíticos estão descritos na Tabela 13. Nota-se, através dos desvios das médias e através das curvas no gráfico (Figura 34), que mesmo para AsnB que fica mais tempo no sítio o potencial flutua consideravelmente ~25 % da média. Isso implica que a AsnB tem uma movimentação intensa dentro do sítio. Os dados mostram que os potenciais mais atrativos de cada Asn, nos sítios, variam entre -

27,72 a $-74,78 \text{ kcal.mol}^{-1}$ entre os sítios. Na Figura 35 é mostrado os PII por resíduos que mostra que, para monômero A, há pouca atração da Asn para os resíduos do sítio catalítico, mesmo o tempo de residência sendo baixo, o que indica que a Asn está mal posicionada no sítio logo no início da DM. Para os demais monômeros os PII são similares, com predominância de PII atrativo Asp177 e Thr116, que são os resíduos responsáveis por promover a catalise diretamente.

Figura 34 - Curvas de PII entre os sítios catalíticos dos monômeros (A, B, C e D) e as Asn nos sítios, no sistema ASPG-ASN-CAT-ALO ao longo do tempo de simulação.



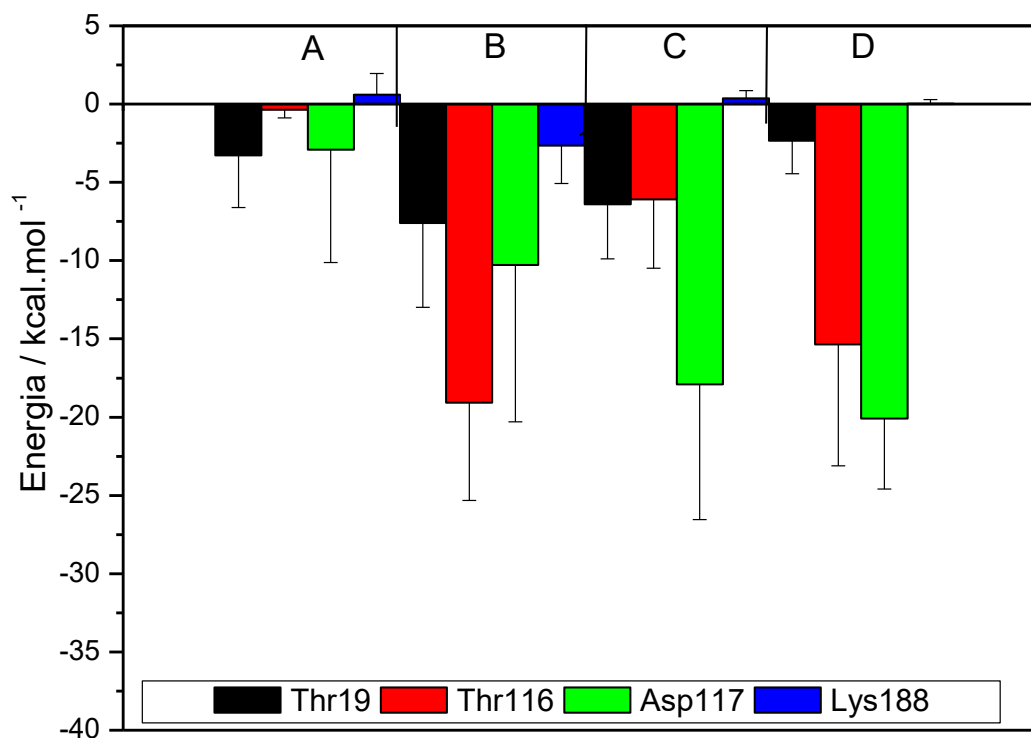
Fonte: O autor.

Tabela 13 - PII Médio entre os sítios catalíticos dos monômeros (A, B, C e D) e as Asn nos sítios residentes nesses monômeros, no sistema ASPG-ASN-CAT-ALO, durante o tempo de residência das Asn no sítio.

Sítios – Asn(sítios)	PII mínimo (kcal.mol ⁻¹)	PII médio (kcal.mol ⁻¹)	Tempo de residência (ns)
A - AsnA	-27,72	- 9,67 ± 6,97	3
B - AsnB	-74,78	- 40,29 ± 10,51	270
C - AsnC	-60,23	-33,97 ± 14,75	3
D - AsnD	-63,17	- 41,92 ± 10,68	12

Fonte: O autor.

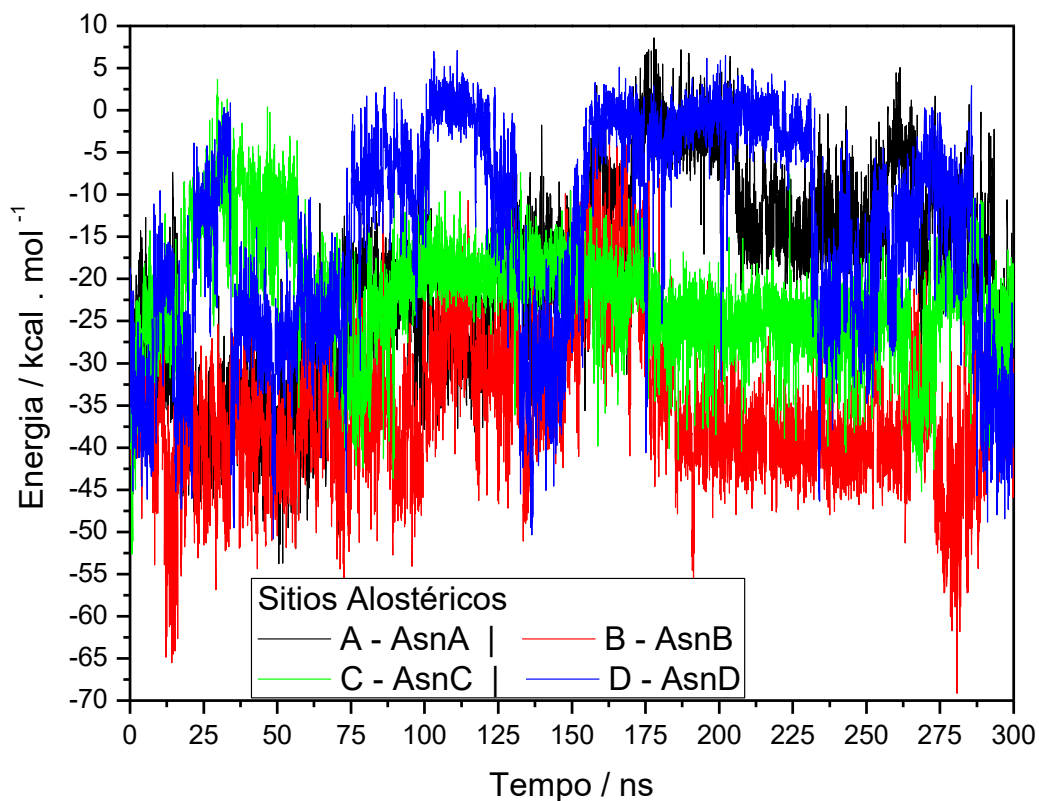
Figura 35 - PII médio e desvio entre os resíduos do sítio catalítico dos quatro monômeros A, B, C, e D e as Asn em cada monômero, durante o tempo de residência no sítio, no sistema ASPG-ASN-CAT-ALO.



Fonte: O autor.

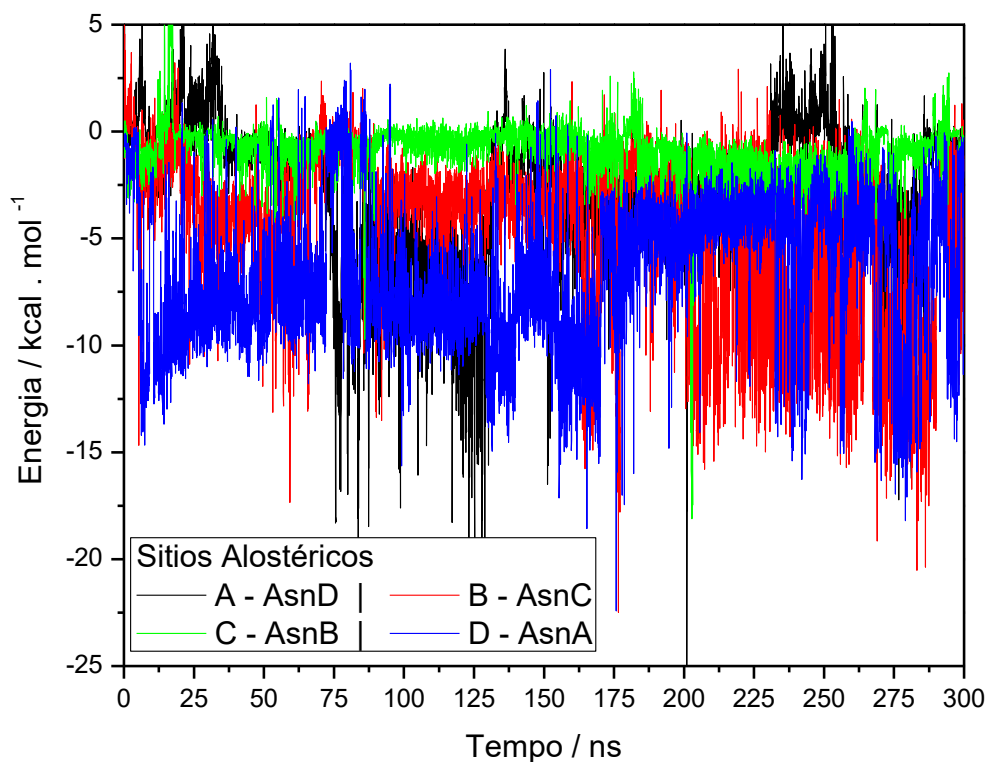
As Figuras 36 e 37 mostram as curvas de PII entre sítios alostéricos e Asn. Nota-se que os PII entre Asn e sítios no mesmo monômeros correspondente oscilam com grande amplitude, entre ~ -65 a 10 kcal mol^{-1} . No caso de PII entre Asn e sítios adjacentes aos monômeros, o PII também tem grande amplitude de oscilação, mas as faixas alcançadas são menores, alcançando potenciais de ~ -25 a 10 kcal mol^{-1} . As médias de PII e os desvios estão relacionados na Tabela 14 e mostram energias mais negativas para PII entre Asn e sítios do mesmo monômero, mas também há interações atrativas com monômeros adjacentes. Isso implica que Asn interage atrativamente com sítios de dois monômeros. Comparando os perfis de PII de Asn com Sítio de residência e adjacente(Figuras 36 e 37), não é observado correlação entre os PII, de forma que não há competição do Asn que está num sítio pelo outro sítio.

Figura 36 - Curvas de PII entre os sítios alostéricos dos monômeros (A, B, C e D) e Asn nos sítios locais, no sistema ASPG-ASN-CAT-ALO ao longo do tempo de simulação.



Fonte: O autor.

Figura 37 - Curvas de PII entre os sítios alostéricos e Asn nos sítios adjacentes, no sistema ASPG-ASN-CAT-ALO ao longo do tempo de simulação.



Fonte: O autor.

Tabela 14 - Médias do PII entre os sítios alostéricos, de cada monômero (A, B, C, D), e os Asn locais e nos monômeros adjacentes, no sistema ASPG-ASN-CAT-ALO, após *teq*.

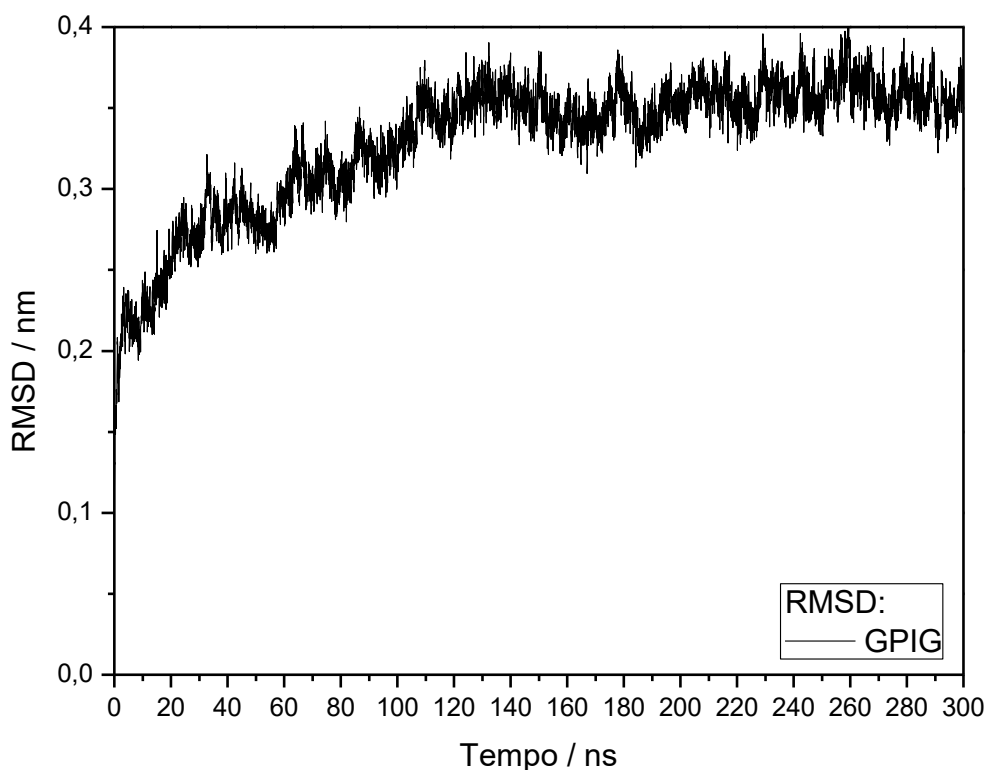
ASPG-ASN-CAT-ALO	Sítios - Asn	PII Médio (kcal.mol ⁻¹)
Asn locais	SítioA - AsnA	- 12,80 ± 6,50
	SítioB - AsnB	- 38,72 ± 6,04
	SítioC - AsnC	- 25,33 ± 5,04
	SítioD - AsnD	- 13,68 ± 12,05
Asn no sítio Adjacente	SítioA - AsnD	- 2,34 ± 2,77
	SítioB - AsnC	- 7,06 ± 4,58
	SítioC - AsnB	- 1,50 ± 1,46
	SítioD - AsnA	- 5,42 ± 3,50

Fonte: O autor.

4.5 DM da gpASNase1 em água

A estrutura de L-asparaginase de *C. porcellus* depositada no Protein Data Bank (cod. pdb.: 4R8K) foi submetida a DM em solução aquosa (sistema GPIG). As variações na estrutura foram monitoradas através de perfis de RMSDs durante a simulação, como descrito na Figura 38. A estrutura alcança o equilíbrio em $\sim t_{eq} = 125$ ns de simulação e após esse momento possui RMSD de $0,35 \pm 0,01$ nm.

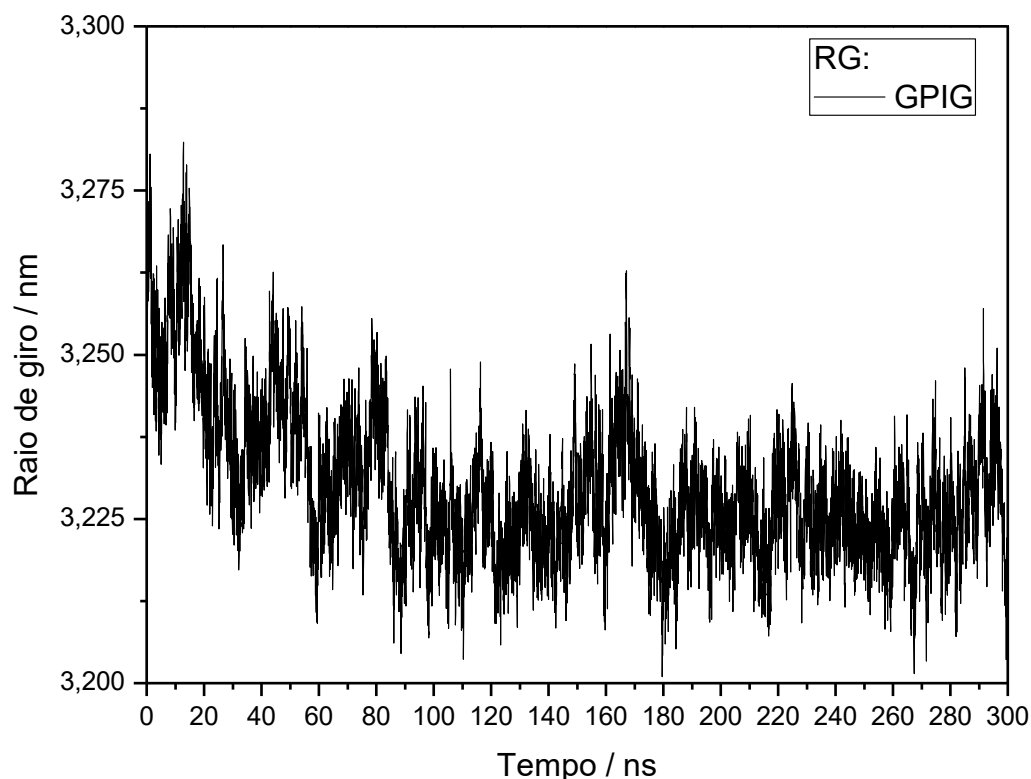
Figura 38 - Curva de RMSD entre as configurações estruturais gpASNase1, comparadas com a estrutura inicial, de referência, ao longo do tempo de simulação, no sistema GPIG.



Fonte: O autor.

A Figura 39 mostra a curva de raio de giro da gpASNase1 ao longo da DM. Nota-se que há uma pequena redução no raio que passa de 3,27 nm a $3,22 \pm 0,01$ nm após 125 ns. Essa discreta aproximação indica uma atração entre os monômeros da L-asparaginase, que estavam, inicialmente, mais distantes entre eles na estrutura proveniente de dados cristalográficos.

Figura 39 - Raio de giro calculado para a estrutura da gpASNase1 no sistema GPIG, ao longo da simulação.

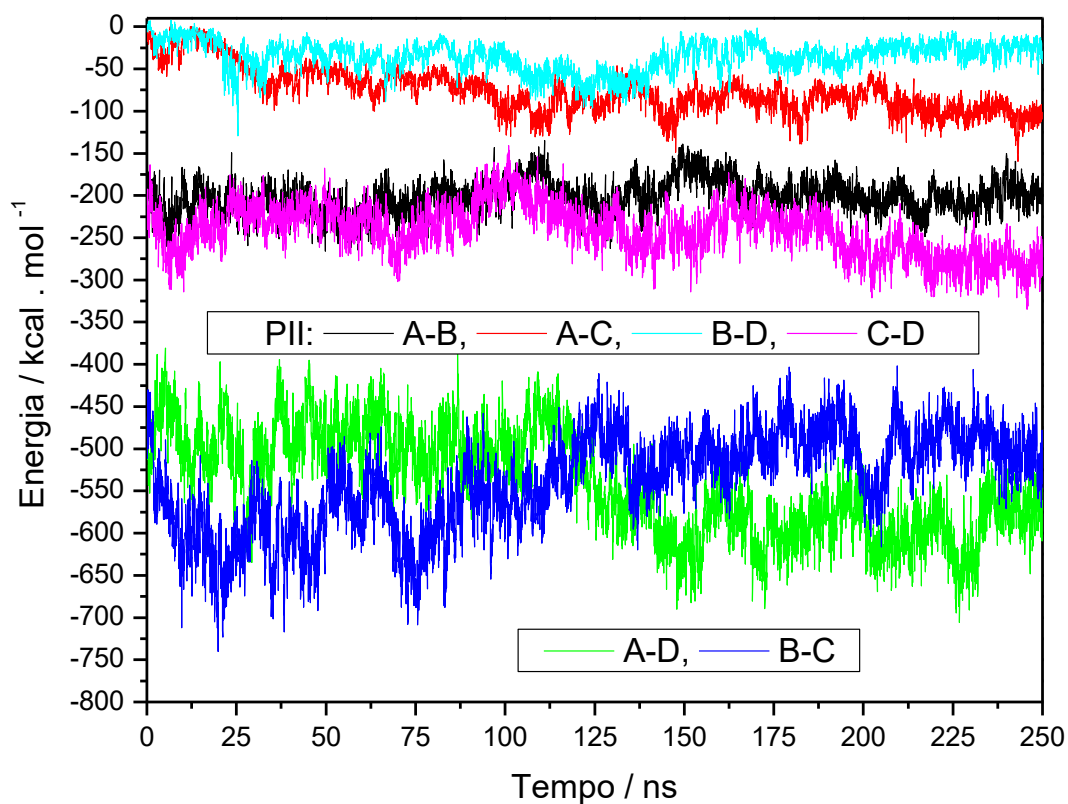


Fonte: O autor.

A curva para o PII intramolecular, entre todos os átomos da gpASNase1 no sistema GPIG não foi mostrada, mas o PII médio foi de $(-86,83 \pm 0,13) 10^3 \text{ kcal mol}^{-1}$, calculado após 125 ns.

Os PIIs intermoleculares, entre monômeros da L-asparaginase, foram obtidos e lançados em gráfico, como mostrado na Figura 40. Os PIIs médio entre os pares de monômeros foram calculados e estão mostrados na Tabela 15. Nota-se que o PII entre monômeros B - D e entre A - C é o menos atrativo com média de $-39,32 \pm 19,71 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $-89,43 \pm 15,94 \text{ kcal.mol}^{-1}$, respectivamente. A interação entre os monômeros A - B e C - D é mais atrativa que o observado para os pares anteriores (B – D e A – C) e possuem PII médio de $-195,76 \pm 19,44 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $-261,64 \pm 27,85 \text{ kcal.mol}^{-1}$, respectivamente. A interação mais atrativa foi detectada entre os monômeros A - D e B - C, que apresentaram PII médio de $-585,59 \pm 34,98 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $-498,92 \pm 32,41 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectivamente.

Figura 40 - Curvas de PII entre pares de monômeros (A, B, C e D) da gpASNase1, ao longo do tempo de simulação, no sistema GPIG.



Fonte: O autor.

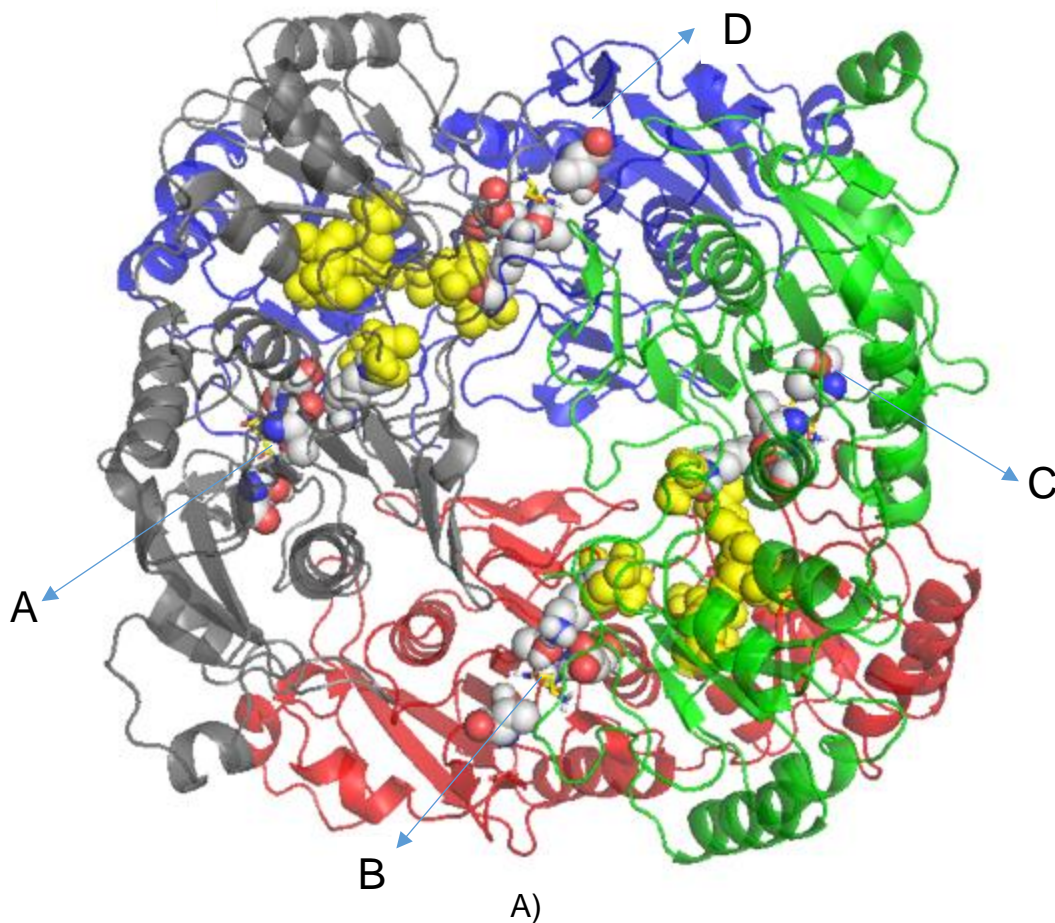
Tabela 15 - Médias e desvios dos PII entre pares de monômeros da gpASNase1 após $t_{eq} = 125$ ns.

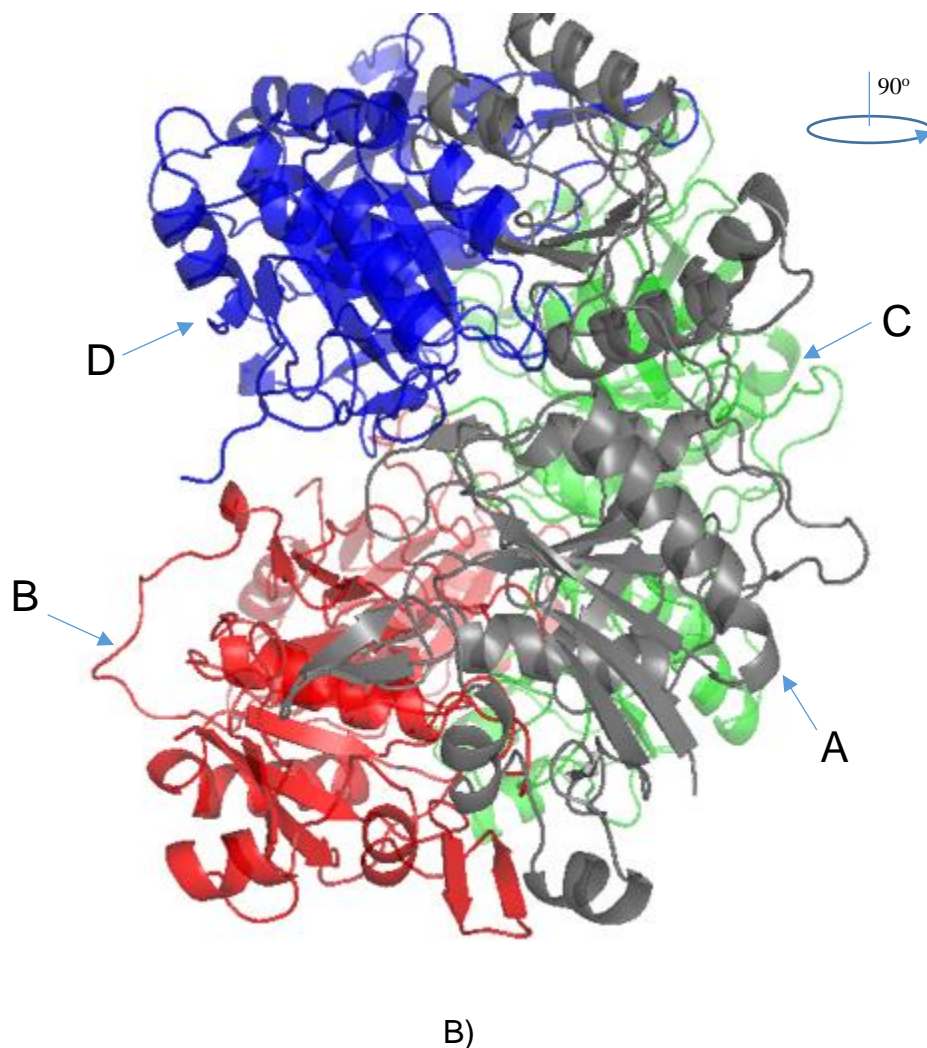
Pares de monômeros	PII (kcal.mol ⁻¹)
A - B	-195,76 ± 19,44
A - C	-89,43 ± 15,94
A - D	-585,59 ± 34,98
B - C	-498,92 ± 32,41
B - D	-39,32 ± 19,71
C - D	-261,64 ± 27,85

Fonte: O autor.

A Figura 41 mostra a representação da configuração final da gpASNase1, após 300 ns de DM. Observa-se que a interface entre os monômeros A - D e B - C é maior que com os pares A - B e D - C. Além disso, o PII entre esses monômeros é bem menor do que para os outros pares de monômeros (Figura 40). Há três PII bem distintos de interação para três tipos de pares formados, como visto na Figura 40 e Tabela 15. Os monômeros A - B e D - C, apresentam os menores PII dos três tipos de pares. Já os pares A - C e B - D foram observados os maiores PII. Portanto, mesmo com uma aparente maior interface, A - C e B - D possuem menor atratividade que os pares A - D e B - C, que estão em contato através de domínios menores dos monômeros (Domínios 2), com visto na Figura 41.

Figura 41 - Representação em fita da estrutura final gpASNase1. Monômero A (preto), monômero B (vermelho), monômero C (verde), monômero D (azul). A) Visualização frontal; B) Rotação 90° sentido anti-horário.



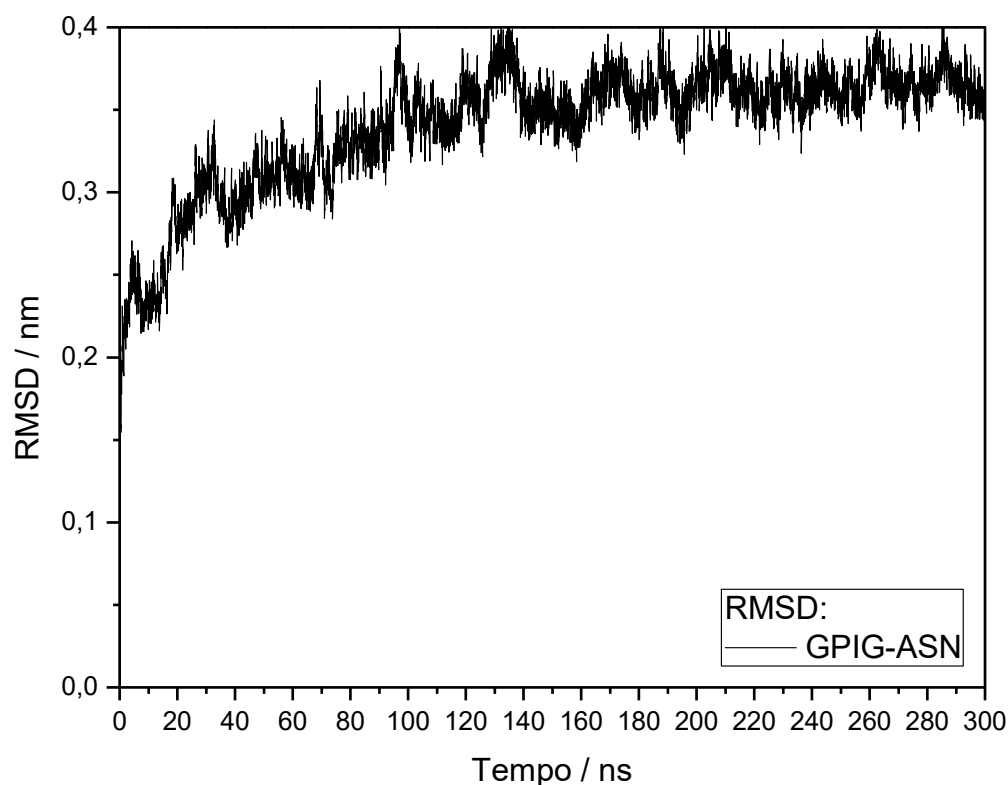


Fonte: O autor.

4.6 DM da gpASNase1 em água e com Asn nos sítios

Aminoácidos Asn foram adicionados aos sítios catalíticos composto pelos resíduos Thr19, Thr116, Asp117, Lys188, em cada monômero (A, B, C e D) da estrutura de L-asparaginase de *C. porcellus* depositada no Protein Data Bank (cod. pdb.: 4r8K). O sistema foi submetido a DM em solução aquosa (sistema GPIG-ASN). As variações na estrutura foram monitoradas através de perfis de RMSDs durante a simulação, como descrito na Figura 42. A estrutura alcança o equilíbrio estrutural em $\sim t_{eq} = 150$ ns de simulação e após esse momento, o RMSD médio é de $0,36 \pm 0,01$ nm.

Figura 42 - Curva de RMSD entre as configurações estruturais da gpASNase1 em água, comparadas com a estrutura inicial, de referência, ao longo do tempo de simulação, sistema GPIG-ASN.



Fonte: O autor.

A interação entre os resíduos Thr19, Thr116, Asp117, Lys188 que compõem os sítios catalíticos de cada monômero (A, B, C, D), e o aminoácido Asn, no sistema GPIG-ASN, foi analisada através do PII, mostrado na Figura 43. Observando as curvas de PII, percebe-se que, em torno de 180 ns o PII entre SítioA e Asn torna-se nulo, indicando que a Asn saiu do sítio. Os tempos de residência das Asn, nos sítios, e os PII médios, nesse período, estão relacionados na Tabela 16. As outras asparaginas permanecem com PII não nulo até o final da simulação, sendo que a que apresenta interação mais atrativa é a Asn no SítioD. Os PII entre Asn e SítioC são negativos e positivos após ~160 ns de simulação, indicando que a posição da Asn muda com frequência em relação aos resíduos do SítioC, o que implica numa eminência de saída do sítio, em muitos momentos. A Figura 44 esclarece que a Asn, no SítioC, inicialmente (0 ns), está localizada entre os resíduos Thr19 e Thr166 e, em 120 ns, a Asn se desloca da posição original e fica ao lado das treoninas. Esse deslocamento resulta numa

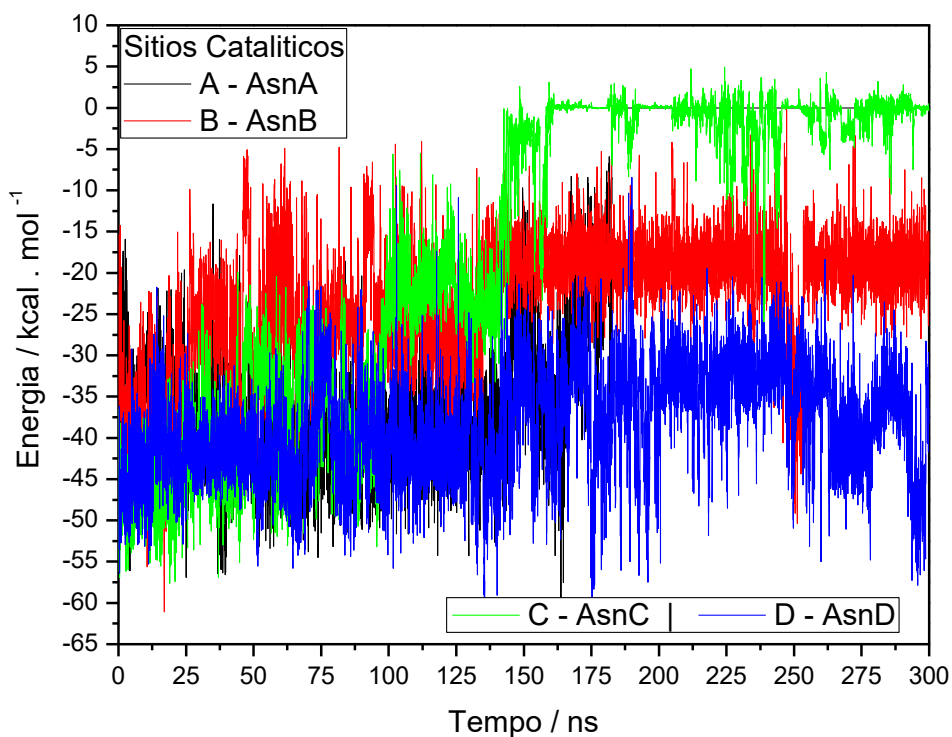
interação com PII resultante de ~ -24 kcal mol⁻¹, o que implica que acima desse PII a Asn não está localizada em local apropriado no sítio (PII ~ -45 kcal mol⁻¹) e está localizado nas adjacências. As curvas de PII entre Asn e os Sítios B e D permanecem negativo do início ao final da DM, contudo os potenciais para SítioB-Asn são superiores.

Nota-se, através da Figura 45, que, nas três configurações separadas da trajetória de DM, a Asn se mantém entre as Thr19 e Thr116 e que o maior PII em 246 ns é decorrente de uma pequena mudança de posição da Asn entre essas treoninas, que pode aproximar o seu grupo ácido aspártico com o da Asp117 e ocorrer repulsão e, por outro lado, esse mesmo grupo pode se aproximar do grupo amônio (-NH₃⁺) da Lys188, ocorrendo maior atração. Isso explica o porque da oscilação na curva de SítioD-Asn. No caso de SítioB-Asn, a média de PII é $-26,06 \pm 9,00$ kcal mol⁻¹ e não chegou a zero em nenhum momento da DM, estando acima da média de SítioD-Asn ($-43,14 \pm 7,00$ kcal mol⁻¹). A curva de PII mostra que a partir de 125 ns há menor oscilação de PII.

A Figura 46 traz configurações de três momentos 0 ns, 120 ns e 246 ns, o que é apropriado para explorar diferenças que expliquem o comportamento na interação entre SítioB-Asn antes e após 125 ns. Nota-se que na Figura 46A (0 ns) que as conformações da cadeia laterais mantem a Asn entre as Thr19 e Thr116, numa estrutura compacta. Nessa configuração observa-se uma alça sobrepondo essa estrutura (indicada por seta na figura e denominada Alça1). Em 120 ns, Figura 46B, a Alça1 está aberta e a estruturação descrita anteriormente é modificada, a Lys188 se distancia de Thr116 e Asp117, mas a Asn é mantida entre as treoninas. Já em 246 ns, quando o PII é mais alto que antes de 125 ns, passando de ~ -30 para ~ -20 kcal mol⁻¹ (Figura 43), a Alça1 está ainda mais aberta que a configuração anterior. Essa abertura causou um distanciamento entre Thr19 e Thr116 que possibilitou a mudança da Asn no sítio, estando representada na Figura 46C na vertical. Nesse ponto os níveis de PII são correlatos ao descritos para SítioC-Asn, na eminência de saída da Asn do sítio e sua manutenção nas adjacências. Portanto, o mecanismo de saída da Asn dos sítios catalíticos na gpASNase1 está ligado a abertura da Alça1. Nesse sentido, a manutenção da estruturação do sítio é importante para que ocorra a catálise, o resíduo que mais interage atrativamente com a Asn é Thr116 e Asp117, como visto na Figura 47, sendo que a Thr19, que sobe quando a Alça1 se abre, e a Lys188, que se distancia de Thr116 e

Asp117, tem papel auxiliar importante. A Thr19 mantém a posição da Asn no sítio e a Lys188 mantém as posições de Thr116 e Asp117 de forma apropriada no sítio.

Figura 43 - Curva do PII entre os resíduos do sítio catalítico, de cada monômero (A, B, C, D) e as Asn, no sistema GPIG-ASN ao longo do tempo de simulação.



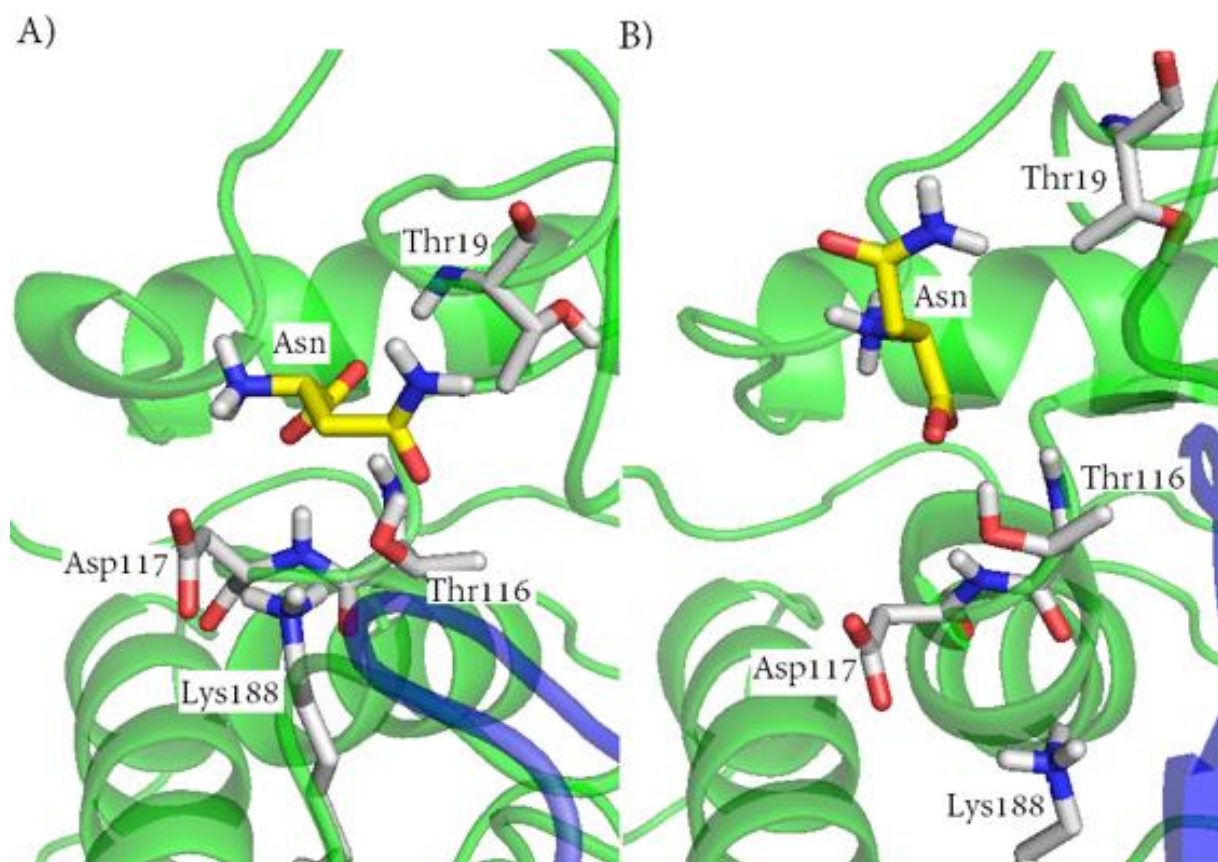
Fonte: O autor.

Tabela 16 - PII Médio entre os sítios catalíticos dos monômeros (A, B, C e D) e as Asn nos sítios residentes nesses monômeros, no sistema GPIG-ASN, durante o tempo de residência no sítio

Sítios-Asn(sítios)	PII mínimo (kcal.mol ⁻¹)	PII médio (kcal.mol ⁻¹)	Tempo de Residência (ns)
A – AsnA	-63,49	- 36,51 ± 8,69	183
B – AsnB	-61,08	- 26,06 ± 9,00	300
C – AsnC	-57,62	- 32,40 ± 13,90	141
D - AsnD	-63,44	- 43,14 ± 7,00	300

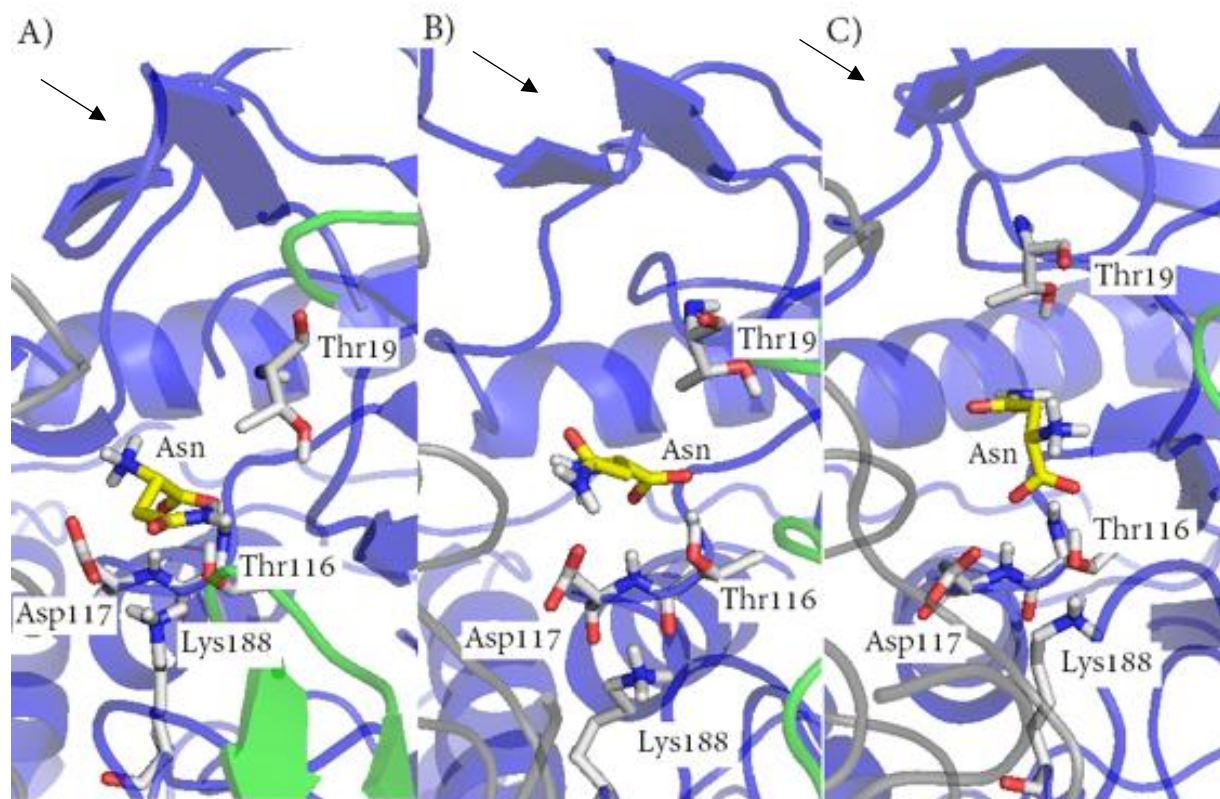
Fonte: O autor.

Figura 44 - Representação em bastão da Asn dos resíduos do sítio catalítico do monômero C de gpASNase1 nos tempos A) 0 ns, B) 120 ns da DM.



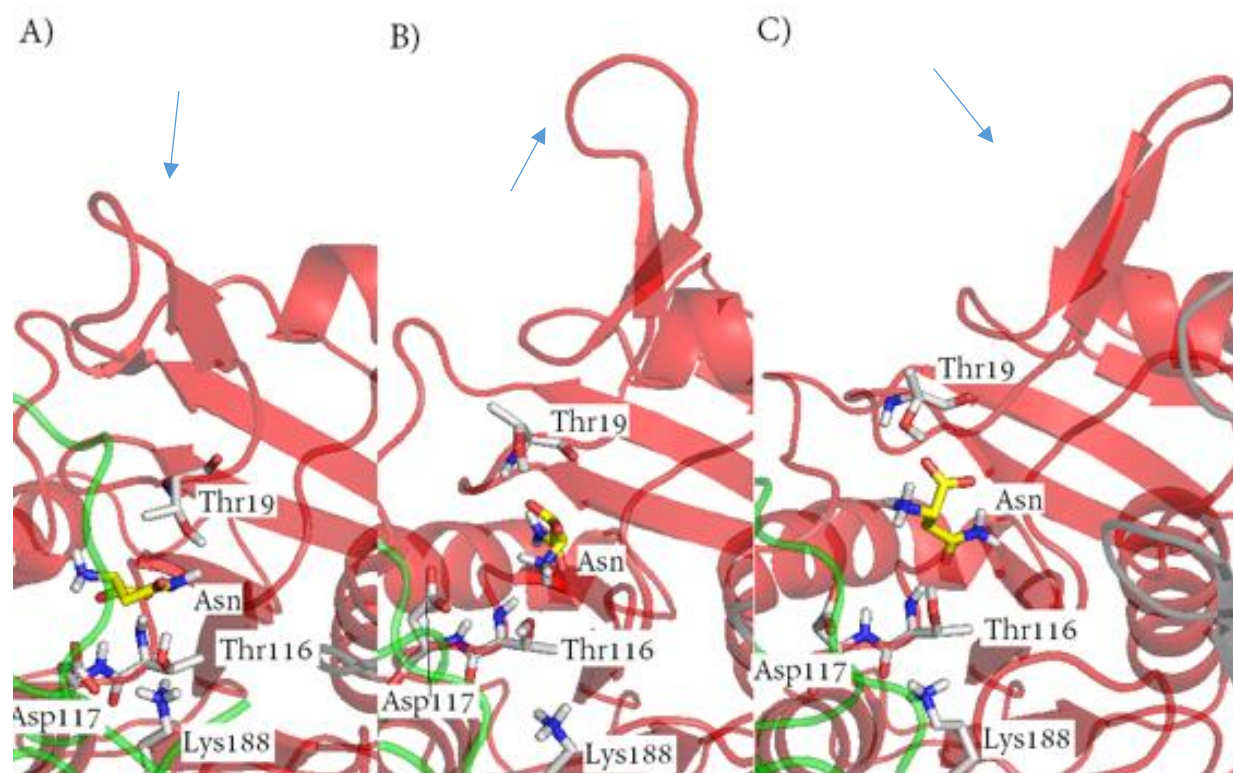
Fonte: O autor.

Figura 45 - Representação em bastão da Asn dos resíduos do sítio catalítico do monômero D de gpASNase1 nos tempos A) 0 ns, B) 120 ns e C) 246 ns da DM, com indicação da Alça1.



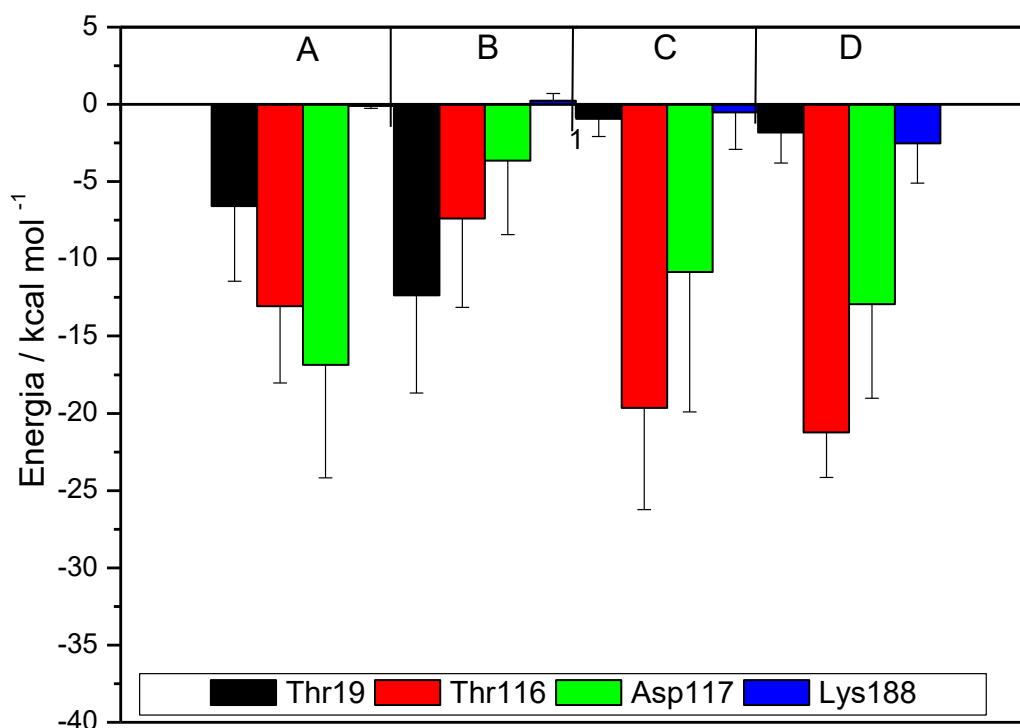
Fonte: O autor.

Figura 46 - Representação em bastão do sítio catalítico do monômero B de gpASNase1 nos tempos A) 0 ns, B) 120 ns e C) 246 ns da DM, com indicação da Alça1.



Fonte: O autor.

Figura 47 - PII médio de cada um dos resíduos do sítio catalítico, de cada monômero (A, B, C, D) e as Asn, no sistema GPIG-ASN ao longo do tempo de simulação.

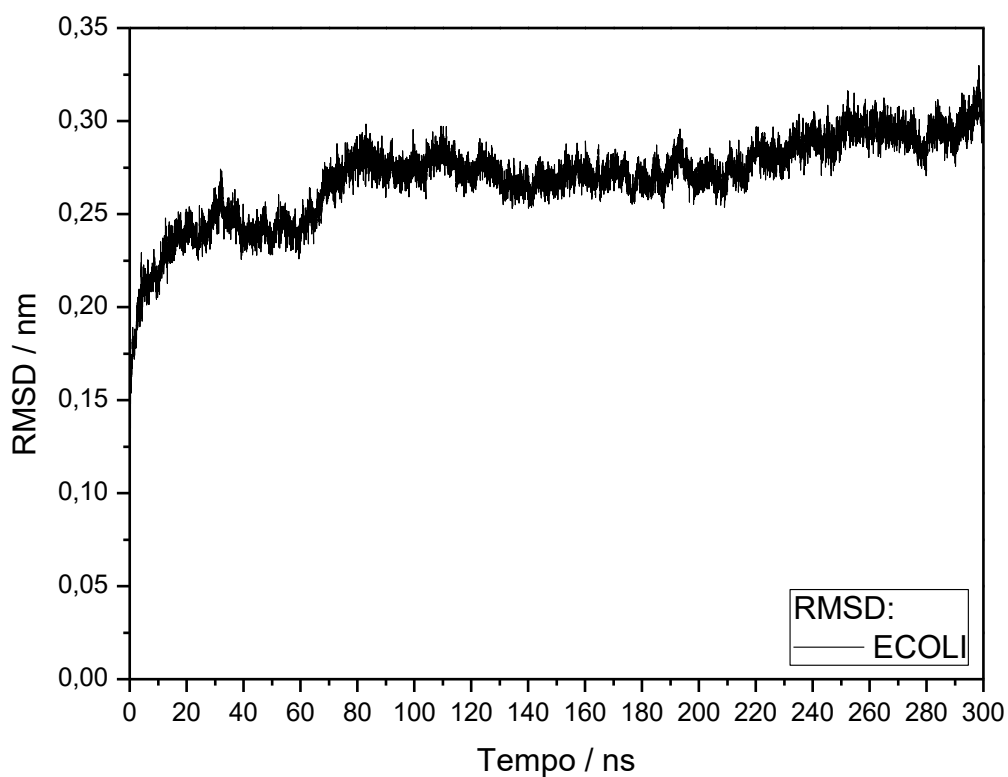


Fonte: O autor.

4.7 DM da EclI em água

A estrutura de L-asparaginase de *E. coli* depositada no Protein Data Bank (cód. PDB.: 3ECA) foi submetida a DM em solução aquosa (sistema ECOLI). A Figura 48 mostra as variações na estrutura através do perfil de RMSD, monitorado durante a simulação. A estrutura alcança o equilíbrio $\sim t_{eq} = 75$ ns de simulação e após esse momento possui RMSD de $0,28 \pm 0,01$ nm.

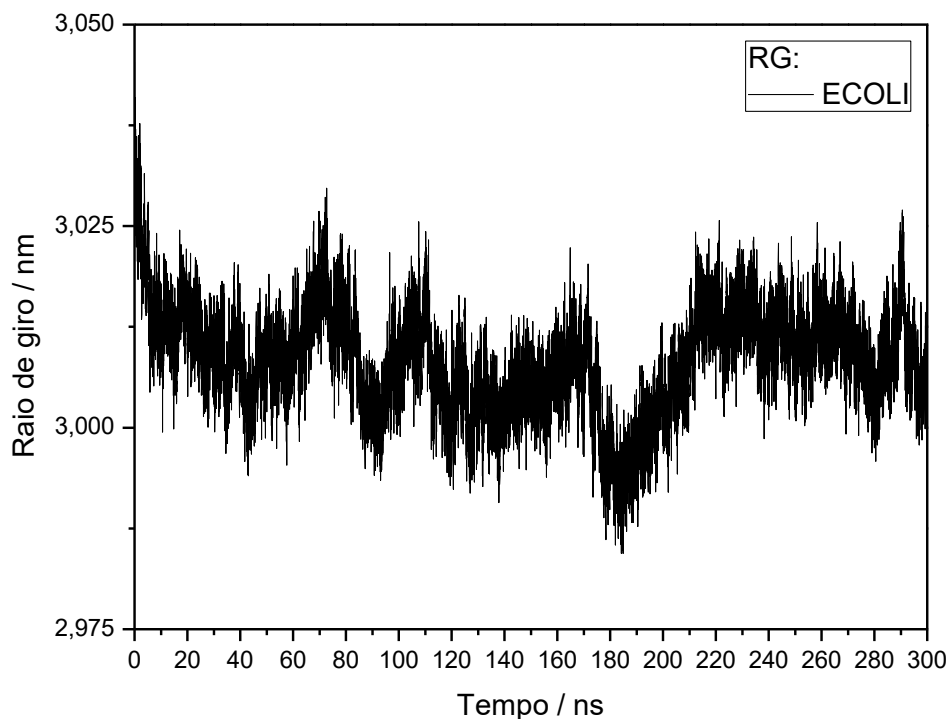
Figura 48 - Curva de RMSD entre as configurações estruturais da *Ecll*, em água, ao longo do tempo de simulação, comparadas com a estrutura de início, sistema ECOLI



Fonte: O autor.

A Figura 49 mostra a curva de raio de giro da L-asparaginase ao longo da DM. Nota-se que há uma aproximação muito pequena dos monômeros durante a simulação com o raio de giro partindo de 3,04 nm e mantendo-se em $3,01 \pm 0,01$ nm após $t_{eq} = 50$ ns.

Figura 49 - Raio de giro da estrutura da *EclI* ao longo da simulação no sistema ECOLI.

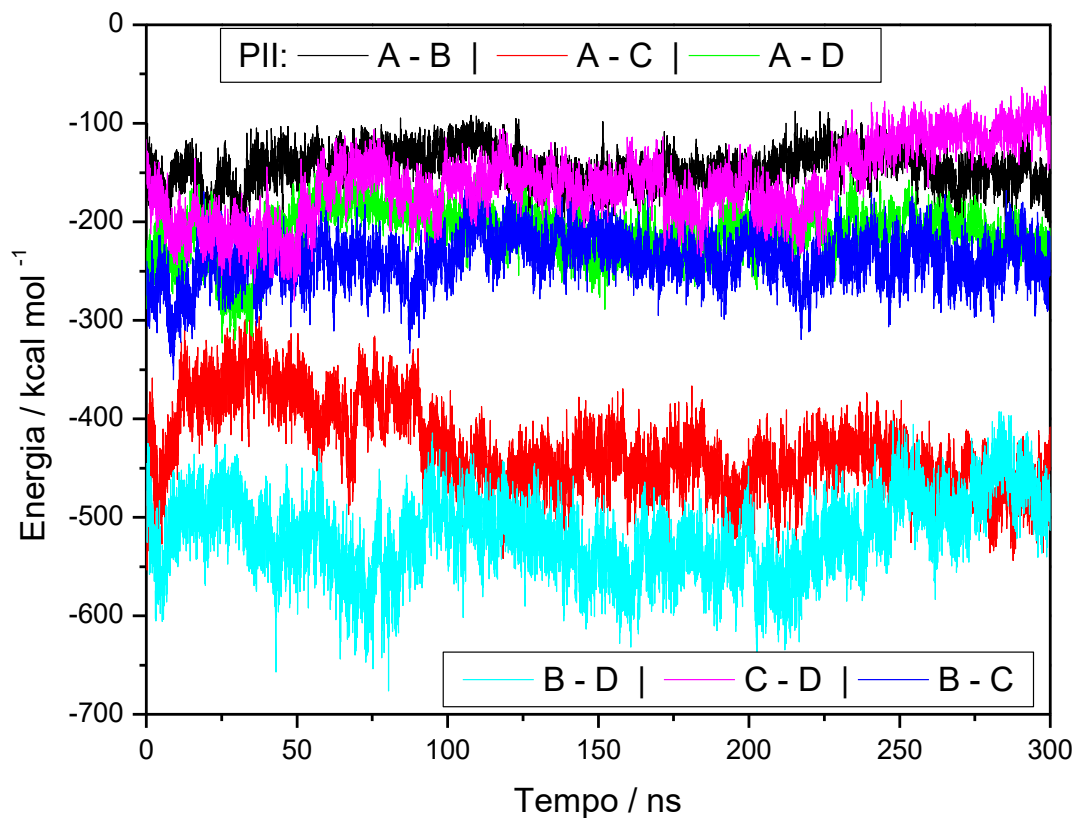


Fonte: O autor.

O PII intramolecular, entre todos os átomos da *EclI* no sistema ECOLI não foi mostrada, mas o PII variou de $(-83,66) 10^3 \text{ kcal mol}^{-1}$ até $(-84,62 \pm 0,13) 10^3 \text{ kcal mol}^{-1}$, PII médio calculado após atingir $t_{eq} = 75 \text{ ns}$. Essa variação no potencial indica que ocorreu uma pequena atração entre os monômeros, podendo ter ocorrido uma maior aproximação entre eles.

Os PIIs entre os monômeros (A, B, C e D) da L-asparaginase, foram obtidos para as configurações ao longo da simulação, como mostrado na Figura 50. A Tabela 17 mostra as médias de PII, os pares de monômeros A - C e entre B - D são os mais atrativos dentre os outros pares, apresentando energia média de $-446,26 \pm 32,52 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $-518,36 \pm 39,60 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Nota-se que os pares A - D e B - C ($-208,79 \pm 18,29$ e $-233,45 \pm 22,79 \text{ kcal.mol}^{-1}$) apresentam PII próximos assim como os pares A - B e C - D ($-143,42 \pm 18,00$ e $-150,35 \pm 31,85 \text{ kcal.mol}^{-1}$). A Figura 51 mostra a representação da estrutura final de DM.

Figura 50 - Curva do PII entre pares de monômeros A, B, C e D da *EclI*, no sistema ECOLI, ao longo do tempo de simulação.



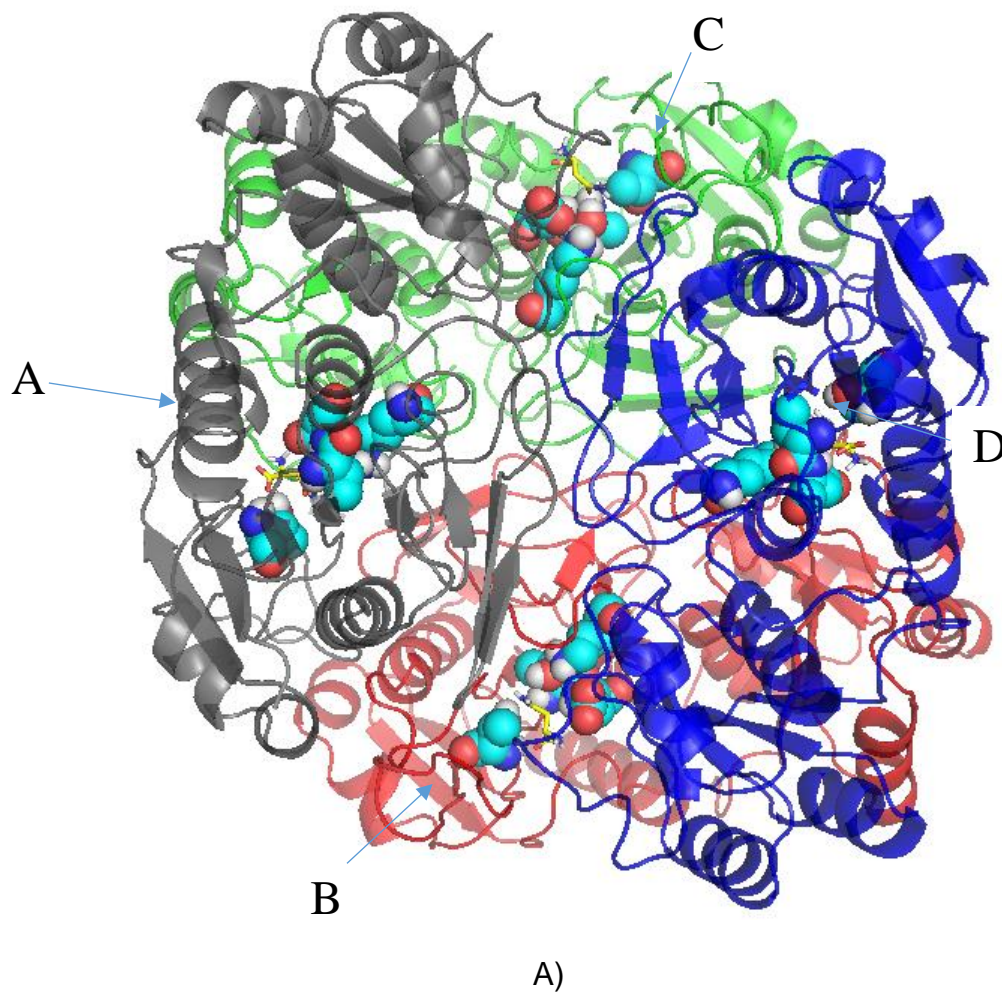
Fonte: O autor.

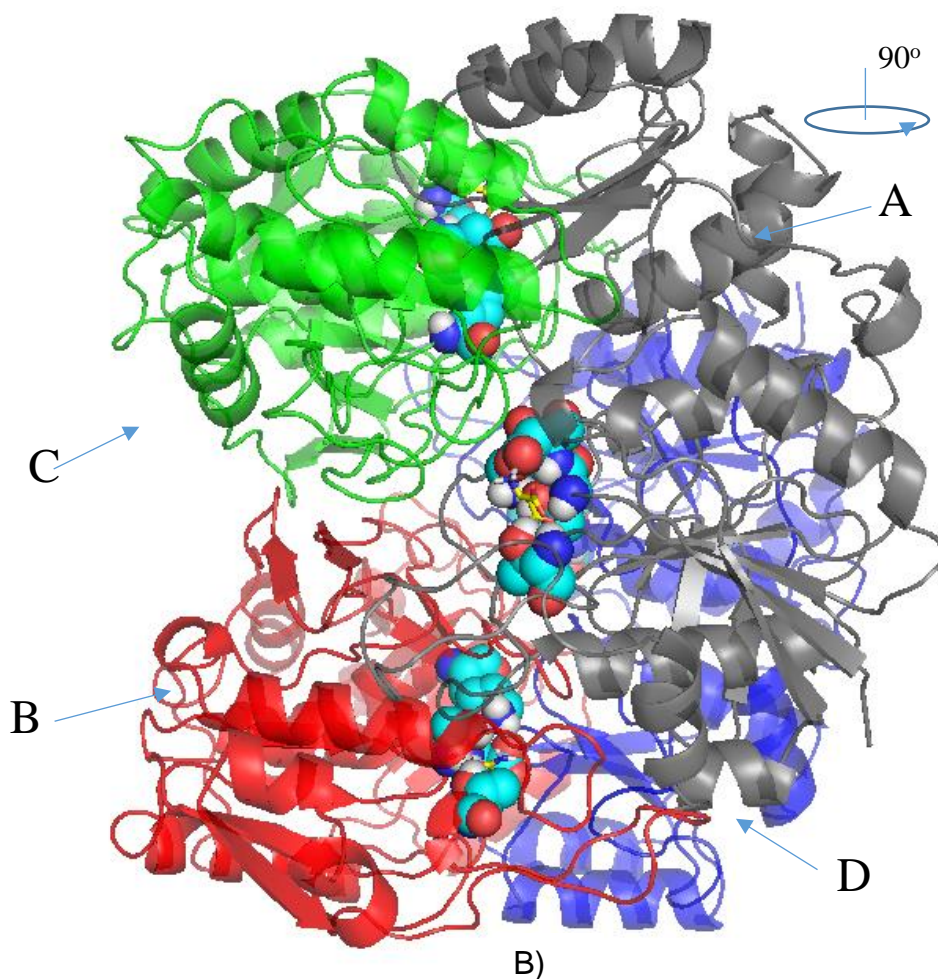
Tabela 17 - Médias e desvios dos PII entre os monômeros da *EclI* ao longo do tempo de simulação, após $t_{eq} = 75$ ns

Pares de Monômeros	PII (kcal.mol ⁻¹)
A - B	-143,42 ± 18,00
A - C	-446,26 ± 32,52
A - D	-208,79 ± 18,29
B - C	-233,45 ± 22,79
B - D	-518,36 ± 39,60
C - D	-150,35 ± 31,85

Fonte: O autor

Figura 51 - Representação em cartoon da estrutura final da DM, *Ecll*. Monômero A (preto), monômero B (vermelho), monômero C (verde), monômero D (azul), sendo que a Asn estão alocadas nos sítios e representadas em bastão, com coloração dos átomos de carbono em amarelo. A) Visualização frontal, as setas indicam também os sítios representados em esferas.; B) Rotação 90° sentido anti-horário.



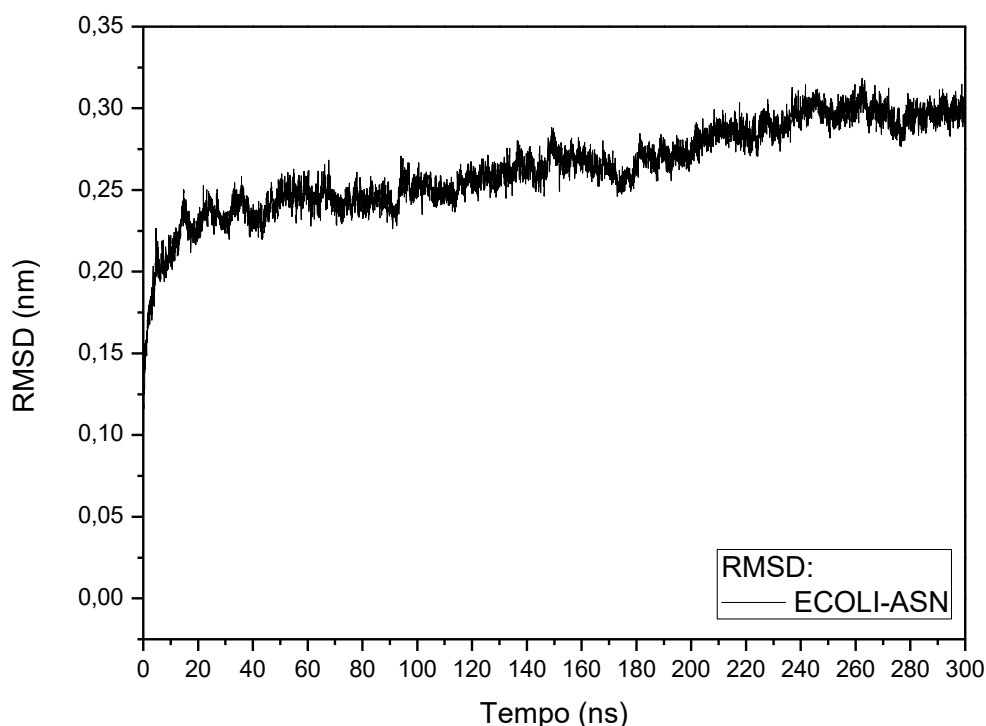


Fonte: O autor.

4.8 DM da EclI em água e com Asn nos sítios.

Asparaginas foram adicionadas aos sítios catalíticos (Thr12, Thr89, Asp90, Lys162), de cada monômero (A, B, C e D) da EclI e submetidas a simulação em solução aquosa. A Figura 52 mostra as variações na estrutura através de perfis de RMSDs, monitorados durante a simulação. A estrutura alcança equilíbrio $\sim t_{eq} = 250$ ns de simulação e após esse momento o RMSD é de $0,30 \pm 0,01$ nm.

Figura 52 - Curva de RMSD entre as configurações estruturais da *EclI*, ao longo do tempo de simulação, comparadas com a estrutura de inicial de referência.



Fonte: O autor.

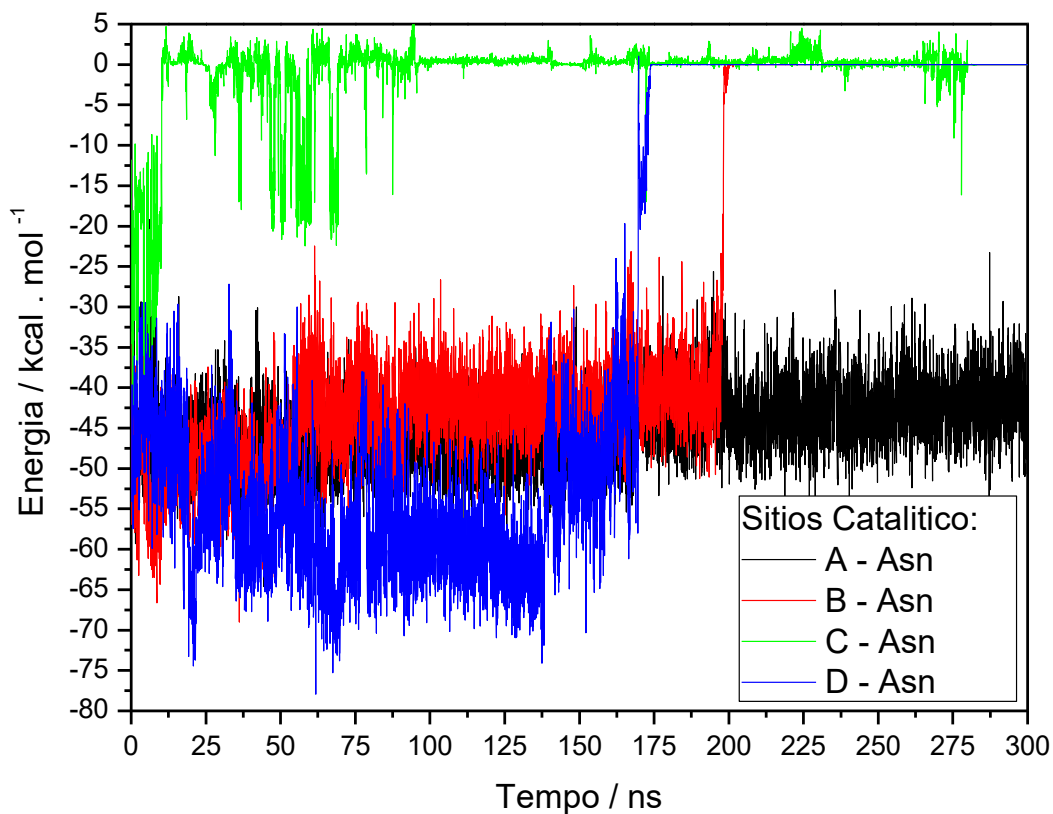
A interação entre os resíduos que compõem o sítio catalítico, Thr12, Thr89, Asp90, Lys162, de cada monômero (SítioA, SítioB, SítioC, SítioD), e o Asn presente nos sítios foi analisada através do PII, mostrado na Figura 53. A Tabela 18 relaciona os tempos de residência das asparaginas nos sítios e os PII médios durante esse período. As asparaginas permanecem nos sítios com tempos de residência distintos, a Asn sai do sítio C em (~ 10 ns), em ~ 171 ns a Asn sai do SítioD, seguida pela Asn do SítioB (~ 201 ns). A Asn do sítioA é a única que permanece durante os 300 ns de simulação, com PII médio de $-45,14 \pm 4,82 \text{ kcal mol}^{-1}$. Nota-se que os potenciais médios durante residência de Asn nos sítios podem ser distintos entre eles, a exceção é para os SítiosA e B que são similares, com PII ($-45,14 \pm 4,82$ e $-43,11 \pm 7,95 \text{ kcal.mol}^{-1}$). No caso do SítioC o PII médio é de $-23,62 \pm 7,28 \text{ kcal mol}^{-1}$, é o sítio que perde Asn num tempo mais curto. O PII do SítioD é o de menor potencial, $-55,02 \pm 9,27 \text{ kcal mol}^{-1}$.

As diferenças nos PII (Tabela 18) indicam que há diferenças de posicionamento da Asn nesses sítios. Isso pode ser ratificado acompanhando as representações

estruturais nos tempos de simulação 0 ns, 136 ns, 159 ns, 252 ns, que são tempos escolhidos para amostrar configurações da trajetória que mostram diferenças estruturais nos sítios e a posição das Asn. A Figura 54A e B mostra os resíduos do SítioA e a Asn, 0 e 252 ns. Nota-se que em o grupo amônio da Asn está orientado para a Asp90 e a cadeia lateral para a Thr112, sendo que essa configuração se mantém até o final da simulação. Nessa figura, a Alça1, que está representada em amarelo, é mantida sobre a Thr112, sendo que em 252 ns ela está ainda mais inserida junto ao SítioA.

A Figura 55A e B mostram as estruturas do SítioB nos tempos de 0 e 159 e 252 ns. Nota-se que a Asn está em orientação similar a observada no SítioA e que a Alça1 sobrepõe Thr12 e se insere na lateral do sítio, como passar do tempo de simulação e mesmo em 252, ns, um longo período após a saída da Asn, a Alça1 permanece inserida a margem do sítio. A Figura 56 mostra as configurações para o SítioC, a com menor tempo de residência de Asn no sítio. Nota-se que em 252 ns, ou seja 242 ns depois da saída do SítioC, a Asn se mantém adjacente ao SítioC, o que é indicado no perfil de PII (Figura 53), pois o potencial não é nulo em nenhum momento. Nota-se que de 0 para 252 ns, a Alça perpassa a Thr12 margeando o SítioC e não houve impedimento da Alça1 na saída da Asn. No caso do SítioD, onde três configurações estão representadas na Figura 57, nos tempos 0, 136 e 159 ns. Nota-se que inicialmente, em 0 ns, o grupo amônio da Asn está orientado para o grupo ácido carboxílico da Asp90. No entanto, após 136 ns (Figura 56B) nota-se que ocorreu uma rotação do Asn no sítio, e o PII observado na Figura 53 está em $\sim 62,5 \text{ kcal mol}^{-1}$, nem menor que o inicial que está em $\sim 62,5 \text{ kcal mol}^{-1}$. Nessa configuração a Asn mantém a posição do grupo amônio, mas aproxima e seu grupo carboxílico do grupo amônio da Lys162, mudando a cadeia lateral de lugar, distanciando da Thr12. Essa é uma configuração não apropriada para ocorrer à catalise, embora o PII de interação seja menor. Na Figura 57C fica mais evidente a diferente posição da Asn no SítioD em relação a inicial e com PII ainda menor que a inicial, mas numa posição de saída do sítio. Nota-se que a Alça1 continua desde o início sobrepondo Thr12 e margeando o sítio, não sendo um impedimento para a saída de Asn.

Figura 53 - Curva do PII entre os resíduos do sítio catalítico da *EclI* de cada monômero (A, B, C, D) e Asn, ao longo do tempo de simulação.



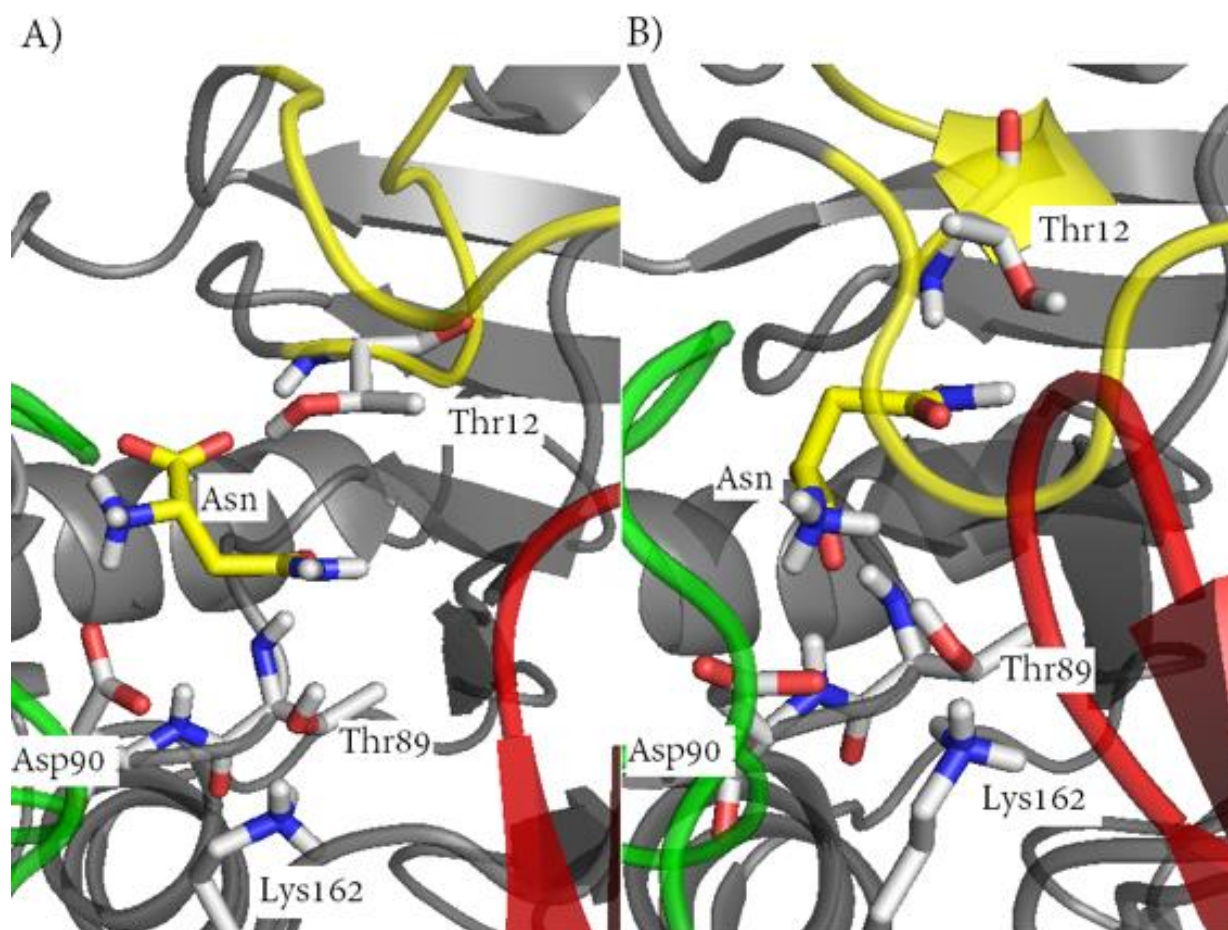
Fonte: O autor.

Tabela 18 - Médias e desvios para o PII entre os resíduos do sítio catalítico, de cada monômero (A, B, C, D), e o substrato Asn.

Sítios-Asn(sítios)	PII mínimo (kcal.mol ⁻¹)	PII médio (kcal.mol ⁻¹)	Tempo de residência (ns)
A – AsnA	-64,60	- 45,14 ± 4,82	300
B – AsnB	-68,99	- 43,11 ± 7,95	201
C – AsnC	-47,23	- 23,62 ± 7,28	10
D – AsnD	-77,92	- 55,02 ± 9,27	171

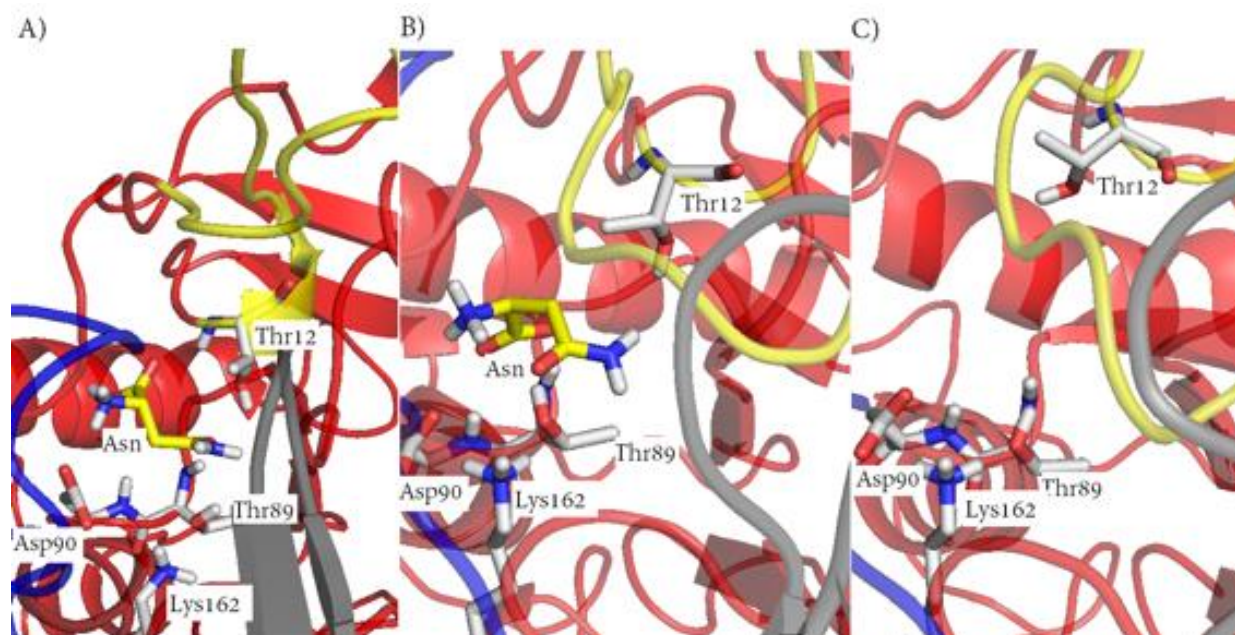
Fonte: O autor.

Figura 54 - Representação em bastão da Asn dos resíduos do sítio catalítico do monômero A de *Ecll* nos tempos A) 0 ns, B) 252 ns da DM.



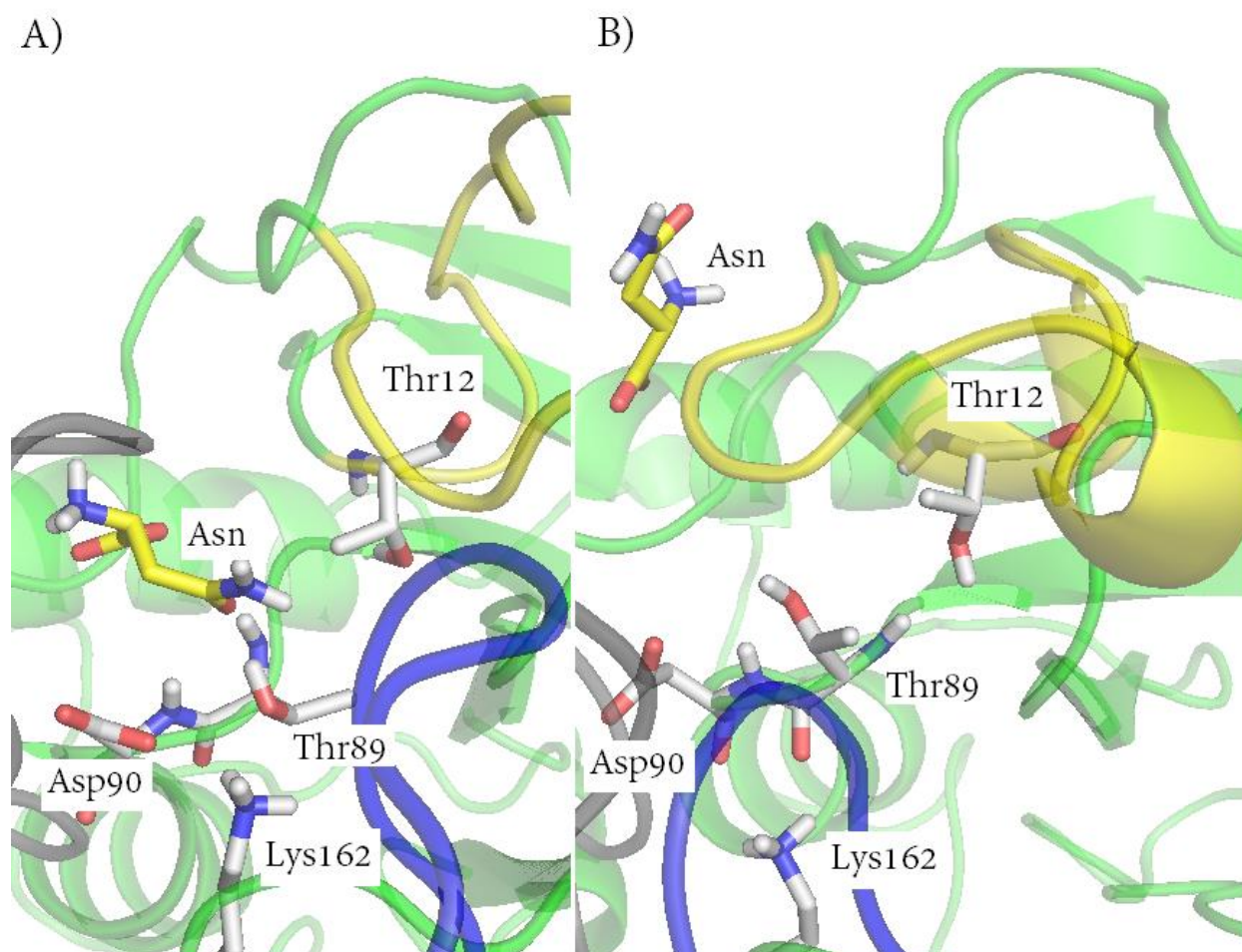
Fonte: O autor.

Figura 55 - Representação em bastão da Asn dos resíduos do sítio catalítico do monômero B de *EclI* nos tempos A) 0 ns, B) 159 ns e C) 252 ns da DM.



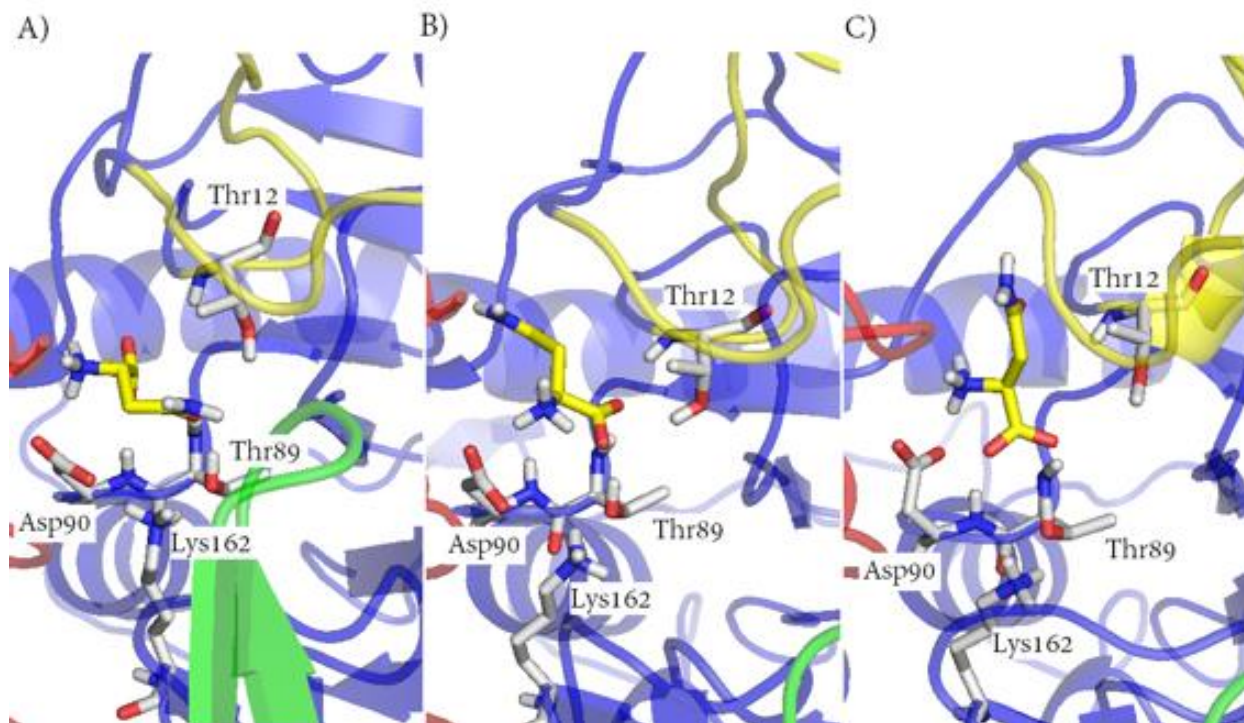
Fonte: O autor.

Figura 56 - Representação em bastão da Asn dos resíduos do sítio catalítico do monômero C de *EclI* nos tempos A) 0 ns, B) 252 ns da DM.



Fonte: O autor.

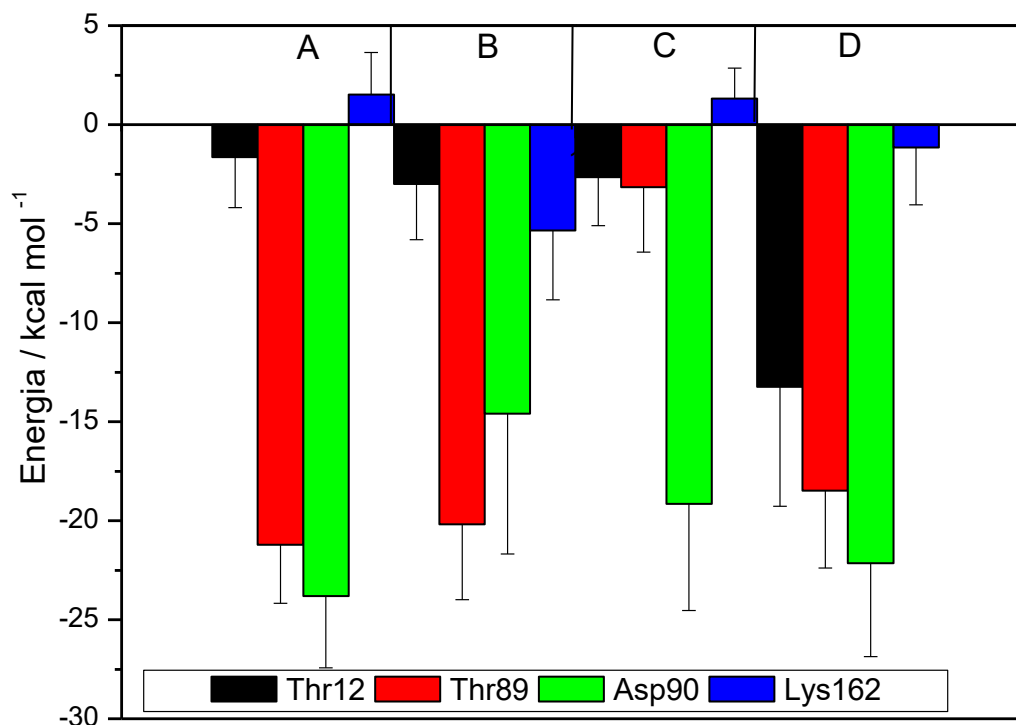
Figura 57 - Representação em bastão da Asn dos resíduos do sítio catalítico do monômero D de *EclI* nos tempos A) 0 ns, B) 136 ns e C) 159 ns da DM.



Fonte: O autor.

Os resíduos que mais interagem atrativamente com a Asn é Thr89 e Asp90, como mostrado na Figura 58. A Lys162 possui PII positivo para os monômeros A e C, indicando que o grupo amônio da Asn deve estar mais próximo de Asp90 e por consequência, mais próximo, também, da Lys162 que resulta em repulsão com esse resíduo.

Figura 58 - PII médio de cada um dos resíduos do sítio catalítico, de cada monômero (A, B, C, D) e as Asn, no sistema ECOLI-ASN ao longo do tempo de simulação.



Fonte: O autor.

5 DISCUSSÃO

5.1 Estrutura

As L-asparaginases simuladas apresentaram baixos RMSD nos sistemas aquosos, ou seja, as estruturas foram mantidas. Pela análise de RMSD dos sistemas de Monômero, Dímero e Tetrâmero, nota-se que o menor RMSD foi observado para a estrutura de Tetrâmero (Figura 12 e Tabela 6), indicando que essa estrutura é a mais estável, seguida pela estrutura monomérica. Karamitros e colaboradores (2007) observaram, através de cromatografia, que, nas condições dos ensaios que eles realizaram, a hASNase1 estava ocorrendo predominantemente na forma de monômero, porém na presença de L-Asn, ocorria certa agregação da proteína. Foi inferido, portanto, que o estado tetramérico, ou dimérico, é induzido pela presença de L-Asn no meio (KARAMITROS; KONRAD, 2014).

Os dados de raio de giro, em função do tempo de DM, mostraram uma queda acentuada do raio da hASNase1, partindo da estrutura inicial de modelo ($3,38$ a $3,26 \pm 0,01$) nm. A hASNase1 apresentou raio de giração maior que gpASNase1 e EclI em água, na fase de equilíbrio estrutural $3,22 \pm 0,01$ nm e $3,01 \pm 0,01$ nm, respectivamente. As estruturas resultantes na DM, para as três L-asparaginases, mostraram ser similares, ou seja nenhuma delas possui disposição espacial dos monômeros de forma uniforme, constituindo, assim, um dímero de dímeros, como já foi descrito na literatura que a forma predominante de gpASNase1, EclI e Ecl, é a tetramérica, mais especificamente, dímero de dímeros (SCHALK et al., 2014; SWAIN et al., 1993; YUN et al., 2007). Karamitros e colaboradores (2014) indicam que a hASNase1, considerada na forma de monômero nesse trabalho, resultou em K_m de 11,5 mM (KARAMITROS; KONRAD, 2014). No entanto, quando adicionou Asn ao meio (20 mM), começou a ser observada certa agregação proteica, representada por um pico na cromatografia correspondente as espécies de maior peso molecular. Entretanto, nas condições do ensaio, o monômero permaneceu a forma predominante. Como há vários relatos na literatura de atividade na forma de tetrâmero acredita-se que a hASNase1 mantenha atividade nessa forma (AVRAMIS, 2012; DHAVALA et al., 2008; MICHALSKA; JASKOLSKI, 2006; SCHALK et al., 2014; SWAIN et al., 1993; TOMAR et al., 2014; YUN et al., 2007).

5.2 A organização dos monômeros como dímeros

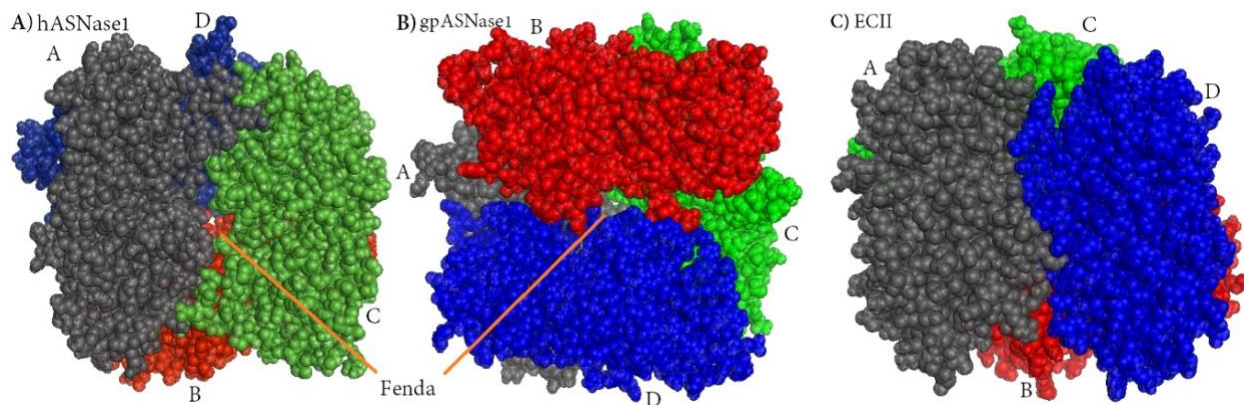
Na estrutura tetramérica de hASNase1 foi observada uma maior atratividade entre os pares de monômeros A-D e B-C, assim como na gpASNase1, alinhados de forma antiparalela, com os domínios 1 e 2 em polos opostos, como mostrado no esquema na Figura 19 (seção 4.2). Schalk e colaboradores (2014) mostraram que o dímero de dímeros na gpASNase1 é formado pelos monômeros A-D e B-C. Nesse estudo, da determinação da estrutura cristalográfica do tetrâmero, a área de contato calculada para o par de monômeros que formam o dímero foi $\sim 1900 \text{ \AA}^2$. Para o par que possui menor contato (A-B e C-D), a área de contato foi $\sim 1100 \text{ \AA}^2$ (SCHALK et al., 2014). Os PII entre os monômeros da hASNase1 mostram maior interação atrativa entre A – D e B – C ($-397,00$ e $-460,52 \text{ kcal mol}^{-1}$), fazendo contato através dos Domínios 2, o que está em

concordância com o observado para a formação de dímero de dímeros para a estrutura funcional da hASNase1 como a da gpASNase1 (SCHALK et al., 2014). Entre os pares restantes, o par A – C é o de menor PII ($-269,57 \pm 29,64$ kcal mol⁻¹), mas destoa do par correspondente B – D que apresenta bem menos atratividade ($-188,06 \pm 28,42$ kcal mol⁻¹). As áreas de contato nas interfaces entre A – C e B – D podem ser a mais significativa do tetrâmero, visto que eles estão orientados lateralmente, com as posições dos domínios 1 e 2 invertidos. Essa diferença entre esses dois pares pode provocar distorções na estrutura, visto que esses pares estão sobrepostos. Também foram observadas as interfaces A – B e C – D (contato entre do Domínios 1) com PII de ~ 210 kcal mol⁻¹ para os dois pares. Isso implica que cada monômero está em contato com todos os três outro monômeros.

Na gpASNase1, considerando o PII, há um segundo padrão de interação não na formação dos pares, mas na ordem de grandeza dos PII, pois, ao contrário da hASNase1, os pares A – B e C – D são muito mais atrativos ($-195,76 \pm 19,44$ e $-261,64 \pm 27,85$) que os pares A – C e B – D ($-89,43 \pm 15,94$ e $-39,32 \pm 19,71$ kcal mol⁻¹). Ou seja, a interação atrativa é menor entre os Domínios 1 e 2, que estão localizados lateralmente. Isso implica numa maior dificuldade de aproximação de A – C e B – D, permanecendo a fenda observada inicialmente na estrutura, no centro do tetrâmero, como visto na Figura 41 e 59

No caso da *EclI*, o arranjo dos quatro monômeros, que formam o dímero de dímeros, a representação é diferente do definido para gpASNase1 e hASNase1, pois os monômeros C e D estão invertidos em posição. Os pares de monômeros que apresentam maior atração são os A-C e B-D, ou seja, entre os Domínios 2, seguido pelo A-D e B-C, em interação lateral, como ocorre para gpASNase1. A atração entre A – C e B – D em gpASNase1 e hASNase1 não resulta em contato total entre esses pares, como observado na Figura 59, permanecendo uma fenda no meio que transpassa toda estrutura quaternária. Isso não é observado para *EclI* e está em concordância com o relatado por Schalk e colaboradores (2014), que a *EclI* não possui o formato de “donut” que a gpASNase1 possui e que a hASNase1 também apresentou. Essa fenda é mantida ao longo da simulação em gpASNase1 e hASNase1.

Figura 59 - Representação em esferas das estruturas de tetrâmero de A) hASNase1, B) gpASNase1 e C) EclI. Os monômeros são representados por diferentes cores: A, em cinza; B, em vermelho; C, em verde e D, em azul.

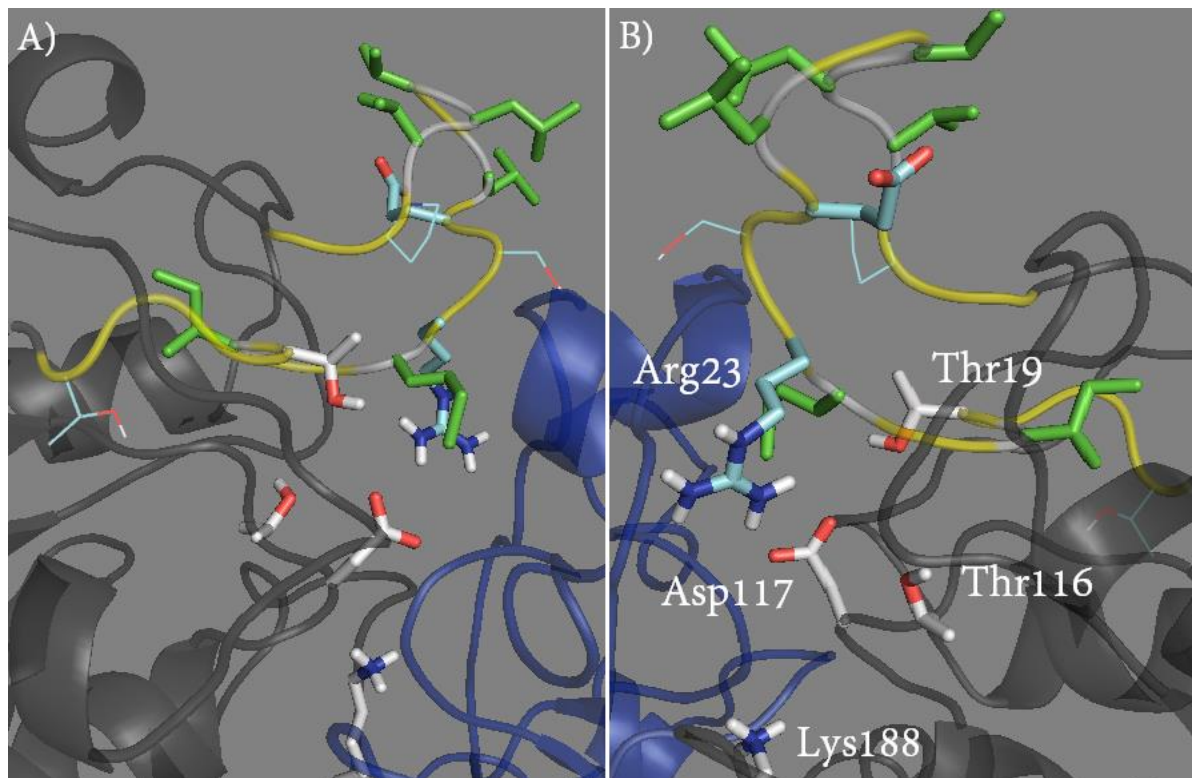


Fonte: O autor.

5.3 Estrutura e função dos resíduos no sítio

Os PII entre os resíduos do sítio catalítico na hASNase1 revelam que nos monômeros A e C os potenciais são similares ($-29,21 \pm 1,87$ e $-25,96 \pm 1,46$ kcal mol⁻¹) mas destoam dos observados para os sítios dos monômeros B e D ($-58,02 \pm 6,28$ e $-44,36 \pm 3,24$ kcal mol⁻¹), que são similares entre eles. Isso sugere que há um padrão de interação entre os sítios e esse padrão se repete entre sítios em posições opostas na estrutura, visto que os Domínios 1, que abrigam os sítios, estão em posições opostas. Ao mesmo tempo, dentro de cada dímero, o sítio do monômero A está próximo, espacialmente, do sítio de D e o sítio de C está próximo do B (Figura 22). Assim, os sítios estão próximos e com comportamentos distintos, um deles se movimentando mais que outro, observado não só pelo valor do PII apresentados, mas também pelos desvios (Figura 21 e Tabela 9). Pode ser observado, também, sítios que os resíduos estão mais distantes um do outro, como o caso do Thr19 que pode se distanciar da tríade Thr116-Asp117-Lys188, como ilustrado na Figura 60A e B.

Figura 60 - Representação da estrutura em fita da hASNase1 no sistema Tetrâmero, com destaque para a Alça1 em amarelo, sendo que os resíduos estão destacados em bastão. Na cor verde os resíduos hidrofóbicos e os elementos como Carbono colorido em azul claro representando resíduos carregados e polares. Os resíduos do sítio catalítico estão em cor de carbono branco.

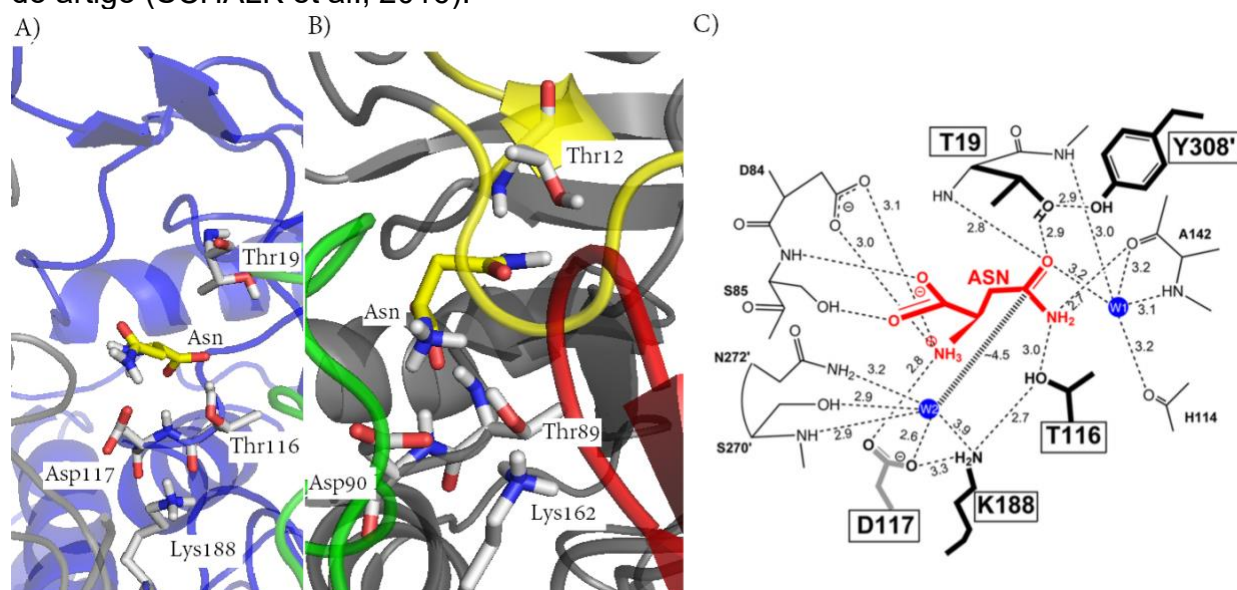


Fonte: O autor.

Através da análise do PII entre resíduos do sítio catalítico e a Asn, para todas as L-asparaginases, pode-se inferir níveis de energias que representam uma boa orientação da Asn no sítio. No caso dos resíduos do sítio da *EclI* foi observado que as Asn permanecem nos SítiosA, B e D com PII mais frequentes na faixa de ~ -47 a -40 kcal mol⁻¹, que é a energia que representa melhor orientação da Asn no sítio, como observado no exemplo do SítioA-AsnA, na Figura 53 e 54B. PIIs nessa faixa de energia também foram observados para Asn na gpASNase1, no Sítio D-AsnD com $-43,14 \pm 7,00$ kcal mol⁻¹ (Figuras 43 e 45 e Tabela 16), enquanto para a hASNase1, no sistema ASPG-ASN-CAT, não foi observado PII suficiente (apenas $-27,07 \pm 4,69$ kcal mol⁻¹). Na Figura 28A, é mostrado a conformação da Asn no sítio para Sítio D-AsnD e a curva de PII na Figura 26. Nota-se que a orientação, embora a Asn esteja com seu plano orientado em

posição paralela ao plano da tríade (Thr116, Asp117 e Lys188) o grupo $-COO^-$ carboxílico e a cadeia lateral estão invertidos em relação a orientação esperada. O mesmo ocorre com os PIIIs suficientes entre Asn e Sítios da hASNase1, no sistema ASPG-ASN-CAT-ALO, o SítioB-AsnB. Em alguns momentos da DM, o PII mostrou energias desejáveis para a orientação da Asn no sítio, $-40,29 \pm 10,51 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Figura 34 e Tabela 13). No entanto, as orientações mostradas na Figura 62B e C, não estão de acordo com o preconizado nos mecanismos. Mesmo com PII oscilando na faixa de energia suficiente, a Asn não está orientada corretamente no sítio. Nota-se que os grupos da cadeia lateral e $-COO^-$ estão com orientação invertida, o $-COO^-$ está voltado para a Thr19.

Figura 61 - Orientação da Asn no sítio catalítico. A) Orientação da Asn na hASNase (PII foi $-27,07 \pm 4,69 \text{ kcal mol}^{-1}$) diferente da orientação em B) na *EclI* (PII foi $-43,14 \pm 7,00 \text{ kcal mol}^{-1}$). C) Orientação correta da Asn no sítio descrita na literatura. Figura retirada do artigo (SCHALK et al., 2016).

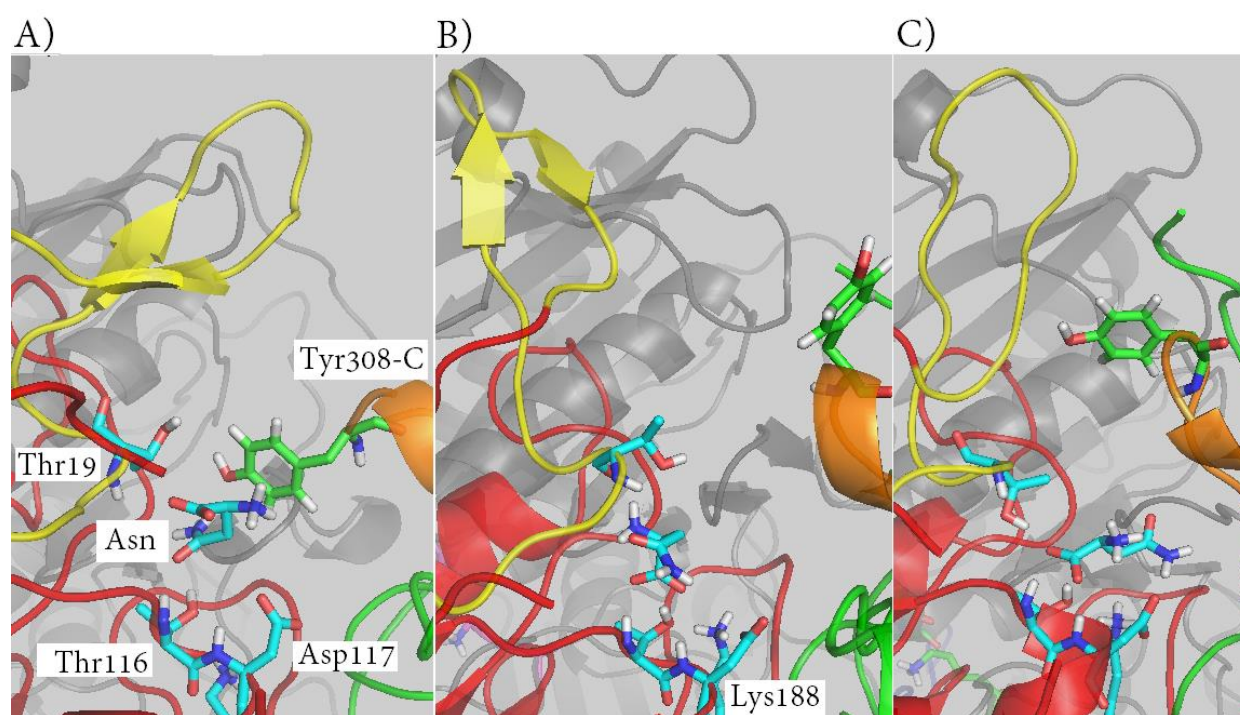


Fonte: O autor.

A orientação da Asn no sítio catalítico já foi descrita por Schalk e colaboradores (2014) para a gpASNase1 e por Swain e colaboradores (1993) para a *EclI* e foi demonstrada ser a orientação também na hASNase1 por Karamitros e colaboradores (2014) que mostraram uma possível orientação da Asn, tanto no sítio catalítico quanto no alostérico, com base no modelo que eles construíram usando como molde a *EclI*. As estruturas foram sobrepostas e foi inferido que, como os sítios são

conservados, e a *Ecl* foi co-cristalizada com Asn, essa é a orientação apropriada também para a hASNase1 (KARAMITROS; KONRAD, 2014) como mostrado na Figura 61C. Portanto, os resultados de DM corroboram os resultados experimentais estruturais de conformação dos resíduos no sítio com a Asn, permitindo inferir um potencial para a interação nessa orientação nos sítios e em meio aquoso, que é favorável a catálise.

Figura 62 - Representação da Asn no sítio catalítico da hASNase1, no sistema ASPG-ASN-ALO, com estrutura em fita, evidenciando a Alça1 em amarelo, Alça2 do monômero C em laranja e a Tyr308, configurações coletadas na DM nos tempos: A) 0 ns, B) 62 ns e C) 205 ns.



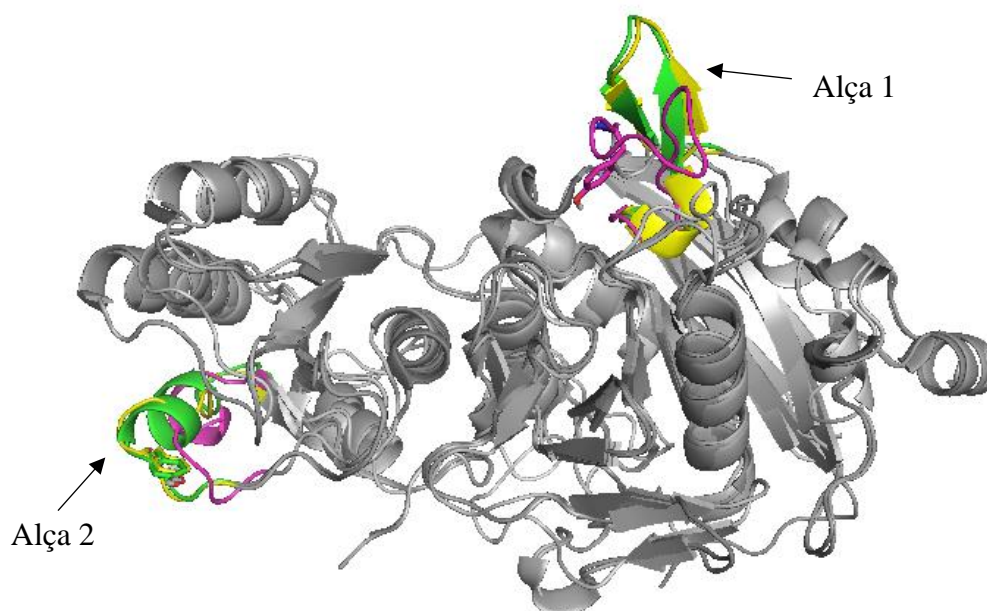
Fonte: O autor.

5.4 Estrutura e função da Alça1

Foi descrito na literatura que a presença da Tyr308, em uma alça que cobre o sítio catalítico, na gpASNase1 e da Tyr25, em uma alça que cobre o sítio catalítico, na *Ecl* é importante para que haja uma alta taxa de catálise (ANISHKIN et al., 2015; AUNG et al., 2000; BAGERT; RÖHM, 1989; PALM et al., 1996; SCHALK et al., 2014, 2016; SWAIN et al., 1993). Porém, o laço que contém a Tyr308 na gpASNase1, não é o mesmo

laço na *EclI* que contém o resíduo Tyr25, embora a função relatada seja a mesma nas duas enzimas. A Figura 63 mostra o posicionamento das Alças, que são denominadas Alça 1 e Alça 2, nos monômeros de *EclI*, gpASNase1 e hASNase1.

Figura 63 - Representação em cartoon dos monômeros de *EclI*, gpASNase1 e hASNase1 sobrepostos evidenciando o posicionamento das Alças 1 e 2, em cores rosa para *EclI*, amarela para gpASNase1 e em verde para hASNase1, bem como a posição da Tyr25 na *EclI* e da Tyr308 na gpASNase1 e hASNase1.

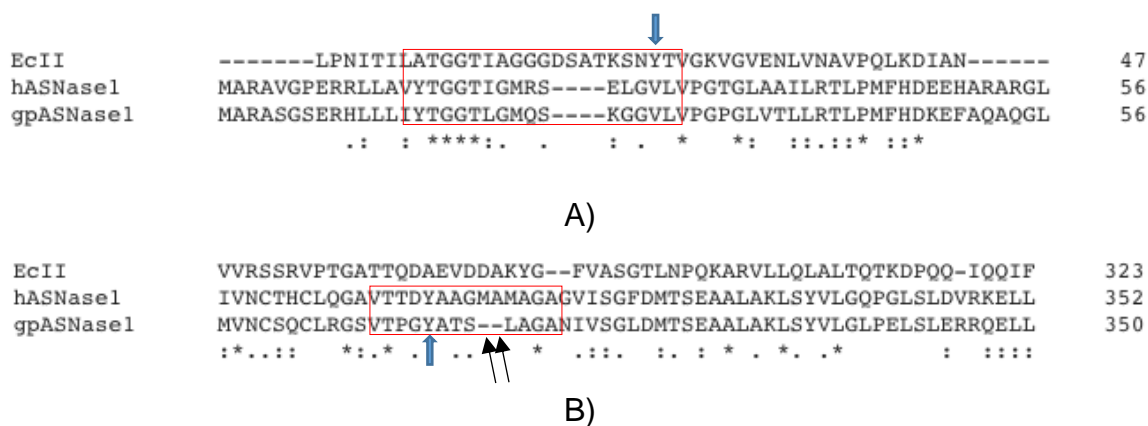


Fonte: O autor.

Através do alinhamento entre *EclI*, hASNase1, gpASNase1 define-se a sequência de aminoácidos dessas Alças, como descrito na Figura 64. Nota-se alta identidade entre as sequências de resíduos na Alça1 de hASNase1 e gpASNase1 e posições de divergência chamam atenção, na posição 25 da hASNase1 e gpASNase1, a presença de Glu25 e Lys25, dois resíduos de cargas opostas. Nessa posição, na *EclI* há uma Lys22. Outra posição divergente que deve ser destacada é a presença de Arg23 e Gln23 em hASNase1 e gpASNase1, respectivamente, e uma Gly16 nessa posição na *EclI*. Portanto, na Alça1 da hASNase1 há dois resíduos carregados, com cargas opostas e na gpASNase1 apenas um resíduo. No caso da *EclI*, o laço possui quatro resíduos a

mais e três resíduos carregados (Asp18, Lys22 e Lys29), sendo que Asp18, Lys22 estão em posições mais centrais na Alça1.

Figura 64 - Recorte do alinhamento entre EcII, hASNase1, gpASNase1. A) Em evidência, circundado em vermelho, a região que corresponde a Alça1 e a seta azul indica a posição da Tyr25. B) Em evidência alinhamento dos resíduos da Alça2, circundado em vermelho, em hASNase1 e gpASNase1. A seta azul indica posição da Tyr308 e as preta indicam a posição de inserção de dois resíduos na Alça1 da gpASNase1 em relação a hASNase1.



Fonte: O autor. Alinhamento feito no Clustal O (1.2.4) (LI et al., 2015; MCWILLIAM et al., 2013; SIEVERS et al., 2011)

Todas as sequências da Alça1 (Figura 64) apresentam alguns resíduos polares e hidrofóbicos (4 resíduos). As estruturas das três proteínas são apresentadas na Figura 65. Nessa representação, as Alças1 de hASNase1 e gpASNase1 estão abertas em relação a da EcII. Na Alça1 da hASNase1, observa-se que a distribuição espacial dos resíduos Arg23 e Glu25 estão separados, entre os resíduos hidrofóbicos. Além disso alguns resíduos polares estão entre os resíduos hidrofóbicos (Figura 65A e B). Essa configuração dificulta a formação de folhas- β no laço e a formação de um bloco hidrofóbico, resultando em instabilidade local Alça1, pois os resíduos estão voltados para a água, mas precisam constantemente minorar esse contato. No caso da gpASNase, a Lys25 está localizada próximo a dobra da Alça1, facilitando sua hidratação (Figura 65 C e D). Por outro lado, na gpASNase1 é observada uma região concentrada de resíduos hidrofóbicos, pertencentes aos dois lados da Alça1, essa configuração ajuda a estabilizar a estrutura local.

A *EclI*, que possui uma Alça1 maior que *hASNase1* e *gpASNase1* (Figura 64), apresenta a mesma quantidade de resíduos hidrofóbicos, porém dos quatro resíduos dois são alaninas. Na *EclI*, os dois resíduos de cadeia lateral mais longa estão mais escondidos do solvente, como mostrado na (Figura 65E e F). A Alça1 está fechada sobre o sítio, mantendo os três resíduos ionizados voltados para o solvente, sendo que um par desses resíduos tem a possibilidade de formação de ponte salina entre Asp18 e Lys22. Essa configuração da *EclI* (Figura 65E e F) mostra o substrato Asn no sítio catalítico, inserida e orientada no SítioA-AsnA, após 300 ns de DM, como também já mostrado na Figura 53B. Essa é uma orientação bem caracterizada pelo PII entre Asn e o sítio, como mostrado na Figura 52. A Figura 65E e F mostra a presença da Tyr25 que está próximo da Asn e do sítio, podendo se aproximar facilmente com reajuste da posição da Alça1.

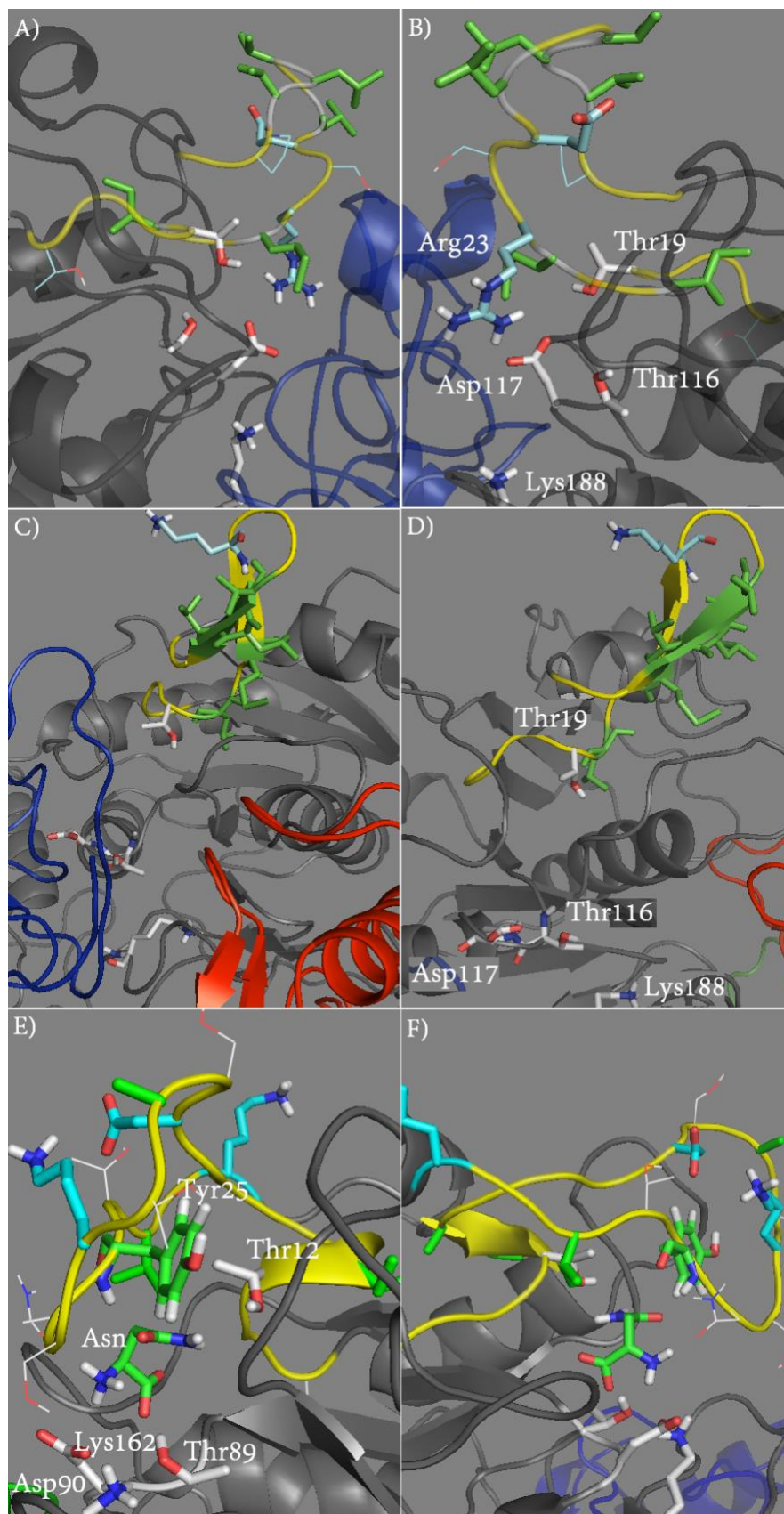


Figura 65 - Representação da estrutura em fita da A) e B) hASNase1 (ASPG-ASN-CAT), C) e D) da gpASNase1 (GPIG-ASN) e E) e F) da ECII (ECOLI-ASN), com destaque para a Alça1 em amarelo, sendo que os resíduos estão destacados em bastão. Na cor verde os resíduos hidrofóbicos e os que estão com átomos coloridos, possui Carbono em azul claro representando resíduos carregados e polares. Os resíduos do sítio catalítico estão em cor branco de carbono. Na Figura E e F está destacado a Tyr25 na Alça1.

Fonte: O autor.

5.5 Movimentação da Alça1

Visando analisar a movimentação da Alça1, foi monitorado o quanto sua posição se distancia da inicial, através de RMSD ao longo da DM. Nesse processo, a região do Domínio1 sem a região da Alça1 é sobreposta, de modo que a mudança de posição da Alça1 é evidenciada, os detalhes estão descritos na Figura 66. Nota-se que há situações e configurações em que a Alça está com diferença de 3,2 nm de distância. As curvas de RMSD, que são normalmente lançadas em gráficos, foram reduzidas a RMSD médios com os respectivos desvios, para todos os quatro monômeros e as quatro Alças, para todos os sistemas, sendo que para aqueles que possuem Asn nos sítios catalíticos, as médias foram calculadas durante o tempo de residência e após, para avaliar o efeito da presença de Asn no sítio. Embora não se tenha interesse no RMSD dos monômeros, eles constituem uma medida de qualidade para o RMSD das Alças, uma vez que se garante que seus RMSD sejam baixos, pois a sobreposição foi feita com qualidade para garantir a medida do desvio das Alças. Nesse caso, se RMSD do monômero fosse alto, significaria que a estrutura não está ou não pode ser sobreposta o que implica que o RMSD da Alça não traz a informação real de variação em relação a referência. Outro fator importante que foi monitorado, mas os dados não foram mostrados, é a estabilidade estrutural da Alça1, pois a mesma pode mudar a sua estrutura. Os RMSD calculados para sobreposição e RMSD das Alças ficaram na ordem de 0,13 nm, mostrando que não há mudanças significativas na Alça que contamine as análises de sua movimentação de abrir e fechar, em relação a referência.

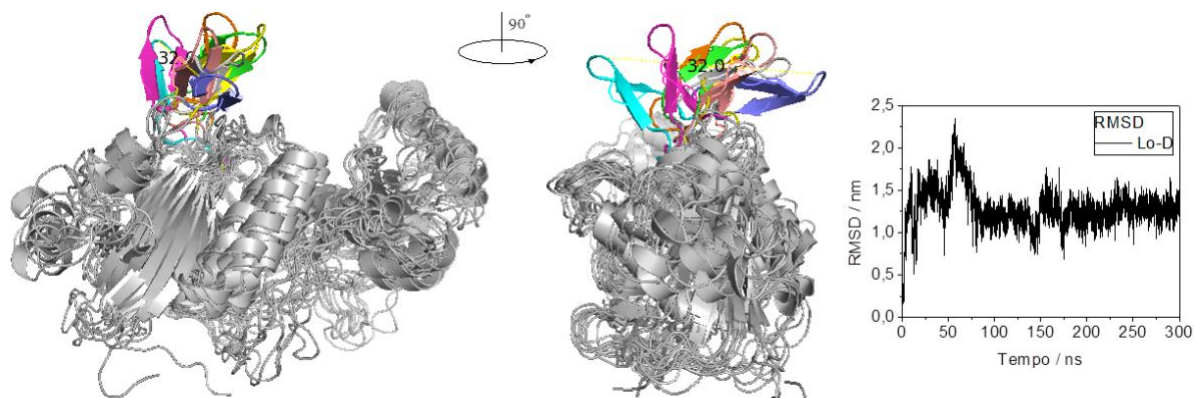
Na Figura 67 estão mostrados os dados para cada sistema de RMSD das Alças e Monômeros. Nota-se que, no sistema Tetrâmero de hASNase1 em água, os RMSD variam entre as Alça1 dos dímeros A – D e B – C com um RMSD alto e outro mais baixo (Figura 67A). Quando analisamos o sistema ASPG-ASN-ALO, a presença da Asn nos sítios alostéricos proporcionou menor movimentação da Alça1, sendo observado apenas um pequeno aumento para Lo-D (Figura 67B). No caso em que a Asn está presente no sítio catalítico, sistema ASPG-ASN-CAT, nota-se RMSD extremamente baixo, com exceção da Lo-D, que mesmo com a presença de Asn no sítio possibilita movimento da Alça1 (Figura 67C). É necessário observar que nesse caso, a Asn no sítio

não possui orientação apropriada para sua catálise, como mostrado na Figura 61. Após a rápida saída das Asn os RMSD estão um pouco acima de 0,4 nm, que são valores próximos do observado para hASNase1 em água. No sistema ASPG-ASN-CAT-ALO, em que foi simulado a presença da Asn nos sítios alostéricos e catalíticos, nota-se que a maioria das Alças se movimentam pouco, estando abaixo de 0,4 nm (Figura 67D). Quando as Asn saem do sítio catalítico, a movimentação da Alça1 aumenta, como observado pelos incrementos nos RMSD, com exceção para Lo-B. No caso da Lo-B, o RMSD é maior quando a Asn está no sítio, demonstrando que, embora a Alça1 esteja aberta para a saída da Asn, ela se mantém no sítio. Essa possibilidade é ratificada pelas oscilações na curva de PII observadas, mostrando que Asn muda de posição no sítio frequentemente. No entanto, de modo geral a presença em posição apropriada no sítio, implica que Asn estabiliza a movimentação a Alça1. Esse achado, está em concordância com a literatura, pois já foi inferido que essa alça adquire maior estabilidade quando há a ligação do substrato no sítio. (ANISHKIN et al., 2015; AUNG et al., 2000; MICHALSKA; JASKOLSKI, 2006).

Os sistemas que foram simulados com a gpASNase1 mostraram movimentações da mesma ordem de RMSD observada para hASNase1 quando em água e maior para gpASNase1 com Asn nos sítios catalíticos (Figuras 67E e F). No sistema PIG-ASN-CAT, mesmo com a presença de Asn no sítio, a Alça1 permanece se movimentando.

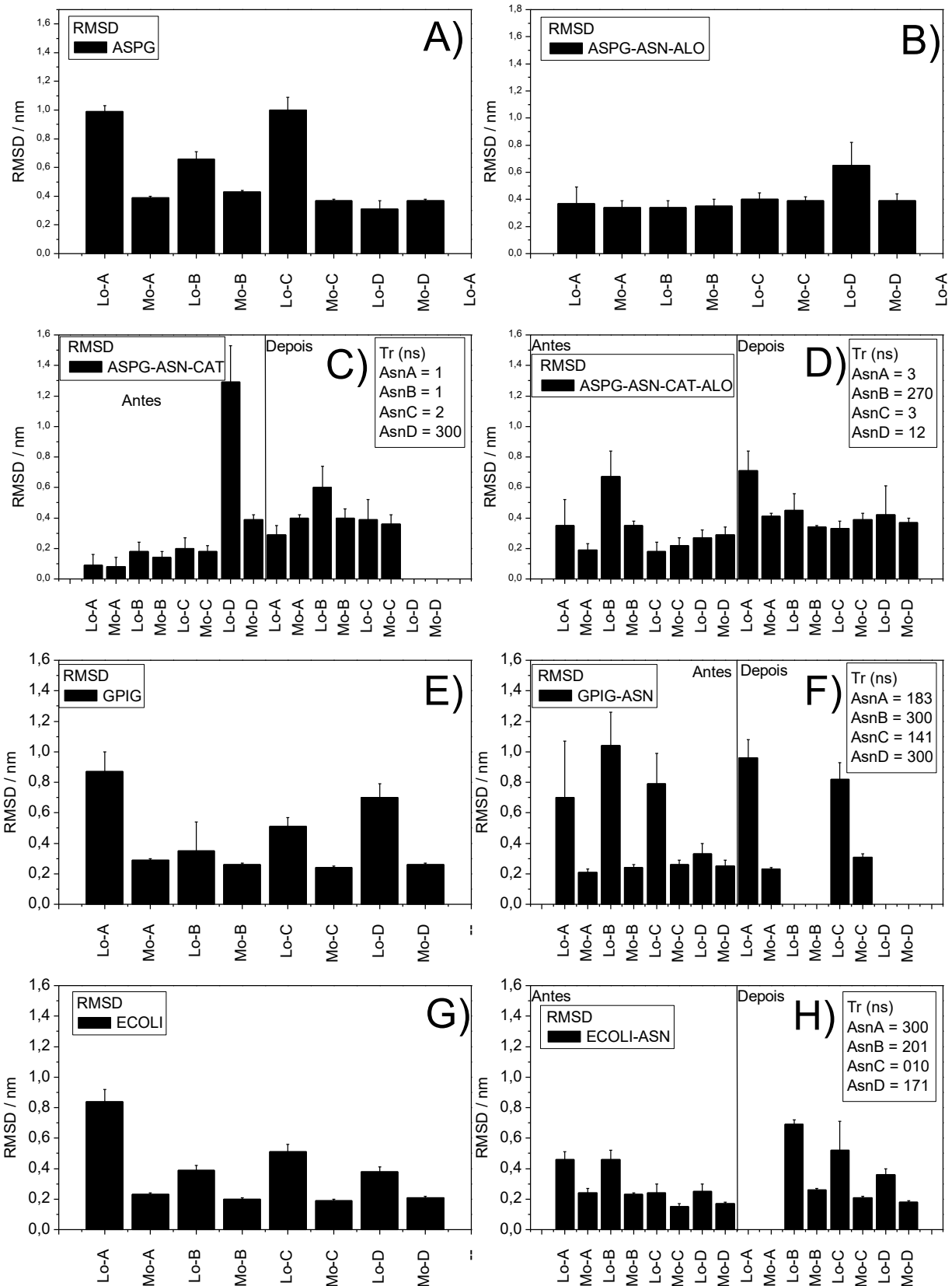
Os RMSD para a *EclI* com e sem Asn, sistemas *ECOLI* e *ECOLI-ASN* respectivamente, mostram (Figura 67G e H) que o padrão de movimentação das Alça1 sem Asn no sítio é muito próximo do observado para gpASNase1, comparando Figura 67G e E. Durante a permanência da Asn nos sítios catalíticos há uma redução comedida da movimentação da Alça1, como visto pela pequena redução do RMSD, comparando lado esquerdo da Figura 67H e Figura 67G. Contudo, após a saída da Asn no sítio a movimentação volta ao mesmo nível do observado para o sistema *ECOLI*, uma vez que RMSDs são em geral comparáveis, como visto comparando as Figura 67E e F. Assim, com exceção da *EclI*, hASNase1 e gpASNase1 não mostram redução efetiva da movimentação da Alça1, com o Asn está inserido no sítio catalítico.

Figura 66 - Sobreposição de oito configurações escolhidas ao longo da DM, do Monômero D (Mo-D). Sobreposição dos carbonos ($C\alpha$) do Domínio1, com exceção dos $C\alpha$ da Alça1 (Lo-D). As estruturas de Mo-D estão representadas em fita e em cinza, enquanto Lo-D estão indicadas cada uma com uma cor diferente. A distância entre as configurações extremas é de 3,2 nm indicada entre Lo-D azul e ciano. A direita a curva de RMSD de Lo-D $\sim 1,2$ nm, sendo que o RMSD do Mo-D $\sim 0,4$ nm.



Fonte: O autor.

Figura 67 - RMSD da Alça1 nos diferentes sistemas simulados para os quatro monômeros (A, B, C e D). A Alça1 de cada monômero é denominada Lo-A, Lo-B, Lo-C, Lo-D e os respectivos monômeros de cada Alça1, sem constar a região da Alça1, é denominado como Mo-A, Mo-B, Mo-C, Mo-D. As médias e desvios estão indicados nos gráficos aos pares de Lo e Mo. Os cálculos consideram situações antes e depois do tempo de residência (TR) e teq para os sistemas que não possuem Asn nos sítios catalíticos e alostéricos.



Fonte: O autor.

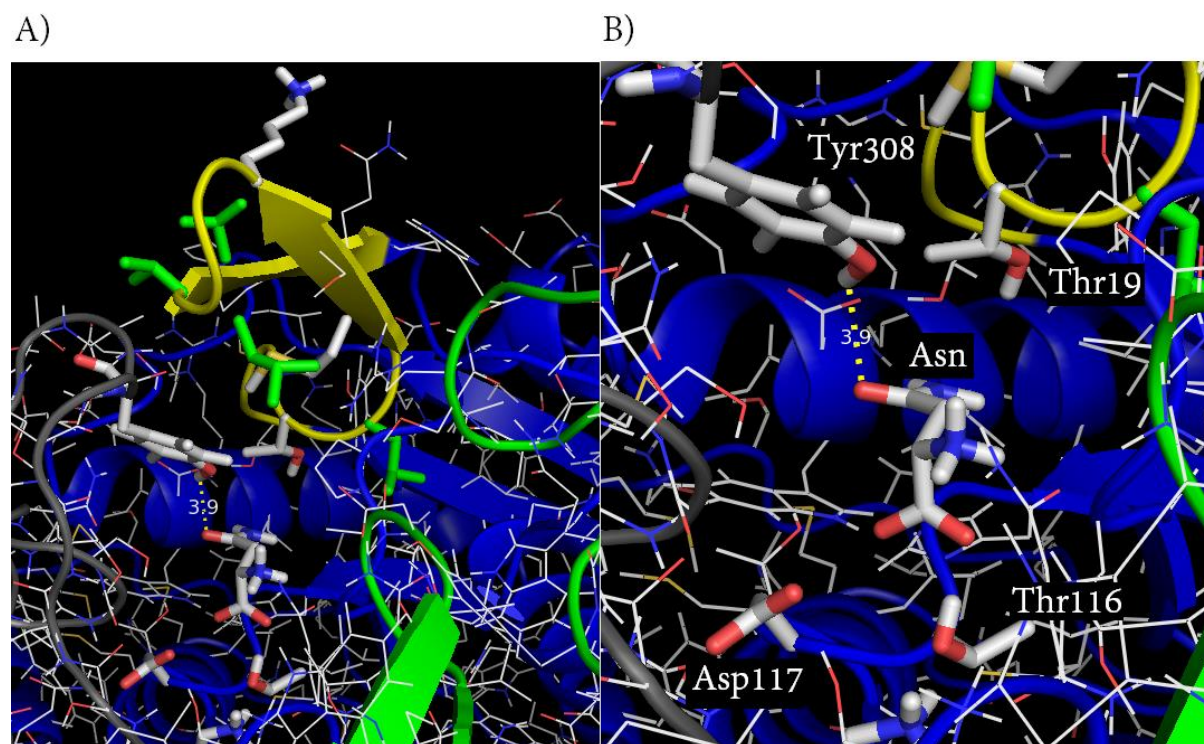
5.6 Função das Tyr25 em *EclI* e Tyr308 em *hASNase1* e *gpASNase1*

Anteriormente, foi atribuído a Tyr25 da *EclI*, de maneira controversa, o papel de nucleófilo-ativador (ORTLUND et al., 2000). Da mesma forma, Michalska e colaboradores (2006) sugeriram que dois resíduos de treonina possuiriam papel do nucleófilo catalítico, em uma tríade Thr-Lys-Asp e em uma díade Thr-Tyr. Os autores reforçam que, embora a opinião consensual favoreça essa hipótese, é controversa a função da Tyr, na díade, atuando como ativador nucleófilo por ela está localizada em uma alça que seria altamente flexível, o que contraria a função de ligação ao substrato (MICHALSKA; JASKOLSKI, 2006). Vários estudos foram realizados com troca da Tyr25 por outros resíduos para estudar os efeitos (AUNG et al., 2000; DERST et al., 1994). O estudo de mutação da Tyr25His, usando RMN, permitiu inferir que há grande mobilidade da cadeia lateral, mas que é reduzido quando há a presença de Asn no meio (BAGERT; RÖHM, 1989). Essa mobilidade da cadeia lateral da Tyr/His implica que a Alça1 é móvel o suficiente para expor o resíduo ao solvente e fechar na presença da Asn, uma evidência também observada pela má definição da densidade eletrônica dessa região (DERST et al., 1994; SWAIN et al., 1993). Portanto, na presença de Asn a Alça1 adota conformação fechada e na sua ausência aberta (BAGERT; RÖHM, 1989; DERST et al., 1994; ORTLUND et al., 2000; WEHNER et al., 1992). Experimentos monitorando a fluorescência de Trp66 mostrou que na presença de Asn a Alça1 fecha rapidamente. As mutações Trp66Tyr e Tyr25Trp promoveram uma redução de k_{cat} e da frequência de movimento da Alça1 por fatores de 10^2 and $>10^3$, respectivamente, sendo que a ligação de Asn no sítio não foi afetada (AUNG et al., 2000).

Na *gpASNase1* a Alça1, quando no estado aberto está com sua extremidade orientada para o solvente, mantendo todos os resíduos hidrofóbicos em contato com a água. No estado fechado a Alça1 fica posicionada entre dois monômeros adjacentes, com os resíduos hidrofóbicos protegidos da água e a Lys25 orientada para a água. O sítio catalítico está localizado nos Domínio2 do dímero como mostrado na Figura 68A. A Figura 68 mostra a posição da Alça1 do monômero D, em relação ao monômeros A e o monômero C que cruza o dímero A-D. A abertura da Alça promove um distanciamento da Thr19 em relação aos outros resíduos do sítio. Quando a Alça1 está fechada, está

fazendo contato direto com os A e C. Esse fechamento é suficiente para posicionar a Thr19, como visto na Figura 68B. Contudo o fechamento não é suficiente para cobrir todo o sítio, restando uma fenda com livre acesso pela água até a região do sítio (Figura 68A). A Figura 68B mostra em detalhes as posições dos resíduos do sítio catalítico, destacando a Tyr308 que pertence ao monômero A e, que nessa representação, está com o átomo de hidrogênio da hidroxila a 0,39 nm da Asn.

Figura 68 - gpASNase1 com exemplo da interação da Tyr308 do monômero A com sítio catalítico do monômero D, em A) figura com visão completa evidenciando a fenda para passagem de água, substrato e produto e B) visão ampliada de A com detalhes dos nomes dos resíduos e a distância Tyr - Asn no sítio.

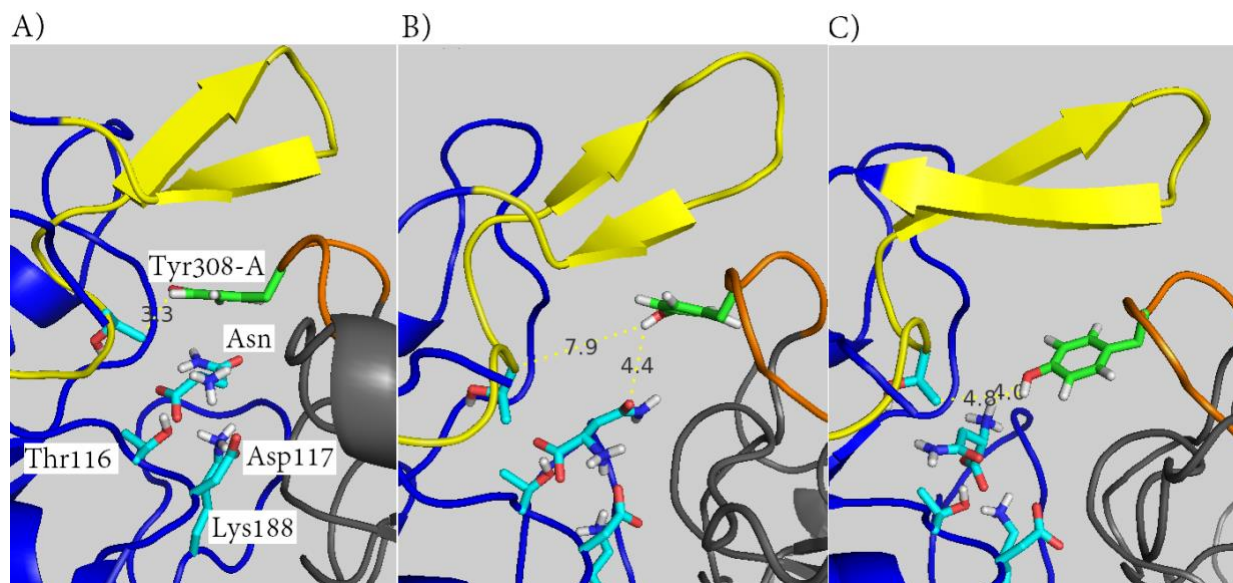


Fonte: O autor.

A Tyr308, na gpASNase1, pertence a um laço que é delimitado pelos resíduos entre Thr305 e Asn316 e denominado nesse trabalho de Alça2. Na Figura 69A, vemos a Tyr308 em contato com o Asn e a Alça1 (Amarelo), que está acima da Alça2 (laranja), e esse é o motivo pela qual a Alça1 não consegue fechar ainda mais sobre o sítio catalítico. Nota-se que, inicialmente, a região da Alça2 é representada como hélice, mas durante a

simulação essa estrutura se perde, dando maior liberdade de aproximação da Tyr308 até Thr19 e ao substrato Asn.

Figura 69 - Representação da estrutura em fita da gpASNase1 e dos resíduos do sítio catalítico do monômero D e da Tyr308 do monômero A (Tyr308-A), representados em bastão. São apresentadas três configurações em tempos A) 0 ns, B) 12 ns e C) 246 ns.



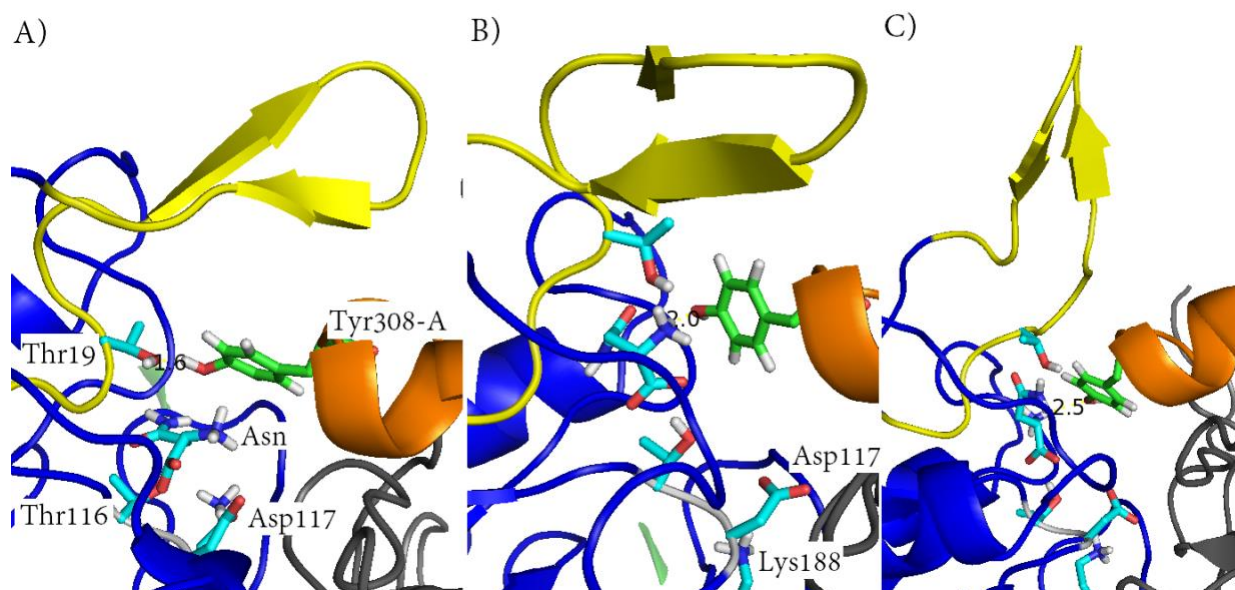
Fonte: O autor.

Os resíduos hidrofóbicos estão espalhados na Alça1, entre resíduos polares e a Arg23 e Glu25. Na Figura 65A e B a Alça1 do monômero A está em destaque, nota-se que a Arg23 está voltada para o interior da interface entre os monômeros B e D e o Glu25 na interface com B. A Alça1 encontra-se “aberta” em relação a posição do sítio catalítico, mas está orientada em direção ao monômero B. Nessa configuração, pelo menos três resíduos ficam voltados para a água (Val28, Leu29 e Val30). Portanto, a Alça não se fecha em direção ao sítio catalítico, mas também não fica totalmente exposta a água, pois minimiza seus contatos com a água quando interage com os monômeros B e D.

A Figura 70 mostra três configurações de sítio do monômero D da hASNase1 em contato com o monômero A e a Tyr308 (Tyr308-A). Nota-se, no tempo 0 ns, que a região definida laço, que define a Alça2, é na verdade uma região linear, que contém a Tyr308, que se estrutura como hélice a partir da Ala309. As configurações de 62 ns e 205 ns mostram que essa hélice é mantida. Sugere-se que essa estrutura em hélice seja

importante para controlar a inserção da Tyr308 até o sítio, diferentemente do que ocorre para a gpASNase1, onde a Alça2 tem estrutura disforme (Figura 69). Nota-se, em todas as configurações, que Tyr308 está bem próximo da Thr19.

Figura 70 - Representação da estrutura em fita da hASNase1 e dos resíduos do sítio catalítico do monômero D e da Tyr308 do monômero A (Tyr308-A), representados em bastão. São apresentadas três configurações em tempos A) 0 ns, B) 62 ns e C) 205 ns.



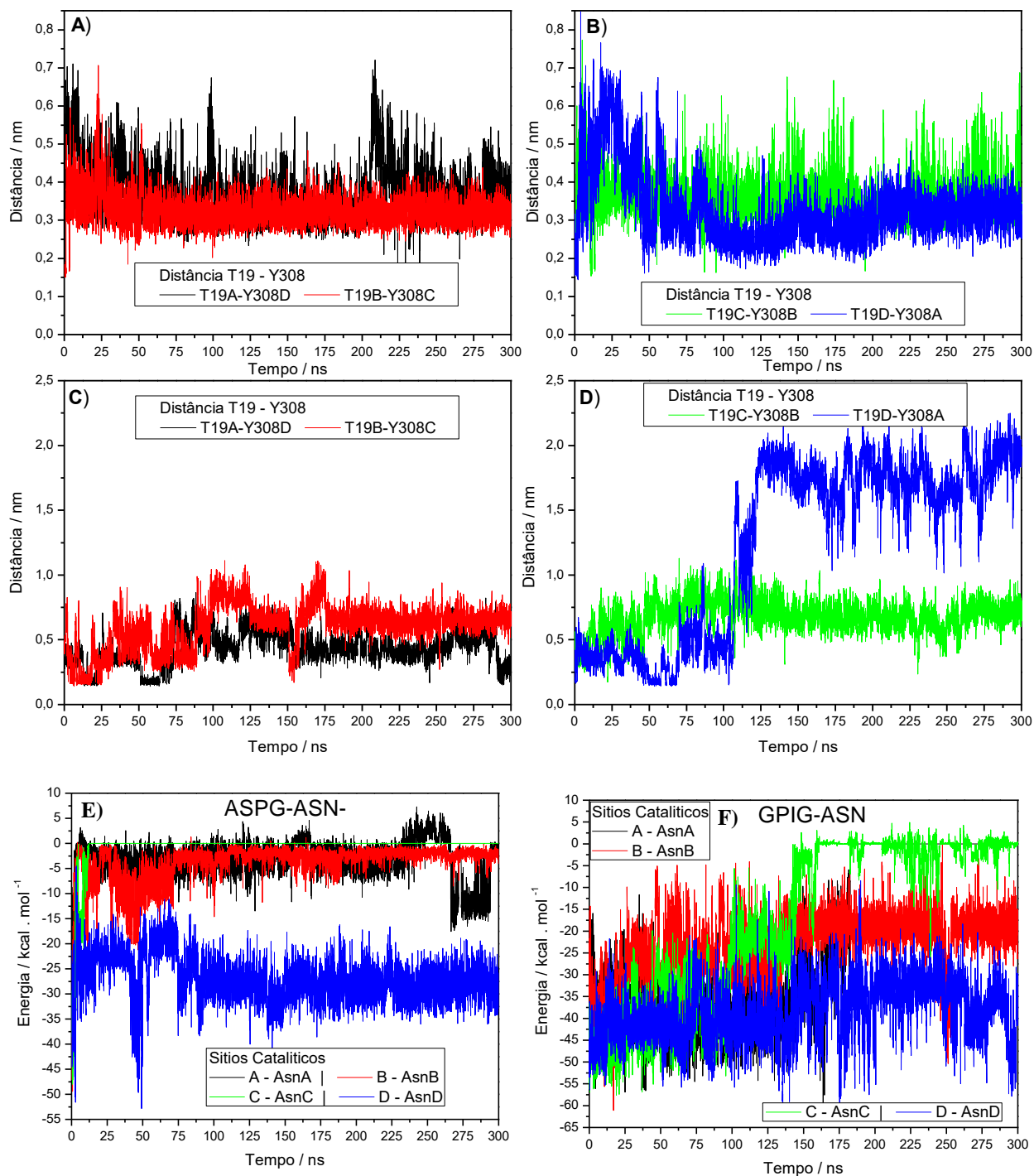
Fonte: O autor.

A Figura 65E e F mostra configurações da estrutura da *EclI*, evidenciando a posição dos resíduos do sítio catalítico e da Tyr25, com Asn presente. Nota-se que a Tyr25 não está orientada para a Thr12, como ocorre claramente para gpASNase1 e hASNase1. No entanto, por estar ligado a Alça1, com uma mudança de local ela pode acessar facilmente a Thr19. No entanto, pela análise da trajetória (dados não mostrados) a Tyr25 fica localizada acima do substrato, assumindo uma função e proteção de hidratação e posicionamento da Asn no sítio.

A Figura 71 mostra as distâncias mínimo monitoradas ao longo da DM da Thr19 e Tyr308 na hASNase1 (Figura 71A e B) e gpASNase1 (Figura 71C e D). Nota-se que as curvas de variação da distância na hASNase1 variam menos que gpASNase1, sendo os dados médios e desvios mostrados na Tabela 19. Esses dados ratificam o observado

anteriormente, em relação a estruturação em hélice da Alça2 na hASNase1 e linear na gpASNase1. Enquanto as distorções na Alça2 da hASNase1 são mais travadas, na gpASNase1 as distorções e movimentação da Alça2 são maiores. Comparando as curvas de distância Thr19 -Tyr308 e o PII entre os sítios catalíticos e Asn (apresentado nas seções 4.3.1 e 4.5, Figura 26 e 43) nota-se que para hASNase1 uma mudança brusca na curva da distância para o monômero D em ~ 55 ns e ao mesmo tempo há uma redução do PII (Figura 71E), indicando que a Asn mudou sua posição no sítio. Isso mostra que a Tyr308 afeta diretamente a estabilidade na orientação no sítio. Da mesma forma, para gpASNase1, mas mais evidente, em ~ 135 ns há mudanças no comportamento da curva de PII para o monômero D, que passa a oscilar com maior amplitude (Figura 71F). A partir desse momento, a curva de distância de Thr19-D - Tyr308-A mostra um grande distanciamento, como consequência de abertura da Alça2, chegando a 2,0 nm de distância. Nesse período, foi mostrado que Asn gira no sítio e pode assumir várias orientações. Portanto há uma relação direta entre o distanciamento da Tyr308-Thr19 e saída da Asn do sítio catalítico. Esse distanciamento é mais facilitado para gpASNase1 do que para a hASNase1.

Figura 71 - Distâncias mínimas entre átomos da Thr19 (T19) e Tyr308 (Y308), considerando o primeiro resíduo a esquerda da legenda, T19, de um monômero X (X= A, B, C e D) e a T308Y (Y = D, C, B e A) de outro monômero. Figuras A) e B) para monômeros da hASNase1, sistema ASPG-ASN-CAT; Figuras C) e D) para monômeros da gpASNase1, sistema GPIG-ASN. Figuras E) e F) PII entre resíduos do sítio catalítico e ASN em cada sítio.



Fonte: O autor.

Tabela 19 - Médias e desvios observados entre as distâncias da T19 de um monômero com a Y308 do monômero vizinho nos sistemas ASPG-ASN-CAT e GPIG-ASN.

Sistema	Distância	Média ± Desvio
	T19 (mon) - Y308 (mon)	(nm)
ASPG-ASN-CAT	T19 (A) - Y308 (D)	0,38 ± 0,07
	T19 (B) - Y308 (C)	0,32 ± 0,03
	T19 (C) - Y308 (B)	0,35 ± 0,06
	T19 (D) - Y308 (A)	0,32 ± 0,03
GPIG-ASN	T19 (A) - Y308 (D)	0,44 ± 0,09
	T19 (B) - Y308 (C)	0,65 ± 0,10
	T19 (C) - Y308 (B)	0,67 ± 0,09
	T19 (D) - Y308 (A)	1,74 ± 0,18

Fonte: O autor.

Autores sustentam que a mudança estrutural na Alça2, para aproximação da Tyr308, é mais severa que na Alça1, pois a Alça1 tem o movimento de abrir e fechar mas conserva a sua estrutura, enquanto a Alça2 se deforma para estender e aproximar a Tyr308 até ao substrato (SCHALK et al., 2014), o que está em concordância com o observado na DM. A proximidade entre Tyr308 e Thr19 e em resíduos homólogos na *EclI* (Tyr25 e Thr12) já foi proposta que essa Tirosina participa de mecanismos de reação, através de formação de intermediário covalente com o substrato Asn (PALM et al., 1996). Experimentos por mutagênese na Tyr308Phe mostram uma redução de 100 vezes a atividade (SCHALK et al., 2016), o que está em acordo com o observado para mutação Tyr25Phe que foi reduzida 1800 vezes (DERST et al., 1994).

5.7 Alostérico na hASNase1

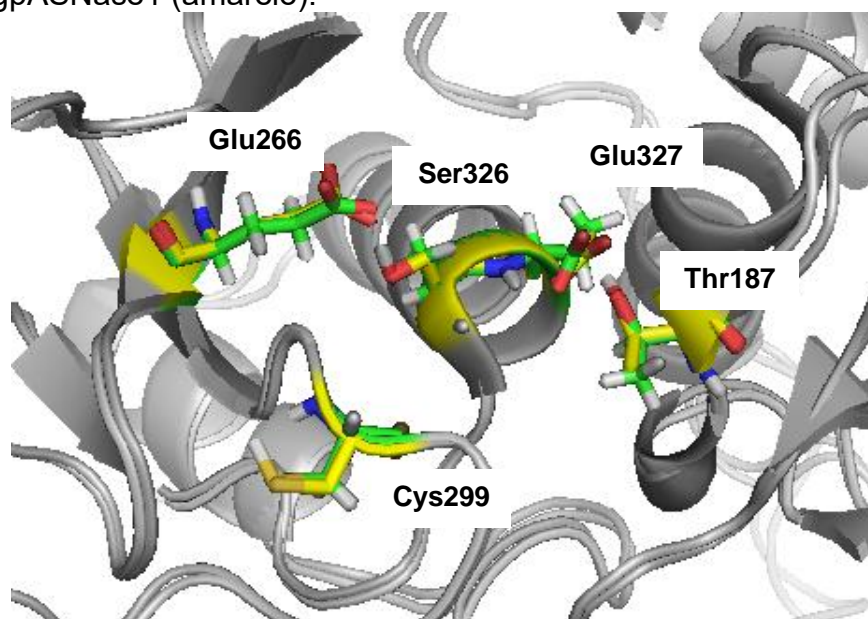
Acredita-se que o alosterismo da hASNase1 possa impedi-la de apresentar uma maior eficiência de catálise, pois sua cinética é bastante parecida com a da *EclI* que

também apresenta alosterismo e alto valor de $[S]_{0.5}$ (0,4 – 1,2 mM) (KARAMITROS; KONRAD, 2014; YUN et al., 2007). Apesar da regulação ser positiva ($n = 3,9 \pm 0,2$), acredita-se que a hASNase1 só operaria de forma eficiente em concentrações bastante elevadas de substrato (KARAMITROS; KONRAD, 2014).

O mutante T162A de *Ecl* foi criado com o intuito de observar se esse resíduo atuava na transmissão de informação do sítio alostérico para o catalítico. Foi verificado que a enzima passou a obedecer a cinética michaeliana e não foi observada cooperatividade. Foi verificado, também, que o sítio alostérico estava realizando as mesmas interações que no sítio alostérico da enzima selvagem. No entanto, o K_m aumentou em relação à enzima selvagem (de 1,2 para 4,6 mM) (YUN et al., 2007). A mesma mutação (T187A) foi realizada na hASNase, porém a mutação ocasionou perda de atividade (KARAMITROS; KONRAD, 2014). Com o intuito de entender melhor como se dá a regulação alostérica na hASNase1, Karamitros e colaboradores (2014) fizeram várias mutações nos resíduos do sítio alostérico, porém todas as mutações causaram perda de atividade da enzima.

Foi observado que a hASNase1 possui os mesmos resíduos, conservados no sítio alostérico e nas mesmas orientações (RMSD 0,02 nm) que na gpASNase1 (Figura 72), porém não há relatos na literatura de nenhum tipo de alosterismo para a gpASNase1 e, além disso, foi reportado que ela segue a cinética michaeliana (OHNUMA; BERGEL; BRAY, 1967).

Figura 72 - Representação em forma de bastão da sobreposição dos resíduos do sítio alostérico da hASNase1 (verde) na gpASNase1 (amarelo).

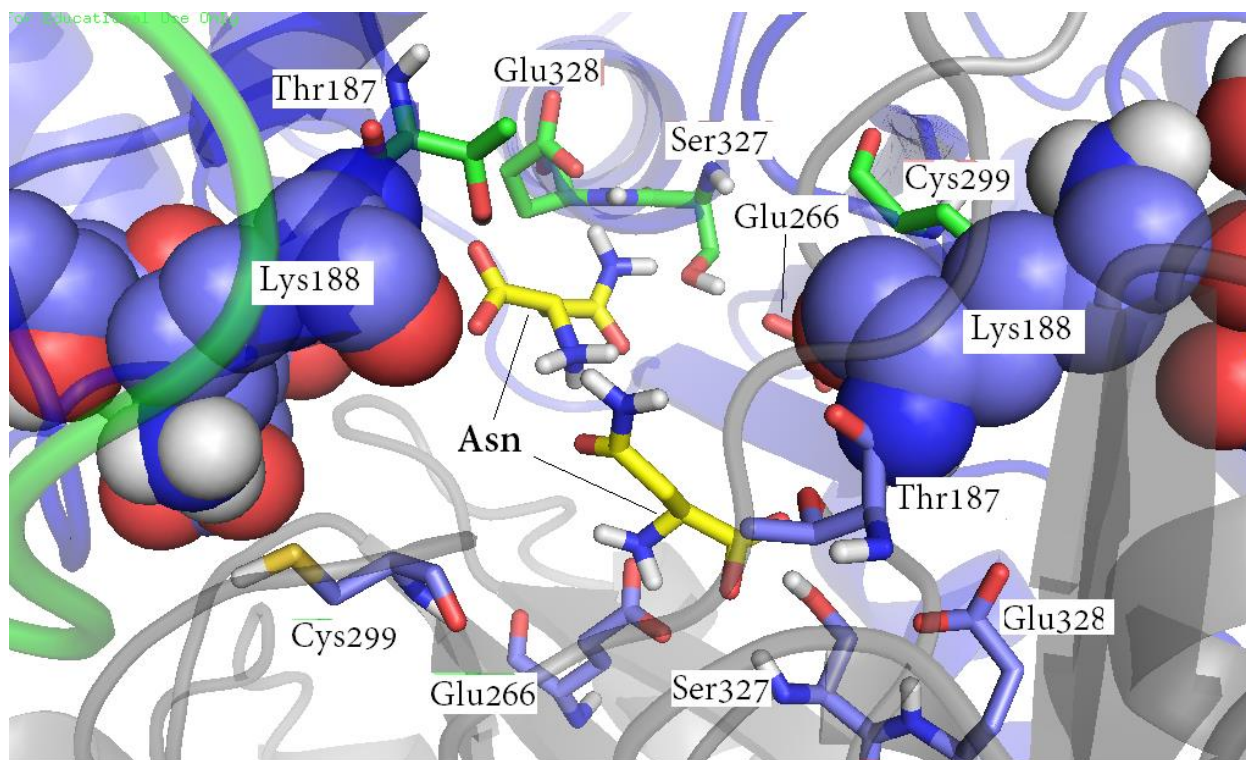


Fonte: O autor.

Foram monitoradas as distâncias mínima da Lys188 aos resíduos Asp117 e Thr116 que representam a díade catalítica ou a tríade, em conjunto com a Lys188. A Thr187 é vizinha a Lys188 e pode influenciar no seu posicionamento, através da cadeia lateral da Treonina voltada para a região do sítio alostérico, como mostrado na Figura 73. Essa região é formada pelos dois monômeros do dímero, e abriga duas Asn na região. Portanto, as distâncias foram monitoradas em todas as simulações com os tetrâmeros de *EclI*, gpASNase1 e hASNase1, para efeito de comparação, como mostrado na Figura 74. Nota-se para a hASNase1 o mesmo comportamento já observado antes para os pares de dímeros A - D e B - C, as distâncias médias são sensivelmente maiores para um dos monômeros dos dímeros (Figura 74A). Esse comportamento também é observado para gpASNase1 (Figura 74C). Todas as simulações envolvendo a hASNase1, com exceção das simulações que receberam Asn nos sítios catalíticos e alostéricos (sistema ASPG-ASN-CAT-ALO), mostram comportamento similares. Ou seja a distância entre os resíduos Thr116 e Asp117 e a Lys188 variam entre ~ 0,2 – 0,5 nm, implicando que esse distanciamento inviabiliza a reação no sítio. No caso do sistema ASPG-ASN-CAT-ALO, nota-se que a distância

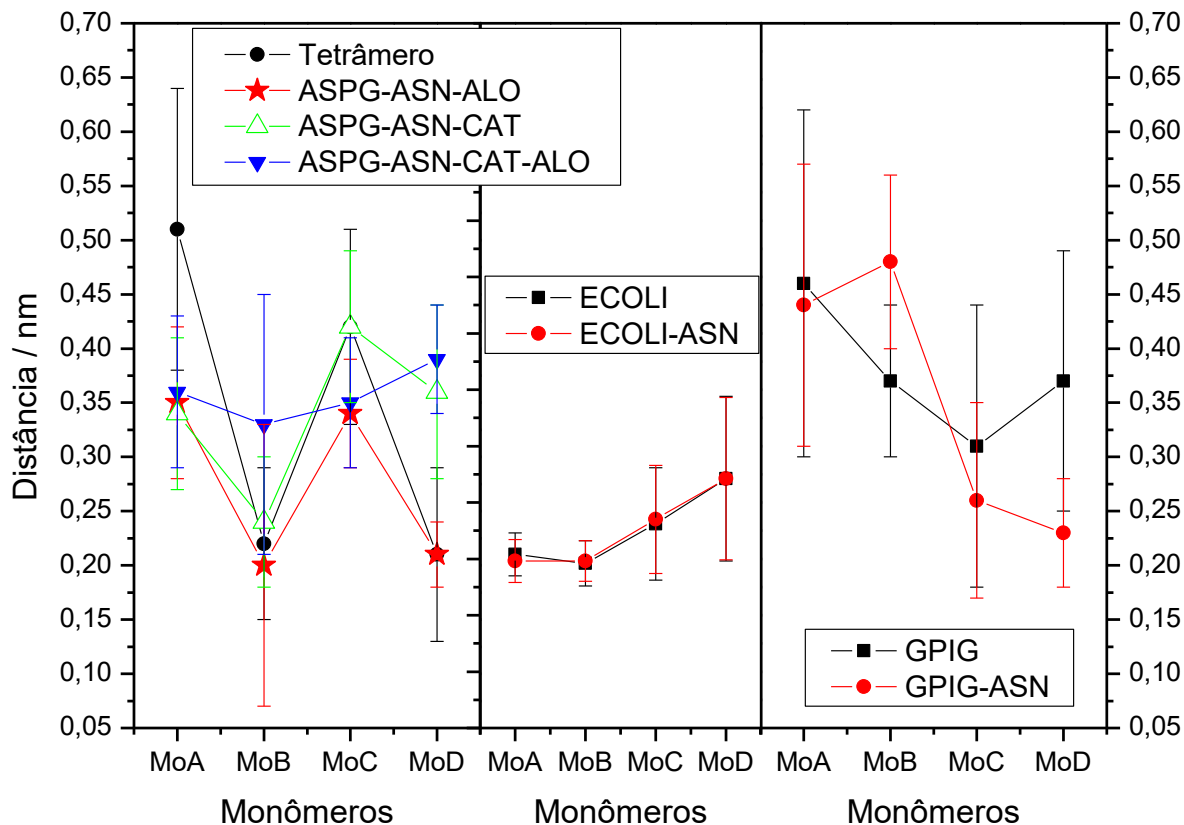
média varia em ~ 0,37 nm, uma distância mais próxima da dupla de resíduos da tríade e mais homogêneo entre todos os monômeros. Esse comportamento mostra que a presença da Asn é essencial para manter a posição da Lys188 e promover a reação no sítio catalítico. A influência da presença da Asn no sítio alostérico é evidenciada quando se compara com os dados para *EclI* (Figura 74B), onde as distâncias médias variam entre 0,2 – 0,27 nm, distâncias suficientes para formação de ligações de hidrogênio, que são conservadas na presença ou não da Asn no sítio catalítico. Isso implica que é necessário que a Lys188 esteja posicionada junto aos resíduos Thr116 e Asp117 na hASNase de uma forma mais estável estruturalmente para alcançar melhor desempenho na catálise. Certamente, o resíduo ao lado, Thr187, é chave nesse processo que está com a cadeia lateral voltado para o ambiente dos sítios alostéricos.

Figura 73 - Representação em fita da estrutura dos monômeros A e D (preto e azul) da hASNase1, a região que mostra os resíduos em bastão representa a interface entre os monômeros e os dois sítios alostéricos com as duas Asn (carbono em amarelo) no centro. Os resíduos representado em efera são os resíduos do sítio catalítico.



Fonte: O autor.

Figura 74 - Distâncias mínimas médias entre Lys188 aos resíduos Asp117 e Thr116, obtida pelo programa gmx mindist, durante o tempo de DM para cada sistema e cada monômero do tetrâmero (MoA, MoB, MoC e MoD).



Fonte: O autor.

6 CONCLUSÕES E OBSERVAÇÕES

Após análise e escolha do modelo 3D, foi possível seguir com as etapas de Dinâmica Molecular para o modelo proposto bem como para L-asparaginases homólogas.

Os resultados de DM demonstraram que a estrutura da hASNase1 é formada por dímero de dímeros. A definição dos dímeros foi bem caracterizada através do PII entre pares de monômeros. Embora hASNase1 e gpASNase1 sejam homólogas, o empacotamento proteico, que define a estrutura tetramérica, mostrou dissimilaridades, por exemplo, uma fenda no centro da estrutura, mais aberta que na gpASNase1. A fenda mais alargada na hASNase1 pode estar relacionada à função alostérica, necessária para

atividade dessa enzima, uma vez que a fenda possibilita a entrada de Asn na região do sítio alostérico. No caso de *EclI*, não foi observado qualquer indício de fenda e a estrutura do tetrâmero da *EclI* é mais condensada que a da *hASNase1* e *gpASNase1*.

As análises de PII entre a Asn e os resíduos do sítio mostraram que há maior liberdade de orientação do substrato em *hASNase1* e *gpASNase1* que em *EclI*. Portanto, foi possível inferir uma faixa de PII, que representa a orientação correta no sítio, somente no caso da *EclI*. Essa dificuldade foi decorrente dos vários aspectos de elementos de estrutura secundária presentes na *hASNase1* e *gpASNase1*, que não ocorrem na *EclI*.

Entre os elementos de estrutura divergentes, a Alça1 de *EclI* é mais estável que nas outras duas enzimas e sua movimentação é mais controlada. As diferenças de constituição de resíduos em arranjo entre resíduos hidrofóbicos, polares e carregadas na Alça1 contribui para essa diferença de estabilidade, principalmente, para o caso da *hASNase1*. Na *hASNase1* e *gpASNase1*, ficou evidente, durante a presença de Asn, que a função da Alça1 é se fechar sobre o sítio para ocorrer a catálise. O fechamento ajuda no posicionamento da Thr19 a um dos lados da Asn, ajustando seu plano ao plano da tríade de resíduos Thr116 e Asp117 e a Lys188. No caso da *EclI*, como já descrito experimentalmente, além de fazer uma cobertura do sítio, a presença da Tyr25 na Alça1 realça essa proteção e sua proximidade atrelada a movimentação observada na Alça1, traz a possibilidade desse resíduo participar da catalise, como já descrito experimentalmente.

Outro ponto de divergência é a função da Tyr25 em *EclI* estar sendo desempenhada na Alça2, através de Tyr308 do outro monômero dímero. No caso da *hASNase1* e *gpASNase1*, a Tyr308 possui papel essencial para a catálise. A simulação mostrou outro elemento de estrutura secundária que implica em diferenças importantes na ação das enzimas *hASNase1* e *gpASNase1*. A Alça2 na *gpASNase1* é mais disforme, durante a DM, do que na *hASNase1*, sendo que na *hASNase1* essa mesma região não é completamente uma alça, pois possui uma parte em α -hélice. Essa estruturação deixa a posição da Tyr308 mais fixa no sítio catalítico da *hASNase1* que no da *gpASNase1* e isso pode implicar em diferença de eficiência catalítica. Certamente, essa região é um determinante estrutural importante de modificação para realçar a atividade catalítica,

assim como a disposição espacial de resíduos de diferentes características químicas na Alça1 da hASNase1.

Outra região importante da hASNase1, que difere das outras enzimas, é a região dos sítios alostéricos. Embora as posições dos resíduos nos sítios alostéricos sejam conservadas, os resíduos de regiões vizinhas entre gpASNase1 e hASNase1 são diferentes e precisam ser melhores entendidas como determinantes estruturais de função alostérica. A DM permitiu definir como corre a manutenção da Asn na região e inferir que a presença de Asn no sítio alostérico mantém a posição da Lys mais estável para a manutenção da tríade, assim como ajuda a estabilizar a movimentação da Alça1, como visto nos baixos RMSD das Asn nos sistemas com Asn nos sítios da hASNase1. O monitoramento da Lys188 também possibilitou determinar que o alosterismo é importante, não só para manter a posição da Lisina na tríade, mas também deixou evidente o efeito de cooperatividade positiva, quando se compara o efeito da presença ou falta da Asn no sítio alostérico na hASNase com Asn no sítio catalítico.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados de comparação, obtidos neste trabalho de mestrado, tornarão possível a identificação de resíduos chave para modificações para realçar a atividade da enzima. Pretende-se, no doutorado, fazer a mutação desses resíduos e verificar seu efeito experimentalmente. Uma vez que se conhece também regiões importantes, como Alça1 e Alça2, pretende-se usar Evolução Dirigida para evoluir a hASNase1, *in vitro*, para se obter uma enzima com maior atividade e não imunogênica.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, M. *et al.* GROMACS User Manual version 5.0.4. [s.l.], 2014. 312 pp. Disponível em: <https://manual.gromacs.org/documentation/>. Acesso em: 20 jul. 2018.
- ABRAHAM, M. J. *et al.* Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, [s.l.], v. 1–2, p. 19–25, 2015.
- ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. [s.l.]: Artmed Editora, 2009. 1392 pp.
- ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. **Computer Simulation of Liquids**. 2. ed. [s.l.]: Oxford University Press, 2017. 418 pp.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic Local Alignment Search Tool. **J Mol Biol**, [s.l.], v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Protein Database Searches Using Compositionally Adjusted Substitution Matrices. **FEBS J**. [s.l.], v. 272, n. 20, p. 5101–5109, 2005.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2019**. Atlanta: American Cancer Society, 2019. p.76. Disponível em: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2019.html>. Acesso em: 15 dez. 2018.
- ANANDAKRISHNAN, R.; AGUILAR, B.; ONUFRIEV, A. V. H++ 3.0: Automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 1, p. 537–541, 2012.
- ANISHKIN, A. *et al.* Catalytic Role of the Substrate Defines Specificity of Therapeutic L-Asparaginase. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 427, n. 17, p. 2867–2885, ago. 2015.
- ARFKEN, G. B.; WEBER, H. J. **Mathematical Methods for Physicists**. 6. ed. Orlando, FL.: Academic Press, 1985. 1182 pp.
- ARUNAN, E. *et al.* Definition of the hydrogen bond (IUPAC Recommendations 2011). **Pure and Applied Chemistry**, [s.l.], v. 83, n. 8, p. 1637–1641, 2011a.
- ARUNAN, E. *et al.* Defining the hydrogen bond: An account (IUPAC Technical Report)*. **Pure and Applied Chemistry**, [s.l.], v. 83, n. 8, p. 1619–1636, 2011b.
- ARYA, A.; KUMAR, A.; JHA, J. **Understanding Enzymes: An Introductory Text**. 1.

ed. New Delhi: Drawing pin Publishing, 2018. 198 pp.

ASSELIN, B. L. *et al.* In vitro and in vivo killing of acute lymphoblastic leukemia cells by L-asparaginase. **Cancer research**, v. 49, n. 15, p. 4363–8, 1989.

AUNG, H.-P. *et al.* Dynamics of a mobile loop at the active site of Escherichia coli asparaginase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, [s.l.], v. 1481, n. 2, p. 349–359, set. 2000.

AVRAMIS, V. I. A randomized comparison of native Escherichia coli asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. **Blood**, [s.l.], v. 99, n. 6, p. 1986–1994, 15 mar. 2002.

AVRAMIS, V. I. Asparaginases: Biochemical Pharmacology and Modes of Drug Resistance. **Anticancer research**, [s.l.], v. 32, p. 2423–2438, 2012.

BAEK, M. *et al.* GalaxyHomomer: A web server for protein homo-oligomer structure prediction from a monomer sequence or structure. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 45, p. W320–W324, 2017.

BAGERT, U.; RÖHM, K.-H. On the role of histidine and tyrosine residues in E. coli asparaginase. Chemical modification and ¹H-nuclear magnetic resonance studies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, [s.l.], v. 999, n. 1, p. 36–41, nov. 1989.

BANSAL, S. *et al.* Hyperthermophilic asparaginase mutants with enhanced substrate affinity and antineoplastic activity: structural insights on their mechanism of action. **The FASEB Journal**, [s.l.], v. 26, p. 1161–1171, 2019.

BELVISO, S. *et al.* The human asparaginase enzyme (ASPG) inhibits growth in leukemic cells. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 12, n. 5, p. 1–14, 2017.

BERENDSEN, H. J. C. *et al.* Interaction models for water in relation to protein hydration. **Intermolecular Forces**, [s.l.], [s.n.], p. 331–342, 1981.

BERENDSEN, H. J. C. *et al.* Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, [s.l.], v. 81, n. 8, p. 3684–3690, 1984.

BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, [s.l.], v. 91, n. 1–3, p. 43–56, 1995.

BERJANSKII, M. *et al.* PROSESS: A protein structure evaluation suite and server. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 38, n. SUPPL. 2, p. 633–640, 2010.

BERMAN, H. M. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 28, n. 1, p. 235–242, jan. 2000.

- BIASINI, M. *et al.* OpenStructure: an integrated software framework for computational structural biology. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, [s.l.], v. 69, n. 5, p. 701–709, 1 maio 2013.
- BISSWANGER, H. **Enzyme Kinetics: Principles and Methods**. 3. ed. [s.l.]: Weinheim, Alemanha, Wiley. 2017. 336 pp.
- BOWIE, J. U.; LUTHY, R.; EISENBERG, D. A Method to Identify Protein Sequences That Fold into a Known Three-Dimensional Structure. **Science**, [s.l.], v. 253, n. 5016, p. 164–170, 1991.
- BRADLEY, P. Toward High-Resolution de Novo Structure Prediction for Small Proteins. **Science**, [s.l.], v. 309, n. 5742, p. 1868–1871, 16 set. 2005.
- BROOME, J. D. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. I. Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. **The Journal of experimental medicine**, [s.l.], v. 118, n. 1, p. 99–120, jul. 1963.
- BURKERT, U.; ALLINGER, N. L. **Molecular Mechanics**. 1 ed. Washington: American Chemical Society, 1982. 339 pp.
- BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **The Journal of Chemical Physics**, [s.l.], v. 126, n. 1, p. 014101, 7 jan. 2007.
- BUSSOLATI, B. *et al.* PAF Produced by Human Breast Cancer Cells Promotes Migration and Proliferation of Tumor Cells and Neo-Angiogenesis. **The American Journal of Pathology**, [s.l.], v. 157, n. 5, p. 1713–1725, nov. 2000.
- CANTOR, J. R. *et al.* The Human Asparaginase-Like Protein 1 hASRGL1 is an Ntn Hydrolase with β -aspartyl Peptidase Activity. **Biochemistry**, [s.l.], v. 48, n. 46, p. 11026–11031, 2009.
- CANUTESCU, A. A.; DUNBRACK, R. L. Cyclic coordinate descent: A robotics algorithm for protein loop closure. **Protein Science**, Filadélfia, v. 12, n. 5, p. 963–972, maio 2003.
- CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I. C. Dissemination and Growth of Cancer Cells in Metastatic Sites. **Nature**, Ontario, v. 2, p. 563–572, 2002.
- CHEN, V. B. *et al.* MolProbity : all-atom structure validation for macromolecular crystallography electronic reprint research papers. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [s.l.], v. 66, p. 12–21, 2010.
- CHIVIAN, D. *et al.* Automated prediction of CASP-5 structures using the Robetta server. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, [s.l.], v. 53, n. S6, p. 524–533, 2003.
- CHIVIAN, D.; BAKER, D. Homology modeling using parametric alignment ensemble generation with consensus and energy-based model selection. **Nucleic Acids**

Research, [s.l.], v. 34, n. 17, p. e112–e112, out. 2006.

COLOVOS, C.; YEATES, T. O. Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. **Protein Science**, [s.l.], v. 2, n. 9, p. 1511–1519, 1993.

COONEY, D. A.; CAPIZZI, A. L.; HANDSCHUMACHER, R. E. Evaluation of L-Asparagine Metabolism in Animals and Man. **Cancer Research**, [s.l.], v. 30, [s.n], p. 929–935, abr. 1970.

DAVIS, I. W. et al. MolProbity : all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 35, n. 13, p. 375–383, 2007.

DELANO, W. L. The PyMol Molecular Graphics System. **Proteins**, [s.l.], v. 30, p. 442–454, 2002.

DERST, C. et al. States and Functions of Tyrosine Residues in Escherichia coli Asparaginase II. **European Journal of Biochemistry**, [s.l.], v. 224, n. 2, p. 533–540, set. 1994.

DHAVALA, P. et al. Expression, purification and crystallization of Helicobacter pylori L -asparaginase. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications**, [s.l.], v. 64, n. 8, p. 740–742, 1 ago. 2008.

DINNDORF, P. A. et al. FDA Drug Approval Summary: Pegaspargase (Oncaspar(R)) for the First-Line Treatment of Children with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). **The Oncologist**, v. 12, n. 8, p. 991–998, 1 ago. 2007.

DONG, G. Q. et al. Optimized atomic statistical potentials: assessment of protein interfaces and loops. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 29, n. 24, p. 3158–3166, dez. 2013.

DUNBRACK, R. L.; COHEN, F. E. Bayesian statistical analysis of protein side-chain rotamer preferences. **Protein Science**, [s.l.], v. 6, n. 8, p. 1661–1681, ago. 1997.

DUVAL, M. et al. Comparison of Escherichia coli–asparaginase with Erwinia-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer—Children’s Leukemia Group phase 3 trial. **Blood**, [s.l.], v. 99, n. 8, p. 2734–2739, 2002.

EASTMAN, P. et al. OpenMM 7: Rapid development of high performance algorithms for molecular dynamics. **PLOS Computational Biology**, [s.l.], v. 13, n. 7, p. e1005659, 26 jul. 2017.

EMADI, A. et al. Asparaginase Erwinia chrysanthemi effectively depletes plasma glutamine in adult patients with relapsed / refractory acute myeloid leukemia. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, [s.l.], v. 81, n. 1, p. 217–222, 2018.

ERVA, R. R. et al. Molecular dynamic simulations of Escherichia coli L -asparaginase to illuminate its role in deamination of asparagine and glutamine residues. **3 Biotech**, [s.l.],

v. 6, n. 2, p. 1–7, 2016.

ESSMANN, U. *et al.* A smooth particle mesh Ewald method. **The Journal of Chemical Physics**, [s.l.], v. 103, n. 19, p. 8577–8593, 1995.

FERLAY, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide : Sources , methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, [s.l.], v. 136, p. 359–386, 2015.

FEUERHERM, A. J. *et al.* Platelet-activating factor induces proliferation in differentiated keratinocytes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 384, n. 1–2, p. 83–94, dez. 2013.

FILHO, O. A. S.; ALENCASTRO, R. B. DE. Modelagem de Proteínas por Homologia. **Química Nova**, [s.l.], v. 26, n. 2, p. 253–259, 2003.

FISER, A.; DO, R. K. G.; ŠALI, A. Modeling of loops in protein structures. **Protein Science**, [s.l.], v. 9, p. 1753–1773, 2000.

FORSTER, M. J. Molecular modelling in structural biology. **Micron**, [s.l.], v. 33, n. 4, p. 365–384, 2002.

FRENKEL, D.; SMIT, B. **Understanding Molecular Simulation - From Algorithms to Applications**. 2. ed. [s.l.]: Academic Press, 2002. 664 pp

GORDON, J. C. *et al.* H++: A server for estimating pKas and adding missing hydrogens to macromolecules. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. Web Server issue, p. W368–W371, 2005.

GUNDA, S. K. *et al.* Homology modeling of human asparaginase like protein and its molecular interaction studies with natural flavonoids. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 287–291, 2016.

HALEY, E.; FISCHER, G.; WELCH, A. The requirement for L-asparagine of mouse leukemia cells L5178Y in culture. **Cancer Research**, [s.l.], v. 21, p. 532–536, 1961.

HESS, B. *et al.* LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, [s.l.], v. 18, n. 12, p. 1463–1472, 1997.

HESS, B. *et al.* GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, [s.l.], v. 4, n. 3, p. 435–447, 2008.

HESS, B. P-LINCS: A parallel linear constraint solver for molecular simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 116–122, 2008.

HESTENES, M. R.; STIEFEL, E. Methods of conjugate gradients for solving linear systems. **Journal of Research of the National Bureau of Standards**, [s.l.], v. 49, n. 6,

p. 409, dez. 1952.

HILL, A. V. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. **The Journal of Physiology**, [s.l.], v. XL., p. v–vii, 1910.

HOCKNEY, R. .; GOEL, S. .; EASTWOOD, J. . Quiet high-resolution computer models of a plasma. **Journal of Computational Physics**, [s.l.], v. 14, n. 2, p. 148–158, fev. 1974.

HÖLTJE, H. D. *et al.* **Molecular Modeling: Basic Principles and Applications**. 3. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2003. 320 pp.

HOOFT, R. W. W. *et al.* Errors in protein structures. **Nature**, v. 381, p. 272–272, 1996.

HOWLADER, N. *et al.* Cancer-Specific Mortality, Cure Fraction, and Noncancer Causes of Death Among Diffuse Large B-Cell Lymphoma Patients in the Immunochemotherapy Era. **Cancer**, [s.l.], v. 0, n. 0, p. 1–9, 2017.

INCA. **ABC do Câncer: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer**. Instituto Nacional do Câncer. Rio de Janeiro, 2011. 128 pp. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322%0D. Acesso em: 9 out. 2018.

INCA; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. **Rev. Bras. Cancerol. [Internet]**. Rio de Janeiro: v. 57, n. 4, dez. 2011. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/1438>. Acesso em: 13 jan. 2012.

INCA; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. **Rev. Bras. Cancerol. [Internet]**. Rio de Janeiro: v. 64, n. 1, mar. 2018. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/115>. Acesso em: 15 dez. 2018.

IUBMB; IUPAC. **Enzyme Nomenclature**. Disponível em: <http://www.sbc.sqmul.ac.uk/iubmb/enzyme/%0D>. Acesso em: 22 out. 2018.

JONES, D. T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 292, n. 2, p. 195–202, set. 1999.

KAPOOR, N. *et al.* Knockdown of ASIC1 and epithelial sodium channel subunits inhibits glioblastoma whole cell current and cell migration. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 284, n. 36, p. 24526–24541, 2009.

KARAMITROS, C. S.; KONRAD, M. Human 60-kDa lysophospholipase contains an N-terminal L-Asparaginase domain that is allosterically regulated by L-Asparagine. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 289, n. 19, p. 12962–12975, mai. 2014.

KELLEY, L. A. *et al.* The Phyre2 web portal for protein modeling , prediction and analysis. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 10, n. 6, p. 845–858, 2015.

KIM, D. E.; CHIVIAN, D.; BAKER, D. Protein structure prediction and analysis using the

Robetta server. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 32, p. 526–531, 2004.

KIM, H.-A. *et al.* Mechanisms of Platelet-Activating Factor-induced Enhancement of VEGF Expression. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [s.l.], v. 27, n. 1, p. 55–62, 2011.

KOBRINSKY, N. L. *et al.* Outcomes of Treatment of Children and Adolescents With Recurrent Non-Hodgkin's Lymphoma and Hodgkin's Disease With Dexamethasone, Etoposide, Cisplatin, Cytarabine, and L-Asparaginase, Maintenance Chemotherapy, and Transplantation: Children's Cancer Group . **Journal of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 19, n. 9, p. 2390–2396, mai. 2001.

KRIVOV, G. G.; SHAPOVALOV, M. V.; DUNBRACK, R. L. Improved prediction of protein side-chain conformations with SCWRL4. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [s.l.], v. 77, n. 4, p. 778–795, dez. 2009.

KUHLMAN, B.; BAKER, D. Native protein sequences are close to optimal for their structures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s.l.], v. 97, n. 19, p. 10383–8, set. 2000.

LASKOWSKI, R. A. *et al.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, [s.l.], v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993.

LASKOWSKI, R. A. *et al.* AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. **Journal of Biomolecular NMR**, [s.l.], v. 8, p. 477–486, 1996.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; THORNTON, J. M. PROCHECK : validation of protein-structure coordinates. **International Tables for Crystallography**, [s.l.], v. F, n. 21.4, p. 684–687, 2012.

LETUNIC, I.; BORK, P. 20 years of the SMART protein domain annotation resource. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 46, n. D1, p. D493–D496, 2018.

LETUNIC, I.; DOERKS, T.; BORK, P. SMART: Recent updates, new developments and status in 2015. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 43, n. D1, p. D257–D260, 2015.

LI, W. *et al.* The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 43, n. W1, p. W580–W584, jul. 2015.

LINDAHL, E.; HESS, B. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. **J Mol Model**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 306–317, 2001.

LÜTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Verify-3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, [s.l.], v. 356, n. 6364, p. 83–85, 1992.

MACKERELL, A. D. *et al.* All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and

Dynamics Studies of Proteins †. **The Journal of Physical Chemistry B**, [s.l.], v. 102, n. 18, p. 3586–3616, abr. 1998.

MACKERELL, A. D.; FEIG, M.; BROOKS, C. L. Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: Limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. **Journal of Computational Chemistry**, [s.l.], v. 25, n. 11, p. 1400–1415, ago. 2004.

MARTÍ-RENOM, M. A. *et al.* Comparative Protein Structure Modeling of Genes and Genomes. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, [s.l.], v. 29, p. 291–325, 2000.

MCWILLIAM, H. *et al.* Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 41, n. W1, p. W597–W600, jul. 2013.

MENNITI, M. *et al.* 60kDa lysophospholipase, a new Sgk1 molecular partner involved in the regulation of ENaC. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [s.l.], v. 26, n. 4–5, p. 587–596, 2010.

MENZEL, D. **Fundamental Formulas of Physics**. 2. ed. New York: Dover Publications Inc, 2003. 411 pp.

MICHALSKA, K.; JASKOLSKI, M. Structural aspects of L-asparaginases, their friends and relations. **Acta Biochimica Polonica**, [s.l.], v. 53, n. 4, p. 627–640, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Esclarecimentos L-asparaginase**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: [http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/22/2_b - L-ASPARAGINASE_CIT_22_06_2017.pdf](http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/22/2_b_L-ASPARAGINASE_CIT_22_06_2017.pdf). Acesso em: 15 dez 2017.

MISHRA, P.; NAYAK, B.; DEY, R. K. PEGylation in anti-cancer therapy: An overview. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 11, n. 3, p. 337–348, jun. 2016.

MORAIS, S. B. DE. **Investigação do mecanismo de autoprocessoamento de asparaginase humana**. 2017. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Carlos Chagas, Paraná, 2017.

MORRIS, A. L. *et al.* Stereochemical quality of protein structure coordinates. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [s.l.], v. 12, n. 4, p. 345–364, 1992.

MORSE, P. M.; FESHBACH, H. **Methods of Theoretical Physics**, Part I (International Series in Pure and Applied Physics). New York: McGraw-Hill, 1953. 997 pp

MULLER, H. J.; BOOS, J. Use of L -asparaginase in childhood ALL. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, [s.l.], v. 28, p. 97–113, 1998.

MYERS, J. *et al.* A Simple Clustering Algorithm Can Be Accurate Enough for Use in Calculations of pKs in Macromolecules. **PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics**, [s.l.], v. 63, n. 2, p. 928–938, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 1328 pp.

NOMME, J. *et al.* Structures of Apo and Product-Bound Human L-Asparaginase: Insights into the Mechanism of Autoproteolysis and Substrate Hydrolysis. **Biochemistry**, [s.l.], v. 51, p. 6816–6826, 2012.

OHNUMA, T.; BERGEL, F.; BRAY, R. Enzymes in cancer. Asparaginase from chicken liver. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 103, n. 1, p. 238–245, abr. 1967.

OININEN, C. *et al.* Three dimensional structure of human lysosomal aspartylglucosaminidase. **Nature**, [s.l.], v. 2, n. 12, p. 1102–1108, 1995.

OLD, L. J. *et al.* Leukaemia-inhibiting Properties and L-Asparaginase Activity of Sera from Certain South American Rodents. **Nature**, [s.l.], v. 198, n. 4882, p. 801-801, mai. 1963.

OOSTENBRINK, C. *et al.* A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. **Journal of Computational Chemistry**, [s.l.], v. 25, n. 13, p. 1656–1676, 2004.

ORIGINLAB CORPORATION. **OriginPro**Northampton, MA, USA, 2007.

ORTLUND, E. *et al.* Reactions of Pseudomonas 7A Glutaminase-Asparaginase with Diazo Analogues of Glutamine and Asparagine Result in Unexpected Covalent Inhibitions and Suggests an Unusual Catalytic Triad Thr-Tyr-Glu. **Biochemistry**, [s.l.], v. 39, n. 6, p. 1199–1204, fev. 2000.

PALL, S. *et al.* Tackling Exascale Software Challenges in Molecular Dynamics Simulations with GROMACS. **LNCS**, [s.l.], v. 8759, p. 3–27, 2015.

PALM, G. J. *et al.* A covalently bound catalytic intermediate in Escherichia coli asparaginase : Crystal structure of a Thr-89-Val mutant. **FEBS Letters**, [s.l.], v. 390, n. 2, p. 211–216, jul. 1996.

PANOSYAN, E. H. *et al.* Asparagine Depletion Potentiates the Cytotoxic Effect of Chemotherapy against Brain Tumors. **Molecular Cancer Research**, [s.l.], v. 12, n. 5, p. 694–702, 2014.

PASUT, G.; SERGI, M.; VERONESE, F. M. Anti-cancer PEG-enzymes: 30 years old, but still a current approach. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 60, n. 1, p. 69–78, jan. 2008.

PEDRESCHI, F.; KAAK, K.; GRANBY, K. The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 109, n. 2, p. 386–392, jul. 2008.

PEDRESCHI, F.; MARIOTTI, M. S.; GRANBY, K. Current issues in dietary acrylamide : formation , mitigation and risk assessment ´ Mariotti a and Kit Granby c. **Journal of the**

Science of Food and Agriculture, [s.l.], v. 94, p. 9–20, 2014.

PERINI, G. **Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia (Abrale)**. Disponível em: <http://abrale.org.br/IIa/tratamento>. Acesso em: 20 jan. 2019.

PIETERS, R. *et al.* L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, [s.l.], v. 117, n. 2, p. 238–249, 15 jan. 2011.

PINTO, G. F.; MENEZES, R. R. DE. **Cinética enzimática**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora E-papers, 2009. 320 pp.

POLA, M. *et al.* In silico modelling and molecular dynamics simulation studies on L-Asparaginase isolated from bacterial endophyte of *Ocimum tenuiflorum*. **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l.], v. 117, n. October 2017, p. 32–40, 2018.

PONTIUS, J.; RICHELLE, J.; WODAK, S. J. Deviations from Standard Atomic Volumes as a Quality Measure for Protein Crystal Structures. **J. Mol. Biol.**, [s.l.], v. 264, p. 121–136, 1996.

PRESCOTT, S. M. *et al.* Platelet-Activating Factor and Related Lipid Mediators. **Annual Review of Biochemistry**, [s.l.], v. 69, n. 1, p. 419–445, jun. 2000.

PRONK, S. *et al.* GROMACS 4.5: A high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 29, n. 7, p. 845–854, 2013.

RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of Polypeptide Chain Configurations. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 95–99, 1963.

RAMACHANDRAN, G.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide-chain configurations. **Current Science**, [s.l.], v. 15, n. 17–18, p. 813–817, 1990.

REMMERT, M. *et al.* HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. **Nature Methods**, [s.l.], v. 9, n. 2, p. 173–175, 25 fev. 2012.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays In Biochemistry**, [s.l.], v. 59, n. 0, p. 1–41, nov. 2015.

ROHL, C. A. *et al.* Modeling structurally variable regions in homologous proteins with rosetta. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [s.l.], v. 55, n. 3, p. 656–677, abr. 2004.

ROSE-INMAN, H.; KUEHL, D. Acute Leukemia. **Emergency Medicine Clinics of North America**, [s.l.], v. 32, n. 6, p. 579–596, 2014.

RYTTING, M. E. Lessons from ALL-REZ BFM 90: Therapy for Childhood Leukemia Based on Timing and Site of Relapse. **Current Hematologic Malignancy Reports**,

[*s.l.*], v. 7, n. 1, p. 1–2, mar. 2012.

SAEED, H. *et al.* Molecular cloning, structural modeling and production of recombinant *Aspergillus terreus* L. asparaginase in *Escherichia coli*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [*s.l.*], v. 106, p. 1041–1051, 2018.

ŠALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. **Journal of Molecular Biology**, [*s.l.*], v. 234, p. 779–815, 1993.

SALZER, W. L. *et al.* Development of asparaginase *Erwinia chrysanthemi* for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [*s.l.*], v. 1329, n. 1, p. 81–92, nov. 2014.

SCHALK, A. M. *et al.* Identification and Structural Analysis of an L -Asparaginase Enzyme from Guinea Pig with Putative Tumor Cell Killing. **Journal of Biological Chemistry**, [*s.l.*], v. 289, n. 48, p. 33175–33186, 2014.

SCHALK, A. M. *et al.* Experimental data in support of a direct displacement mechanism for type I/II L-asparaginases. **Journal of Biological Chemistry**, [*s.l.*], v. 291, n. 10, p. 5088–5100, 2016.

SHEN, M.; SALI, A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. **Protein Science**, [*s.l.*], v. 15, n. 11, p. 2507–2524, nov. 2006.

SHIN, W. *et al.* Prediction of Protein Structure and Interaction by GALAXY Protein Modeling Programs. **Bio Design**, [*s.l.*], v. 2, n. 1, p. 1–11, 2014.

SIEVERS, F. *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, [*s.l.*], v. 7, n. 539, p. 1–6, abr. 2011.

SILVA, V. B. DA; SILVA, C. H. T. . Modelagem Molecular de Proteínas-Alvo por Homologia Estrutural. **Revista Eletrônica de Farmácia**, [*s.l.*], v. 4, n. 1, p. 15–26, 2007.

SIMONS, K. T. *et al.* Assembly of protein tertiary structures from fragments with similar local sequences using simulated annealing and bayesian scoring functions. **Journal of Molecular Biology**, [*s.l.*], v. 268, n. 1, p. 209–225, abr. 1997.

SINGH, J. *et al.* L-Asparaginase as a new molecular target against leishmaniasis: insights into the mechanism of action and structure-based inhibitor design. **Molecular BioSystems**, v. 11, n. 7, p. 1887–1896, 2015.

SIPPL, M. J. Recognition of Errors in Three-Dimensional Structures of Proteins. **PROTEINS: Structure, Function, and Genetics**, [*s.l.*], v. 17, p. 355–362, 1993.

SIRCAR, K. *et al.* Integrative Molecular Profiling Reveals Asparagine Synthetase Is a Target in Castration-Resistant Prostate Cancer. **The American Journal of Pathology**, [*s.l.*], v. 180, n. 3, p. 895–903, 2012.

SMITH, T. F.; WATERMAN, M. S. Identification of common molecular subsequences. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 147, n. 1, p. 195–197, mar. 1981.

SOARES, A. L. *et al.* Effects of polyethylene glycol attachment on physicochemical and biological stability of *E. coli* L-asparaginase. **International Journal of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 237, n. 1–2, p. 163–170, abr. 2002.

SOARES, R. O. **Dinâmica molecular de proteínas**: estabilidade e renaturação térmica. 2009. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60136/tde-27052009-170433/>. Acesso em: 15 dez 2018.

SODING, J. Protein homology detection by HMM-HMM comparison. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 21, n. 7, p. 951–960, 1 abr. 2005.

SRIKHANTA, Y. N. *et al.* Distinct physiological roles for the two L-asparaginase isozymes of *Escherichia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 436, n. 3, p. 362–365, 2013.

STAFFORINI, D. M. Diverse Functions of Plasma PAF-AH in Tumorigenesis. **Enzymes**, Utah, v. 38, p. 157–179, 2015.

STAVRAKOUDIS, A. Computational modelling and molecular dynamics simulations of a cyclic peptide mimotope of the CD52 antigen complexed with CAMPATH-1H antibody. **Molecular Simulation**, [s.l.], v. 36, n. 2, p. 127–137, 2010.

SUGIMOTO, H.; ODANI, S.; YAMASHITA, S. Cloning and expression of cDNA encoding rat liver 60-kDa lysophospholipase containing an asparaginase-like region and ankyrin repeat. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 273, n. 20, p. 12536–12542, 1998.

SWAIN, A. L. *et al.* Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, [s.l.], v. 90, n. February, p. 1474–1478, 1993.

TOMAR, R. *et al.* Structural and functional insights into an archaeal L-asparaginase obtained through the linker-less assembly of constituent domains. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, [s.l.], v. 70, n. 12, p. 3187–3197, dez. 2014.

VAN DER SPOEL, D. *et al.* GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, [s.l.], v. 26, n. 16, p. 1701–1718, 2005.

VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Algorithms for macromolecular dynamics and constraint dynamics. **Molecular Physics**, [s.l.], v. 34, n. June 2014, p. 1311–1327, 1977.

VAN GUNSTEREN, W. F.; DOLENC, J.; MARK, A. E. Molecular simulation as an aid to

experimentalists. **Current Opinion in Structural Biology**, [s.l.], v. 18, n. 2, p. 149–153, 2008.

VAN ZUNDERT, G. C. P. *et al.* The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 428, n. 4, p. 720–725, 2015.

VERLET, L. Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. **Physical Review**, [s.l.], v. 159, n. 1, p. 98–103, 1967.

WARANGKAR, S. *et al.* Effect of dihydropyrimidine derivatives on kinetic parameters of *E. carotovora* L-asparaginase. **International Journal of Biotechnology Applications**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 5–13, 2009.

WATERHOUSE, A. *et al.* SWISS-MODEL : homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 1, p. 1–8, 2018.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**. São Francisco, v. 47, n. 1, p. 5.6.1–5.6.32, 2014.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**, São Francisco, v. 54, p. 5.6.1-5.6.37, 2016.

WEHNER, A. *et al.* Site-specific mutagenesis of *Escherichia coli* asparaginase II. None of the three histidine residues is required for catalysis. **European Journal of Biochemistry**, [s.l.], v. 208, n. 2, p. 475–480, set. 1992.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web : interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 35, p. 407–410, 2007.

WIKMAN, L. E. K. *et al.* Crystallization and preliminary crystallographic analysis of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications**, [s.l.], v. 61, n. 4, p. 407–409, 2005.

WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. 7. ed. [s.l.]: Cambridge University Press, 2010. 759 pp.

XU, J.; JIAO, F.; BERGER, B. A tree-decomposition approach to protein structure prediction. *In*: IEEE Computational Systems Bioinformatics Conference (CSB'05), 2005, Stanford. **IEEE Computational Systems Bioinformatics Conference**, Stanford, 2005, p. 247-256.

YUN, M. *et al.* Crystal Structure and Allosteric Regulation of the Cytoplasmic *Escherichia coli* L-Asparaginase I. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 369, n. 3, p. 794–811, jun. 2007.

ZHANG, B. *et al.* Targeting asparagine and autophagy for pulmonary adenocarcinoma therapy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 100, p. 9145–9161, 2016.

ZIMMERMAN, G. A. *et al.* The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. **Critical Care Medicine**, [s.l.], v. 30, p. S294–S301, mai. 2002.