



LETÍCIA CRISTINA DE ASSIS

**ESTUDOS TEÓRICOS DA PP5-Mg²⁺ COMO ALVO
PROMISSOR
PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER:
UMA ABORDAGEM DE MODELAGEM MOLECULAR**

**LAVRAS – MG
2018**

LETÍCIA CRISTINA DE ASSIS

**ESTUDOS TEÓRICOS DA PP5-Mg²⁺ COMO ALVO PROMISSOR PARA O
TRATAMENTO DO CÂNCER: UMA ABORDAGEM DE MODELAGEM
MOLECULAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Agroquímica, área de concentração
em Química/Bioquímica, para a obtenção do título
de Doutor.

Profa. Dra. Elaine Fontes Ferreira da Cunha
Orientadora

**LAVRAS – MG
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

de Assis, Letícia Cristina.

Theoretical studies of PP5-Mg²⁺ as promising target for cancer
treatment: a molecular modeling approach / Letícia Cristina de
Assis. - 2018.

91 p.

Orientador(a): Elaine Fontes Ferreira Da Cunha.

.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Modelagem Molecular. 2. PP5. 3. Cantaridina e seus
derivados. I. Da Cunha, Elaine Fontes Ferreira. . II. Título.

LETÍCIA CRISTINA DE ASSIS

**ESTUDOS TEÓRICOS DA PP5-Mg²⁺ COMO ALVO PROMISSOR PARA O
TRATAMENTO DO CÂNCER: UMA ABORDAGEM DE MODELAGEM
MOLECULAR**

**THEORETICAL STUDIES OF PP5-Mg²⁺ AS PROMISING TARGET FOR
CANCER TREATMENT: A MOLECULAR MODELING APPROACH**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Agroquímica, área de concentração
em Química / Bioquímica, para a obtenção do título
de Mestre.

APROVADA em 23 de Março de 2018.

Profa. Dra. Daiana Teixeira Mancini	UFLA
Profa. Dra. Ana Paula Guimarães	UFV
Prof. Dr. Daniel Henrique Soares Leal	UFES
Prof. Dr. Teodorico de Castro Ramalho	UFLA

Profa. Dra. Elaine Fontes Ferreira da Cunha
Orientadora

**LAVRAS – MG
2018**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre ter me guiado e por todas as oportunidades concebidas ao longo da minha vida.

A minha mãe Agda, e meu padrasto Joel, agradeço, pelo apoio, compreensão, amor e a confiança, durante um longo caminho até chegar aqui, e aos meus irmãos pelo incentivo.

A minha orientadora, professora Elaine, pela presença, incentivo, paciência, e pela oportunidade de realizar este trabalho e outros. Agradeço, pelos diálogos e pelas valiosas dicas recebidas durante minha vida acadêmica.

Aos professores Daiana e Teodorico, pela presença constante durante minha formação, sempre com as melhores contribuições para os trabalhos de pesquisa.

A todos os meus queridos amigos do Grupo de Química Computacional, pela amizade, convivência durante todo esse período, compreensão e por toda a ajuda. Em especial a Juliana, Alexandre e a Ingrid por não medirem esforços para me ajudar.

Aos meus amigos, Ranylson Marcello, Eduardo Pereira pela parceria, ajuda e apoio.

Aos membros da banca, professores Daniel, Teodorico, Ana Paula e Daiana pela disposição e pelas considerações que certamente complementarão meu trabalho.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Química, pela minha formação acadêmica.

Aos amigos conquistados ao longo desses anos, obrigado pelo dia a dia, por cada um contribuir a sua maneira para a minha formação.

À Capes, pelo financiamento dos recursos para o desenvolvimento deste trabalho.

Enfim, agradeço a todos que tiveram uma participação direta ou indireta neste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

“O Senhor é meu pastor, nada me faltará.”

Salmos 23:1

RESUMO GERAL

A modelagem molecular (MM) é indispensável no desenvolvimento de fármacos mais eficientes, potentes e seguros. Nesta linha, para a realização deste trabalho, foram aplicados métodos de mecânica molecular e mecânica quântica, a fim de interpretar o mecanismo molecular envolvido na interação fármaco-receptor, responsável pela atividade biológica específica. Como alvo terapêutico, foi escolhida a serina/treonina fosfatase 5 (PP5) estando esta diretamente relacionada ao quadro patológico do câncer. Esta doença, apesar de todos os avanços científicos e tecnológicos, ainda está associada à possibilidade de sofrimento físico, emocional e exige de suas vítimas um tratamento bem agressivo. Diante dessas circunstâncias, torna-se necessário investigar o mecanismo de inibição da PP5. Uma vez que esta enzima afeta diversas funções celulares, tais como a proliferação, migração, diferenciação e reparação de danos no DNA. Sendo assim, a PP5 pode ser considerada um alvo terapêutico inovador, desafiador e promissor para o tratamento do câncer. Portanto, o emprego da MM será importante para avaliar as interações que são mais favoráveis para a atividade inibitória da PP5, que auxiliem na proposta de novos compostos bioativos. Desse modo, os métodos computacionais utilizados neste trabalho foram: simulação de dinâmica molecular clássica, métodos QM/MM e cálculos AIM. Os resultados mostraram que os resíduos de Arg275, Asn303, His304, His352, Arg400, His427, Val429, Tyr452 e Phe446 contribuíram favoravelmente para uma boa acomodação do inibidor Cantaridina e seus derivados no sítio da PP5, e a potencialidade dos compostos está relacionada com a coordenação que eles realizam com os metais Mg^{2+} . Esses resultados trouxeram uma melhor compreensão de como ocorre o mecanismo de inibição na PP5, permitindo potencialmente o planejamento de fármacos para o tratamento do câncer.

Palavras-chave: Modelagem Molecular. PP5. câncer. Cantaridina e seus derivados. dinâmica molecular clássica. QM/MM. AIM

GENERAL ABSTRACT

Molecular modeling is indispensable in the development of more efficient, potent and safe drugs. In this line, for the accomplishment of this work, diverse methods of molecular mechanics and quantum mechanics were applied, in order to interpret the molecular mechanism involved in the drug-receptor interaction, responsible for the biological activity. As therapeutic target, PP5 was chosen, being this directly related to the pathological frame of cancer. This disease, despite all scientific and technological advances, is still associated with the possibility of physical and emotional suffering, and requires of its victims a very aggressive treatment. In view of these circumstances, it is necessary to investigate the mechanism of inhibition of PP5. Since this enzyme affects several cellular functions, such as proliferation, migration, differentiation and repair of DNA damage. Thus, PP5 can be considered an innovative, challenging and promising therapeutic target for the treatment of cancer. Therefore, the use of MM will be important to evaluate the interactions that are more favorable for the inhibitory activity of PP5, which help in the proposal of new bioactive compounds. Thus, the computational methods used in this work were: classical molecular dynamics simulation, QM / MM methods and AIM calculations. The results showed that Arg275, Asn303, His304, His352, Arg400, His427, Val429, Tyr452 and Phe446 contributed favorably to a good accommodation of the Cantharidin-like inhibitors at the PP5 site, and the potentiality of the compounds is related to the coordination that they perform with the Mg^{2+} metals. These results have brought an understanding of how the inhibition mechanism in PP5 takes place, potentially allowing the planning of drugs for the treatment of cancer.

Keywords: Molecular Modeling. PP5. cancer. Cantharidin-like inhibitors. Classical molecular dynamics. QM / MM. AIM.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 - Fosforilação e Desfosforilação de proteínas.....18
- Figura 2 - Mecanismo catalítico da proteína fosfatase da família PPP...20
- Figura 3 - Uma representação da estrutura tridimensional completa da PP5 (código do PDB: 1WAO).....21
- Figura 4 - Estruturas dos inibidores da PP5.....25
- Figura 5 - Representação de uma molécula em modelagem molecular (massa pontual: átomos e as molas: Ligações químicas).....28
- Figura 6 - A) Deformação no comprimento de ligação; B) Deformação no ângulo de ligação; C) Ângulo de torção e D) Interações de van der Waals.....29

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

Figure.1	Cantharidin and its analogues used in this study..	50
Figure.2	Active site structure of the Mg ²⁺ PP5 catalytic domain complexed with Cantharidin.....	51
Figure.3	RMSD values of (A) MOL2/hssPP5 and (B) MOL3/hssPP5 monitored along 50 ns production phase in MD simulations... ..	54
Figure. 4	RMSF values of (A) MOL2/hssPP5 and (B) MOL3/hssPP5 obtained by average residual fluctuations over 50 ns MD simulation, analysis performed for the Backbone.....	56
Figure. 5	Interactions performed during 50ns in the MD simulation with the MOL2/hssPP5 complex.....	57
Figure. 6	Interactions performed during 50ns in the DM simulation with the MOL3 / hssPP5 complex.....	58
Figure. 7	QM reaction system for the coordination reaction of the inhibitors within a catalytic radius of 5Å.....	62
Figure. 8	Bond critical points (bcps) for each transition state geometry acquired from MOL2 and MOL3, respectively	65

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

Table.1	Interaction energy along the MD simlation.....	60
Table.2	Relative reactional energy of different ligands in the coordination reaction with the <i>hssPP5</i> enzyme metal ions:.....	61
Table.3	The AIM B3LYP/6-31G (d, p) parameters, electron density ($\rho(r)$), Laplacian ($\nabla^2\rho(r)$), kinetic electron energy density ($G(r)$), and potential electron energy density ($V(r)$) for bond critical point (bcp) of the inhibitor/metal ionscomplex in the transition state.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

Ala (A)	Alanina
Arg (R)	Arginina
Asn (N)	Asparagina
Asp (D)	Aspartato
Cys (C)	Cisteína
Phe (F)	Fenilalanina
Gln (Q)	Glutamina
Glu (E)	Glutamato
Gly (G)	Glicina
His (H)	Histidina
Ile (I)	Isoleucina
kDa	Quilodalton
Leu (L)	Leucina
Lys (K)	Lisina
Met (M)	Metionina
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
Pro (P)	Prolina
Tyr (Y)	Tirosina
Thr (T)	Treonina
Trp (W)	Triptofano
Ser	Serina
Val	Valina
Zn	Zinco

LISTA DE SIGLAS

ATM	Proteína quinase mutante da Ataxia-telangiectasia
ATR	Quinase relacionada a ATM e Rad3
Ask 1	Quinase sinal de regulação da apoptose 1
BCP	Ponto crítico de ligação
DM	Dinâmica molecular
DFT	Teoria do funcional da densidade
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FCP/SCP	Proteína fosfatase a base de Aspartato
FDA	Food and Drug Administration
IUPAC	União de Química Pura e Aplicada Internacional
MAPK	Quinase ativada por mitógeno
MM	Mecânica Molecular
PPM	Proteínas fosfatases dependentes de metal
PPP	Fosfoproteínas fosfatases
PSTPs	Proteína serina/treonina fosfatase
PP1	Proteína serina/treonina fosfatase do tipo 1
PP2B	Proteína serina/treonina fosfatase do tipo 2B ou calcineurina
PP2C	Proteína serina/treonina fosfatase do tipo 2C
PP4	Proteína serina/treonina fosfatase do tipo 4
PP5	Proteína serina/treonina fosfatase do tipo 5
PP6	Proteína serina/treonina fosfatase do tipo 6
PP7	Proteína serina/treonina fosfatase do tipo 7
QM	Quântico-mecânico
QTAIM	Teoria Quântica de Átomos e Moléculas
RNA	Ácido ribonucleic

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS.....	17
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
3.1	FOSFATASES DE SERINA/TREONINA	18
3.2	SERINA/TREONINA FOSFATASE DO TIPO 5 (PP5).....	20
3.3	PP5 E CÂNCER	23
3.4	INIBIDORES DA PP5	24
3.5	MÉTODOS COMPUTACIONAIS EMPREGADOS NA ÁREA DE QUÍMICA MEDICINAL	26
3.5.1	MÉTODOS CLÁSSICOS- MECÂNICA MOLECULAR.....	27
3.5.1.1	DINÂMICA MOLECULAR CLÁSSICA	30
3.5.2	MÉTODOS QUÂNTICOS	32
3.5.2.1	ASSOCIAÇÃO DE CÁLCULOS QUANTO-MECÂNICOS E MECÂNICA MOLECULAR (QM/MM)	33
3.5.2.2	TEORIA DE ÁTOMOS EM MOLÉCULAS.....	35
4	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	36
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO	45
	ARTIGO 1 - MOLECULAR DYNAMICS AND QM/MM SIMULATIONS OF THE CANTHARIDIN-LIKE INHIBITORS INTERACTION WITH HUMAN PROTEIN PHOSPHATASE-5 IN A Mg²⁺ SYSTEM.....	45
	ANEXO A.....	70

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A modelagem molecular (MM), por meio de simulações computacionais, é uma poderosa ferramenta indispensável no planejamento racional e na descoberta de novos compostos bioativos. Esta abordagem permite a obtenção de informações a respeito das propriedades específicas de uma molécula, as quais podem influenciar em sua interação com o receptor. Além disto, possibilita a comparação estrutural entre diferentes compostos, a fim de encontrar um índice de similaridade que pode estar correlacionado com suas atividades farmacológicas. Outra característica relevante da MM é facilitar a compreensão, em nível atômico, a respeito dos principais requisitos que permitem uma interação adequada do composto bioativo no seu sítio receptor (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; SCOTTI et al., 2007).

Nesta perspectiva, o presente trabalho tem como foco abordar métodos de modelagem de estruturas moleculares, que são fundamentais para a compreensão de fenômenos químicos presentes na interação de complexos ligante/receptor e no desenvolvimento de vários modelos para o planejamento de compostos bioativos. Para isto, a enzima serina/treonina fosfatase 5 (PP5-Mg²⁺) foi selecionada como agente terapêutico, pois configura-se como novo alvo para o tratamento de diversos tipos de cânceres, que atingem grande parte da população mundial (LIU; CHEN; ZHANG, 2015; ONU_BR, 2018).

A enzima PP5-Mg²⁺ é um membro da família de genes de PPP fosfatases que catalisa reações de desfosforilação. Estas reações atuam como mecanismo regulador nas vias de transdução de sinal que controlam diversos processos biológicos, como quimiotaxia, diferenciação e crescimento celular (LIU; CHEN; ZHANG, 2015; OBEROI et al., 2016).

Em particular, a PP5 está envolvida na regulação de receptores que estão diretamente relacionados com a modulação da atividade do receptor de glicocorticoides, crescimento celular e, mediada pela quinase ATM, na resposta a danos no DNA (LIU; CHEN; ZHANG, 2015; OBEROI et al., 2016). Assim, a expressão atípica da PP5 pode ocasionar a proliferação descontrolada de células, o que leva à formação de tecido anormal, resultando no surgimento de câncer (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2018). Portanto, a regulação desses receptores em que a PP5 interfere,

compartilham de componentes comuns no desenvolvimento de fármacos para o tratamento desta doença (LIU; CHEN; ZHANG, 2015).

Diante deste cenário, torna-se necessário investigar o mecanismo de inibição da PP5. Para isso, foram escolhidos o inibidor Cantaridina e seus derivados. Pois essa classe de toxinas, além de atuar em vários processos celulares, como danos no DNA, parada do ciclo celular e apoptose, são usados na medicina chinesa para tratar cânceres humanos. Contudo, a aplicação clínica da Cantaridina é restrita, devido aos graves efeitos colaterais no trato gastrointestinal, rim e uréter. Até o momento, existem poucos estudos sobre a interação dessas toxinas e seus derivados no sítio catalítico da PP5, logo, entender o mecanismo de reação entre estas biomoléculas, pode contribuir no desenvolvimento de novos inibidores menos citotóxicos e específicos (BERTINI et al., 2009; LIU; CHEN; ZHANG, 2015).

Assim, os métodos de modelagem molecular em sistemas biomoleculares, aplicados nesse trabalho, podem fornecer informações microscópicas sobre as interações que ocorrem entre a enzima e os inibidores, e fornecer informações de energia que controlam os processos químicos ocorridos durante a reação de inibição da enzima.

Portanto, este trabalho será bastante promissor para pesquisas de novos candidatos a antitumorais, uma vez que o câncer é uma doença que prejudica milhares de pessoas a cada ano, trazendo morbidade e até mesmo a mortalidade entre indivíduos que possuem esta patologia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

2 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo é obter informações sobre o mecanismo de reação envolvido no processo de inibição da enzima PP5, utilizando metodologias de cálculos baseados na mecânica molecular e quântica.

Os objetivos específicos podem ser sumarizados da seguinte forma:

- i) Pretende-se investigar quais interações são mais favoráveis para a atividade inibitória da PP5;
- ii) Estudar o mecanismo de inibição de dez compostos derivados da Cantaridina no sítio ativo da PP5;
- iii) Analisar se o caráter das ligações químicas formadas na geometria do estado de transição são predominantemente iônicas ou covalentes.

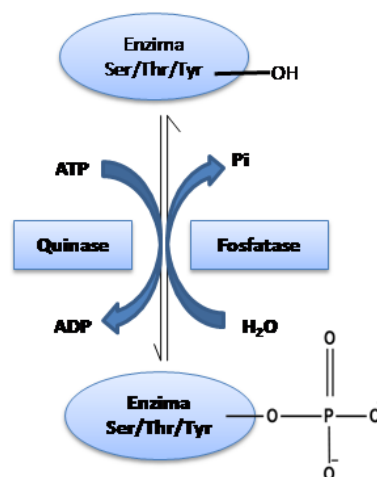
Com base em todo este contexto, este trabalho está dividido em duas partes: a primeira está centralizada em uma abordagem geral dos estudos já descritos na literatura; na segunda, uma descrição dos resultados deste trabalho presente no artigo 1.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Fosfatases de Serina/treonina

As células apresentam mecanismos distintos para modificar, reversivamente, as funções de suas proteínas. Um destes é a fosforilação reversível de aminoácidos, que está associado ao controle de uma grande variedade de processos intracelulares, catalisado por proteínas quinases e fosfatases (Figura 1). Esse processo pode ocorrer nos resíduos de tirosina, serina, treonina, cisteína, lisina, histidina, arginina, aspartato e glutamato. A fosforilação em resíduos de serina e treonina é prevalente em organismos eucarióticos e fundamental na regulação de uma série de funções biológicas, que incluem a mitose, apoptose, transcrição e tradução (BECK-SICKINGER; MÖRL, 2006; MOORHEAD et al., 2008; VIRSHUP; SHENOLIKAR, 2009).

Figura 1- Fosforilação e desfosforilação de proteínas.



Fonte: Do Autor (2018)

O genoma humano codifica apenas 40 serina/treonina fosfatases, um número bastante inferior em comparação aos 428 genes de serina/treonina quinases (LIU; XU, 2011). Acredita-se que essa diferença entre os genes das proteínas serina/treonina quinases e serina/treonina fosfatases está associada ao fato de que as quinases se diversificaram por duplicação gênica e imediata especiação, enquanto que as fosfatases se diversificaram por meio da formação de diferentes complexos proteicos ao longo da evolução (CEULEMANS; BOLLEN, 2004; CHEN; COHEN, 1997; HUBBARD; COHEN, 1993).

Devido a essas circunstâncias, durante décadas as proteínas fosfatases foram tratadas como enzimas de manutenção, cujo papel era somente de reverter a ação das

proteínas quinases. Em cenários atuais, este conceito foi profundamente modificado, e hoje, as proteínas fosfatases são reconhecidas como reguladores centrais de diversos processos celulares que envolvem fosforilação reversível de proteínas, com importância equivalente às proteínas quinases, tornando um alvo promissor e desafiador (LAJARÍN-CUESTA; ARRIBAS; DE LOS RÍOS, 2016). Nesta perspectiva, daremos ênfase nesse trabalho às proteínas serina/treonina fosfatases (PSTPs).

Os diferentes tipos de PSTPs, com base na sua determinação da sequência gênica em vários organismos, puderam ser agrupados em três famílias principais: as proteínas fosfatases dependentes de metal (PPMs), as fosfatases à base de aspartato representadas pelo FCP / SCP e as fosfoproteínas fosfatases (PPPs) (CHEN; SHUMIN; ZHANG, 2013).

A família PPM compreende as proteínas fosfatases dependentes de íons manganês / magnésio (Mn^{2+}/Mg^{2+}), como as PP2C e a piruvato desidrogenase fosfatase mitocondrial. Diferente da família da PPP, os membros da família PPM não possuem subunidades regulatórias, no entanto, possuem domínios adicionais e motivos de sequência conservados que podem contribuir na determinação da especificidade do substrato (SHI, 2009; ZHANG et al., 2013).

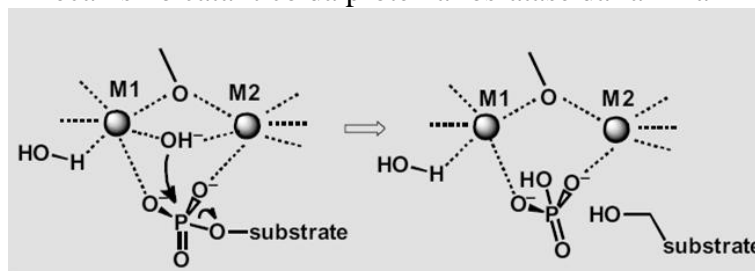
As fosfatases da família FCP/SCP, como outros membros da superfamília de haloácido desidrogenases (HAD), necessitam da presença de um íon metálico (Mg^{2+}), bem como a sequência DxDx(V/T) no sítio ativo para a catálise. Sua função está relacionada com a desfosforilação das serinas do domínio carboxi terminal (CTD) da RNA polimerase II (CHEN; SHUMIN; ZHANG, 2013; COHEN, 2003; MARTINS, 2010; FAHS; LUJAN; KÖHN, 2016).

As proteínas da família PPP subdividem-se em: proteína fosfatase 1 (PP1), PP2A, PP2B (ou calcineurina), PP4, PP5, PP6 e PP7. Estes membros da família PPP estão entre as proteínas mais altamente conservadas e conhecidas, sendo definidas com base na presença de três sequências (-GDXHG-, -GDXVDRG- e -GNHE-, sendo X qualquer aminoácido) que estão presentes em um domínio catalítico de 280 resíduos. Além disso, as enzimas da família PPP formam complexos multiméricos por meio da associação da subunidade catalítica com uma ou mais subunidades reguladoras, que determinam a função, localização, e especificidade ao substrato da fosfatase (CHEN; SHUMIN; ZHANG, 2013; COHEN, 2003; SHI, 2009).

Quanto à sua função, as proteínas fosfatases da família PPP catalisam uma reação de fosforilação pela hidrólise do grupo fosfato a partir de resíduos fosforilados

de serina e treonina. Para isso, dois íons metálicos (Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+}) são coordenados no sítio ativo para mediar a transferência do fosfato sem formar um intermediário, e um íon hidroxila se liga aos dois íons metálicos participando do ataque nucleofílico no grupo fosfato do substrato. O mecanismo catalítico das fosfatases da família PPP está representado na Figura 2 (CHEN; SHUMIN; ZHANG, 2013; RIBEIRO et al., 2013).

Figura 2- Mecanismo catalítico da proteína fosfatase da família PPP.



Fonte: ZHANG (2013)

Dentre as demais enzimas fosfatases da família PPP, neste trabalho pretende-se compreender melhor o mecanismo de ação da PP5, visto que pode ser considerado um modelo adequado para investigar a base estrutural da inibição dos membros da PPP (BERTINI et al., 2009).

3.2 Serina/treonina fosfatase do tipo 5 (PP5)

A PP5 distingue das demais enzimas da família PPP por apresentar as funções de conhecimento catalítico, regulador e de segmentação subcelular em uma única cadeia polipeptídica e, também, por conter três sequências de repetições Tetratricopeptídeo (TPR) o que confere a enzima baixa atividade basal (CHINKERS, 2001; GOLDEN; SWINGLE; HONKANEN, 2008; KANG et al., 2001; LIU; XU, 2011).

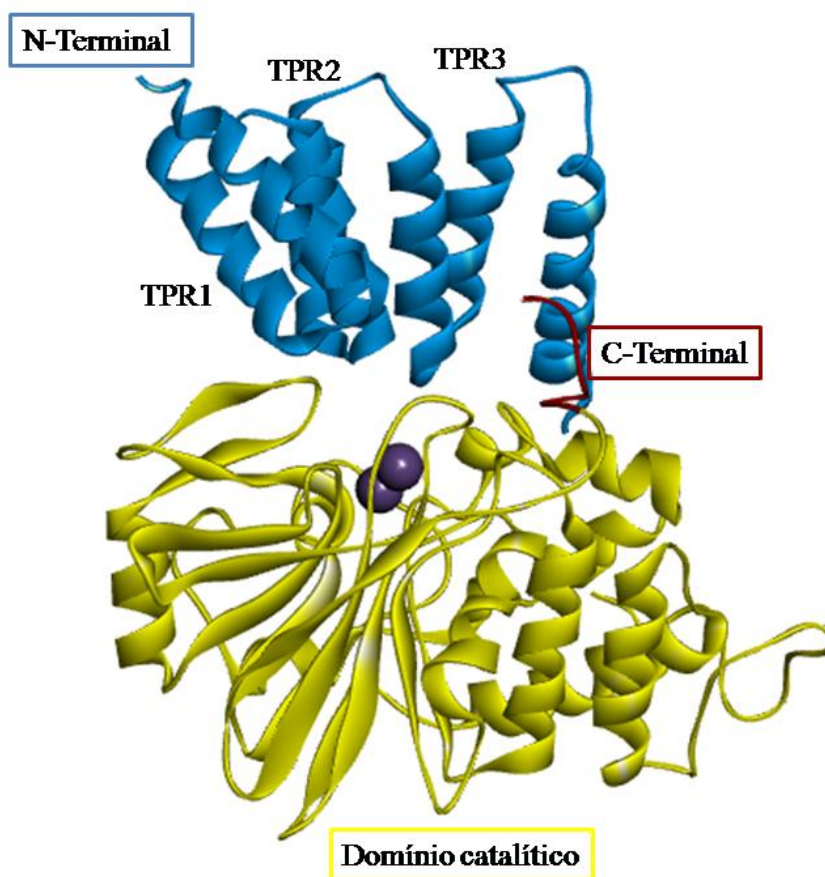
A PP5 é formada por uma única cadeia polipeptídica de 499 aminoácidos, que compreende três regiões principais: Domínio catalítico, N-Terminal e C-terminal (SWINGLE; HONKANEN; CISZAK, 2004).

O domínio catalítico compartilha cerca de 30 a 45% de identidade sequencial com as subunidades catalíticas da PP1, PP2A e PP2B, e é identificado pela presença de dois íons metálicos divalentes (Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+}), e um total de dez resíduos catalíticos (Asp242, His244, Asp271, Asp274, Arg275, Asn303, His304, His352, Arg400 e His427). Cada íon é coordenado por seis ligantes em uma geometria octaédrica ligeiramente distorcida. Os resíduos de Asn303, His427 e His352 coordenam um íon metálico, enquanto o Asp242, His244 e uma molécula de água

coordenam o outro íon metálico (CHATTOPADHYAY et al., 2016; SWINGLE; HONKANEN; CISZAK, 2004).

O domínio N-terminal é constituído por três repetições de Tetratricopeptídeo (TPR1, TPR2 e TPR3), formando três conjuntos de alfa hélices antiparalelas, que estão envolvidas na mediação das interações proteína-proteína. E, por fim, o subdomínio C-terminal, que ajuda a manter uma conformação fechada, estabilizando a posição do domínio N-terminal sobre o sítio catalítico. A Figura 3 representa esquematicamente os domínios estruturais da PP5 (GOLDEN; SWINGLE; HONKANEN, 2008; HINDS; SÁNCHEZ, 2008; OBEROI et al., 2016; RIBEIRO et al., 2013).

Figura 3- Uma representação da estrutura tridimensional completa da PP5 (código do PDB: 1WAO).



Legenda: Os íons metálicos do sítio ativo estão representados por esferas cinza.

Fonte: Golden (2008)

Os genes para a PP5 já foram descobertos em vários organismos distintos, incluindo mamíferos, plantas e fungos, sendo codificada por apenas um gene entre os eucariotos (BROWN et al., 2000; CHEN; PETERSON; SCHREIBER, 1998; VAN BENTEM et al., 2003). Em mamíferos, a PP5 é identificada em vários tecidos, com níveis particularmente elevados no cérebro e nos neurônios, com localização intracelular tanto no núcleo como no citoplasma (HINDS; SÁNCHEZ, 2008).

As funções celulares afetadas pela PP5 incluem proliferação, migração, diferenciação, equilíbrio de eletrólitos, apoptose, sobrevivência e reparação de danos no DNA. Especificamente, ela desempenha um papel importante na regulação da fosforilação dinâmica de muitos componentes de sinalização, como o heterocomplexo receptor de glicocorticoide (GR-Hsp90), complexo promotor da anáfase com as subunidades do ciclo de divisão celular Cdc16/Cdc27, a quinase sinal de regulação da apoptose 1 (ASK1), proteínas serina/treonina quinases dependentes de DNA (DNA-PKcs), quinase mutada da ataxia-telangiectasia (ATM), quinase relacionada a ATM e Rad 3 (ATR), subunidade A da PP2A, quinase ativada por mitógeno (MAPK), dentre outros (GOLDEN; SWINGLE; HONKANEN, 2008; LIU; CHEN; ZHANG, 2015).

Como exemplo, tem-se o caso da interação da PP5 com o complexo receptor de glicocorticoide (GR-Hsp90), no qual a PP5 liga-se diretamente a proteína de choque térmico 90 (Hsp90), conhecida como a chaperona molecular que, entre outras funções, regula os estágios iniciais da atividade do receptor de esteróides. A interação da sequência TPR da PP5 com a Hsp90 resulta na ativação dessa enzima através da desestabilização da interação do domínio N-terminal com o subdomínio C-terminal, permitindo assim, o acesso do substrato ao sítio catalítico (KANG et al., 2001; YANG et al., 2005). Uma vez ocorrida a desfosforilação, os receptores de esteróides são liberados do complexo Hsp90 após a ligação hormonal, e o complexo do receptor hormonal então dimeriza, e liga-se ao DNA para modular a transcrição dos genes alvo (CHEN; COHEN, 1997; CHER et al., 2010; RAMSEY; CHINKERS, 2002).

As pesquisas a respeito das funções biológicas da PP5 mostram que muitos dos caminhos que a PP5 interfere, compartilham de componentes comuns para o desenvolvimento de fármacos contra o câncer, como por exemplo, ASK-1, GR-Hsp90, ATR, ATM, DNA-PKcs (GOLDEN; SWINGLE; HONKANEN, 2008; LIU; CHEN; ZHANG, 2015). Portanto, estudos sobre as ações da PP5 não só devem fornecer uma visão sobre o comportamento celular, mas também devem ajudar no desenvolvimento de novas terapias anticâncer.

3.3 PP5 e câncer

O câncer é um conjunto de doenças caracterizadas pelo crescimento de células anormais, que tem o potencial de invadir partes adjacentes do corpo e / ou espalhar-se para outros órgãos, formando tumores malignos. Estes tumores podem afetar quase qualquer parte do corpo e têm muitos subtipos anatômicos e moleculares, sendo que cada um exige estratégias de manejo específicas. Nesta linha, o tratamento do câncer poder ser através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia, ou ainda, com a combinação dessas técnicas (DE ALMEIDA et al., 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2018).

Apesar de vários estudos sobre esta doença, o câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo, e representou 8,8 milhões de mortes em 2015. O câncer de pulmão, próstata, colorretal, estomacal e hepático são os tipos mais comuns de câncer nos homens, enquanto os cânceres mamários, colorretais, pulmonares e estomacais são os mais comuns entre as mulheres (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2018).

Até o momento, relata-se vários estudos que implicam diretamente a enzima PP5 no desenvolvimento do câncer. O primeiro que envolve a PP5, com crescimento celular, partiu de estudo sem leveduras, no qual o homólogo da PP5 (PPT1) foi expresso em níveis elevados em células em proliferação (GOLDEN; SWINGLE; HONKANEN, 2008; JEONG et al., 2003). Enquanto que estudos em ratos mostraram níveis de RNA mensageiro (mRNA) da PP5 significativamente elevados em hepatomasascíticos (relacionado a câncer de pâncreas) altamente malignos (GOLDEN; SWINGLE; HONKANEN, 2008; SHIRATO et al., 2000).

Outros estudos revelaram uma correlação positiva entre níveis elevados de PP5 e câncer de mama humano, e o gene PP5 foi associado a uma região de amplificação cromossômica em amostras de osteossarcoma de pacientes (ATIYE et al., 2005). Além disso, foi identificado um nível elevado de PP5 na insuficiência renal celular, com deficiência de VHL em linhagens celulares de carcinoma celular (ccRCC) e em tumores de pacientes (DUSHUKYAN et al., 2017). Considerado as observações acima mencionadas, há certamente evidências circunstanciais sugerindo que a expressão anormal da PP5 pode auxiliar no desenvolvimento ou na progressão de vários cânceres humanos.

Assim, torna-se necessário compreender melhor o mecanismo de reação da PP5 e seus inibidores, a fim de permitir a concepção de novos medicamentos contra o câncer. Uma vez que esta doença é atualmente responsável por causar milhões de mortes. Nesta linha, os avanços na busca por novos alvos terapêuticos e novas classes de inibidores são essenciais para auxiliar os métodos de remediação.

3.4 Inibidores da PP5

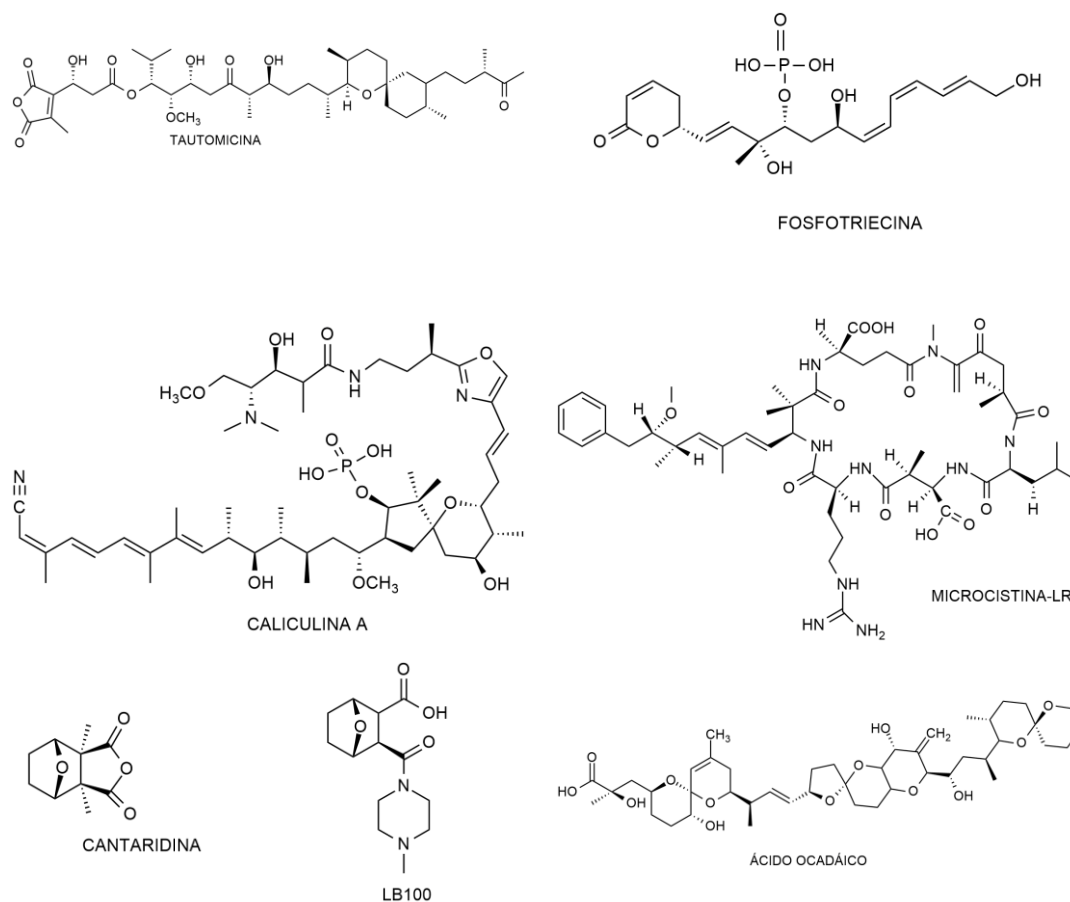
Cantaridina foi isolada pela primeira vez em 1810 por Robiquet, um químico francês. Esse composto é uma toxina natural oriunda dos besouros de bolhas para preservar seus ovos de predadores, sendo considerado um forte inibidor das fosfatases, a qual possui uma ação bastante citotóxica. Ela já tem sido usada, por muitos anos, na tradicional medicina chinesa, contra lesões cutâneas cancerosas, e também como um afrodisíaco, abortivo, e para tratar úlceras (BERTINI et al., 2009; CHATTOPADHYAY et al., 2016; PUERTO GALVIS; VARGAS MÉNDEZ; KOUZNETSOV, 2013; YOUNG, 1984).

Cantaridina é um anidrido cíclico, sólido inodoro e incolor nas condições ambientes, sua nomenclatura de acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (em inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC), é (3ar, 4s, 7r, 7as) - 3a,7a-dimetilexahidro-4,7-epoxi-2-benzofuran-1,3-diona. Sua fórmula química é $C_{10}H_{12}O_4$ e sua estrutura está representada na Figura 3 (BERTINI et al., 2009; CHATTOPADHYAY et al., 2016; PUERTO GALVIS; VARGAS MÉNDEZ; KOUZNETSOV, 2013; YOUNG, 1984).

O LB100 é um agente candidato derivado da Cantaridina, que já se encontra em testes clínicos na fase I, que se refere ao estudo de toxicidade em indivíduos saudáveis (LIU; CHEN; ZHANG, 2015). Este composto é um inibidor farmacológico da PP2A. A inibição farmacológica da PP2A produz atividade anti-tumoral contra muitos tipos de cânceres em humanos (Figura 3) (WEI et al., 2013).

A Cantaridina não é a única toxina natural que apresenta inibição contra as proteínas fosfatases, por exemplo, o ácido ocadáico, microcisteína, caliculina A, tautomicina e fosfotriecina estão entre os inibidores mais investigados, as estruturas estão dispostas na Figura 4 (BERTINI et al., 2009; CHATTOPADHYAY et al., 2016).

Figura 4 - Estruturas dos inibidores da PP5.



Fonte: Do Autor (2018)

De acordo com a Figura 4, a maioria dessas toxinas possui pesos moleculares relativamente elevados, aproximadamente de 500-1000 kDa, portanto apresentam dificuldade de fazer coordenação com os íons metálicos presentes no sítio ativo da PP5, isso é importante, pois é a forma de inibição desta. Em contradição com estas moléculas, a Cantaridina pode ser capaz de se ligar com facilidade ao sítio com o metal, e por este motivo, este inibidor e seus derivados foram escolhidos para dar desenvolvimento a este projeto (BERTINI et al., 2009; CHATTOPADHYAY et al., 2016).

Acredita-se que os inibidores análogos da Cantaridina irão fazer coordenação com o metal mais facilmente, em relação às demais classes mencionadas, e possivelmente terão um potencial inibitório bem significativo contra a PP5. E também, o principal motivo de suas excelentes propriedades farmacofóricas ainda não está bem esclarecido, bem como um entendimento mais fundamental da ação desses compostos (ou seja, sua

elevada atividade anti-fosfatase) de interesse para o tratamento do câncer. Dessa forma, esse assunto representa um campo aberto para investigação.

Neste contexto, o emprego de ferramentas de simulação computacional representa um robusto modelo “*in silicio*” para o rápido desenvolvimento de novos fármacos com novas e atrativas propriedades farmacofóricas, proporcionando assim, um completo entendimento que possibilita racionalizar a reatividade em tempo real, bem como, caracterizar de maneira mais adequada a estrutura destes compostos a nível molecular.

Além disso, fornece pistas muito úteis no desenvolvimento e descobertas de novos fármacos, promissores para o tratamento de inúmeras doenças graves, como vários tipos de cânceres (DA CUNHA et al., 2010; MATOS et al., 2011; SANTOS-GARCIA et al., 2016).

3.5 Métodos Computacionais empregados na área de Química Medicinal

A concepção e desenvolvimento de novos candidatos a fármacos é um processo desafiador, demorado e caro. Presuma-se que o custo para trazer um fármaco ao mercado fica em torno de \$2,6 bilhões de dólares. Geralmente estes gastos estão vinculados a 75% das falhas que acontecem ao longo da descoberta do fármaco e, além disso, 90% dos fármacos que entram em testes clínicos não obtêm aprovação da pela agência que regulamenta medicamentos nos Estados Unidos (em inglês, *U. S. Food and Drug Administration*, FDA) (LEELANANDA, S. P.; LINDERT, S., 2016; TOLLMAN, 2001).

Nesta perspectiva, a química computacional é uma ferramenta eficaz e indispensável que pode ser usada em vários projetos no desenvolvimento de novas drogas, pois possibilita a proposta de compostos com propriedades bem definidas, diminuindo consideravelmente a síntese experimental exploratória de uma quantidade enorme de substâncias (MARTINS et al., 2009). Além de possuir uma ampla atuação aplicada a problemas químicos específicos, que trata desde a nanotecnologia até a simulação de processos industriais, resolvendo os problemas de modo eficiente, e encontrando uma solução apropriada para cada situação que se apresenta (SIEGBAHN; BLOMBERG, 2000).

De um modo detalhado, a aplicação de métodos computacionais no estudo e no planejamento de compostos bioativos é orientado por uma hipótese racional sobre o mecanismo de ação destes compostos, que têm seus efeitos associados a interações ou

reações químicas com estruturas macromoleculares presentes no sistema vivo, como as proteínas. Ou seja, para ocorrer tais interações ou reações químicas entre a biomacromolécula e o composto ativo, é necessário que haja complementaridade estrutural entre ambas. E esta complementaridade é importante, pois permite o estabelecimento de interações específicas (como as ligações de Hidrogênio, as interações hidrofóbicas, entre outras) que contribuem para a associação de ambas as moléculas (SANT'ANNA, 2009).

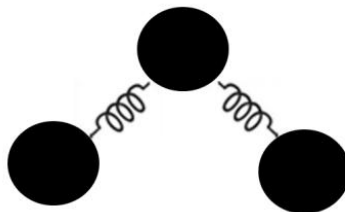
E, principalmente por causa desses fatores, a modelagem molecular pode dar sua contribuição para o desenvolvimento de compostos bioativos, pois através desse estudo, é possível ter uma descrição detalhada da estrutura, das interações intermoleculares e das reações químicas existentes entre o composto ativo e a biomacromolécula (SANT'ANNA, 2009).

Em estudos de modelagem molecular, existem duas abordagens que são bastante utilizadas, a abordagem clássica, que abrange os métodos da mecânica molecular e a abordagem quântica, que abrange os métodos ab initio e semi-empíricos. Geralmente, para escolher entre essas duas aproximações, é preciso saber quais propriedades se deseja avaliar no estudo, e também a capacidade computacional disponível para a realização dos cálculos (SANT'ANNA, 2009).

3.5.1 Métodos Clássicos- mecânica molecular

A mecânica molecular (MM) é fundamentada na aproximação de Born-Oppenheimer (COELHO et al., 1999). Esta aproximação descreve que os movimentos dos núcleos e dos elétrons podem ser tratados separadamente, pois a velocidade do núcleo, em relação aos elétrons, é muito pequena. Didaticamente pode-se dizer que na mecânica molecular, as moléculas são descritas como um conjunto de “átomos conectados”, em que cada átomo é considerado como uma massa pontual que é conectada por molas, que são as ligações químicas (Figura 5). O movimento de cada átomo é determinado pelas forças que agem sobre ele por todos os outros átomos (JR, 2011). Essas forças que atuam em cada partícula são calculadas a cada passo usando campos de força (SANT'ANNA, 2009).

Figura 5 - Representação de uma molécula em modelagem molecular (massa pontual: átomos e as molas: Ligações químicas).



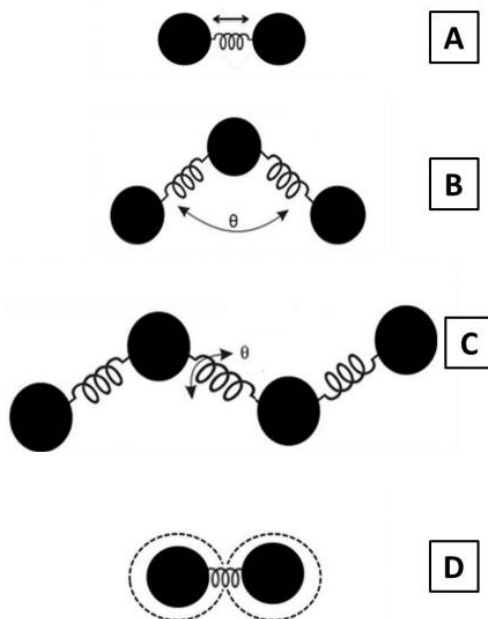
Fonte: NASCIMENTO (2013)

O campo de força (Equação 1) é um conjunto completo dos potenciais de interações entre os átomos, que incluem termos potenciais ligados (comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedros) e não ligados (interações de van der Waals e de Coulomb); um típico campo de força pode ser descrito pela equação 1 (DUBEY; OJHA, 2013; NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008):

$$v(r^N) = \sum_{\text{ligações}} \frac{k_i}{2} (r_i - r_{i,0})^2 + \sum_{\text{ângulos}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{torções}} V_n [1 + \cos(n\omega - \gamma)] + \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \left(4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right) \quad (1)$$

Onde, $v(r^N)$ é a energia potencial total, que é uma função das posições (\mathbf{r}) de N partículas (normalmente átomos). O primeiro termo modela as interações entre pares de átomos ligados, modelados aqui pelo potencial harmônico que dá o aumento na energia quando o seu comprimento r_i desvia do valor de referência $r_{i,0}$. O segundo termo é uma soma sobre todos os ângulos de valência (ângulos A-B-C) na molécula, novamente modelada usando um potencial harmônico. O terceiro termo é o potencial torcional, que modela como a energia varia quando as ligações giram. A quarta contribuição é o termo não ligado, este é calculado entre todos os pares de átomos (i e j) que estão em diferentes moléculas ou na mesma molécula, mas separados por no mínimo três ligações. Na figura 6, tem-se uma representação esquemática de um campo de força.

Figura 6 - A) Deformação no comprimento de ligação; B) Deformação no ângulo de ligação; C) Ângulo de torção e D) Interações de van der Waals.



Fonte: NASCIMENTO (2013)

Alguns campos de força incluem outros termos, com o intuito de se obter uma melhor concordância com espectros vibracionais, como por exemplo, termos que especificam melhor o acoplamento de oscilações entre ângulos ou comprimentos de ligação. A escolha do campo de força depende, geralmente, das propriedades que serão estudadas no sistema, sendo uma etapa bem importante, pois influencia diretamente na confiabilidade dos resultados (NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008).

Os campos de força mais utilizados, em sistemas biomoleculares, são: CHARMM (BROOKS *et al.*, 1983), GROMOS (SCOTT *et al.*, 1999), AMBER (WEINER; KOLLMAN, 1981), OPLS (JORGENSEN; MAXWELL; TIRADO-RIVES, 1996), entre outros. Dentre as diversas metodologias empregadas na MM, simulação de dinâmica molecular foi o método escolhido para este trabalho, por possibilitar a resposta das hipóteses levantadas.

3.5.1.1 Dinâmica molecular clássica

Dentre os métodos computacionais, a simulação de dinâmica molecular clássica (DM) é um dos métodos mais versáteis para o estudo de proteínas, ácidos nucleicos e bicamadas lipídicas (FATTEBERT et al., 2015; NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008; RAMALHO et al., 2016). É uma técnica que proporciona informações microscópicas sobre as forças envolvidas na interação enzima-ligante como uma função do tempo e também fornece uma compreensão sobre o efeito do solvente na dinâmica de proteínas (JR, 2011; NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008; RAMALHO et al., 2016).

A metodologia de DM é utilizada predominantemente para investigar a estrutura, dinâmica e termodinâmica de biomacromoléculas e seus complexos. Além de fornecer informações detalhadas sobre as flutuações e mudanças conformacionais de tais compostos (HAILE, 1992; RAPAPORT, 2004).

Os cálculos de DM se fundamentam na solução numérica, gradativamente, da equação de movimento de Newton (DUBEY; OJHA, 2013; NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008), na qual cada átomo i do sistema molecular é representado pelas equações 2 e 3:

$$F_i(t) = m_i a_i \quad (2)$$

$$F_i(t) = \frac{\partial V(r_i)}{\partial r_i} \quad (3)$$

Onde F_i é a força que atua sobre cada átomo do sistema e a_i é a aceleração do átomo i de massa m_i . O tratamento analítico tradicional somente calcula a resolução dessas equações para sistemas com no máximo duas partículas independentes. Assim, para sistemas maiores é necessário o uso de métodos numéricos e aproximações adicionais para minimizar a complexidade das avaliações de força globais. Se a posição no tempo t é $r(t)$, a posição após um curto intervalo de tempo Δt pode ser obtida seguindo a série de Taylor (Equação 4), como se segue:

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \frac{dt}{dt} \Delta t + \frac{d^2_r}{dt^2} \frac{\Delta t^2}{2} + \dots \quad (4)$$

A solução da equação depende da posição $r(t)$, da velocidade dr/dt e da aceleração d^2r/dt^2 para cada partícula. O intervalo de tempo (Δt) deve ser bem pequeno para que a aceleração possa ser considerada como constante nesse intervalo, permitindo assim, simular os movimentos de maior frequência do sistema, que muitas vezes são as vibrações das ligações (DURRANT; MCCAMMON, 2011; RAMALHO et al., 2016).

Geralmente, os algoritmos confiáveis utilizados em dinâmica molecular para integrar as equações de movimento são: o algoritmo de Verlet (VERLET, 1967), o algoritmo de Beeman (SCHUMANN; SWEET, 1976) e o método *leap-frog* (HOCKNEY, 1970).

Após a definição do campo de força, pode-se obter as velocidades, que ao sofrer integração, permitem a mudança de coordenada de cada partícula. Com as novas velocidades e coordenadas de cada átomo, obtêm-se as energias potenciais e cinéticas do sistema. Resumindo, essas equações (2 e 3) descritas acima são resolvidas sucessivamente, em um espaço de tempo bem pequeno gerando a “trajetória”, que nada mais é do que o conjunto de posições e velocidades de cada partícula ao longo do tempo (NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008).

Para realizar um cálculo de DM é necessário inicialmente identificar as posições iniciais de cada partícula do sistema, que em geral, serão colocadas nas posições de uma rede cristalina (caixa), de modo a evitar sobreposição indesejada. Assim, o sistema de interesse será montado dentro de uma caixa que pode assumir várias geometrias. Posteriormente, são adicionadas moléculas de água na caixa em casos de sistemas biomoleculares, sendo aplicado o modelo de condições periódicas de contorno, evitando que as partículas que estão dentro da rede cristalina escapem pelo meio (NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008).

Após a preparação do complexo inicial, ocorrerá a minimização de energia, que tem por finalidade encontrar um conjunto de coordenadas que minimizam a energia potencial do sistema. Esse procedimento é importante, pois relaxa as distorções nas ligações químicas, nos ângulos entre ligações e nos contatos de van der Waals, de modo a obter uma energia próxima ao mínimo local (NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008). Os algoritmos de minimização mais utilizados são: o método *steepest descent* que usa a derivada primeira para determinar a direção para o mínimo (ARFKEN, 1985; MORSE; FESHBACH, 1953); o método dos gradientes conjugados que utiliza informação das prévias derivadas primeiras para determinar uma direção ótima da busca (HESTENES;

STIEFEL, 1952); e por fim, o método de Newton-Raphson, usa tanto as derivadas primeiras quanto as segundas da função (GROSSMANN, 1981).

Em seguida, o sistema é gradualmente aquecido para a temperatura de interesse, e também é ajustada a pressão, conhecida como etapa de equilibração, que se dá por finalizada quando se alcança o equilíbrio termodinâmico. Os termostatos usados com frequência são: termostato de Berendsen (BERENDSEN et al., 1984), os termostatos de Nosé-Hoover (HOOVER, 1985; NOSÉ, 1984) e Nosé-Poincaré (HOOVER, 1985). Para o controle da pressão, os barostatos mais utilizados são os de Berendsen (BERENDSEN et al., 1984) e Parrinello-Rahaman (PARRINELLO; RAHMAN, 1981).

Uma vez atingido a etapa de equilibração, pode-se então obter as trajetórias da DM (NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008). Por meio dos cálculos de Dinâmica Molecular, é possível analisar as mudanças de conformação sofridas pelas enzimas, e também investigar e compreender o comportamento de uma molécula quimicamente ativa no sítio ativo de um receptor, entre outros processos (KARPLUS; MCCAMMON, 2002).

3.5.2 Métodos Quânticos

De modo diferente do processo de mecânica molecular, a mecânica quântica leva em consideração as interações entre os seus elétrons e núcleos (CARVALHO et al., 2003; SANT'ANNA, 2009), calculando as propriedades energéticas de uma molécula por meio da equação de Schrödinger. Esta equação é à base dos cálculos das energias de átomos e moléculas (ALCÁCER, 2007). A equação 5 representa a equação de Schrödinger, independente do tempo :

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2m} \left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right) + V(x, y, z) \right] \Psi(x, y, z) = E\Psi(x, y, z) \quad (5)$$

Onde: Ψ representa a função de onda, (x, y, z) representa o conjunto das três coordenadas de espaço, \hbar constante de Planck e m corresponde à massa.

A equação 5 significa que, ao se aplicar os operadores de energias cinética e potencial na função de onda, é adquirida como resposta a própria função de onda multiplicada pela energia total do sistema. A equação de Schrödinger é especialmente importante nos cálculos de química quântica, abrangendo diversos métodos computacionais (HOUSE, 2003; SANT'ANNA, 2009).

Em casos de sistemas biomoleculares, não é comum o emprego da mecânica quântica sozinha, devido à presença de milhares de átomos. Entretanto, a combinação das duas técnicas (mecânica molecular e mecânica quântica) em sistemas grandes fornecem informações cruciais sobre o sistema de interesse. Nessa perspectiva, podemos citar os cálculos quanto-mecânicos e mecânica molecular (QM/MM), que é uma técnica amplamente utilizada na química computacional.

3.5.2.1 Associação de cálculos quanto-mecânicos e mecânica molecular (QM/MM)

Nas últimas décadas, os cálculos quanto-mecânicos (QM) combinados com os cálculos de mecânica molecular (MM) tornaram-se o método de escolha para reações que envolvem sistemas biomoleculares, sistemas de estado sólido e processos químicos que ocorrem em solventes explícitos. Tais técnicas acopladas (QM e MM) representam um método computacional que permite modelar as reações dentro das enzimas, associando a potência e a exatidão de um cálculo quântico com a simplicidade da mecânica molecular (RYDE, 2016; ZHENG; WALLER, 2016).

Os métodos de QM permitem a modelagem dos processos eletrônicos envolvidos na quebra ou na formação de ligações químicas, na transferência de carga e excitação de elétrons. Além disso, possui a vantagem de proporcionar informações energéticas que controlam todos os processos químicos (RYDE, 2016; SENN; THIEL, 2009). Entretanto, os cálculos de QM incluem somente sistemas de até algumas centenas de átomos; portanto, o tamanho e a complexidade conformacional das estruturas moleculares grandes são um problema para este tipo de cálculo, já que estas biomoléculas necessitam de métodos capazes de analisar até cem mil átomos e permitir simulações ao longo de escalas de dezenas de nanossegundos (SENN; THIEL, 2009). Uma maneira de resolver esta questão é utilizar métodos de MM (RYDE, 2016; SENN; THIEL, 2009; VAN DER KAMP; MULHOLLAND, 2013).

Portanto, associando as duas técnicas QM e MM, é possível estudar biomoléculas grandes e investigar uma pequena porção do sistema, usando cálculos QM, e o restante do sistema por métodos de MM (RYDE, 2016). Por exemplo, em se tratando de enzimas, a região do sítio ativo seria analisada por cálculos de QM, utilizando um nível *ab initio*, semi-empírico, ou teoria do funcional da densidade (DFT). A região da enzima, que não está diretamente envolvida na reação, seria tratada

por cálculos de mecânica molecular, que são baseados nos campos de força (RAMALHO et al., 2016; VAN DER KAMP; MULHOLLAND, 2013).

Uma das principais características entre os métodos de QM/MM está em como são tratadas as interações existentes entre as fronteiras dos sistemas QM e MM, ou seja, o acoplamento das duas regiões. A estratégia mais simples consiste no uso de cargas pontuais na região QM interagindo com o resto da região MM (RAMALHO et al., 2016; SENN; THIEL, 2009).

Assim, neste tipo de cálculo, a energia QM/MM de todo o sistema é representada pela Equação 6, que indica que todas as interações entre os sistemas QM/MM são mantidas ao nível MM. Isto é adequado para as interações de van der Waals, pois cálculos de QM descrevem com pouca precisão interações deste tipo, entretanto, é mais discutido para interações eletrostáticas, pois geralmente fornecem o efeito catalítico dominante (RYDE, 2016).

$$E_{\text{TOTAL}}^{\text{QM/MM}} = E_{\text{TOTAL}}^{\text{MM}} + E_{\text{QM região}}^{\text{QM}} - E_{\text{QM região}}^{\text{MM}} \quad (6)$$

Onde $E_{\text{TOTAL}}^{\text{MM}}$, o primeiro termo da equação representa a energia MM de todo o sistema, o segundo termo $E_{\text{QM região}}^{\text{QM}}$ representa a energia QM da região quântica, e o último termo $E_{\text{QM região}}^{\text{MM}}$ é a energia MM da região QM.

Em grande parte dos métodos QM/MM, considera-se o efeito de polarização na região QM pelo ambiente MM. Esses tipos de métodos estão associados com interações eletrostáticas presentes nas regiões QM e MM (RAMALHO et al., 2016).

A energia total de todo o sistema não pode ser escrita somente como a soma das energias dos subsistemas, pois dependendo do tipo de esquema do QM/MM, pode abranger átomos adicionais que fazem parte do subsistema QM e não fazem parte do sistema inteiro, ou podem conter átomos com características especiais que aparecem tanto no cálculo QM como no MM (RAMALHO et al., 2016). Assim, é muito importante levar em consideração os métodos de acoplamento das duas regiões na fronteira entre os subsistemas.

O método QM/MM também pode ser aplicado ao sistema de uma forma sequencial. O QM/MM sequencial (S-QM/MM) é uma variante da abordagem QM/MM convencional, que busca por valores estatisticamente convergidos para a propriedade de

interesse, reduzindo o número de cálculos QM necessários para obter esses valores. Inicialmente no S-QM/MM, são aplicadas a técnica de *docking molecular* ou DM a fim de gerar as conformações dos compostos que compõem o sistema, nesta etapa, é aplicada a abordagem MM para o sistema todo. Em seguida, uma parte desse sistema é cortada e cálculos QM são executados sobre essas conformações. Canuto e Coutinho propuseram a metodologia S-QM/MM para estudar os efeitos do solvente sobre as propriedades eletrônicas e estruturais de solutos (CANUTO; COUTINHO, 2000; COUTINHO; CANUTO, 1997; DA SILVA GONCALVES et al., 2014).

Além desta metodologia, outra técnica que envolve a abordagem mecânico-quântico aplicada neste trabalho foi a Teoria de Átomos em Moléculas, com o objetivo de caracterizar as ligações químicas formadas no estado de transição que foram identificadas no QM/MM.

3.5.2.2 Teoria de Átomos em Moléculas

A Teoria Quântica de Átomos em Moléculas (em inglês, *Quantum Theory in Molecules*, QTAIM) foi desenvolvida por Bader e colaboradores (BADER, 1985). Esta teoria mecânico-quântico proporciona uma descrição quântica sobre a localização e o comportamento dos átomos em uma ligação química (BADER, 1994; POPELIER, 2000). É uma teoria amplamente aplicada para desvendar as interações átomo-átomo em interações covalentes e não covalentes em moléculas, moléculas pequenas, proteínas e empilhamento da base de DNA (OLIVEIRA; ARAÚJO; RAMOS, 2010).

Na abordagem do QTAIM, as propriedades observáveis de um sistema químico estão contidas em sua densidade eletrônica molecular, $\rho(\mathbf{r}; \mathbf{X})$, em que a densidade é usada como observável mecânico-quântico para execução de integrações numéricas, no qual o vetor gradiente $\nabla\rho(\mathbf{r})$ é a condição básica para se determinar a topologia molecular (BADER, 1994; OLIVEIRA; ARAÚJO; RAMOS, 2010).

As propriedades topológicas de densidade eletrônica e seus derivados são úteis na delimitação do conceito de ligação por meio de pontos críticos de ligação (BCPs). A densidade eletrônica juntamente com seus derivados nos BCPs fornece uma descrição precisa da ligação dentro de uma molécula ou cristal (KUMAR, P. S. V.; RAGHAVENDRA, V.; SUBRAMANIAN, V., 2016).

Através da densidade eletrônica $\rho(\mathbf{r}; \mathbf{X})$, do laplaciano $\nabla^2\rho$, muitos estudos têm sido realizados a fim de elucidar fenômenos químicos fundamentais, como, por

exemplo, o comportamento ácido/base segundo a teoria de Lewis. Em resumo, o formalismo da QTAIM foi desenvolvido para ser utilizado no estudo da ligação química e na interpretação de fenômenos moleculares (OLIVEIRA; ARAÚJO; RAMOS, 2010; KUMAR, P. S. V.; RAGHAVENDRA, V.; SUBRAMANIAN, 2016).

4 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O presente trabalho consiste na investigação da inibição da enzima PP5. Níveis elevados desta enzima na célula podem promover a progressão de vários tipos de cânceres. Com base nos resultados obtidos, as análises de dinâmica molecular indicam que a maioria dos compostos se acomodou bem no sítio ativo da PP5. Além disso, nas análises do mecanismo de inibição e os cálculos AIM, mostraram que a força de ligação química entre os inibidores e o metal Mg^{2+} interfere significativamente na atividade inibitória dessa enzima. De uma forma geral, este trabalho contribui para as pesquisas de novos candidatos antitumorais. Visto que, o câncer, é uma doença grave, que exige de suas vítimas um tratamento bem agressivo, e ainda trazem morbidade e até mesmo a mortalidade.

5 REFERÊNCIAS

- ALCÁCER, L. Introdução à Química Quântica Computacional. 1. ed. Lisboa: IST Press, 2007.
- ARFKEN, G. Introduction BT - Mathematical Methods for Physicists. 3.ed. Virginia Charlottesville: Academic Press, p. 1008, 1985.
- ATIYE, J. et al. Gene amplifications in osteosarcoma - CGH microarray analysis. **Genes Chromosomes and Cancer**, Itália, v. 42, n. 2, p. 158–163, 11 nov. 2005.
- BADER. Atoms in molecules: a quantum theory. In: Oxford: Oxford Universit., p. 458, 16 Jun.1994.
- BADER, R. F. W. Atoms in molecules. **Accounts of Chemical Research**, Ontario, v. 18, n. 1, p. 9–15, jan.1985.
- BECK-SICKINGER, A. G.; MÖRL, K. Posttranslational Modification of Proteins. Expanding Nature's Inventory. By Christopher t. Walsh. **Angewandte Chemie International Edition**, Lúpsia, v. 45, n. 7, p. 1020, 6 fev. 2006.
- BERENDSEN, H. J. C. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, Groningen, v. 81, n. 8, p. 3684–3690, 27 jun.1984.

- BERTINI, I. et al. Structural basis of serine/threonine phosphatase inhibition by the archetypal small molecules cantharidin and norcantharidin. **Journal of Medicinal Chemistry**, Florência, v. 52, n. 15, p. 4838–4843, 14 jul.2009.
- BROOKS, B. R. et al. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. **Journal of Computational Chemistry**, Cambridge, v. 4, n. 2, p. 187–217, 14 out.1983.
- BROWN, G. P. et al. Long-Term Potentiation Induced by θ Frequency Stimulation Is Regulated by a Protein Phosphatase-1-Operated Gate. **The Journal of Neuroscience**, New York, v. 20, n. 21, p. 7880 LP-7887, 1 nov. 2000.
- CANUTO, S.; COUTINHO, K. From Hydrogen Bond to Bulk: Solvation Analysis of the $n-\pi^*$ Transition of Formaldehyde in Water. **International Journal of Quantum Chemistry**, Mogi das Cruzes, v. 77, p. 192–198, 10 mar. 2000.
- CARVALHO, I. et al. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, Ribeirão preto, v. 26, n. 3, p. 428–438, 11 sep. 2003.
- CEULEMANS, H.; BOLLEN, M. Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. **Physiological reviews**, Leuven, v. 84, n. 1, p. 1–39, 1 jan. 2004.
- CHATTOPADHYAY, D. et al. Crystal structures and mutagenesis of PPP-family ser/thr protein phosphatases elucidate the selectivity of cantharidin and novel norcantharidin-based inhibitors of PP5C. **Biochemical Pharmacology**, Mobile, v. 109, p. 14–26, 1 jun. 2016.
- CHEN, J.; PETERSON, R. T.; SCHREIBER, S. L. $\alpha 4$ Associates with Protein Phosphatases 2A, 4, and 6. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Cambridge, v. 247, n. 3, p. 827–832, 29 jun. 1998.
- CHEN, M. X.; COHEN, P. T. Activation of protein phosphatase 5 by limited proteolysis or the binding of polyunsaturated fatty acids to the TPR domain. **FEBS letters**, Dundee, v. 400, n. 1, p. 136–140, 2 jan. 1997.
- CHEN, X.; SHUMIN, L.; ZHANG, Y. Identification and biochemical characterization of protein phosphatase 5 from the cantharidin-producing blister beetle, *Epicauta chinensis*. Yangling, **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 12, p. 24501–24513, 11 Dez. 2013.
- CHER, C. et al. Identification of chaulmoogric acid as a small molecule activator of protein phosphatase 5. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, San Diego, v. 160,

n. 5, p. 1450–1459, 14 jan. 2010.

CHINKERS, M. Protein phosphatase 5 in signal transduction. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, Mobile, v. 12, n. 1, p. 28–32, jan.feb.2001.

COELHO, L. W. et al. Aplicação de mecânica molecular em química inorgânica. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, p. 396–404, 2 dez. 1999.

COHEN, P. T. W. Protein Serine / Threonine Phosphatases and the PPP Family. **Handbook of Cell Signaling**, Dundee, v. 1, p. 593–600, jan. 2003.

COUTINHO, K.; CANUTO, S. Solvent Effects from a Sequential Monte Carlo - Quantum Mechanical Approach. **Advances in Quantum Chemistry**, São Paulo, v. 28, s/n, p. 89–105, 1997. Disponível em:

[https://doi.org/10.1016/S0065-3276\(08\)60209-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3276(08)60209-9).

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065327608602099>). Acesso em 08/05/2018

DA CUNHA, E. F. F. et al. Molecular Modeling of Mycobacterium Tuberculosis DNA Gyrase and its Molecular Docking Study with Gatifloxacin Inhibitors. **Journal of biomolecular structure & dynamics**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 619–625, 21 may. 2010.

DA SILVA GONCALVES, A. et al. Reactivation steps by 2-PAM of tabun-inhibited human acetylcholinesterase: reducing the computational cost in hybrid QM/MM methods. **Journal of biomolecular structure & dynamics**, Vila Velha, v. 32, n. 2, p. 301–307, 22 jan. 2014.

DE ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, Belo Horizonte, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.

DUBEY, K. D.; OJHA, R. K. T. AND R. P. Recent Advances in Protein–Ligand Interactions: Molecular Dynamics Simulations and Binding Free Energy Current Computer Aided-Drug Design, **Current computer-aided drug design**, Lavras, v. 9, n. 4, p. 518-531, 1 dec. 2013.

DURRANT, J.; MCCAMMON, J. Molecular dynamics simulations and drug discovery. **BMC biology**, San Diego, v. 9, p. 71, 28 oct. 2011.

DUSHUKYAN, N. et al. Phosphorylation and Ubiquitination Regulate Protein Phosphatase 5 Activity and Its Prosurvival Role in Kidney Cancer. **Cell Reports**, New York, v. 21, n. 7, p. 1883–1895, 14 nov. 2017.

MARTINS, Layla Farage. **Análise do perfil de expressão de serina/treonina fosfatases e prospecção da função biológica para algumas dessas enzimas em**

Dictyostelium discoideum. 2010.160p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

FAHS, S.; LUJAN, P.; KÖHN, M. Approaches to study phosphatases. **ACS Chemical Biology**, Heidelberg, v. 11, n. 11, p. 2944–2961, 4 oct. 2016.

FATTEBERT, J. L. et al. Large-Scale First-Principles Molecular Dynamics Simulations with Electrostatic Embedding: Application to Acetylcholinesterase Catalysis. **Journal of Chemical Theory and Computation**, Califórnia, v. 11, n. 12, p. 5688–5695, 27 oct. 2015.

GOLDEN, T.; SWINGLE, M.; HONKANEN, R. E. The role of serine/threonine protein phosphatase type 5 (PP5) in the regulation of stress-induced signaling networks and cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, Mobile, v. 27, n. 2, p. 169–178, Jun. 2008.

GROSSMANN, C. Fletcher, R., Unconstrained Optimization. Practical Methods of Optimization 1. Chichester-New York-Brisbane-Toronto, John Wiley&Sons 1980. VIII, 120 S., £ 8.80. ISBN 0–471–27711–8. **ZAMM - Journal of Applied Mathematics and Mechanics / Zeitschrift für Angewandte Mathematik und Mechanik**, Berlin, v. 61, n. 8, p. 408, 1981.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.

HAILE, J. M. Molecular Dynamics Simulation: Elementary Methods. 1st. ed. New York, NY, USA: John Wiley & Sons, Inc., jan. 1992.

HESTENES, M. R.; STIEFEL, E. Methods of conjugate gradients for solving linear systems *Journal of Research of the National Bureau of Standards*. **Journal of Research of the National Bureau of Standards**, Washington, v.49, n.6, p. 1-28, Dec. 1952.

HINDS, T. D.; SÁNCHEZ, E. R. Protein phosphatase 5. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Toledo, v. 40, n. 11, p. 2358–2362, Aug. 2008.

HOCKNEY, R. W. The potential calculation and some applications. **Methods Comput. Phys.**, City unknown/Code not available, v. 9, p. 136, 1 jan. 1970.

HOOVER, W. G. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. **Physical Review A**, California, v. 31, n. 3, p. 1695–1697, 1 mar. 1985.

HOUSE, J. Fundamentals of Quantum Chemistry. 2. ed., Academic Press, p. 291, 10 Sep. 2003

HUBBARD, M. J.; COHEN, P. On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. **Trends in biochemical sciences**, New Zealand, v. 18, n. 5, p.

172–177, may 1993.

JEONG, J.-Y. et al. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* protein Ser/Thr phosphatase T1 and comparison to its mammalian homolog PP5. **BMC Cell Biology**, West Lafayette, v. 4, p. 3, 28 mar. 2003.

JORGENSEN, W. L.; MAXWELL, D. S.; TIRADO-RIVES, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. **Journal of the American Chemical Society**, New HaVen, v. 118, n. 45, p. 11225–11236, 1 jan. 1996.

JR, W. F. A. Molecular Dynamics Simulations of Protein Targets Identified in *Mycobacterium tuberculosis*. **Current Medicinal Chemistry**, Porto Alegre, v. 18, n.9, p. 1353–1366, mar. 2011.

KANG, H. et al. Identification of amino acids in the tetratricopeptide repeat and C-terminal domains of protein phosphatase 5 involved in autoinhibition and lipid activation. **Biochemistry**, Mobile, v. 40, n. 35, p. 10485–10490, 29 jun. 2001.

KARPLUS, M.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nature structural biology**, Cambridge, v. 9, n. 9, p. 646–652, 1 sep. 2002.

LAJARÍN-CUESTA, R.; ARRIBAS, R. L.; DE LOS RÍOS, C. Ligands for Ser/Thr phosphoprotein phosphatases: a patent review (2005-2015). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, Madrid, v. 3776, n. February, p. 1–19, 7 feb. 2016.

LEELANANDA, S. P.; LINDERT, S. Computational methods in drug discovery. **Beilstein journal of organic chemistry**, Columbus, v. 12, p. 2694, 12 Dec. 2016.

LIU, B.; XU, X. Serine/threonine protein phosphatases in DNA damage response. **Chinese Science Bulletin**, Beijing, v. 56, n. 30, p. 3122–3131, 30 Jun. 2011.

LIU, J. Y.; CHEN, X. E.; ZHANG, Y. L. Insights into the key interactions between human protein phosphatase 5 and cantharidin using molecular dynamics and site-directed mutagenesis bioassays. **Scientific Reports**, Shaanxi, v. 5, n. 12359, p. 1–11, 20 jul. 2015.

MARTINS, J. P. A. et al. LQTA-QSAR: a new 4D-QSAR methodology. **Journal of chemical information and modeling**, Campinas, v. 49, n. 6, p. 1428–1436, 13 jan. 2009.

MATOS, K. S. et al. Molecular Aspects of the Reactivation Process of Acetylcholinesterase Inhibited by Cyclosarin. **Journal of the brazilian chemical**

society, Rio de Janeiro, v. 22, n. 10, p. 1999–2004, oct. 2011.

MOORHEAD, G. B. G. et al. Displacement affinity chromatography of protein phosphatase one (PP1) complexes. **BMC biochemistry**, Dundee, v. 9, p. 28, 10 nov. 2008.

MORSE, P. M.; FESHBACH, H. Methods of theoretical physics. **New York: McGraw-Hill**, v.1, n.1953, p.29, jan.1953.

NAMBA, A. M.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: Teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Ecletica Química**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 4, p. 13–24, 11 Dec. 2008.

NASCIMENTO, G. N. L. **Simulação, por Dinâmica Molecular, das Interações Água-Etanol-NaCl com Fosfolípidos de Membrana**. 78p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

NOSÉ, S. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. **Molecular Physics**, Ontário, v. 52, n. 2, p. 255–268, 1 jan. 1984.

OBEROI, J. et al. Structural and functional basis of protein phosphatase 5 substrate specificity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, London, v. 113, n. 32, p. 9009–9014, 27 jul.2016.

OLIVEIRA, B. G.; ARAÚJO, R. C. M. U.; RAMOS, M. N. A Topologia molecular q̄taim e a descrição mecânico- quântica de ligações de hidrogênio e ligações de di-hidrogênio. **Química Nova**, João Pessoa, v. 33, n. 5, p. 1155–1162, 23 apr. 2010.

ONU_BR. **Doenças que mais matam no mundo**, Brasil, 1 jan. 2018 Disponível em: <https://nacoesunidas.org/?post_type=post&s=doenças+que+mais+matam+no+mundo>

Acesso em 16 de março de 2018

PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. **Journal of Applied Physics**, Trieste, v. 52, n. 12, p. 7182–7190, 14 Aug.1981.

KUMAR, P. S. V.; RAGHAVENDRA, V.; SUBRAMANIAN, V. Bader's theory of atoms in molecules (AIM) and its applications to chemical bonding. **Journal of Chemical Sciences**, v. 128, n. 10, p. 1527-1536, 19 Aug. 2016.

PEPELIER, P. **Atoms in molecules: an introduction**. 1st ed,Manchester: Prentice Hall, 2000.

PUERTO GALVIS, C. E.; VARGAS MÉNDEZ, L. Y.; KOUZNETSOV, V. V. Cantharidin-based small molecules as potential therapeutic agents. **Chemical biology &**

drug design, Bucaramanga, v. 82, n. 5, p. 477–99, 20 jun. 2013.

RAMALHO, T. C. et al. Computational Enzymology and Organophosphorus Degrading Enzymes: Promising Approaches Toward Remediation Technologies of Warfare Agents and Pesticides. **Current Medicinal Chemistry**, Lavras, v. 23, n.10, p. 1041–1061, 1 mar. 2016.

RAMSEY, A. J.; CHINKERS, M. Identification of potential physiological activators of protein phosphatase 5. **Biochemistry**, Mobile, v. 41, n. 17, p. 5625–5632, 6 apr. 2002.

RAPAPORT, D. C. **The Art of Molecular Dynamics Simulation**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2004.

RIBEIRO, A. J. M. et al. The catalytic mechanism of protein phosphatase 5 established by DFT calculations. **Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)**, Arcavacata di Rende, v. 19, n. 42, p. 14081–14089, 6 sep. 2013.

RYDE, U. QM/MM Calculations on Proteins. **Methods in Enzymology**, 1. ed. Lund: Elsevier Inc., v.577 p. 119-158, jan. 2016.

SANT'ANNA, C. M. R. Molecular modeling methods in the study and design of bioactive compounds: An introduction. **Revista Virtual de Química**, Seropédica, v. 1, n. 1, 2 feb.2009.

SANTOS-GARCIA, L. et al. QSAR analysis of nicotinamidic compounds and design of potential Bruton's tyrosine kinase (Btk) inhibitors. **Journal of biomolecular structure & dynamics**, Lavras, v. 34, n. 7, p. 1421–1440, 11 may 2016.

SCHUMANN, U.; SWEET, R. A. A direct method for the solution of poisson's equation with neumann boundary conditions on a staggered grid of arbitrary size. **Journal of Computational Physics**, Colorado, v. 20, n. 2, p. 171–182, 1 Feb. 1976.

SCOTT, W. R. P. et al. The GROMOS Biomolecular Simulation Program Package. **The Journal of Physical Chemistry A**, Zurich, v. 103, n. 19, p. 3596–3607, 1 mar. 1999.

SCOTTI, L. et al. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Araraquara, v. 43, n. 2, p. 153–166, apr/jun. 2007.

SENN, H. M.; THIEL, W. QM/MM methods for biomolecular systems. **Angewandte Chemie - International Edition**, Glasgow, v. 48, n. 7, p. 1198–1229, 28 jan. 2009.

SHI, Y. Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. **Cell**, Beijing, v. 139, n. 3, p. 468–484, 30 oct. 2009.

SHIRATO, H. et al. Expression in hepatomas and chromosomal localization of rat protein phosphatase 5 gene. **International journal of oncology**, Japan, v. 17, n. 5, p.

909–912, 1 nov.2000.

SIEGBAHN, P. E. M.; BLOMBERG, M. R. A. Transition-Metal Systems in Biochemistry Studied by High-Accuracy Quantum Chemical Methods. **Chemical Reviews**, Stockholm, v. 100, n. 2, p. 421–438, 15 jan. 2000.

SWINGLE, M. R.; HONKANEN, R. E.; CISZAK, E. M. Structural basis for the catalytic activity of human serine/threonine protein phosphatase-5. **Journal of Biological Chemistry**, Alabama, v. 279, n. 32, p. 33992–33999, 15 mar.2004.

TOLLMAN. P. Revolution in R&D: How genomics and genetics are transforming the biopharmaceutical industry. Boston, jan. 2001.

VAN BENTEM, Sergio de la Fuente et al. The subcellular localization of plant protein phosphatase 5 isoforms is determined by alternative splicing. **Plant physiology**, Amsterdam ,v. 133, n. 2, p. 702-712, 25 mar. 2003.

VAN DER KAMP, M. W.; MULHOLLAND, A. J. Combined quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) methods in computational enzymology. **Biochemistry**, Bristol, v. 52, n. 16, p. 2708–2728, 4 apr.2013.

VERLET, L. Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. **Physical Review**, New York, v. 159, n. 1, p. 98–103, 5 jul. 1967.

VIRSHUP, D. M.; SHENOLIKAR, S. From Promiscuity to Precision: Protein Phosphatases Get a Makeover. **Molecular Cell**, Republic of Singapore, v. 33, n. 5, p. 537–545, 21 fev. 2009.

WEI, D. et al. Inhibition of protein phosphatase 2A radiosensitizes pancreatic cancers by modulating CDC25C/CDK1 and homologous recombination repair. **Clinical Cancer Research**, unknown city, v. 19, n. 16, p. 4422–4432, 1 Aug. 2013.

WEINER, P. K.; KOLLMAN, P. A. AMBER: Assisted model building with energy refinement. A general program for modeling molecules and their interactions. **J Comput Chem**, San Francisco, v. 2, n. 3, p. 287–303, 14 jan.1981.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **CANCER**. Genebra, 1 feb. 2017Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>.

YANG, J. et al. Molecular basis for TPR domain-mediated regulation of protein phosphatase 5. **The EMBO Journal**, Dundee, v. 24, n. 1, p. 1–10, 12 jan. 2005.

YOUNG, D. K. Cantharidin and Insects: An Historical Review. **The Great Lakes Entomologist**, Madison, v. 17, n. 4, 1984.

ZHANG, M. et al. Viewing serine/threonine protein phosphatases through the eyes of

drug designers. **FEBS Journal**, Texas, v. 280, n. 19, p. 4739–4760, 3 Jul. 2013.

ZHENG, M.; WALLER, M. P. Adaptive quantum mechanics/molecular mechanics methods. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, Münster, v. 6, n. 4, p. 369–385, 28 apr. 2016.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

ARTIGO - Molecular Dynamics and QM/MM simulations of the Cantharidin-like inhibitors interaction with human protein phosphatase-5 in a Mg²⁺ system

O artigo foi submetido no Periódico científico: *Journal of Molecular Modeling*.

Abstract:

The serine/threonine protein phosphatase type 5 (PP5) is a promising target for designing new antitumor drugs. This enzyme is a member of the gene family of PPP phosphatases, which catalyze a dephosphorylation reaction: a regulatory process in the signal transduction pathway that controls various biological processes. The aim of this work is to study the inhibition of PP5 by ten Cantharidin-like inhibitors, in order to bring about contributions which are relevant for the better comprehension of their inhibitory activity. In this theoretical investigation we used molecular dynamics techniques to understand the role of key interactions that occur in the protein active site; QM/MM calculations were employed to study the interaction mechanism of these inhibitors in the enzyme. In addition, we carried out Atoms in Molecules (AIM) calculations to characterize the chemical bonds among the atoms involved and investigate the orbital interactions with their respective energy values. The obtained results suggest that the Arg275, Asn303, His304, His352, Arg400, His427, Glu428, Val429, Tyr451 and Phe446 residues contribute favorably to the interactions between inhibitors and PP5. However, the Asp271 and Asp244 amino acid residues do not favor such interactions for some inhibitors. Through the QM/MM calculations, we can suggest that the reactional energy of the coordination mechanism of these inhibitors in the PP5 active site is quite important and is responsible for the inhibitory activity. The AIM technique employed in this work was essential to get a better comprehension of the transition states acquired from the mechanism simulation. This work offers insights of how the Cantharidin-like inhibitors interact with the human PP5, allowing potentially the design of more specific and even less cytotoxic drugs for cancer's treatment.

Keywords: Serine/threonine phosphatase 5, Cantharidin-like inhibitors, molecular dynamics, QM/MM, AIM.

1. Introduction

Reversible phosphorylation of proteins catalyzed by kinases and phosphatases is an important process in the regulation of numerous biological events, including cell growth, differentiation, senescence, and cell death [1,2]. The amount of catalytic subunits of protein phosphatases is nearly an order of magnitude lower than protein kinases, so there is a belief that phosphatases are very nonspecific enzymes. However, a recent evidence proves otherwise and presents us with phosphatases as a challenging and promising therapeutic target [3,4]. The phosphatases proteins revert the phosphorylation reaction through the hydrolysis of the phosphate group of phosphorylated residues of the protein [5]. The most frequent phosphorylated residues are tyrosine, serine and threonine, where in serine is the predominant target [6].

The serine/threonine phosphatase-5 protein (PP5) is a member of the protein phosphatases (PPP) family which also includes PP1, PP2A, PP2B (or calcineurin), PP4, PP6 and PP7 enzymes [3,7]. PP5 has many important biological roles, like the activation of steroid hormone receptors and the regulation of the dynamic phosphorylation of many signaling components, such as apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK-1) and mitogen-activated kinase protein (MAPK) [8,9]. PP5 is expressed in almost all mammalian tissues, particularly with high levels in brain and neurons, and it is highly conserved among eukaryotes [7,10]. For these reasons, aberrant PP5 activity has been associated with diverse illnesses, including Alzheimer's and cancer diseases [4].

Cantharidin is a strong inhibitor of PPP-family ser/thr protein phosphatases. This natural toxin is an active compound found in the blister beetles and it is employed in traditional Chinese medicine to treat human cancers. Cantharidin and its derivatives act in multiple cellular effects such as DNA damage, cell cycle arrest, and apoptosis [11,12]. However, the clinical application of this toxin is limited and was not approved by the Food and Drug Administration, due to the severe effects on the gastrointestinal tract, kidney, and ureter [8,11]. Therefore, it is necessary the development of less cytotoxic compounds than the Cantharidin for cancers treatment. Recent researches indicate [8] that the LB100 (a potent inhibitor of PP2A) is in Phase

I clinical trials as a novel antitumor agent (Phase I trials refer to the toxicity study in healthy individuals) [8].

All PPP family phosphatases, including PP5, share a catalytic site with high homology on the amino acids sequence. Therefore, PP5 can be considered a representative model to investigate the structural basis of PPP inhibition by Cantharidin and its analogues [11]. The PP5 active site is identified from the positions of two metal ions (which can be Mn^{2+} , Zn^{2+} or Mg^{2+}), essential to the catalytic hydrolysis of the phosphate ester bond of protein residues [2,4,5,13].

There are currently few studies [8,12] on the major interactions between Cantharidin and its derivatives at the PP5 catalytic site. Thus, in order to provide insights into the development of novel less cytotoxic inhibitors, it becomes necessary a better understanding of the interactions and reaction mechanisms between these toxins and the human phosphatase protein, allowing the design of new anti-cancer drugs. This illness is currently responsible for causing millions dead. In this line, advances in new therapeutic targets are essential for assisting the remediation methods. Thus, our findings show themselves significant for the medicinal chemistry domain.

In this context, computational chemistry is an efficient and indispensable tool that can be employed in several projects in the development of new drugs, since it allows the proposal of compounds with well defined properties, considerably reducing the experimental exploratory synthesis of a huge amount of substances [14].

Among the methods of computational chemistry, we employed the molecular dynamics (MD) simulation and quantum mechanics (QM) calculations combined with molecular mechanics (QM/MM). The MD is one of the most versatile methods for the study of biomolecules, as it provides microscopic information on the forces involved in the enzyme-ligand interaction as a function of time [15,16]. On the other hand, the hybrid QM/MM technique represents a computational method that allows to model reactions inside enzymes, associating the power and flexibility of a quantum calculation (QM) with the simplicity of classic molecular mechanics (MM). In other words, the association of QM and MM techniques allows the study of biomolecules, which provides reactional parameters that control all

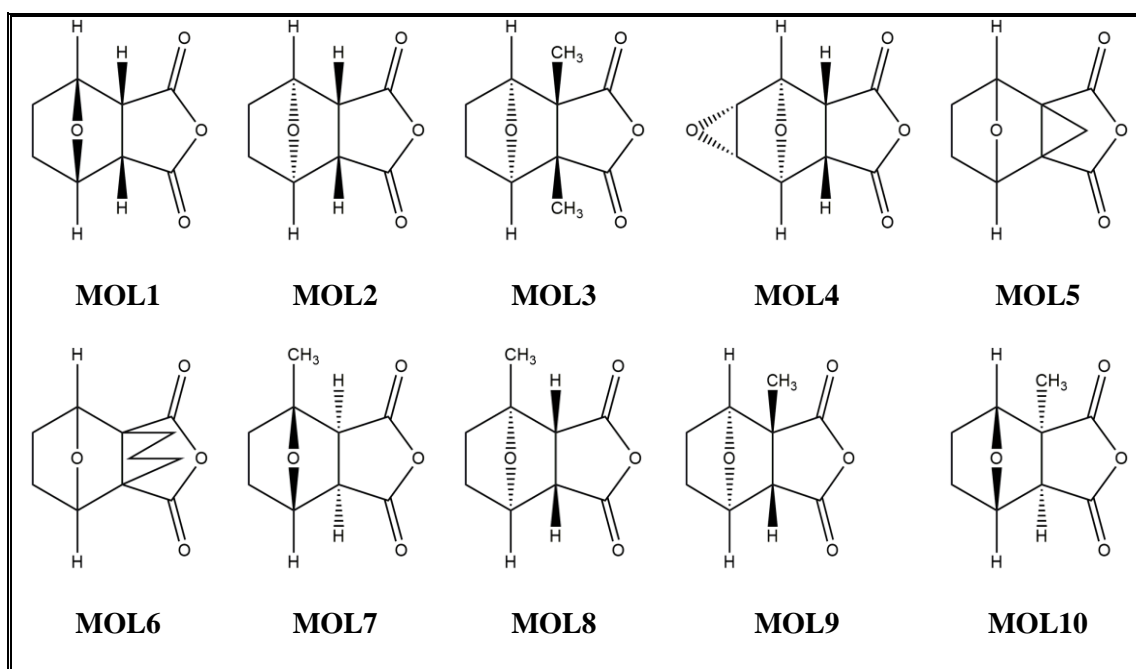
chemical processes, such as electronic properties involved in the breaking and formation of chemical bonds, charge transfer and electrons excitation [17,18].

Thus, the goal of this work is to study the inhibition of human PP5 (*hssPP5*) by ten Cantharidin-like inhibitors, using molecular dynamics simulation methods to understand the key interactions between inhibitors and *hssPP5* enzyme. This work is also focused in the investigation of the coordination mechanism between these toxins and *hssPP5*, using the QM/MM approach. Interesting data are expected from the transition state analysis by employing the AIM technique.

2. Methodology

2.1 The serine/threonine phosphatase-5 human protein (*hssPP5*) and Cantharidin-like inhibitors

The three-dimensional structure of *hssPP5* was obtained from the Protein Data Bank (PDB entrance 3H63) [19]. The crystallographic structure was determined by x-ray diffraction method, with a high resolution: 1.3Å. This enzyme was chosen because it contains the co-crystallized Cantharidin ligand in its catalytic site. Thus, this co-crystallized compound was used as a template for the construction of the other structures studied in this work (Figure 1). For this purpose, it was employed the *Discovery Studio Software* [20].



*MOL2 (Norcantharidin) and MOL3 (Cantharidin) are the only inhibitors that presented IC_{50} values, $1.0\mu M$ and $0.2\mu M$ respectively [12]

Figure 1. Cantharidin and its analogues used in this study.

Figure 2 shows a close-up view of the Cantharidin ligand position within *hssPP5* catalytic site, containing one Mg^{2+} binuclear metal center and their near amino acid residues. Cantharidin is situated in the active site in a hydrolyzed form, known as Cantharic Acid. The metal M1 is coordinated by three Cantharidin oxygens, two from carboxylate functional groups and one from the furan ring, while the metal M2 is coordinated by only one carboxylate oxygen [11,13].

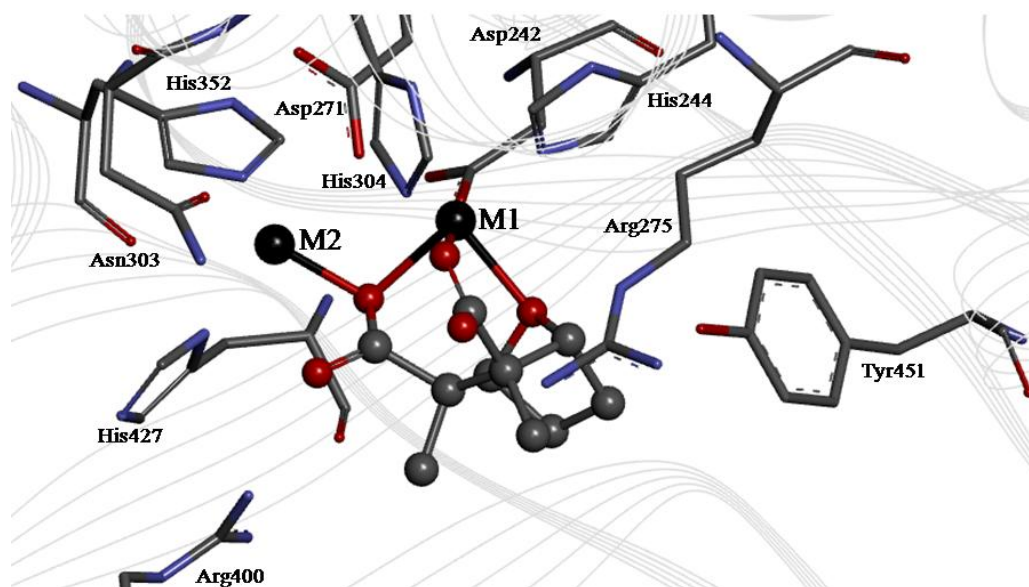


Figure 2. Active site structure of the Mg^{2+} PP5 catalytic domain complexed with Cantharidin.

2.2 Molecular dynamics simulation

Each complex (Inhibitor/*hss*PP5) formed was submitted to Molecular Dynamics (MD) simulations, using the GROMACS 5.1 package [21], with the all-atom force-field GROMOS54A7 [22]. The parameterizations of the studied ligands were carried out in the Automated Topology Builder (ATB) server and Repository version 2.2, available on website (<https://atb.uq.edu.au/index.py>).

The complexes were assembled into a cubic box of 9.908 Å and an appropriate number of Na^+ and Cl^- ions were added to neutralize the global charge of the entire systems. Furthermore, explicit SPC (Simple Point Charge) water molecules were employed to fill the simulation box.

Then, all the systems were minimized using the *Steepest Descent* algorithm for unconstrained position. The minimization was performed with 50000 steps in order to reduce unwanted contact among the atoms, thereby minimizing the potential energy of the system [23]. The 1 ns equilibration was done in the NVT ensemble slowly increasing the temperature from 50 to 300 K. In order to maintain the pressure of 1 atm, we have employed the Parrinello-Rahman barostat [24]. The 300K temperature was controlled by Parrinello-Rahman barostat

[24]. After the equilibration of the box, the systems were submitted to a MD production step with 50 ns of simulation and a 2fs integration time. The bonding lengths were restricted with the LINCS algorithm. A cutoff of 1.4 nm was used and the electrostatic interactions were calculated using the PME (Particle Mesh Ewald) algorithm [25]. Periodic boundary conditions were employed in all the simulations steps.

The MD trajectory was analysed with the VMD (Visual Molecular Dynamics) program [26]. The plots of the total energy variation, the variation of the temporal RMSD (root mean square deviation) and hydrogen bonds formed along the MD were generated with Origin Pro 8.0 program [27]. Some frames from the ten different trajectories were selected for the QM/MM analysis, according to the frame of higher stability.

2.3 QM/MM Methodology

For small systems, Quantum Mechanics (QM) can provide reliable physicochemical properties, such as molecular structure, reactional energies and spectroscopic characteristics [28]. In turn, the QM/MM approach allows the treatment of larger systems, like reaction mechanism simulations within enzymes active site. In this line, QM/MM techniques were employed in this work to simulate the coordination reaction pathway of different inhibitors with the metal ions (Mg^{2+}) [12].

To perform the calculations, the QM part was carried out at the density functional theory (DFT) level by the Gaussian 09 package, with B3LYP density functional and 6-31G (d, p) basis set [29]. Currently, DFT methods have been intensively employed, showing good performance for bulky systems, such as biomolecules [30,31]. The calculations were based on the generalized gradient approximation functional proposed by Gustin et al [32].

All transition states, intermediates and precursors involved were characterized by the identification of imaginary frequencies [33]. The QM system considered peptide bonds, link atoms, cofactors (Mg^{2+}) and ligands inside a sphere with a radius of 5Å centered in the ligand. The acidic/basic residue side chains were properly protonated/deprotonated for pH 7. The MM

system was treated with methods based on the classic mechanics, by using the GROMOS54A7 [22].

2.4 AIM calculations

Atoms in Molecules (AIM) calculations [34] are quite important as an attempt to comprehend the nature of chemical bonds (for example, if the bond is found covalent, partially covalent or non-covalent). These calculations allow us to characterize hydrogen bonds and to investigate the orbitals that are participating in these interaction with their respective energy values [35]. In the present work, AIM calculations were carried out for the coordination complex formed between MOL2/MOL3 and metals in the *hssPP5* active site [11]. Important information that should be highlighted here is that the AIM procedure was performed taking into account the transition state geometry obtained through the reaction mechanism simulation. These calculations were also performed at the DFT level, with B3LYP density functional and 6-31G (d, p) basis set.

3. Results and discussion

3.1 Molecular dynamics simulations

3.1.1 Root-Mean-Square Deviation (RMSD)

The ten complexes were simulated in order to study their dynamic behavior inside the *hssPP5*, considering *in vivo* conditions like temperature, pressure and environment.

The RMSD calculations were performed on all the atoms of each ligand studied along the 50 ns of simulation, with the objective of analyzing whether there was a significant change in the initial structure throughout the simulation. Figure 3 illustrates the RMSD results for MOL2 and MOL3 inhibitors. The graphs generated for the other inhibitors are available in the supplementary material.

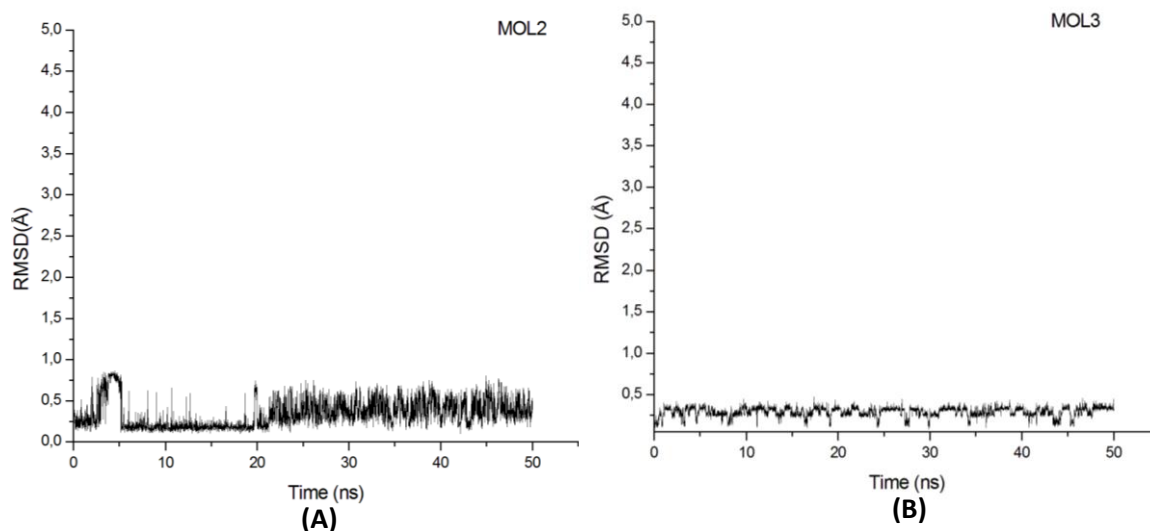


Figure 3. RMSD values of (A) MOL2/*hssPP5* and (B) MOL3/*hssPP5* monitored along 50 ns production phase in MD simulations.

Analyzing the results of the RMSD graphs, it was observed that the mean deviations of the ligands structures were very small, almost never exceeding 1.0 Å; in other words, the ligands were well-accommodated in the *hssPP5* active site. Figure 2A shows that MOL2, known as norcantharidin, in the first nanoseconds of the simulation has undergone constant conformational changes, which allowed rapid and simultaneous interactions with several residues that are part of the active site, and only after 20ns of simulation, the structure of that inhibitor was able to remain in a stable conformation within *hssPP5*.

The MOL3 inhibitor, known as Cantharidin, remained more stable than the other inhibitors (low RMSD variation) throughout the simulation, below 0.5Å according to Figure 2B. This happened because MOL3 performed several strong interactions with the main residues in the active site.

The MOL1 and MOL9 inhibitors showed RMSD values around 1.0 Å. Analyzing the MOL1 behavior, it was observed that the ligand structure adopted an unfavorable conformation that prevented it from interacting with some residues of the active site, and for these reasons, it performed few interactions in the *hssPP5* active site (Figure S1). On the other hand, the MOL9 structure remained in a stable conformation within the *hssPP5* active site after the first 5 ns of simulation. This occurred because after this simulation time, the methyl group performed interactions which were not previously observed, with the His304 residue throughout the

dynamics; in addition, there were some effective hydrogen interactions with important residues of the active site, such as: Asn303, His427 and His244. These interactions are indicative of a good accommodation of MOL9 in the site. On the other hand, expected hydrophobic interactions with some active site residues were not observed (Figure S9).

MOL4, MOL5, MOL8 and MOL10 had RMSD values around 0.5Å, which suggest that these inhibitors remained stable throughout the simulation. MOL4 showed a peak in approximately 22 ns, and this fact occurred due to a change in the structural conformation of this inhibitor, causing a lost of interaction with Cys452. However, after 22 ns, the compound returned to its prevailing conformation adopted in the beginning of the simulation and remained stable until the end of the simulation (Figure S4).

The MOL5 ligand structure remained balanced during most of the 50ns of simulation; however, in the last nanoseconds, there was a considerable change in the ligand conformation, which resulted in the undock of the ligand from the *hssPP5* site, breaking some essential interactions for its stabilization (Figure S5). MOL8, on the other hand, reached structural stability around the 30 ns of simulation (Figure S8), and MOL10 did not vary much throughout the simulation, while maintaining a mean distribution of interactions with the residues Asp271, Arg275, His304 and Asn303 (Figure S10).

In turn, MOL6 presented a different behavior in relation to the other inhibitors of the series, since it presented two conformations throughout the simulation, and it was not known which conformation is prevalent. Through the results, it is estimated as being 50% of each conformation. This may have occurred due to the disruption of interactions with Asp271 and Asn303. In one conformation, the MOL6 carried out hydrogen bonds with Asn303 and an unfavorable interaction with Asp271, while in the other conformation this fact inverted, i.e., MOL6 carried out hydrogen bond with Asp271 and unfavorable interaction with the Asn303 amino acid residue. The other changes that took place throughout the simulation were maintained. It is important to notice that this fact did not influence an increase in RMSD, on the contrary, the deviation for MOL6 within the *hssPP5* active site remained around 0.5 Å (Figure S7).

The MOL7 inhibitor presented high RMSD value, and by observing the graph shown in the supplementary material (Figure S7), it is concluded that every 10 ns, the ligand structure has acquired a different behavior. Thus, this compound did not remain stable in the enzyme active site during the 50ns of the simulation.

3.1.2 RMSF (Root Mean Square Fluctuation)

To confirm the structural stabilization in the simulation environment, RMSF was calculated from the average position of each amino acid residue of PP5. The graphs of the RMSF MOL2/*hss*PP5 and MOL3/*hss*PP5 systems are shown in Figure 4.

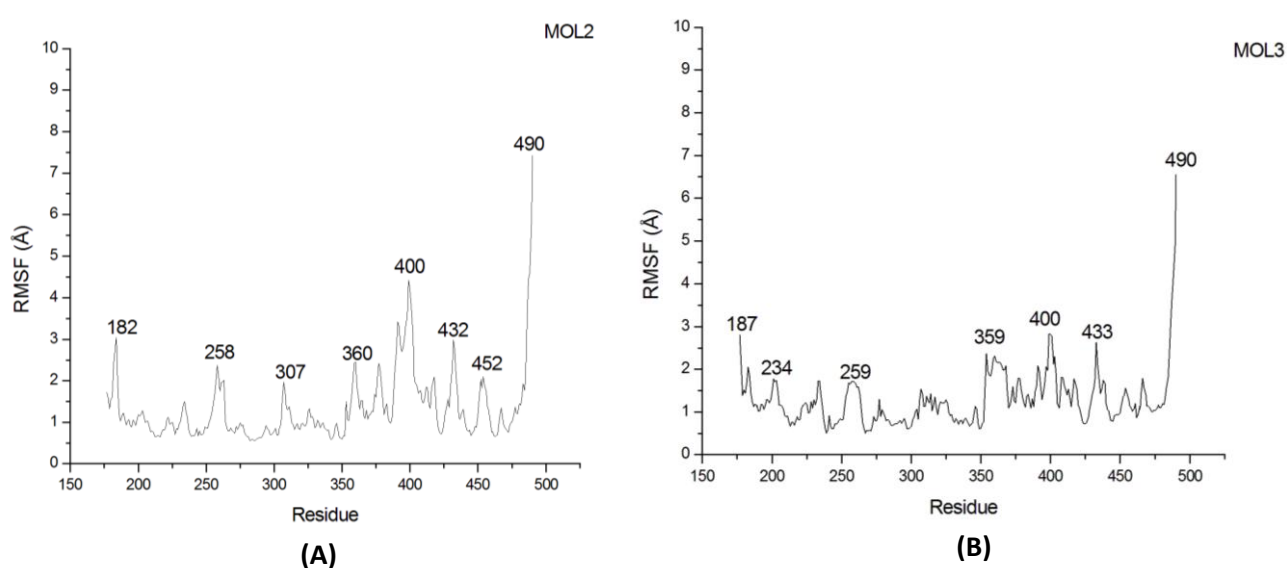


Figure 4. RMSF values of (A) MOL2/*hss*PP5 and (B) MOL3/*hss*PP5 obtained by average residual fluctuations over 50 ns MD simulation, analysis performed for the Backbone.

According to Figure 3, the higher values of RMSF indicate the residues that showed the greatest oscillation with respect to their initial position. It is observed that the residues that presented larger movement correspond to Glu182, Gly258, Asp307, Gly360, Glu432, Cys452 for MOL2 system and Gly187, Thr234, Leu259, Asp359, Arg400, Gly433 and Ala490 for MOL3 system. This was due to the fact that these residues were located in a protein loop, a region of considerable flexibility. Furthermore, it is possible to observe that although both systems are constituted by the same protein and present exactly the same simulations criteria,

one can notice that there were fluctuations in different amino acids. This is likely due to interactions with distinct inhibitors.

Moreover, the residues that make up alpha helices and beta sheets presented a lower RMSF value, thus revealing the greater stability of these regions. Another fact to be mentioned is that all systems had a similar behavior in the analysis of the protein buoyancy deviation, the results of which are set forth the supplemental material.

3.1.3 Analysis of inhibitor interactions in the *hssPP5* active site

For the analysis of the interactions that took place during the simulation, we employed the pharmacophoric map (Figure 5) which presents the distribution of the mean of the interactions in the simulated time. The residues that contributed to the stabilization of the PP5/MOL2 system were: Asp242, His244, Asp271 Arg275, Asn303, His304, Arg400, His427, Glu428, Val429, Phe446 and Tyr451. Among them, we especially highlight the H-bond interactions involving His304 and Arg400 residues that are in great agreement with the literature data [8,11].

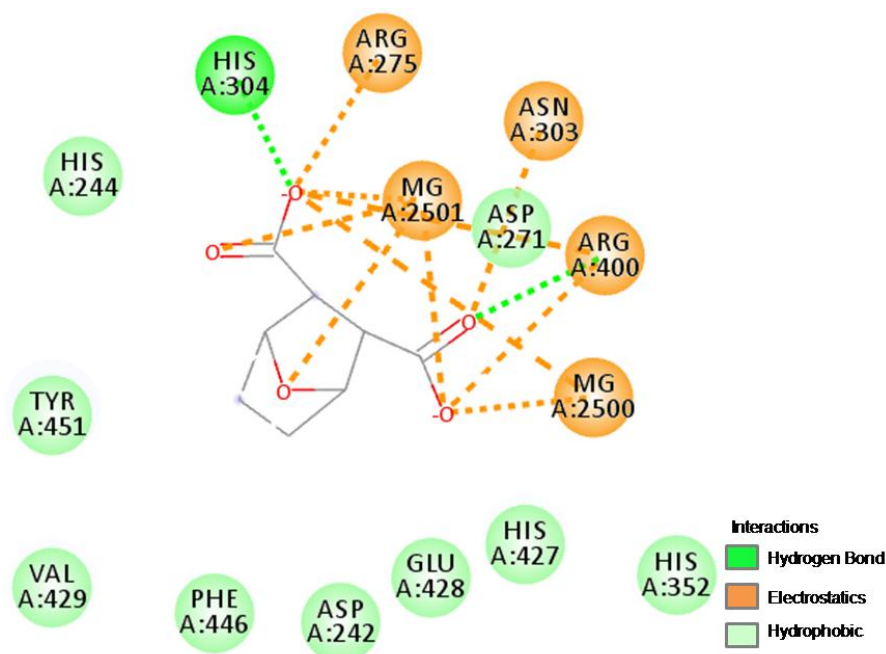


Figure 5. Interactions performed during 50ns in the MD simulation with the MOL2/*hssPP5* complex.

Regarding MOL3/*hssPP5* complex (Figure 6), the residues that help in the inhibitory protein interactions are His244, Arg275, His304, Arg400, His427, Val429 and Tyr451. Among them, the side chains of the Arg275 and His304 residues are responsible for the hydrogen bond interaction with MOL3. Thus, according to the results obtained by the simulation, it is suggested that other intermolecular interactions have a greater contribution for the MOL3 stabilization in the *hssPP5* active site. They are: electrostatic interactions formed by the Arg275 and Arg400 residues, and hydrophobic interactions formed by His244, Asp271, Asn303, His352, His427, Val429, Glu428, Tyr451 and Phe446 residues.

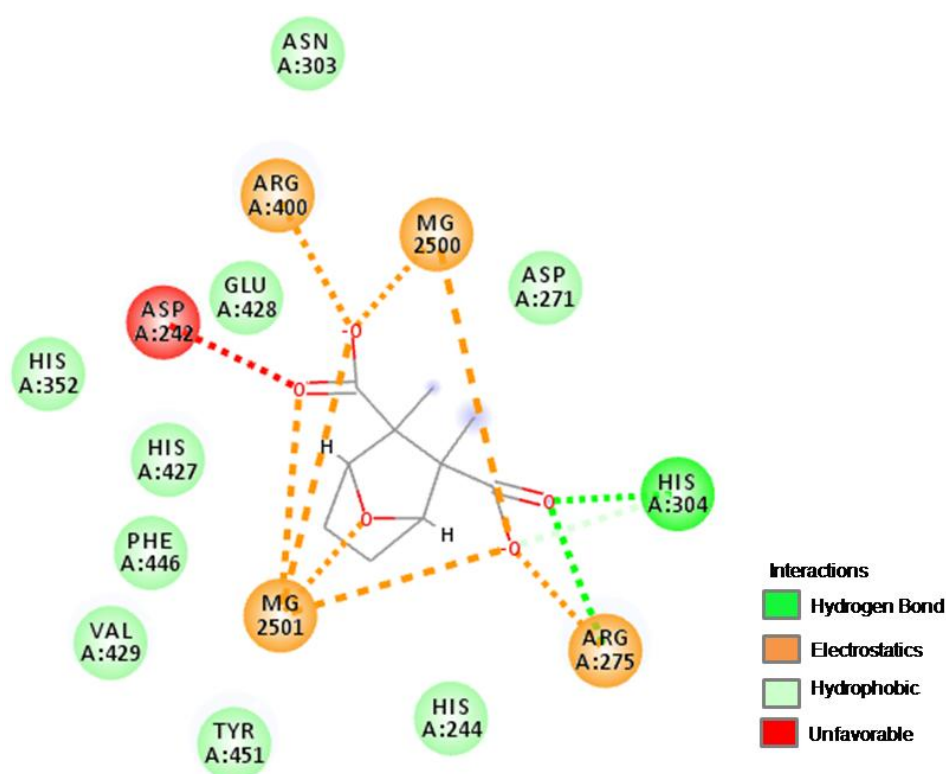


Figure 6. Interactions performed during 50ns in the DM simulation with the MOL3 / *hssPP5* complex.

In general, it was observed that the residues which are important for the ligands stabilization within *hssPP5* correspond to Arg275, His304 and Arg400, due to the fact that the association of these three conserved residues along with the two metal ions present in the *hssPP5* active site form a positive charge and surface binding site which assist in the favorable interaction with the ionic part of the carboxyl groups present in all ligands [12]. On the other

hand, Val429, Phe446, Tyr451 and especially Glu428, together act as a "claw" in the hydrophobic pocket contributing to the increase of the ligands interactions [8]. In addition, other residues like Asp271, His244, Asn303, His427 and His352 also contributed favorably to the formation of the inhibitors/*hssPP5* complex. In some specific cases, it was observed that Asp242 and Asp271 impaired the interaction of the ligands with *hssPP5*, since the side chains of these residues are negatively charged. The pharmacophoric maps of all systems are available in the supplementary material.

3.1.4 Interaction Energy for each complex

In the table below, it is possible to observe that MOL5 was the inhibitor that presented the most favorable interaction energy with respect to the other compounds. This fact happened because, among the simulated molecules, MOL5 was the one that performed the strongest interactions described in the literature, as observed in our work [11], such as hydrogen bond with Arg400, His304 and Arg275 residues; hydrophobic interactions with Asp271, Asp242, His244, Asn303, Met309, His352, Val429, Phe446, Glu428, and Tyr451 residues, and electrostatic interactions with Arg400. This interactions set contributes favorably to the increase of the Inhibitor/*hssPP5* interaction, which is responsible for stabilizing the ligand within the site. MOL1 showed few interactions with these residues, obtaining high interaction energy. The interaction energy graphs are arranged in the supplementary material.

Table 1. Interaction energy along the MD simulation

Inhibitors	Interaction Energy (kJ.mol ⁻¹)
MOL1	-34.40
MOL2	-65.08
MOL3	-69.25
MOL4	-66.47
MOL5	-89.75
MOL6	-84.23
MOL7	-75.18
MOL8	-76.06
MOL9	-67.05
MOL10	-85.48

Through the results obtained by the MD, we conclude that groups, such as methyl or apolar cyclic carbon chains in α carbon, are important for the increase of the biological activity, because they perform interactions with important residues that contribute to the stabilization of the ligand within the active site. Modifications to the furan ring, such as polar groups (MOL4), should be avoided due to the hydrophobic nature of the site, because the coordination with the two Mg²⁺ metals are important in inhibiting *hssPP5*.

3.2 QM/MM studies in the *hssPP5* active site

It is quite relevant to keep in mind that to design new *hssPP5* inhibitors, it is necessary the comprehension of the coordination reaction mechanism of these ligands [36], as well as considering steric and electronic effects which govern the reaction pathway. In this sense, the QM/MM approach can be used in order to get a better understanding of the interaction and reactional modes between these ligands and *hssPP5*. The QM cluster models were treated at DFT level. This work brings about significant data regarding the coordination modes, given that the compounds with better reactional energies could lead to the enzyme inhibition. The theoretical results of this simulation are presented in Table 2.

Table 2. Relative reactional energy of different ligands in the coordination reaction with the *hssPP5* enzyme metal ions:

Inhibitors	Relative Reactional Energy $\Delta\Delta E^\#$ (kcal.mol ⁻¹)
MOL1	16.72
MOL2	17.46
MOL3	10.32
MOL4	26.08
MOL5	15.17
MOL6	10.39
MOL7	Unknown*
MOL8	0.97
MOL9	0.00
MOL10	17.51

*MOL7 did not keep stable inside the *hssPP5* active site during the 50ns of the dynamics simulation.

To carry out these calculations, the reaction mechanism was looked into according to the QM system shown in Figure 7. By observing the QM system, it is possible to realize that the metal ions have a key role in the inhibition process, due to the formation of chemical bonds between the inhibitors and Mg²⁺ ions. According to the literature, this chemical reaction is important to give rise to the inhibition activity [8].

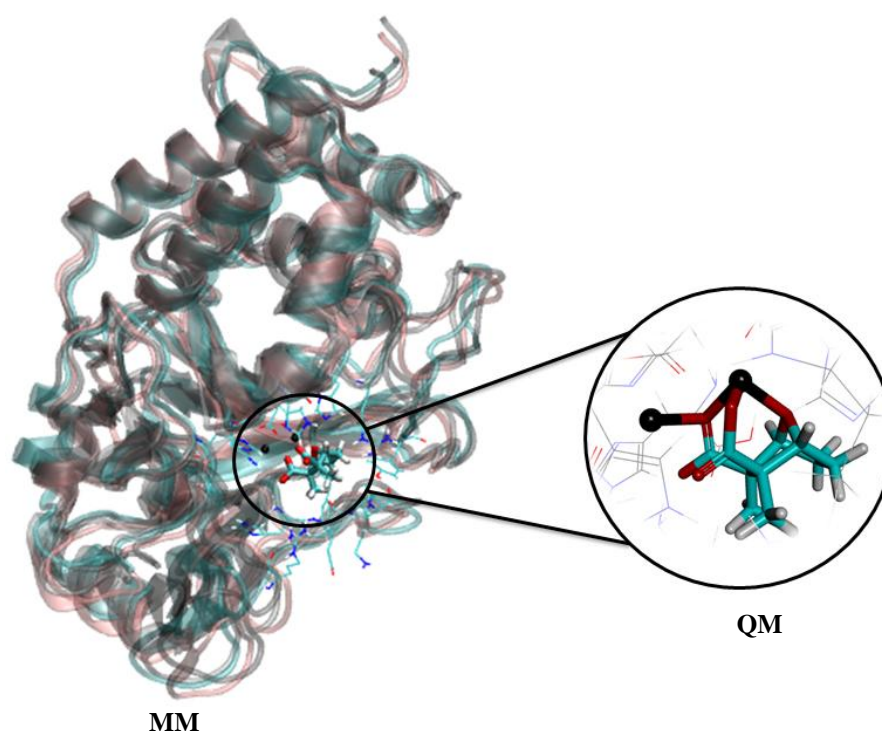


Figure 7: QM reaction system for the coordination reaction of the inhibitors within a catalytic radius of 5 Å.

Table 2 displays the relative activation energy values, $\Delta\Delta E^\ddagger$, for each inhibitor. With respect to the compounds investigated, just MOL2 and MOL3 present experimental values of biological activity [8,12]. Experimental and theoretical studies are found in the literature, showing the importance of this field, which is expanding and can bring about remarkable contribution to the medicinal chemistry [8,11,12].

The experimental investigation performed by Chattopadhyay and co-workers [12] evaluated the biological activity (IC_{50}) for MOL2 and MOL3 ligands. According to their results, MOL3 presents the highest inhibitory activity in relation to MOL2, with a value of IC_{50} equals to 0.2 μM (Table 1). On the other hand, MOL2 exhibits a value of IC_{50} equals to 1.0 μM (Figure 1).

According to the reaction mechanism data shown in Table 2, it is possible to observe that the theoretical results of activation energy for inhibitor/*hssPP5* complexes are in a good agreement with the experimental results from Chattopadhyay et al., for the MOL2 and MOL3 compounds. MOL3 presented a lower energetic barrier for the coordination process, with a

relative energy value of $10.32 \text{ kcal.mol}^{-1}$, which corroborates with the low value of IC_{50} . In turn, MOL2 has shown a superior activation energy ($17.46 \text{ kcal.mol}^{-1}$), with an energy difference of $7.14 \text{ kcal.mol}^{-1}$ in relation to MOL3. According to these findings, it is observed that the reaction performed by MOL3 in the *hssPP5* site presents a good stabilization of the transition state, i.e., the reaction intermediates are better stabilized, decreasing the overall energy for the whole process.

By observing Figure 1, one can realize that the only difference regarding MOL2 and MOL3 structures consists in the addition of a methyl group in α carbon, and this alkyl substituent may contribute to the increase of the electronic density on carboxylate group, bringing about a stronger bond formation with the metals in the coordination pathway. Other factors are likely to be influencing in the reaction mechanism results, for instance, we can cite the conformation adopted by the inhibitors in the *hssPP5* active site along the molecular dynamics simulation, the steric hindrance and electronic effects as well.

In this context, it is found the MOL9 inhibitor, which displayed the lowest energetic barrier in the reaction studied. This is probably due to diverse factors described previously. Furthermore, MOL4 was the ligand that presented the highest energy value for the process, with an energy difference of $26.08 \text{ kcal.mol}^{-1}$, in relation to MOL9. According to the MOL4 structure displayed in Figure 1, we can notice the presence of an epoxide group. Through the dynamics simulation, it was possible to observe that the epoxide group did not allow the displacement and approximation of this compound throughout the metals, due to the performing of hydrogen bond with the Cys452 amino acid residue in the active site, exhibiting a bond length of 2.96 \AA (supplementary material). The theoretical results obtained for the other compounds are showed in Table 2.

The experimental data cannot be rationalized just with interaction energy values. In this line, the theoretical reaction mechanism was performed in order to have a good approach with respect to the inhibitory potential of the compounds investigated. Based on our results, it can be concluded that not always the interaction energy dictates the acting mode of those compounds,

and as observed in this work, the reactional energy is quite important and is responsible for the inhibitory activity.

3.3 AIM analysis

The computed data by employing the AIM technique is presented in Table 3. It is important to notice that for ionic character: $\nabla^2\rho(r) > 0$; $-G/V > 1$; $G+V > 0$ and for covalent character: $\nabla^2\rho(r) < 0$; $-G/V < 1$; $G+V < 0$ [35]. Our purpose here was to evaluate the chemical bonds formed between the inhibitors MOL2 and MOL3 and the metal ions (Mg^{2+}) in the coordination pathway, considering the transition state geometry acquired for each inhibitor.

Table 3. The AIM B3LYP/6-31G (d, p) parameters, electron density ($\rho(r)$), Laplacian ($\nabla^2\rho(r)$), kinetic electron energy density ($G(r)$), and potential electron energy density ($V(r)$) for bond critical point (bcp) of the inhibitor/metal ions complex in the transition state**

Inhibitors	Bond	$\rho(r)$ (a.u)	$\nabla^2\rho(r)$ (a.u)	$G(r)$ (a.u)	$V(r)$ (a.u)	$-G/V$	$G+V$
MOL2	O3-Mg1	+0.0562	+0.5328	+0.1118	-0.0904	+1.237	+0.0214
	O5-Mg2	+0.0532	+0.4486	+0.0963	-0.0804	+1.198	+0.0159
	O16-Mg2	+0.0468	+0.3557	+0.0765	-0.0641	+1.193	+0.0124
	O20-Mg2	+0.0432	+0.3103	+0.0670	-0.0564	+1.188	+0.0106
MOL3	O5-Mg2	+0.0315	+0.1784	+0.0403	-0.0360	+1.119	+0.0043
	O21-Mg2	+0.0411	+0.2811	+0.0611	-0.0520	+1.175	+0.0091
	O28-Mg2	+0.0381	+0.2544	+0.0554	-0.0473	+1.171	+0.0081
	O28-Mg1	+0.0364	+0.2226	+0.0496	-0.0436	+1.138	+0.0060

**Computed results were performed by using the AIM program.

Right after the optimization and formation of the transition state geometries, the AIM procedure was performed, and by employing these calculations, it was possible to evaluate the chemical bond character between the inhibitors and metal ions, keeping in mind that the less the ionic character of the bond, the more strongly the coordination process takes place. In this line, according to the previous table, it is easy to observe that MOL3 presents the least ionic chemical bonds with the metals, fact that leads us to believe that this inhibitor could have a more stable transition state throughout the coordination reaction, decreasing the activation energy, and

consequently the process could take place more efficiently. These values are also in a good agreement with the experimental results already mentioned above.

According to the data shown in Table 3, MOL2 has revealed a more ionic character in its bonds with the cofactors, according to the larger values of $\nabla^2\rho(r)$, $-G/V$ and $G+V$. Other factors could influence a lot in the transition state stability, for example, the substituent attached to the α carbons in this case. MOL3 presents methyl substituents, which seem to be important in conducting these results. The bond critical points (bcps) for MOL2 and MOL3 are represented in Figure 8.

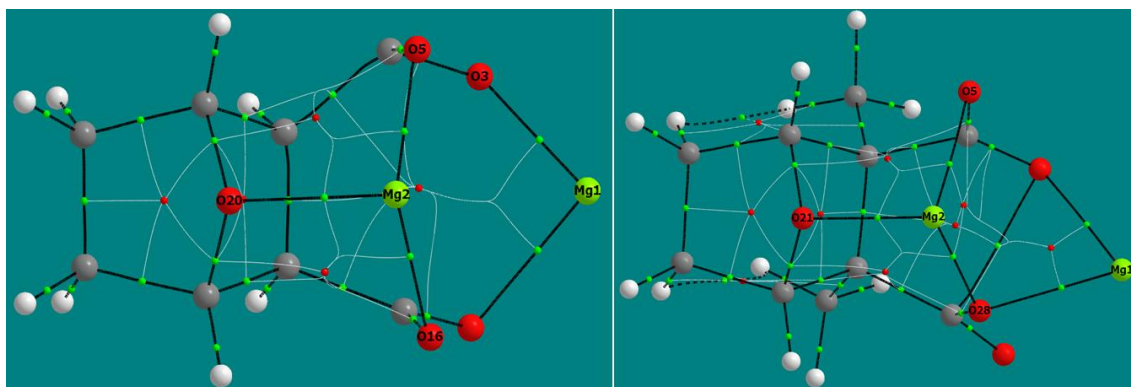


Figure 8. Bond critical points (bcps) for each transition state geometry acquired from MOL2 and MOL3, respectively.

4. Conclusion

This work was conducted by MD simulations, QM/MM and AIM calculations, offering a relevant and detailed understanding about the key interactions, which occur to *hssPP5* with Cantharidin-like inhibitors. MD analyzes showed that the Arg275, Asn303, His304, His352, Arg400, His427, Val429, Glu428, Tyr451 and Phe446 residues contribute to the inhibition against *hssPP5*. Through the QM/MM and AIM calculations, we can observe that the coordination reaction between metal ions and inhibitors is significant to exert an inhibitory activity against *hssPP5*. Thus, this current study provides in detail how Cantharidin and its analogs bind to PP5, contributing to the development of novel Cantharidin-derived inhibitors for anticancer therapies.

5. Acknowledgments

The authors wish to thank the Brazilian financial agencies Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior / Ministério da Defesa (CAPES/MD), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) and Federal University of Lavras (UFLA) for providing the physical infra structure and working space.

6. References

- [1] Chinkers M (2001) Protein phosphatase 5 in signal transduction. *Trends Endocrinol Metab.* 12:28–32. doi:10.1016/S1043-2760(00)00335-0.
- [2] Golden T, Swingle M, Honkanen RE (2008) The role of serine/threonine protein phosphatase type 5 (PP5) in the regulation of stress-induced signaling networks and cancer . *Cancer Metastasis Rev* 27:169–178. doi:10.1007/s10555-008-9125-z.
- [3] Chen X, Shumin L, Zhang Y (2013) Identification and biochemical characterization of protein phosphatase 5 from the cantharidin-producing blister beetle *Epicauta chinensis*. *Int J Mol Sci* 14:24501–24513. doi:10.3390/ijms141224501.
- [4] Lajarín-Cuesta R, Arribas RL, De Los Ríos C (2016) Ligands for Ser/Thr phosphoprotein phosphatases: a patent review (2005-2015). *Expert Opin Ther Pat* 3776: 1–19. doi:10.1517/13543776.2016.1135903.
- [5] Ribeiro AJM, Alberto ME, Ramos MJ, Fernandes PA, Russo N (2013) The catalytic mechanism of protein phosphatase 5 established by DFT calculations. *Chemistry* 19:14081–14089. doi:10.1002/chem.201301565.
- [6] Shi Y (2009) Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. *Cell* 139:468–484. doi:10.1016/j.cell.2009.10.006.
- [7] Swingle MR, Honkanen RE, Ciszak EM (2004) Structural basis for the catalytic activity of human serine/threonine protein phosphatase-5. *J Biol Chem* 279: 33992–33999. doi:10.1074/jbc.M402855200.
- [8] Liu JY, Chen XE, Zhang YL (2015) Insights into the key interactions between human protein phosphatase 5 and cantharidin using molecular dynamics and site-directed mutagenesis bioassays. *Sci Rep* 5:12359. doi:10.1038/srep12359.

- [9] Oberoi J, Dunn DM, Woodford MR, Mariotti L, Schulman J, Bourboulia D, Mollapour M, Vaughan (2016) CK Structural and functional basis of protein phosphatase 5 substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 9009–9014. doi:10.1073/pnas.1603059113.
- [10] Hinds TD, Sánchez ER (2008) Protein phosphatase 5. *Int J Biochem Cell Biol* 40:2358–2362. doi:10.1016/j.biocel.2007.08.010.
- [11] Bertini I, Calderone V, Fragai M, Luchinat C, Talluri E (2009) Structural basis of serine/threonine phosphatase inhibition by the archetypal small molecules cantharidin and norcantharidin. *J Med Chem* 52: 4838–4843. doi:10.1021/jm900610k.
- [12] Chattopadhyay D, Swingle MR, Salter EA, Wood E, D’Arcy B, Zivanov C, Abney K, Musiyenko A, Rusin SF, Kettenbach A, Yet L, Schroeder CE, Golden JE, Dunham WH, Gingras AC, Banerjee S, Forbes D, Wierzbicki A, Honkanen RE (2016) Crystal structures and mutagenesis of PPP-family ser/thr protein phosphatases elucidate the selectivity of cantharidin and novel norcantharidin-based inhibitors of PP5C. *Biochem Pharmacol* 109: 14–26. doi:10.1016/j.bcp.2016.03.011.
- [13] Salter EA, Honkanen RE, Wierzbicki A (2015) Modeling the antiferromagnetic MnII-MnII system within the protein phosphatase-5 catalytic site. *J Mol Model* 21: 2556. doi:10.1007/s00894-014-2556-2.
- [14] Martins JPA, Barbosa EG, Pasqualoto KFM, Ferreira MMC (2009) LQTA-QSAR: a new 4D-QSAR methodology. *J Chem Inf Model* 49:1428–1436. doi:10.1021/ci900014f.
- [15] Namba AM, Da Silva VB, Silva CHTP (2008) Dinâmica molecular: Teoria e aplicações em planejamento de fármacos. *Eclét Quim* 33:13–24. doi:10.1590/S0100-46702008000400002.
- [16] Ramalho TC, Castro AA, Silva DR, Silva MC, França TCC, Bennion BJ, Kuca K (2016) Computational Enzymology and Organophosphorus Degrading Enzymes: Promising Approaches Toward Remediation Technologies of Warfare Agents and Pesticides. 1041–1061.
- [17] Senn HM, Thiel W (2009) QM/MM methods for biomolecular systems. *Angew Chemie - Int Ed* 48:1198–1229. doi:10.1002/anie.200802019.
- [18] Ryde U (2016) QM/MM Calculations on Proteins, 1^o ed, Elsevier Inc doi:10.1016/bs.mie.2016.05.014.

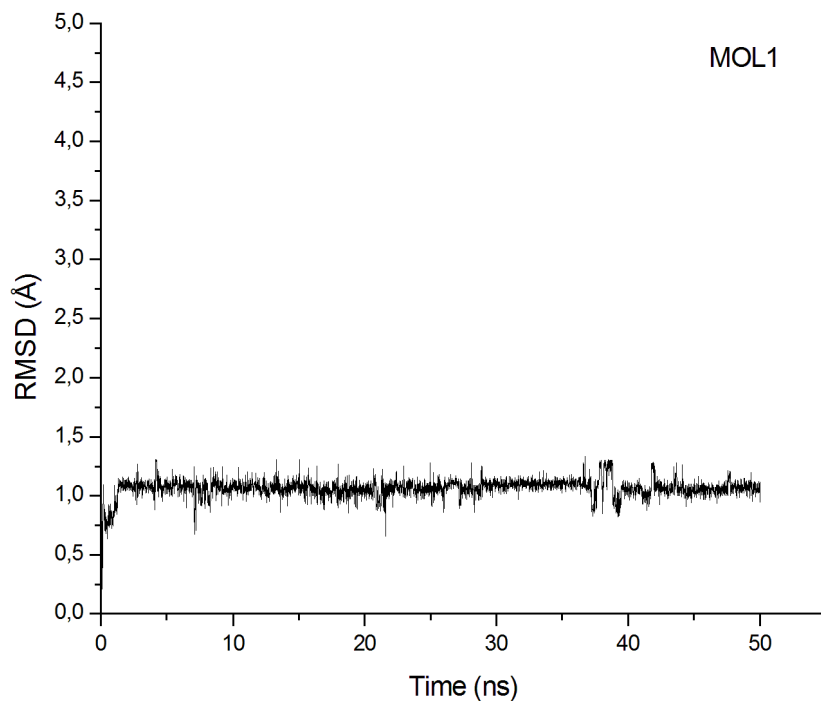
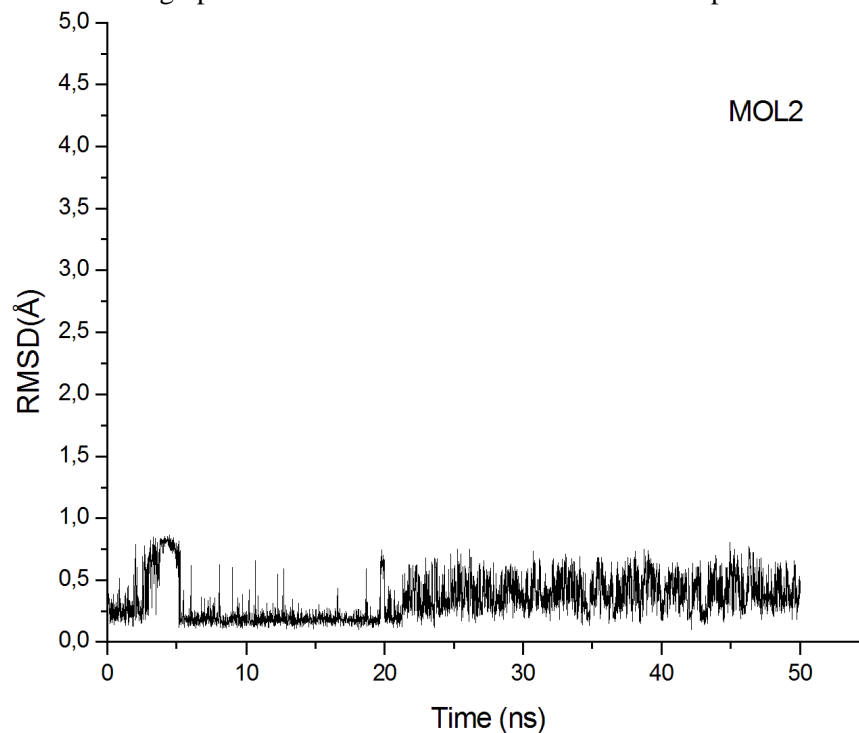
- [19] Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28: 235–242. doi:10.1093/nar/28.1.235.
- [20] Accelrys Software (2012) Discovery Studio Modeling Environment. <http://accelrys.com/>.
- [21] Páll S, Abraham MJ, Kutzner C, Hess B, Lindahl E (2015) Tackling Exascale Software Challenges in Molecular Dynamics Simulations with GROMACS, in: S. Markidis, E. Laure (Orgs.). *Solving Softw Challenges Exascale Int Conf Exascale Appl Software. EASC 2014 Stock Sweden April 2-3:2014. Revis Sel Pap.* Springer International Publishing. Cham 3–27. doi:10.1007/978-3-319-15976-8_1.
- [22] Scott WRP, Hünenberger PH, Tironi IG, Mark AE, Billeter SR, Fennen J, Torda AE, Huber T, Krüger P, Van Gunsteren WF (1999) The GROMOS Biomolecular Simulation Program Package. *J Phys Chem A* 103: 3596–3607. doi:10.1021/jp984217f.
- [23] Wong KY, Mercader AG, Saavedra LM, Honarparvar B, Romanelli GP, Duchowicz PR (2014) QSAR analysis on tacrine-related acetylcholinesterase inhibitors. *J Biomed Sci* 21:84. doi:10.1186/s12929-014-0084-0.
- [24] Parrinello M, Rahman A (1981) Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J Appl Phys* 52:7182–7190. doi:10.1063/1.328693.
- [25] Darden T, York D, Pedersen L (1993) Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys* 98:10089–10092. doi:10.1063/1.464397.
- [26] Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14: 33–38. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5.
- [27] Origin 8. OriginLab Corporation, ([s.d.]) 1-800-969–7720.
- [28] Jorgensen WL (2013) Foundations of biomolecular modeling. *Cell* 155:1199–1202. doi:10.1016/j.cell.2013.11.023.
- [29] Frisch WCMJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Petersson GA, Nakatsuji H, Li X, Caricato M, Marenich A, Bloino J, Janesko BG, Gomperts R, Mennucci B, Hratchian HP, Ort JV (2009) Gaussian Inc. Wallingford CT.
- [30] Besler BH, Merz KM, Kollman PA (1990) Atomic charges derived from semiempirical methods. *J Comput Chem* 11:431–439. doi:10.1002/jcc.540110404.

- [31] Singh UC, Kollman PA (1984) An approach to computing electrostatic charges for molecules. *J Comput Chem* 5:129–145. doi:10.1002/jcc.540050204.
- [32] Gustin DJ, Mattei P, Kast P, Wiest O, Lee L, Cleland WW, Hilvert D (1999) Heavy atom isotope effects reveal a highly polarized transition state for chorismate mutase [5]. *J Am Chem Soc* 121:1756–1757. doi:10.1021/ja9841759.
- [33] Giacoppo JOS, França TCC, Kuća K, Da Cunha EFF, Abagyan R, Mancini DT, Ramalho TC (2014) Molecular modeling and *in vitro* reactivation study between the oxime BI-6 and acetylcholinesterase inhibited by different nerve agents. *J Biomol Struct Dyn* .1–11. doi:10.1080/07391102.2014.989408.
- [34] P SHYAM VINOD KUMARV RAGHAVENDRAV SUBRAMANIAN (2016) Bader's Theory of Atoms in Molecules (AIM) and its Applications to Chemical Bonding. *J Chem Sci* 128:1527–1536.
- [35] Silva TC, de Almeida KJ, Pires M S, Castro AA, Gonçalves MA, da Cunha EFF, Ramalho TC (2017) Theoretical structural and electronic analyses with emphasis on the reactivity of iron oxide prototypes in methane C–H bond activation. *React Kinet Mech Catal* 120:195–208. doi:10.1007/s11144-016-1103-9.
- [36] Castro A A, Melissa C S, Silva T, Mancini D, Pereira E R, da Cunha EFF (2016) Molecular Docking Metal Substitution and Hydrolysis Reaction of Chiral Substrates of Phosphotriesterase. *Comb Chem High Throughput Screen*. 19: 334–344.

ANEXO A - Supporting Information

Molecular Dynamics and QM/MM simulations of the Cantharidin-like inhibitors interaction with human protein phosphatase-5 in a Mg^{2+} system

RMSD

**Figure S1:** RMSD graphs of a 50 ns simulation of the MOL1 compound.**Figure S2:** RMSD graphs of a 50 ns simulation of the MOL2 compound.

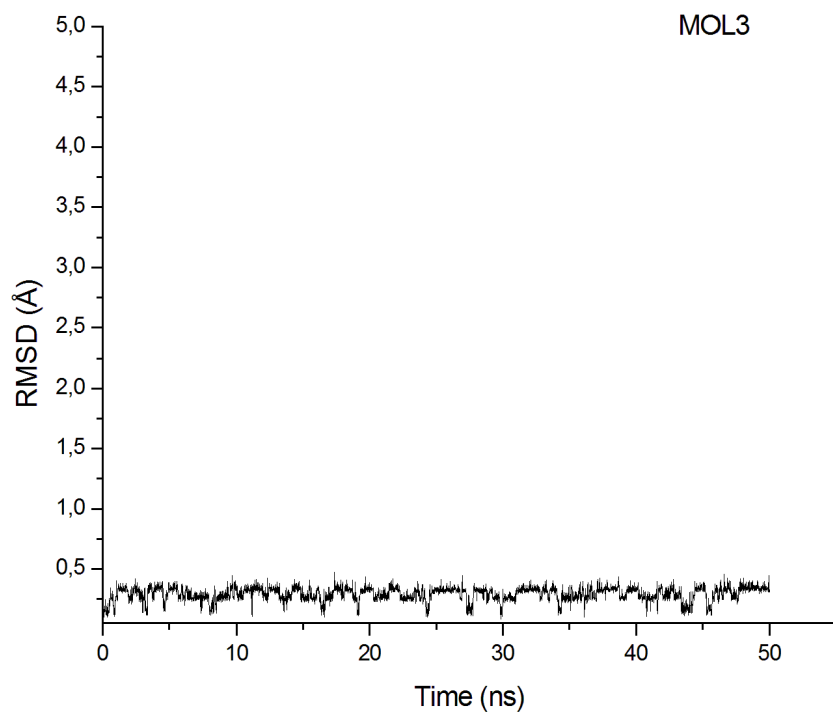


Figure S3: RMSD graphs of a 50 ns simulation of the MOL3 compound.

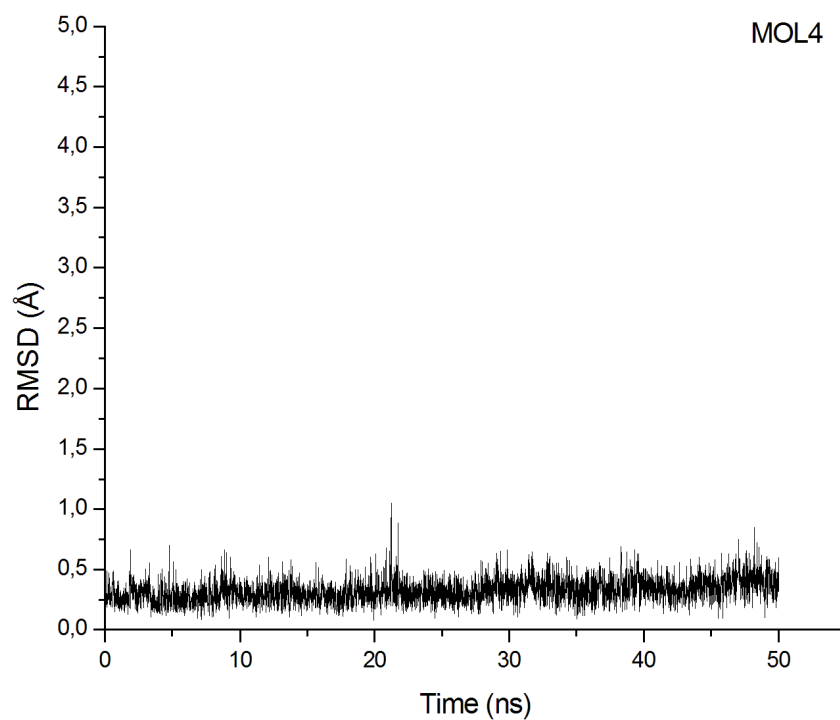


Figure S4: RMSD graphs of a 50 ns simulation of the MOL4 compound.

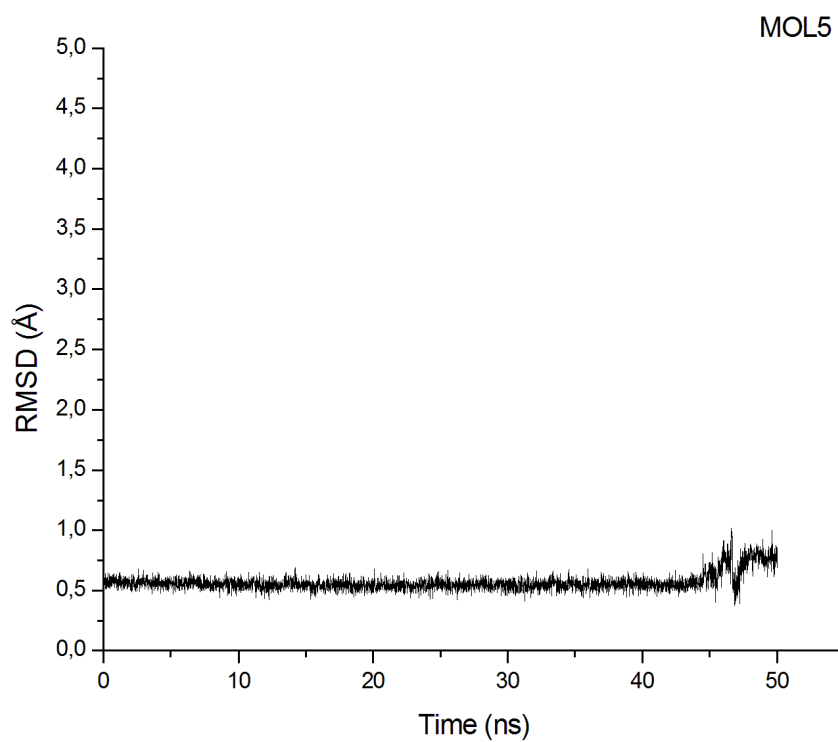


Figure S5: RMSD graphs of a 50 ns simulation of the MOL5 compound.

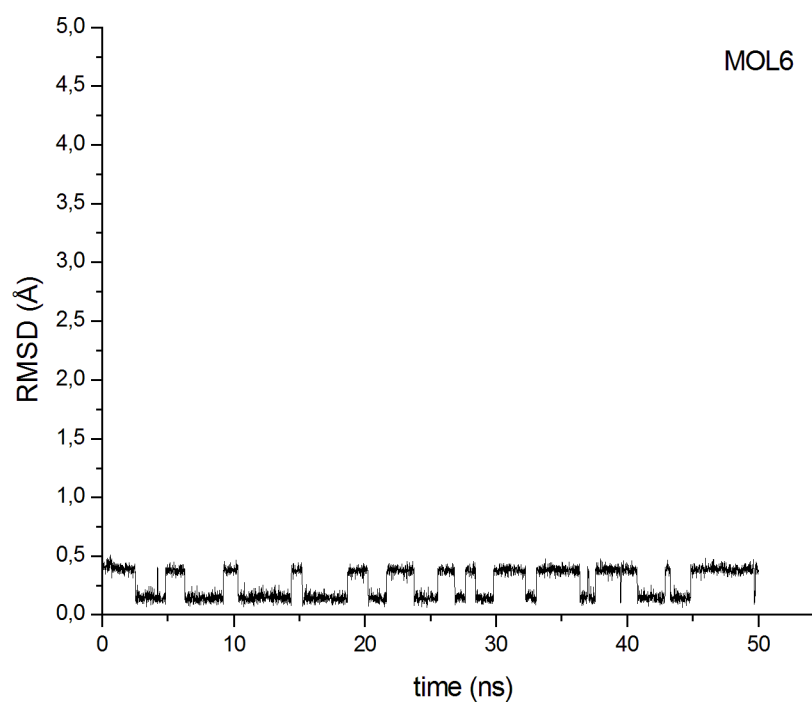


Figure S6: RMSD graphs of a 50 ns simulation of the MOL6 compound.

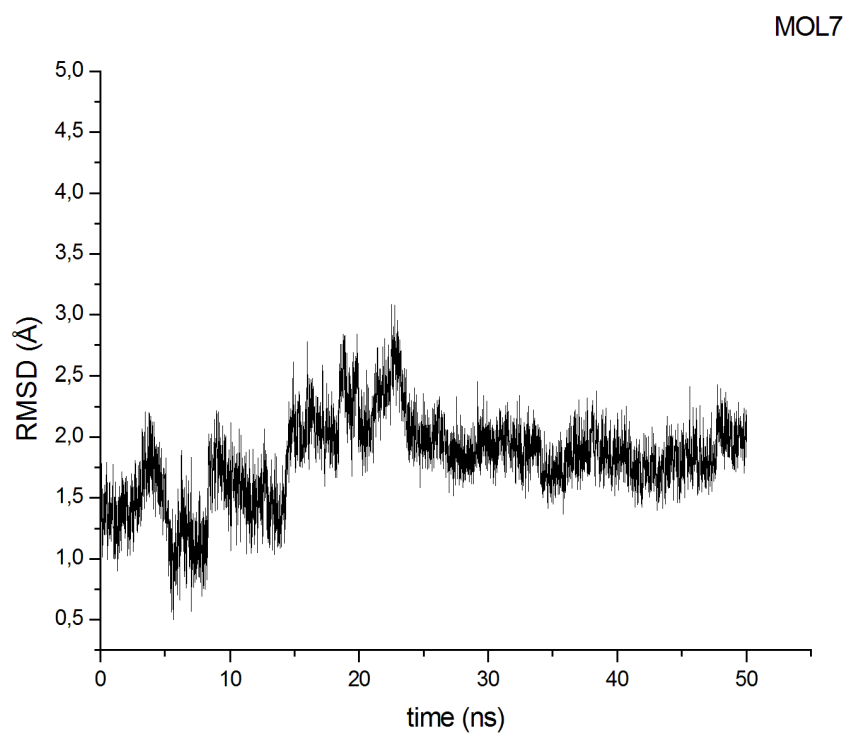


Figure S7: RMSD graphs of a 50 ns simulation of the MOL7 compound.

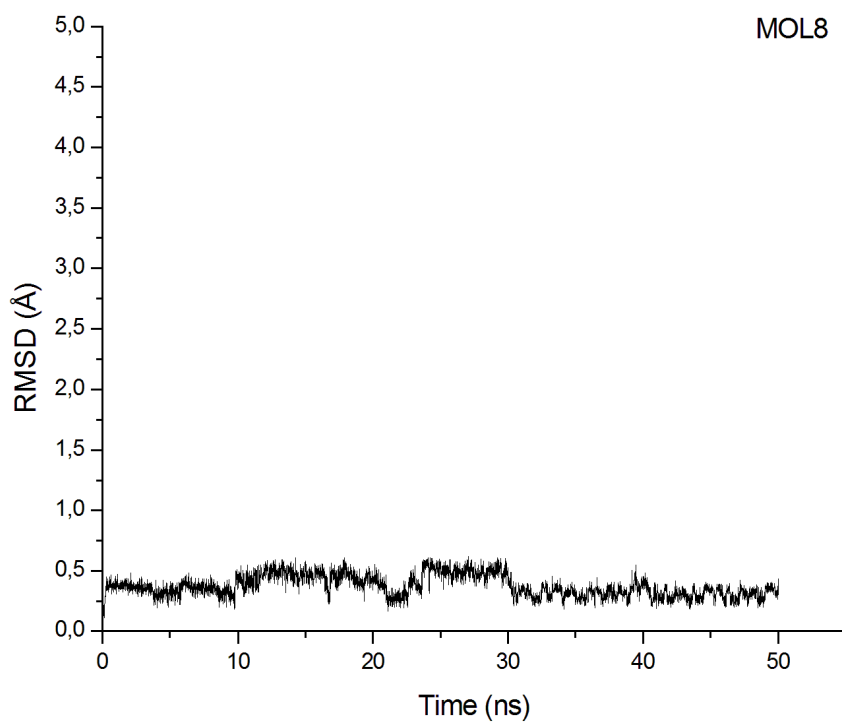


Figure S8: RMSD graphs of a 50 ns simulation of the MOL8 compound.

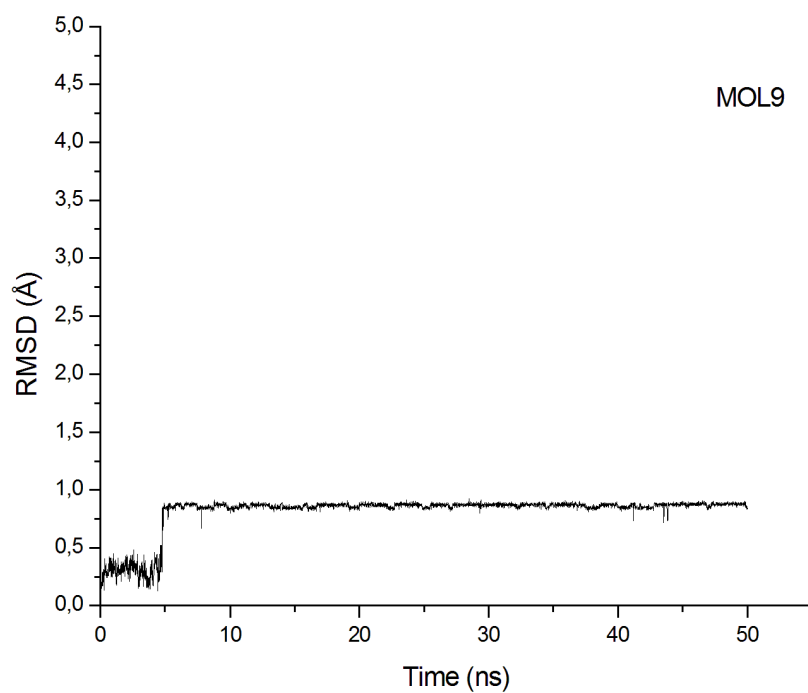


Figure S9: RMSD graphs of a 50 ns simulation of the MOL9 compound.

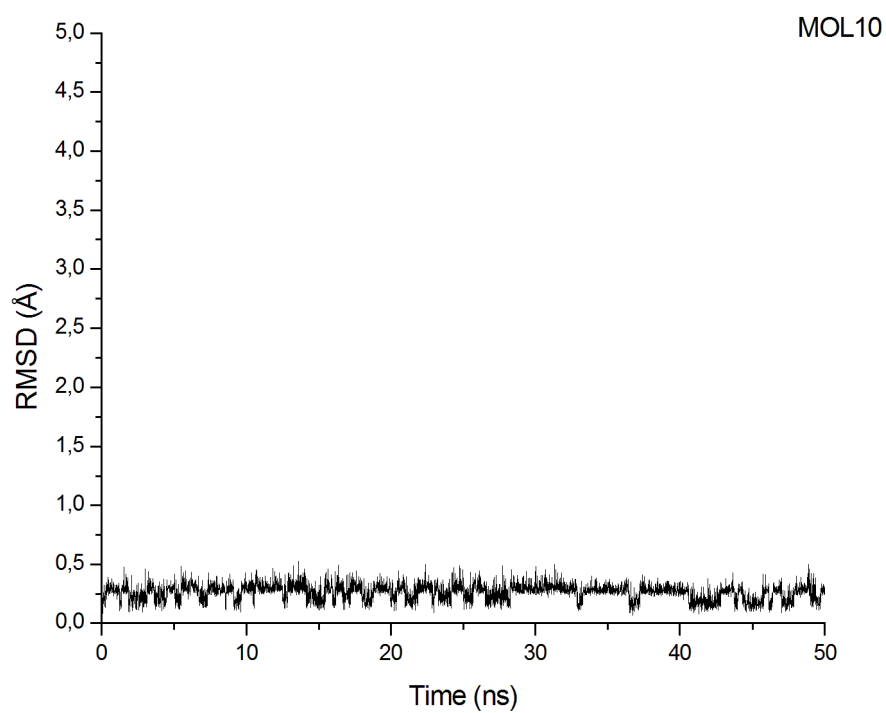


Figure S10: RMSD graphs of a 50 ns simulation of the MOL10 compound.

RMSF

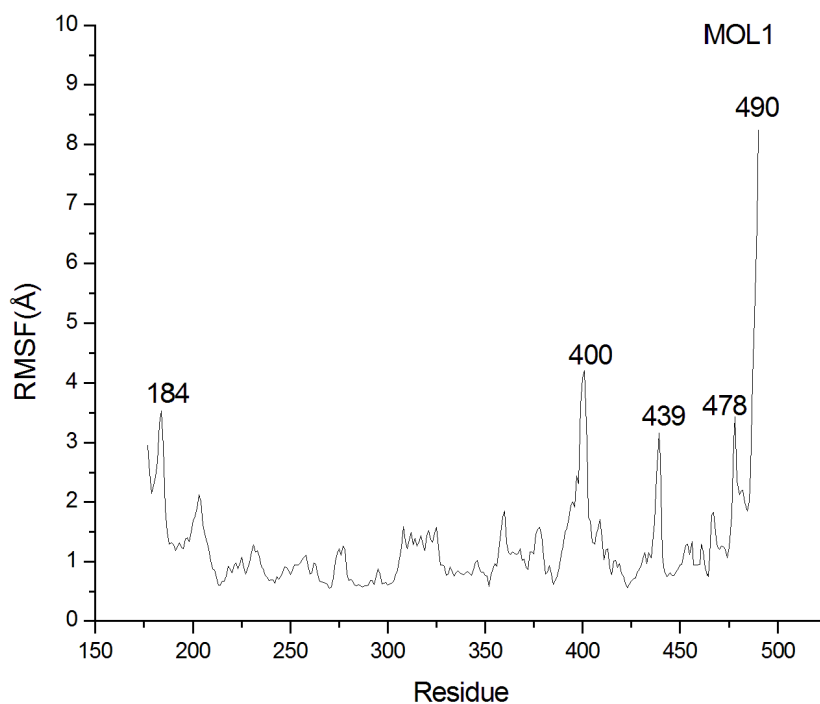


Figure S11: Residue fluctuations obtained by average residual fluctuations over 50 ns MD simulation, analysis performed from the Backbone.

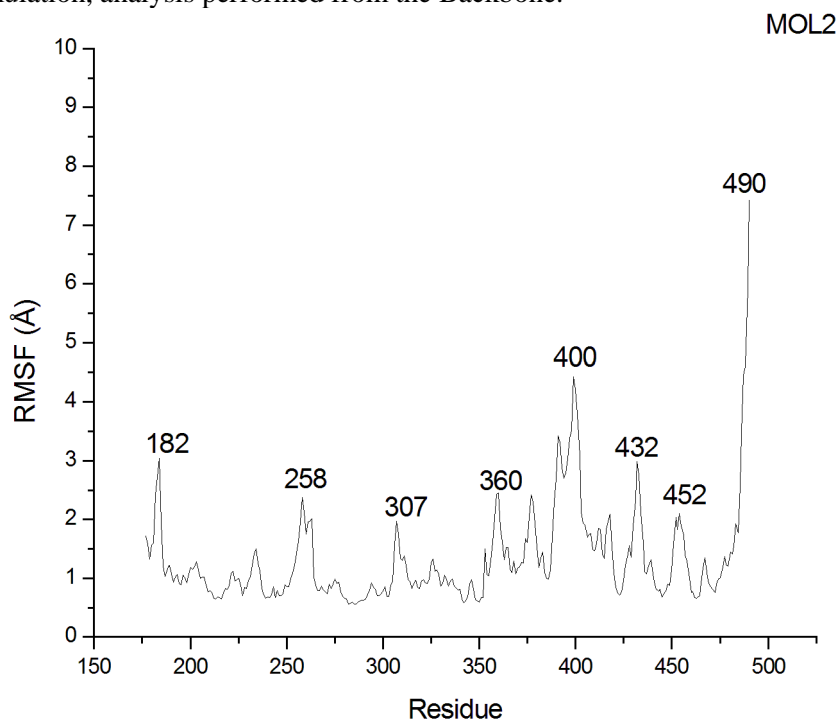


Figure S12: Residue fluctuations obtained by average residual fluctuations over 50 ns MD simulation, analysis performed from the Backbone.

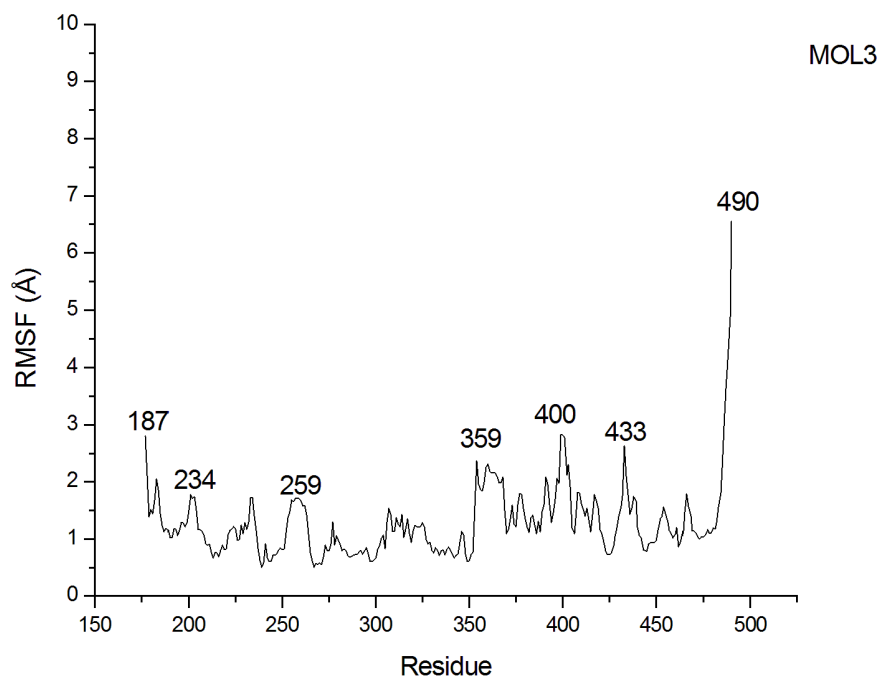


Figure S13: Residue fluctuations obtained by average residual fluctuations over 50 ns MD simulation, analysis performed from the Backbone.

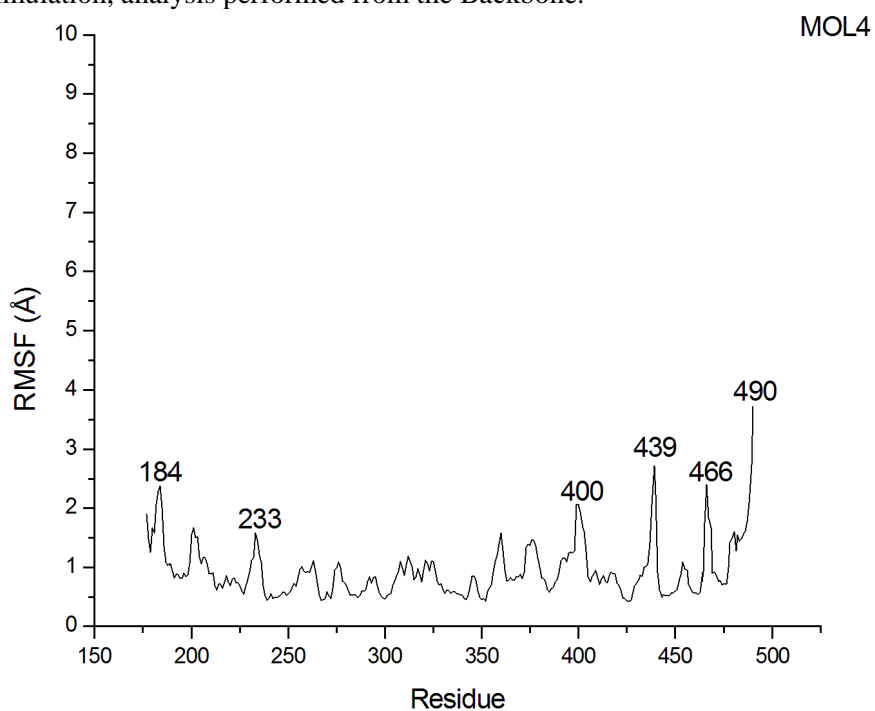


Figure S14: Residue fluctuations obtained by average residual fluctuations over 50 ns MD simulation, analysis performed from the Backbone.

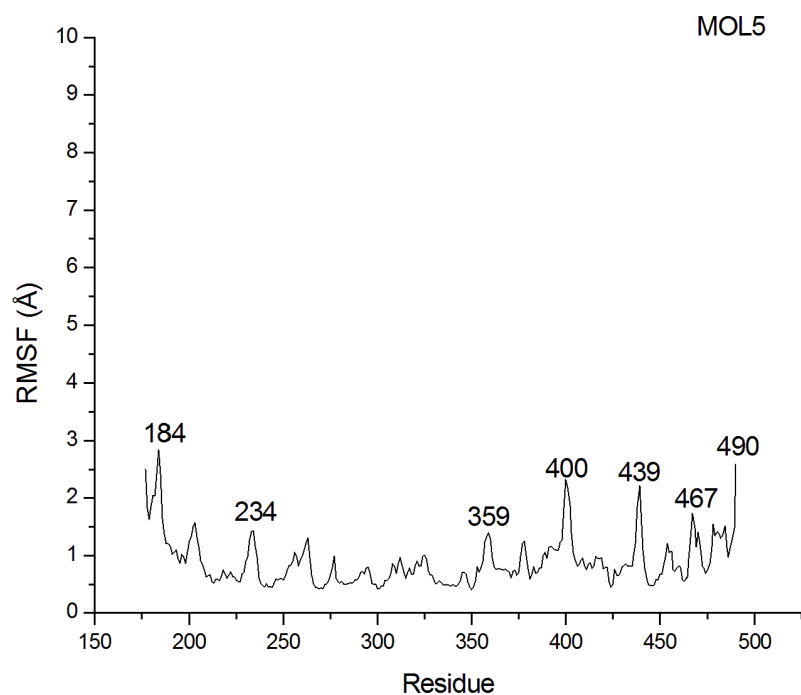


Figure S15: Residue fluctuations obtained by average residual fluctuations over 50 ns MD simulation, analysis performed from the Backbone.

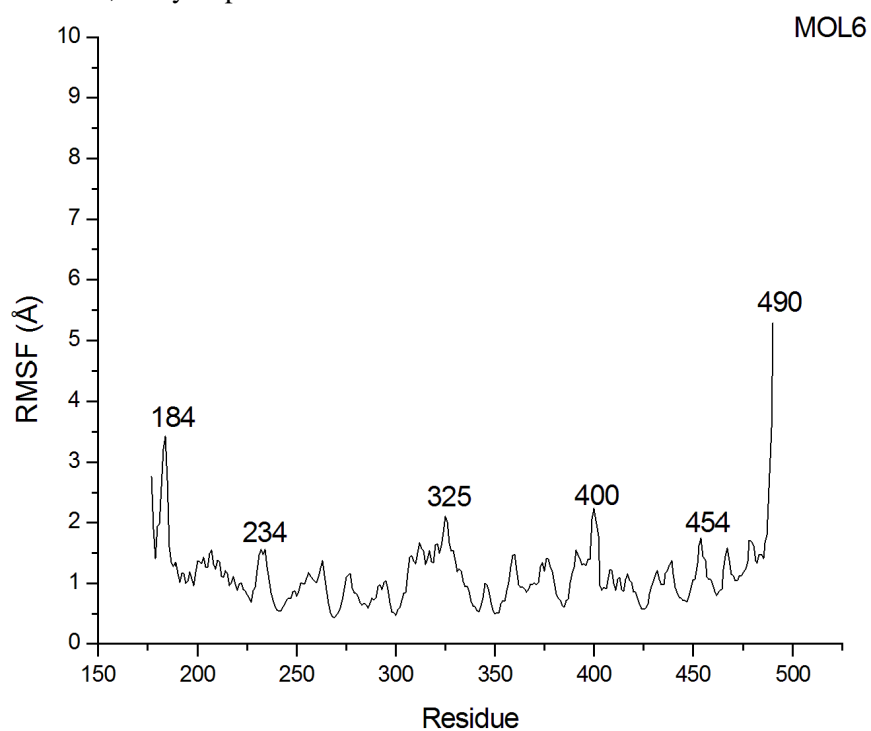


Figure S16: Residue fluctuations obtained by average residual fluctuations over 50 ns MD simulation, analysis performed from the Backbone.

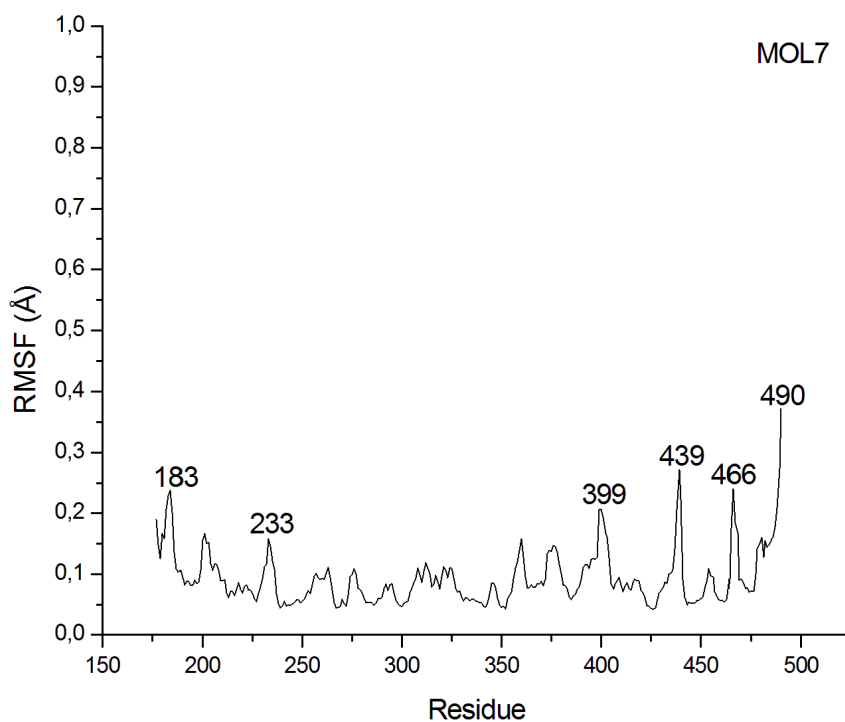


Figure S17: Residue fluctuations obtained by average residual fluctuations over 50 ns MD simulation, analysis performed from the Backbone.

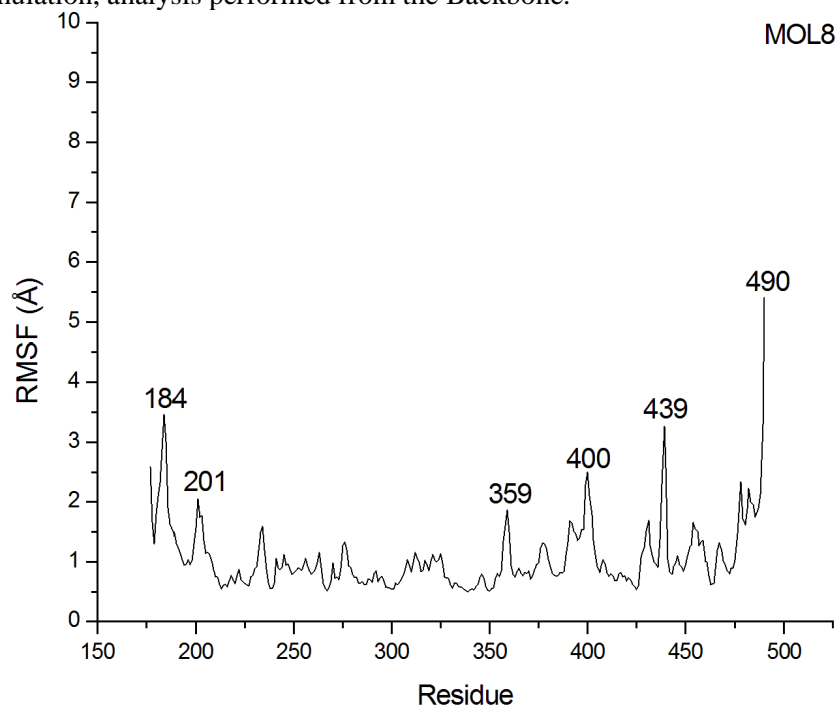


Figure S18: Residue fluctuations obtained by average residual fluctuations over 50 ns MD simulation, analysis performed from the Backbone.

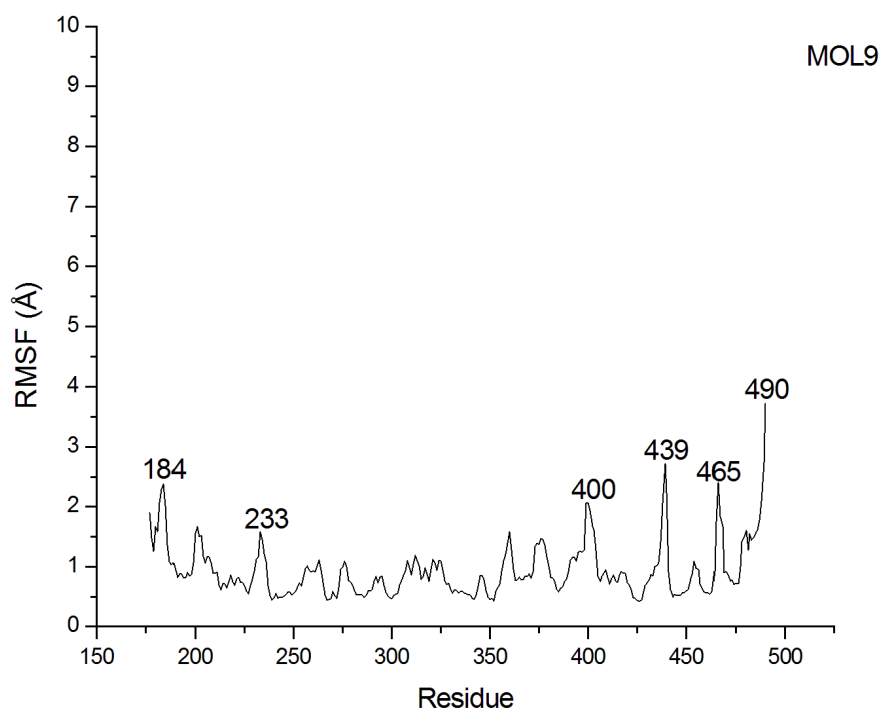


Figure S19: Residue fluctuations obtained by average residual fluctuations over 50 ns MD simulation, analysis performed from the Backbone.

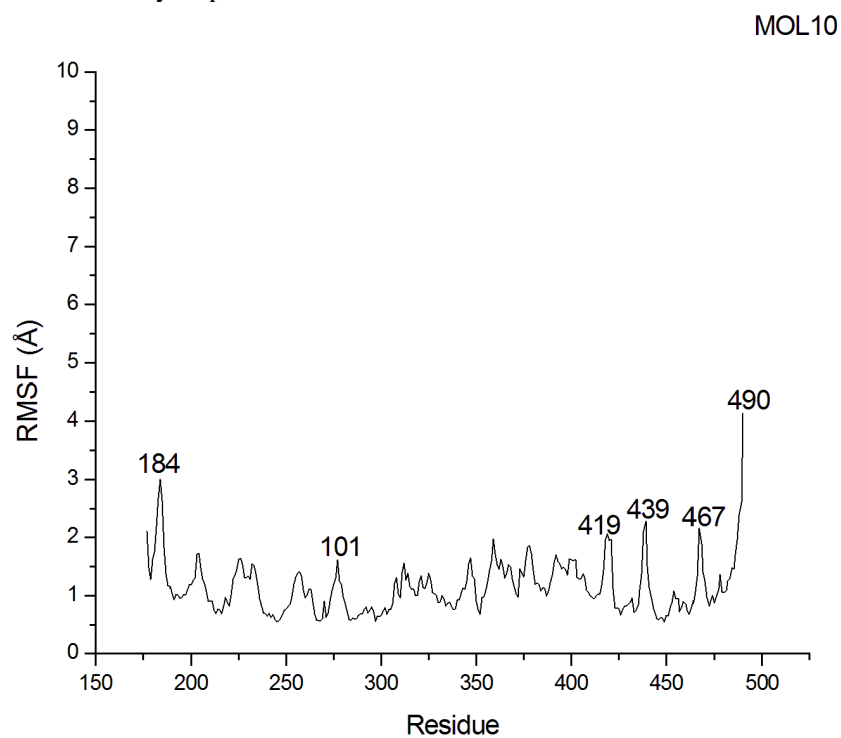


Figure S20: Residue fluctuations obtained by average residual fluctuations over 50 ns MD simulation, analysis performed from the Backbone.

PHARMACOPHORIC MAP

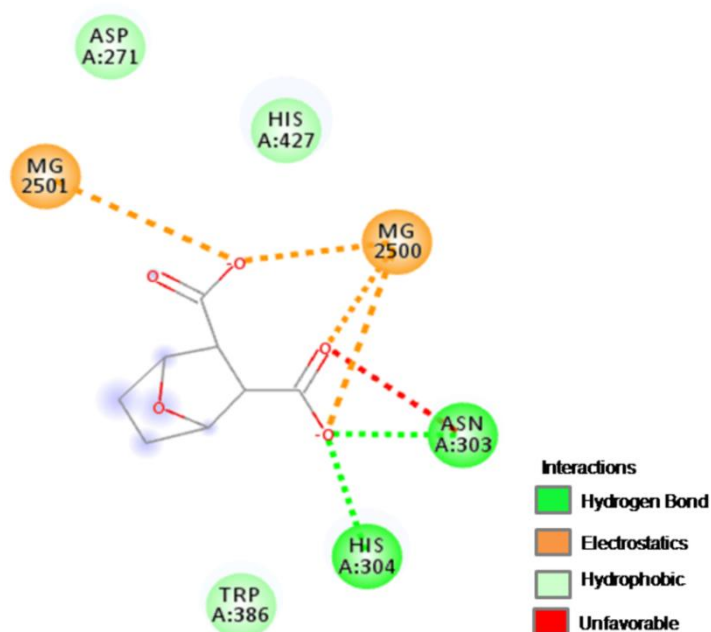


Figure S21. Interactions performed during 50ns in the DM simulation with the MOL1 / *hssPP5* complex

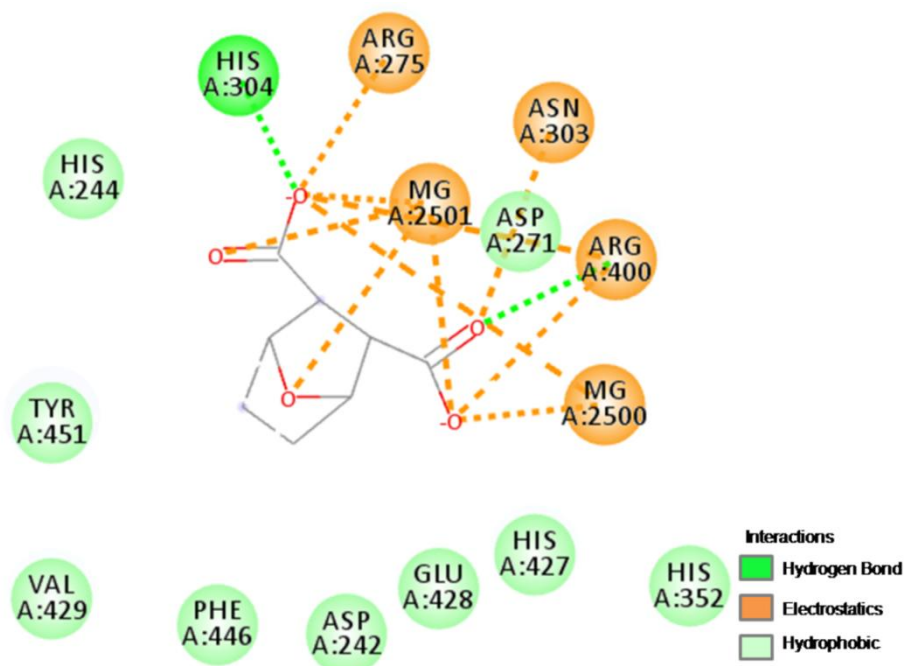


Figure S22. Interactions performed during 50ns in the DM simulation with the MOL2 / *hssPP5* complex.

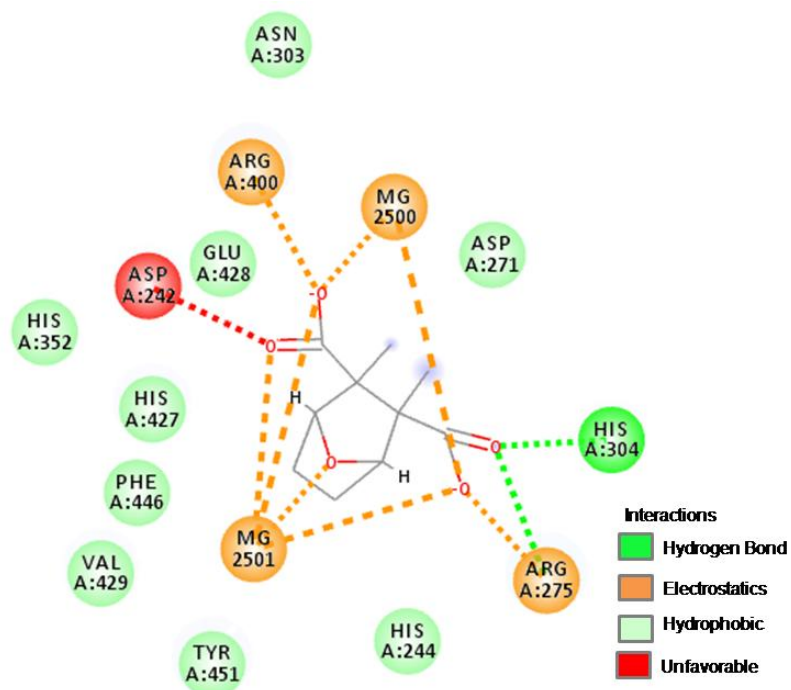


Figure S23. Interactions performed during 50 ns in the DM simulation with the MOL3 / *hssPP5* complex.

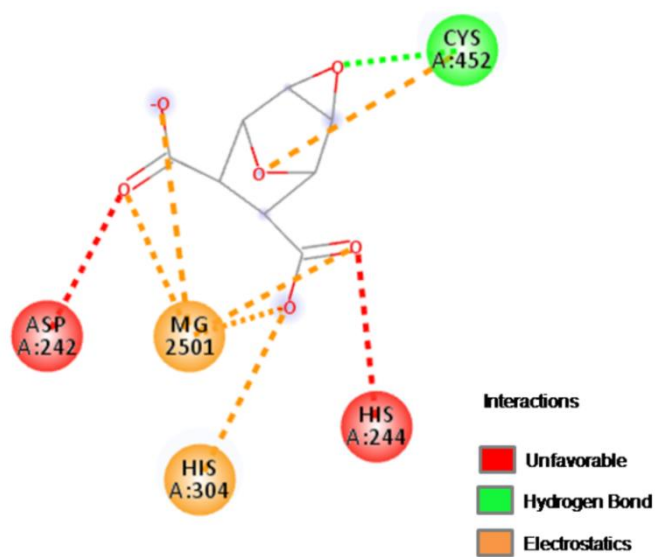


Figure S24. Interactions performed during 50 ns in the DM simulation with the MOL4 / *hssPP5* complex

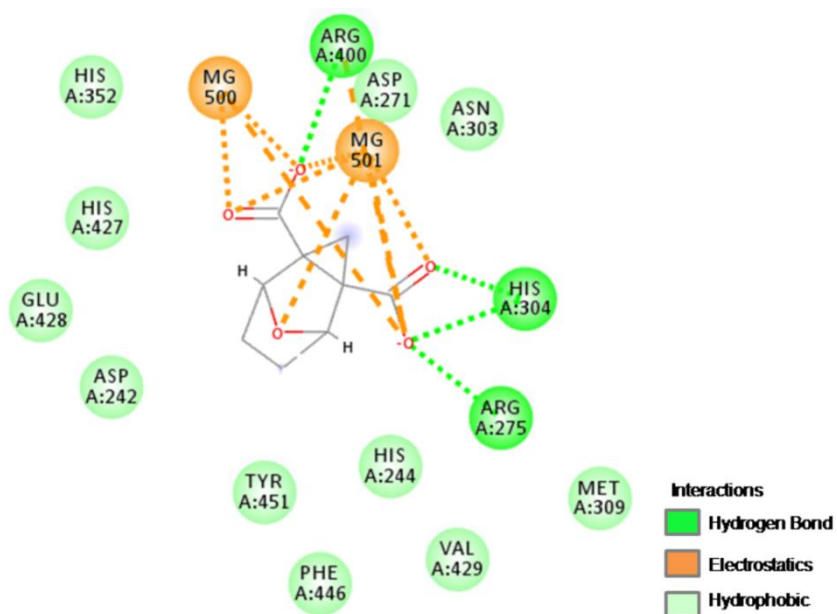


Figure S25. Interactions performed during 50 ns in the DM simulation with the MOL5 / *hssPP5* complex

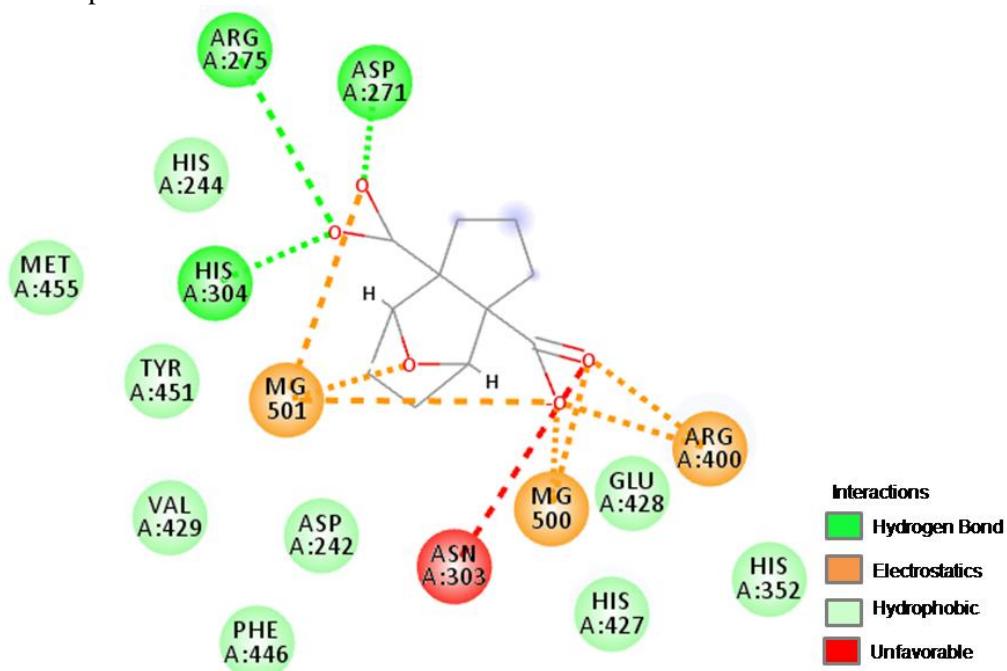


Figure S26. Interactions performed during 50 ns in the DM simulation with the MOL6 / *hssPP5* complex. Conformation A.

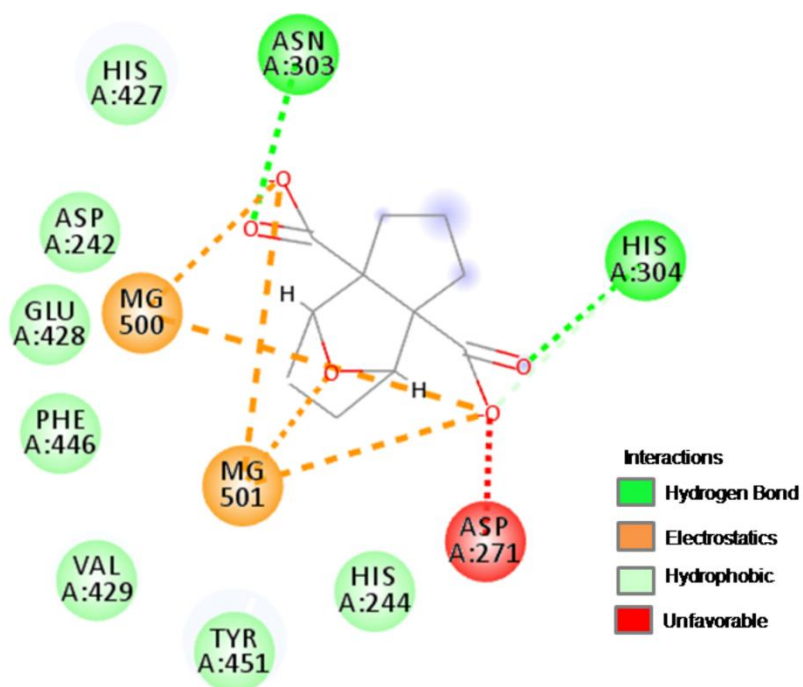


Figure S27. Interactions performed during 50ns in the DM simulation with the MOL6/ *hssPP5* complex. Conformation B.

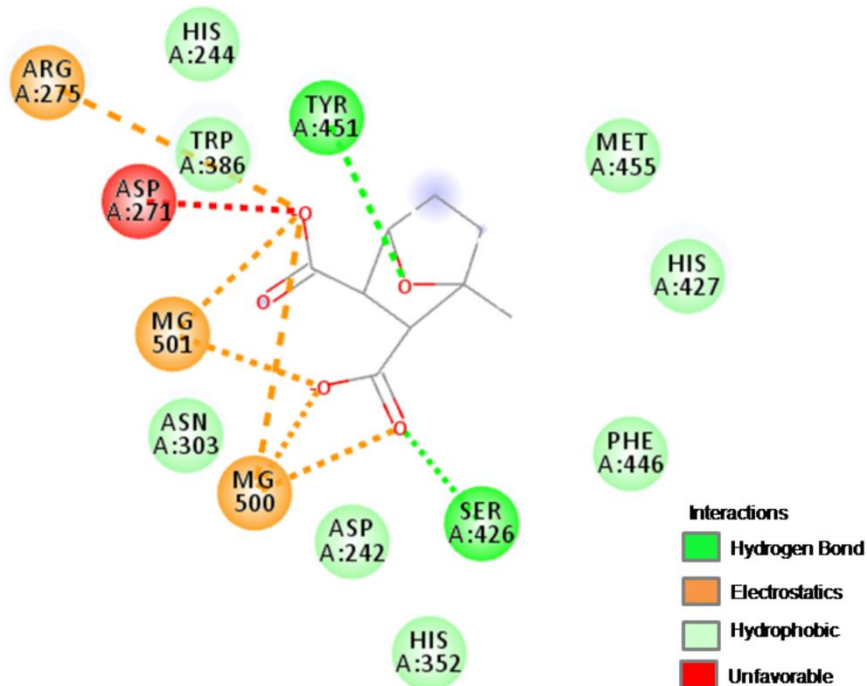


Figure S28. Interactions performed during 50ns in the DM simulation with the MOL7 / *hssPP5* complex.

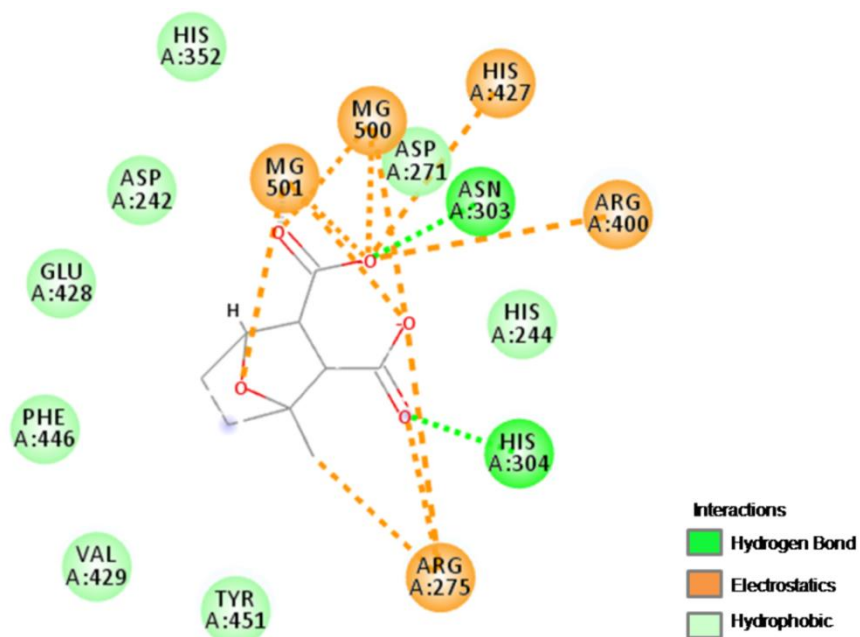


Figure S29. Interactions performed during 50ns in the DM simulation with the MOL8 / *hssPP5* complex

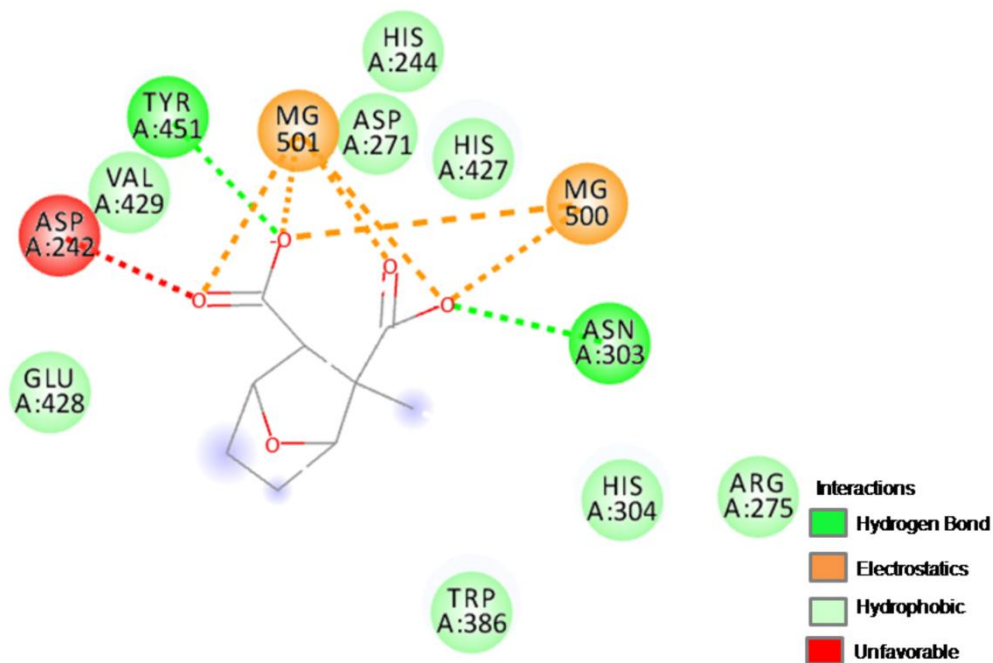


Figure S30. Interactions performed during 50ns in the DM simulation with the MOL9 / *hssPP5* complex

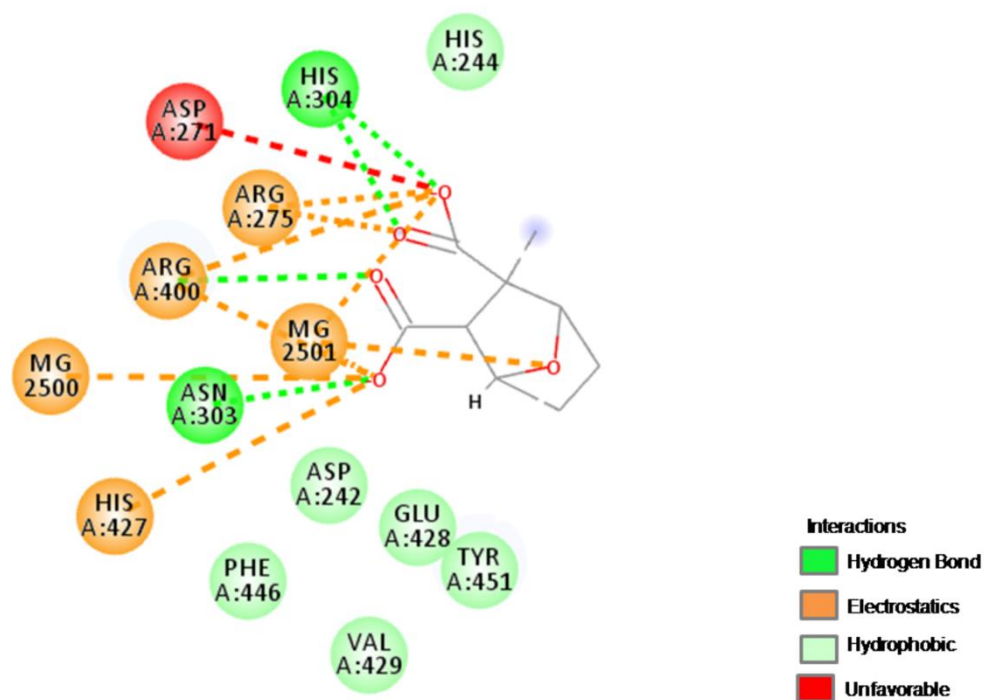


Figure S31. Interactions performed during 50ns in the DM simulation with the MOL10 / *hssPP5* complex

Table 1S: Hydrogen bonding distances performed between the inhibitors and *hssPP5*, corresponding to the heavy atoms.

Inhibitors	Residues	H-Bond Length (Å)
MOL1	His304	3.00
	Asn303	2.98
MOL2	His304	2.79
	Arg400	2.74
MOL3	His304	2.84
	Arg275	3.01
MOL4	Cys452	2.96
	Arg400	3.04
MOL5	His304	2.93
		2.83
	Arg275	2.97
MOL6-A	Asp271	2.79
	His304	3.16
MOL6-B	Asn303	2.82
	His304	3.08
MOL7	Tyr451	2.58
	Ser426	2.66
MOL8	Asn303	2.43
	His304	2.71
MOL9	Asn303	2.66
	Tyr451	2.58
MOL10		2.84
	His304	3.10
	Asn303	3.15
	Arg400	3.06

INTERACTION ENERGY THROUGHOUT DYNAMICS

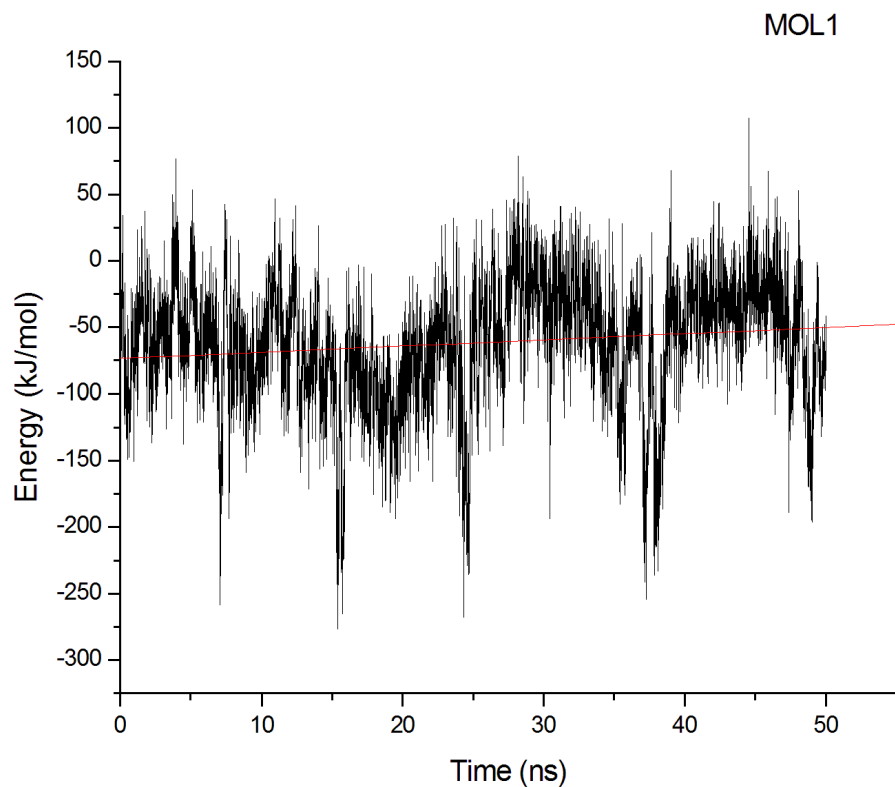


Figure S32. Interaction energy of MOL1 compound, during 50ns in the DM simulation.

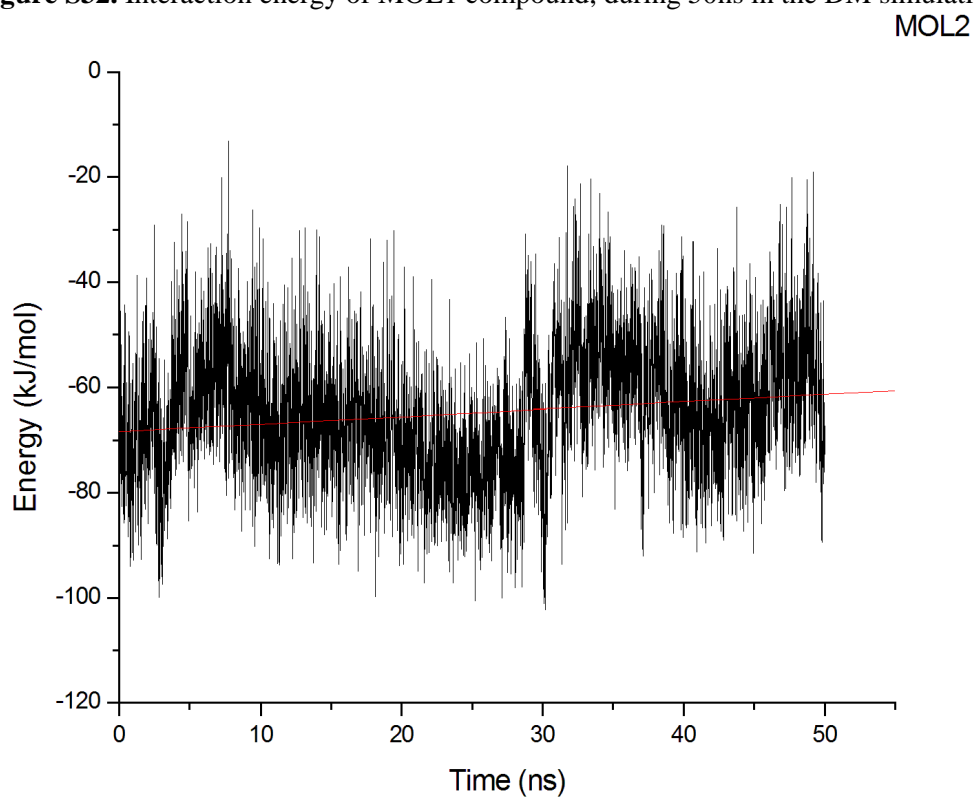


Figure S33. Interaction energy of MOL2 compound, during 50ns in the DM simulation.

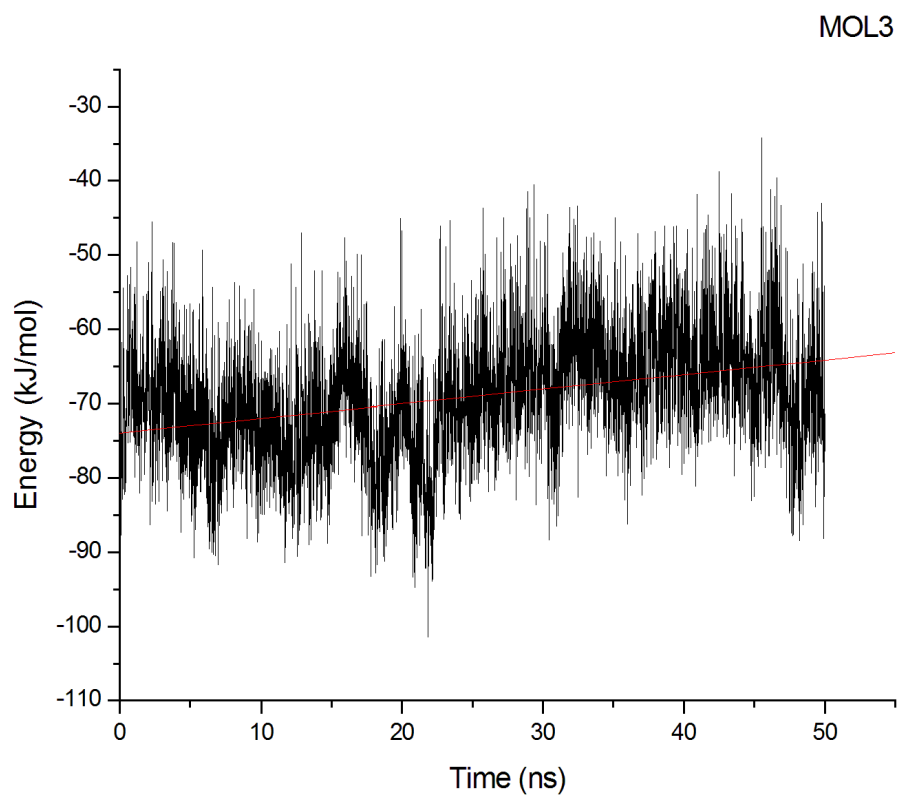


Figure S34. Interaction energy of MOL3 compound, during 50ns in the DM simulation.

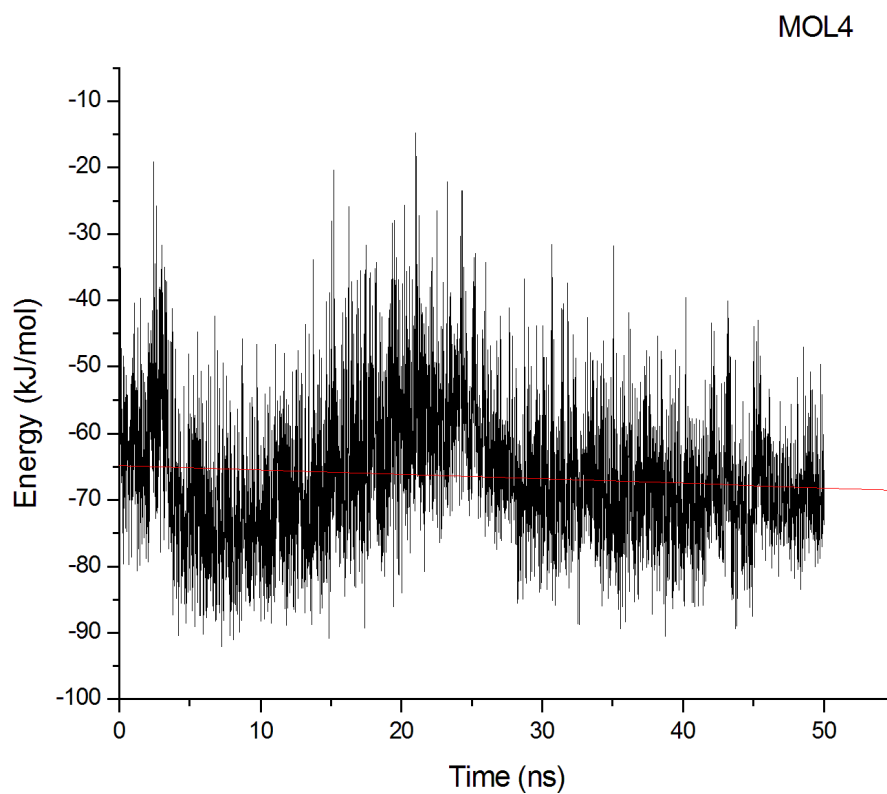


Figure S35. Interaction energy of MOL4 compound, during 50ns in the DM simulation.

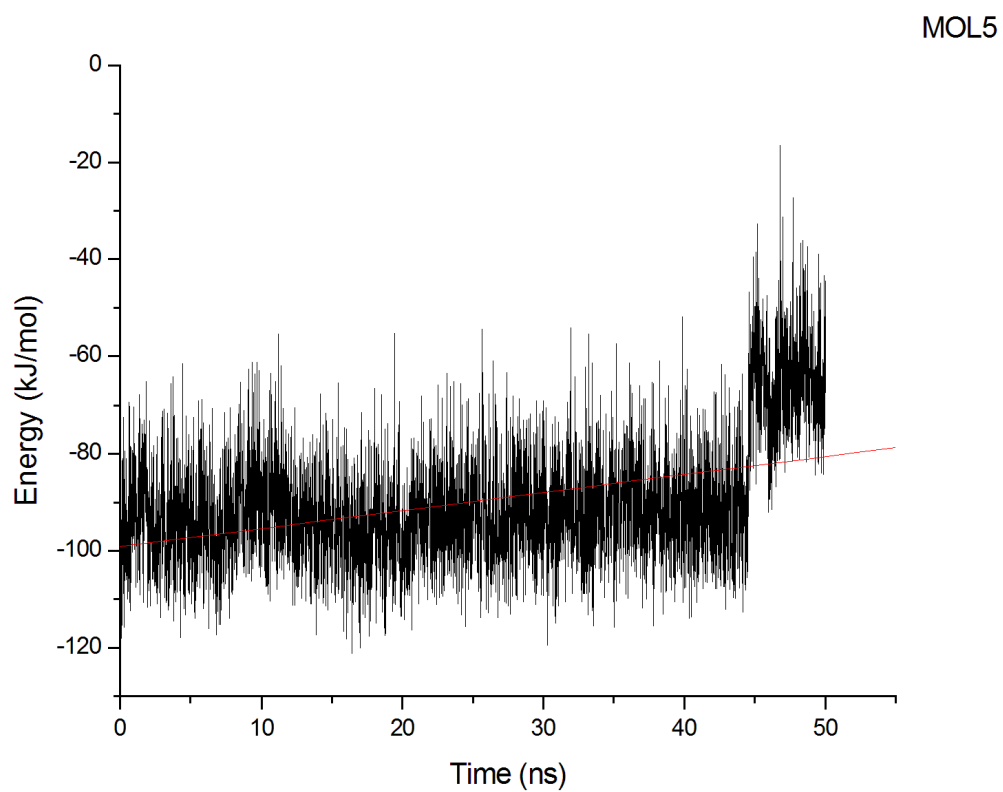


Figure S36. Interaction energy of MOL5 compound, during 50ns in the DM simulation.

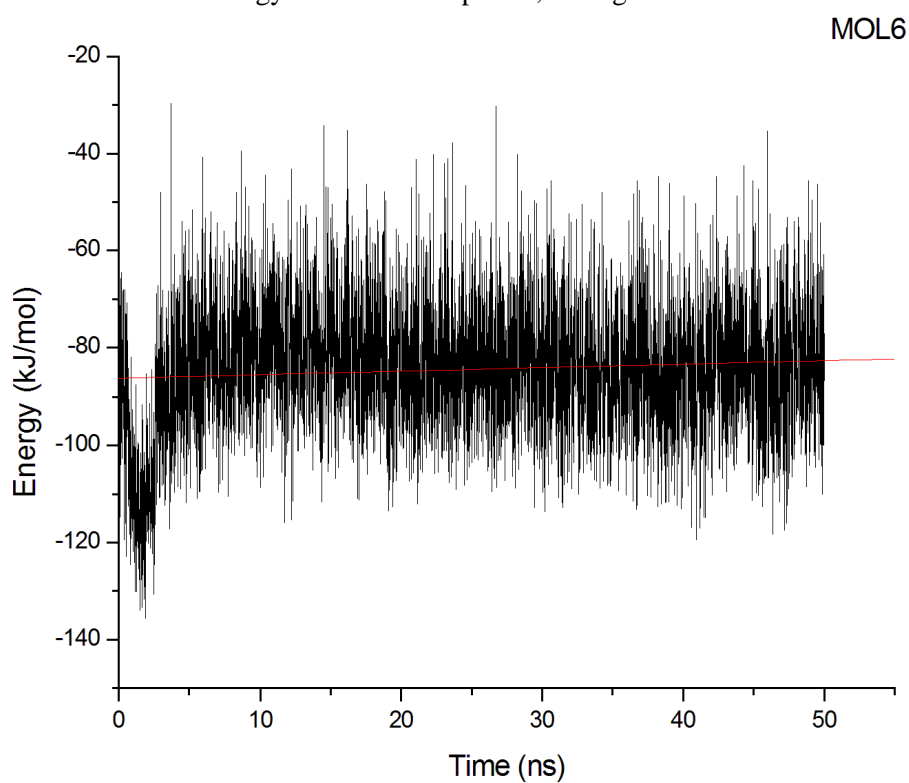


Figure S37. Interaction energy of MOL6 compound, during 50ns in the DM simulation.

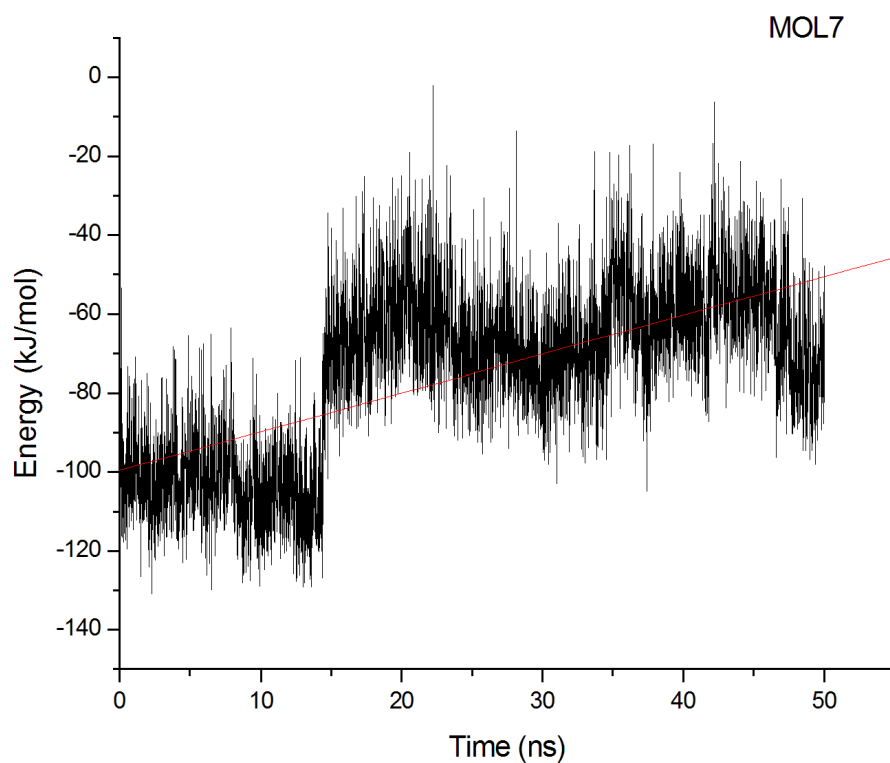


Figure S38. Interaction energy of MOL7 compound, during 50ns in the DM simulation.

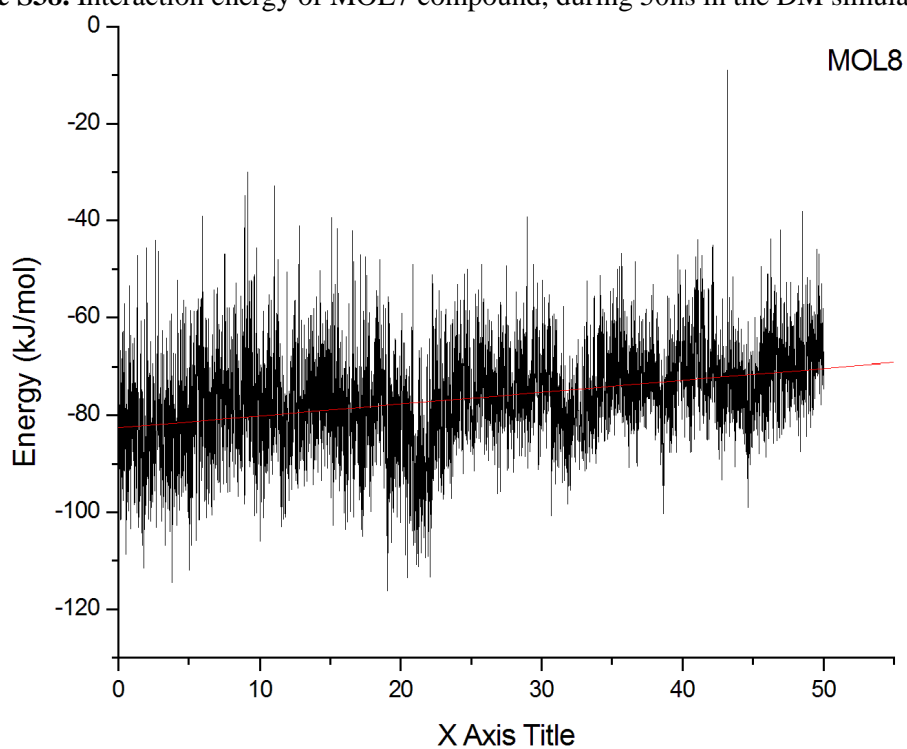


Figure S39. Interaction energy of MOL8 compound, during 50ns in the DM simulation.

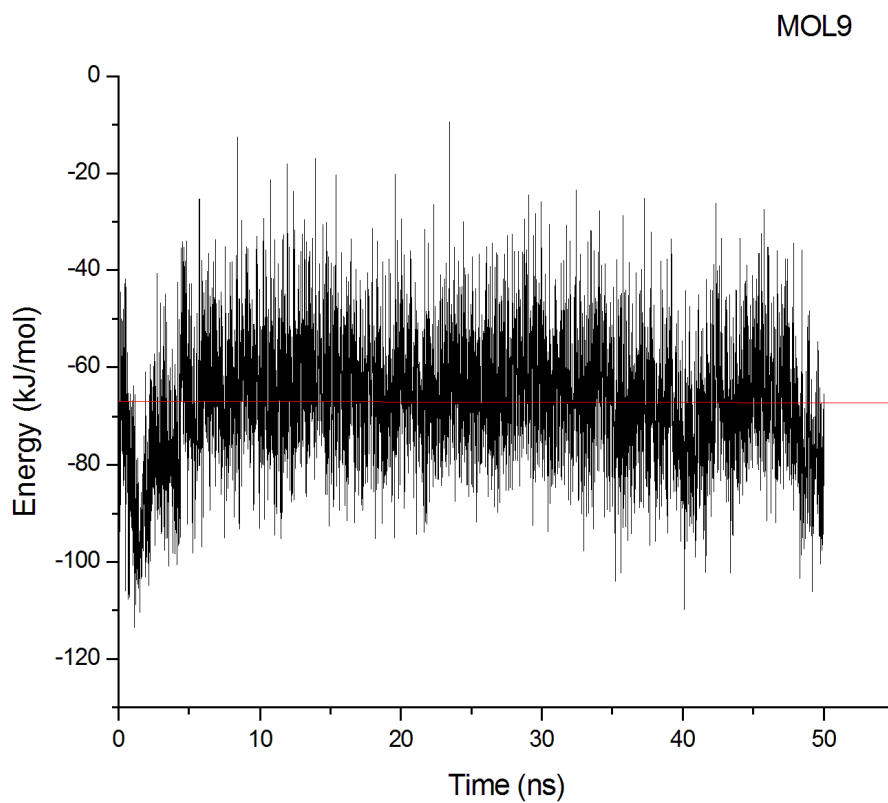


Figure S40. Interaction energy of MOL9 compound, during 50ns in the DM simulation.

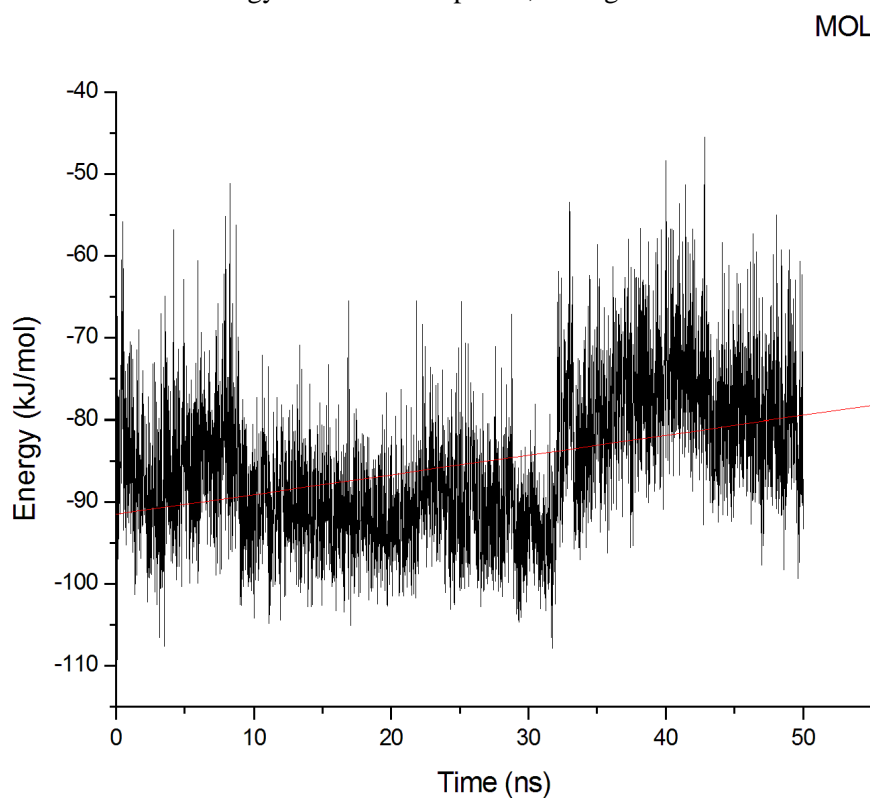


Figure S41. Interaction energy of MOL10 compound, during 50ns in the DM simulation.