

## Docking e dinâmica molecular para estudo do mecanismo catalítico da carboxipeptidase G2

Kely M. Turra (PG)<sup>1\*</sup>, Kerly F. M. Pasqualoto (PQ)<sup>1</sup>, Elizabeth I. Ferreira (PQ)<sup>1</sup>, Daniela G. Rando (PQ)<sup>2</sup> [kely.turra@usp.br](mailto:kely.turra@usp.br)

<sup>1</sup>LAPEN, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo-USP. <sup>2</sup> Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP.

Palavras Chave: Carboxipeptidase G<sub>2</sub>, metotrexato, docking, dinâmica molecular

### Introdução

A carboxipeptidase G<sub>2</sub> (CPG<sub>2</sub>), metaloenzima zinco-dependente produzida por *Pseudomonas sp.*, catalisa a clivagem da porção C-terminal de folato reduzido, não reduzido e de análogos em ácido pteróico e ácido L-glutâmico.<sup>1</sup> Esta metaloprotease é empregada em tratamento de pacientes com intoxicação induzida por metotrexato (MTX) e em sistemas ADEPT (*antibody-directed enzyme prodrug therapy*) na terapia contra câncer. Embora bastante utilizada, o mecanismo de ação da CPG<sub>2</sub> ainda não está totalmente elucidado.<sup>1,2</sup> Neste trabalho, estudos de ancoramento (*docking*) e dinâmica molecular (DM) foram desenvolvidos a fim de obter maiores informações sobre o reconhecimento do fármaco pela CPG<sub>2</sub> em nível molecular, bem como sobre o mecanismo catalítico envolvido. Tais informações serão relevantes no planejamento de novos substratos para o uso da enzima em sistemas de direcionamento de fármacos.

### Resultados e Discussão

A estrutura 3D do MTX foi desenhada no programa Hyperchem 7.51 utilizando como referência as coordenadas depositadas no PDB, código 3IA4 (R:1,70 Å). A energia foi minimizada em campo de força MM+ sem quaisquer restrições e as cargas atômicas parciais foram calculadas com o método semi-empírico PM3. A estrutura 3D da enzima CPG<sub>2</sub> (PDB código 1CG2, R:1,5 Å), foi utilizada e pré-tratada, no Hyperchem 7.51, para os estudos de ancoramento (programa Gold 3.1). Os átomos de zinco (Zn<sup>+2</sup>) da CPG<sub>2</sub> foram parametrizados como metais de coordenação geométrica tetraédrica e um deles foi selecionado como referência na formação do complexo. A molécula de água, localizada entre os Zn<sup>+2</sup>, foi considerada durante o processo de reconhecimento ligante-proteína. O ancoramento foi realizado dez vezes em condições idênticas. Cada corrida gerou dez conformeros, classificados em ordem crescente de energia total do complexo, dentre os quais, o energeticamente mais favorável foi escolhido para desenvolver as simulações de DM (MOLSIM 3.2). O

esquema de aquecimento lento empregou DM curtas (20 ps) a 50, 100, 200 e 300 K.

O conformero de menor energia mínima selecionado da simulação a 300 K foi utilizado em DM de 100 ps a 298 K. A trajetória foi salva a cada 20 passos. O conformero de mínimo global do complexo foi selecionado para a análise e visualização (Figura 1).

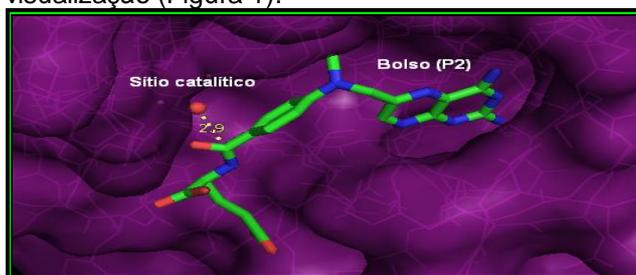


Figura 1. MTX no sítio catalítico da CPG<sub>2</sub>

O MTX interage em pontos críticos para o reconhecimento e clivagem pela CPG<sub>2</sub> e se orienta de forma a acomodar a porção pteridina no bolso vizinho ao sítio catalítico (P2). A porção glutamato se orienta para o lado externo da estrutura protéica e interage com o resíduo Arg324 e com as moléculas de água de adsorção da CPG<sub>2</sub>. A carbonila da amida do MTX está a 2,92 Å do oxigênio da água coordenada pelos átomos de Zn<sup>+2</sup> do sítio catalítico. Tal distância favorecerá a clivagem do substrato mediante ataque nucleofílico.

### Conclusões

As interações moleculares e estéricas observadas para o complexo estão em concordância com o esperado para o mecanismo catalítico da CPG<sub>2</sub>.<sup>1</sup> O conhecimento deste mecanismo, mesmo que teórico, nos fornece importantes informações para o desenvolvimento de substratos para sistemas ADEPT de liberação de fármacos.

### Agradecimentos

CNPQ

<sup>1</sup> Rowsell, S.; Pauptit, R. A.; Tucker, A. D.; Melton, R. G.; Blow, D. M.; Brick, P. *Structure*.1997, v. 5, 337;<sup>2</sup> Holz, R.C.; Bzymek, K. P.; Swierczek, S. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2003, v.7, 197.