



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA MEDICINAL E MODELAGEM
MOLECULAR
LABORATÓRIO DE PLANEJAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS**

GUELBER CARDOSO GOMES

**ESTUDO TEÓRICO DA REAÇÃO DE METILAÇÃO DA PROTEÍNA LISINA
METILTRANSFERASE (PKMT)**

**BELÉM - PARÁ
2019**

GUELBER CARDOSO GOMES

**ESTUDO TEÓRICO DA REAÇÃO DE METILAÇÃO DA PROTEÍNA LISINA
METILTRANSFERASE (PKMT)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular como parte do requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Jerônimo Lameira Silva

Coorientador: Prof. Dr. Anderson Henrique Lima e Lima

BELÉM - PARÁ
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará

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

G633e Gomes, Guelber Cardoso
ESTUDO TEÓRICO DA REAÇÃO DE METILAÇÃO DA
PROTEÍNA LISINA METILTRANSFERASE (PKMT) /
Guelber Cardoso Gomes. — 2019. 82 f.
: il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Jerônimo Lameira Silva
Coorientador(a): Prof. Dr. Anderson Henrique Lima E
Lima

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Química Medicinal e Modelagem Molecular, Instituto de Ciências
da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

1. Histonas. 2. Mecanismo. 3. metilação. 4. QM/MM. I.
Título.

CDD 541.2

GUELBER CARDOSO GOMES

ESTUDO TEÓRICO DA REAÇÃO DE METILAÇÃO DA PROTEÍNA LISINA
METILTRANSFERASE (PKMT)

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular como parte do requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Jerônimo Lameira Silva

Coorientador: Prof. Dr. Anderson Henrique Lima e Lima

Data da apresentação: ___/___/___

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Anderson Henrique Lima e Lima-(UFPA)

Prof. Dr. José Rogério de Araújo Silva-(UFPA)

Prof. Dr. Nelson Alberto Nascimento de Alencar-(UNAMA)

RESUMO

O câncer é um dos principais alvos na pesquisa acadêmica e seu entendimento está relacionado à regulação genica através da metilação das histonas. A proteína G9a é a responsável pela metilação da Lisina 9 da histona 3 (H3K9), a qual pode realizar uma ou duas metilações neste resíduo específico. Desta forma, foi utilizado técnicas computacionais para descrever esta reação através de simulação QM/MM usando as técnicas de SEP, PMF no programa Dynamo e o mecanismo no programa AMBER com os métodos AM1, AM1D, PM3, PM6 e RM1 determinando o melhor método e os parâmetros para descrever a reação. Os resultados mostram que a reação para a desprotonação da Lisina 9 apresentou melhores valores no programa Amber18, ficando próximo do esperado através de uma transferência direta da Lisina 9 para a Tirosina 1154 com o método RM1 e barreira de energia de 27,15 kJ/mol. A transferência do grupo metil da molécula de SAM para a Lisina 9 mostrou que o método PM6 utilizando a técnica de PMF do programa Dynamo apresentou uma barreira de energia de 72,80 kJ/mol o qual é próximo ao obtido através dos dados experimentais.

Palavras-Chave: QM/MM, Histonas, Mecanismo, metilação

ABSTRACT

Cancer is one of the main targets in academic research and its understanding is related to gene regulation through histone methylation. G9a protein is responsible for the methylation of histone 3 Lysine 9 (H3K9), which can perform one or two methylations on this specific residue. Thus, computational techniques were used to describe this reaction through QM/MM simulation using the techniques of SEP, PMF in the Dynamo program and the mechanism in the AMBER program with the methods AM1, AM1D, PM3, PM6 and RM1 determining the best method. the parameters to describe the reaction. The results show that the reaction for deprotonation of Lysine 9 showed better values in the Amber18 program, being close to expected through a direct transfer of Lysine 9 to Tyrosine 1154 with the RM1 method and energy barrier of 27.15 kJ/mol. The transfer of the methyl group from the SAM molecule to Lysine 9 showed that the PM6 method using the Dynamo PMF technique had an energy barrier of 72.80 kJ/mol which is close to that obtained by the experimental data.

Keywords: QM/MM, Histones, Mechanism, methylation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas de formação de tumores a partir de mutações.....	16
Figura 2: Estrutura do nucleossoma e resíduos disponíveis para modificações post-traducionais.....	19
Figura 3: Complexo de ativação e repressão com a proteína G9a	21
Figura 4: Velocidade Enzimática baseada utilizando a equação de Michaelis-Menten	22
Figura 5: Cinética enzimática usando a equação de Lineweaver-Burk	23
Figura 6: resíduos presentes no sítio ativo que apresentam interações com a molécula de SAH e com a Lisina 9 metilada para a proteína SET7/9. As tirosinas Y245 e Y305 são responsáveis por facilitar a transferência do grupo metil.....	26
Figura 7: Energia livre global (curva sólida espessa) e as contribuições A_i de algumas das janelas (curvas tracejadas finas). Na parte inferior, as distribuições de polarização P_{bi} obtidas da simulação são mostradas (curvas sólidas finas).....	45
Figura 8: Reação da transferência a) do Hidrogênio da água para a TYR1154, b) do Hidrogênio da LYS9 para a molécula de água e da água para a TYR 1154, c) do átomo de Hidrogênio da LYS9 para a TYR1154 e d) do metil da molécula de SAM para a LYS9	46
Figura 9: Região definida como quântica para as reações de transferência do átomo de Hidrogênio usando o pDynamo.....	50
Figura 10: Região definida como quântica para a transferência do grupo metil....	51
Figura 11: Região definida como quântica para a transferência do hidrogênio no programa AMBER18	53
Gráfico de energia para a transferência do átomo H2 da água para a o átomo OH da Tirosina usando o SEP.....	55
Figura 13: Estruturas de Reagente, TS e produto para a transferência do hidrogênio da água para a Tirosina com o método PM6 na SEP	56
Figura 14: Gráfico de energia para a desprotonação da LYS9 com a molécula de água e usando a SEP 2D.....	58
Figura 15: Estruturas de Reagente, TS e produto para a transferência do hidrogênio usando a SEP 2D com o método PM6.....	59

Figura 16: Gráfico de energia para a desprotonação da LYS9 diretamente para a Tirosina usando a SEP.....	60
Figura 17: Gráfico de energia para a desprotonação da LYS9 diretamente para a Tirosina usando a PMF	61
Figura 18: Gráfico de energia para a desprotonação da LYS9 diretamente para a Tirosina usando o AMBER	62
Figura 19: Gráfico de energia para a desprotonação da LYS9 diretamente para a Tirosina usando o AMBER e o método PM6.....	63
Figura 20: Estruturas de Reagente, TS e produto para a transferência do hidrogênio diretamente da Lisina para a Tirosina com o método PM3 usando a SEP.	64
Figura 21: Estruturas de Reagente, TS e produto para a transferência do hidrogênio diretamente da Lisina para a Tirosina com o método AM1 usando o PMF.	65
Figura 22: Estruturas de Reagente, TS e produto para a transferência do hidrogênio diretamente da Lisina para a Tirosina com o método AM1 usando o programa AMBER	66
Figura 23: Gráfico de energia para a transferência do grupo metil usando a SEP..	67
Figura 24: Gráfico de energia para a transferência do grupo metil usando o PMF. .	68
Figura 25: Gráfico de energia para a transferência do grupo metil usando o programa AMBER.....	69
Figura 26: Estruturas do Reagente, TS e produto para a transferência do grupo metil com o método AM1D usando a SEP.....	70
Figura 27: Estruturas do Reagente, TS e produto para a transferência do grupo metil com o método PM6 usando a PMF.	71
Figura 28: Estruturas do Reagente, TS e produto para a transferência do grupo metil com o método PM6 usando o programa AMBER.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de barreira de energia e energia livre para a reação de transferência do hidrogênio da água para a Tirosina em kJ/mol.....	55
Tabela 2: Distâncias observadas durante a reação da transferência do hidrogênio da água para a Tirosina com o método PM6 no Reagente, TS e produto (valores em Å).	56
Tabela 3: Valores de barreira de energia e energia livre para a reação de transferência do hidrogênio usando a SEP 2D em kJ/mol.	57
Tabela 4: Distâncias observadas durante a reação da transferência do hidrogênio usando a SEP 2D com o método PM6 no Reagente, TS e produto (valores em Å)..	59
Tabela 5: Valores de barreira de energia e energia livre para a reação de transferência do hidrogênio direto da Lisina para a Tirosina em kJ/mol.....	63
Tabela 6: Distâncias observadas durante a reação da transferência do hidrogênio diretamente da Lisina para a Tirosina no Reagente, TS e produto (valores em Å)..	66
Tabela 7: Valores de barreira de energia e energia livre para a reação de transferência do grupo metil em kJ/mol.....	69
Tabela 8: Distâncias observadas durante a reação da transferência do grupo metil no Reagente, TS e produto (valores em Å).....	72

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

H2A	-	Histona 2 A
H2B	-	Histona 2 B
H3	-	Histona 3
H4	-	Histona 4
PKMT	-	Proteínas Lisina Metiltransferases
DNA	-	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
H3K9	-	Histona 3 na Lisina 9
WHO	-	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)
Globocan	-	Observatório Global do Câncer (<i>Global Cancer Observatory</i>)
INCA	-	Instituto Nacional do Câncer
H3K4me3	-	Terceira Metilação na Lisina 4 da Histona 3
H3K4me9	-	Terceira Metilação na Lisina 9 da Histona 3
H3K4me27	-	Terceira Metilação na Lisina 27 da Histona 34
HAT	-	Histonas Acetiltransferases
HMT	-	Histonas Metiltransferases
HDAC	-	Histonas Deacetilases
HDM	-	Histonas Desmetilases
QM/MM	-	Mecânica Quântica/ Mecânica Molecular
AM1	-	Austin Model 1
AM1/d	-	Método AM1 com Extensão para o Orbital d
PM3	-	Método Parametrizado 3
PM6	-	Método Parametrizado 3

RM1	-	Recife Model 1
DFT	-	Teoria da Densidade Funcional
SEP	-	Superfície de Energia Potencial
PDB	-	Protein Data Bank
PMF	-	Potencial de Força Média
SAM	-	S-adenosilmetionina
SAH	-	S-Adenosil-L-homocisteína
NAMD	-	Nanoscale Molecular Dynamics

SUMÁRIO

RESUMO	4
ABSTRACT	5
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE SIMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	9
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 GERAL	15
2.2 ESPECÍFICO	15
3 REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1 ASPECTOS DO CÂNCER	16
3.2 EPIGENÉTICA DO CÂNCER.....	18
3.3 CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	21
3.4 PROTEINAS LISINA METILTRANSFERASE	24
3.5 QUÍMICA COMPUTACIONAL.....	27
3.6 MECÂNICA ESTATÍSTICA	28
3.7 MECÂNICA MOLECULAR	29
3.7.1 Campos de força.....	29
3.7.2 Ligações	29
3.7.3 Ângulos	30
3.7.4 Torções.....	30
3.7.5 Interações eletrostáticas.....	31
3.7.6 Interações de Van de Waals.....	31

3.8	Mecânica Quântica.....	32
3.9	Métodos Híbridos.....	34
3.9.1	Moléculas inteiras na região quântica.....	35
3.9.2	Cortando ligações químicas	36
3.9.3	Métodos semi-empíricos.....	36
3.9.3.1	AM1.....	37
3.9.3.2	PM3.....	38
3.9.3.3	PM6.....	39
3.9.3.4	AM1/d.....	40
3.9.3.5	RM1.....	41
3.10	Teoria do Estado de Transição	41
3.11	Superfície de Energia Potencial.....	42
3.12	Potencial de Força Média	43
4	METODOLOGIA.....	46
4.1	REAÇÕES.....	46
4.2	PREPARAÇÃO DO SISTEMA	47
4.3	SEP.....	49
4.4	PMF.....	51
4.5	AMBER	52
5	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	54
6	CONCLUSÃO.....	73
7	BIBLIOGRAFIA.....	74

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um dos principais alvos de estudos a nível mundial devido a sua grande relevância econômica e social visto que este é o segundo maior causador de mortes no mundo, com aproximadamente 9,6 milhões de mortes em 2018 causando um custo estimado em mais de 1,16 trilhões de dólares anuais (WHO, 2018a).

Os estudos sobre o surgimento e tratamento desta doença vem sendo feitos em diversas vias de sinalização e fatores que podem levar ao surgimento do câncer, entra elas temos a metilação do DNA e as modificações das histonas que apresentam um papel na expressão dos genes e erros nestas modificações são relatadas em diversos tipos de câncer (LI et al., 2016). Neste contexto, as histonas são proteínas que compõem o núcleo do nucleossoma que é formada por duas espirais de DNA e 4 pares de proteínas histonas, que são as histonas H2A, H2B, H3 e H4 (REECE; CAMPBELL, 2002).

As histonas podem sofrer diversos tipos de modificações covalentes que podem ser a metilação, a acetilação, a ubiquitilação, a sumoilação e a fosforilação (KOUZARIDES, 2007). Diversas famílias de proteínas são responsáveis por estas modificações, e entre elas temos a Lisina metiltransferases (PKMT) que atuam na metilação de resíduos de Lisinas nas histonas e estas podem catalisar a transferência de até três grupos metilas para resíduos de Lisina (COUTURE et al., 2008).

Dentro da família de proteínas PKMT temos a G9a que é responsável pela metilação da Lisina 9 na histona H3 sendo também nomeada de metiltransferase H3K9. Esta proteína é diretamente responsável pelo silenciamento de genes envolvidos na fase embrionária, sendo relatado em diversos tipos de câncer, através da manutenção da via de biossíntese da serina-glicina (LI et al., 2016).

Esta metilação se dá através de duas reações principais, a primeira é a transferência de um átomo de Hidrogênio do resíduo de Lisina (LYS9) para um resíduo de Tirosina (TYR1154), esta reação apresenta a possibilidade de ocorrer usando uma molécula de água, que pode servir como uma ponte para a transferência do hidrogênio. A reação subsequentemente é a transferência do grupo metil de uma molécula de S-adenosilmetionina (SAM) para a Lisina 9 da histona.

Assim, neste trabalho utilizamos as abordagens QM/MM com os programas Amber18 e pDynamo, além de diferentes técnicas e métodos semi-empíricos para descrever as possíveis reações da transferência do hidrogênio (onde 3 possibilidades foram analisadas) envolvendo ou não a água presente no sítio ativo da proteína e a transferência do grupo metil do SAM para a LYS9. Os resultados obtidos com estas metodologias foram comparados com o experimental para descrever qual os melhores parâmetros utilizados para descrever ambas as reações.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar o mecanismo de reação da enzima Lisina metiltransferases (PKMT) usando métodos QM/MM

2.2 Específico

Encontrar as estruturas principais que permitam a compreensão do mecanismo catalítico da proteína em estudo;

Determinar as características do mecanismo de reação;

Determinar barreira de energia da reação;

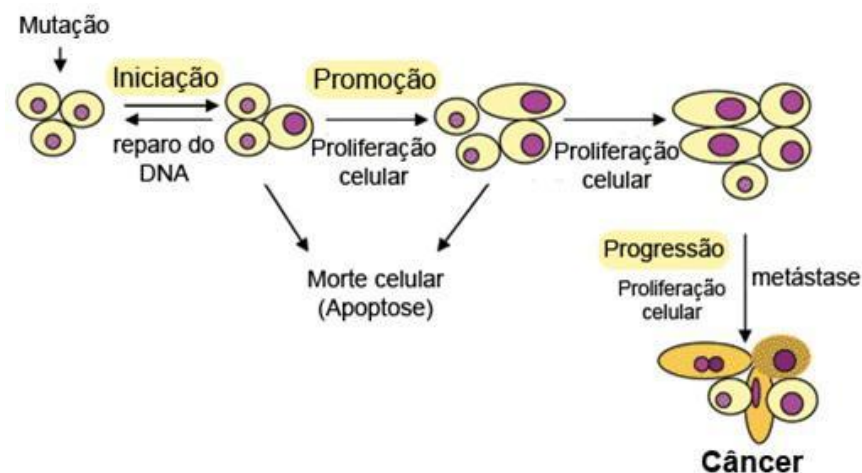
Comparar e analisar a energia livre de ativação calculada com dados experimentais.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Aspectos do Câncer

O material genético (DNA, do inglês *desoxyribonucleic acid* ou ADN, do português ácido desoxirribonucleico) presente nas células é sensível ao dano de diversos agentes, tanto exógenos (como a radiação) quanto endógenos (como os danos provocados pelo estresse oxidativo ou mesmo pelos erros na replicação). Para cada dano que o DNA sofre é necessária uma resposta específica de recuperação, sendo necessária a identificação do dano, a ativação dos pontos de checagem do ciclo celular e o reparo das lesões ou indução da apoptose. Estes danos ao DNA podem levar a quebras nas fitas simples, ou seja, em apenas uma das fitas que compõem o material genético ou na fita dupla o qual causa um dano total a fita de DNA e conseqüentemente ao material genético, evasão do reparo, resposta mutagênica, alteração da expressão de múltiplos genes, transformação celular e ativação da carcinogênese (Figura 1) (KASTAN; BARTEK, 2004; KHANNA; JACKSON, 2001).

Figura 1: Etapas de formação de tumores a partir de mutações



Fonte: Inca – Instituto Nacional de Câncer – Ministério da Saúde

O câncer se origina de uma célula anormal que tem a capacidade de burlar os mecanismos de reparo presentes e podem transmitir essa característica anormal às células filhas. Esta anormalidade, adquirida ou herdada, pode ser uma alteração genética ou epigenética (modificação no padrão de expressão dos genes, e não na

sequência de DNA), resultando no desenvolvimento da neoplasia (HANAHAN; WEINBERG, 2011; KHANNA; JACKSON, 2001).

Devido a esta complexidade de causas, o câncer atualmente é considerado uma das maiores preocupações na área da saúde pública em âmbito global visto que é, na realidade, um conjunto de doenças complexas. O câncer é caracterizado, entre outros fatores, pela proliferação acentuada e desordenada das células; o surgimento de um câncer se dá a partir da perda de um fenótipo normal originando um maligno e é tido como um resultado da interação entre o ambiente externo e as alterações nos mecanismos regulatórios de vital importância para as células. De fato, mais de 100 tipos diferentes de tumores já foram identificados em diversos tecidos do organismo, contribuindo assim para que seja a 2ª maior causa de mortes no mundo. A diversidade e a complexidade são fatores que criam um problema para o correto controle do câncer, mesmo que os estudos na área tenham avançado bastante. (FERREIRA; ROCHA, 2004; HANAHAN; WEINBERG, 2011; WHO, 2018a).

Visto o grande impacto criado, a organização mundial da saúde (WHO) em parceria com a Globocan (*Global Cancer Observatory*) divulga constantemente novas estatísticas sobre a incidência, prevalência e mortalidade de diversos tipos de câncer ao redor do mundo. Os dados divulgados em 2018 mostram que a incidência neste ano foi de mais de 18 milhões de casos e a mortalidade de mais de 9.5 milhões, sendo o câncer de pulmão e mama os com maior incidência neste ano, enquanto os mais mortais foram de pulmão e o colón-retal (GLOBOCAN, 2018a; WHO, 2018b).

A incidência nos casos de câncer apresenta uma grande variação quando se leva em conta as regiões do globo, sendo mais frequente em países asiáticos e na Europa, enquanto apresentou menor incidência na Oceania e na África, esta tendência também se observa quando se relaciona ao número de mortes. Quando relacionamos ao sexo, é visto que alguns tipos de câncer são específicos de um determinado sexo (o câncer de mama para o sexo feminino e câncer de próstata para o sexo masculino) ou tem uma incidência muito maior neste sexo (GLOBOCAN, 2018b).

Quando consideramos o cenário brasileiro, a GLOBOCAN apontou o surgimento de aproximadamente 560 mil novos casos de câncer e 243 mil mortes no Brasil em 2018, enquanto o instituto nacional do câncer (INCA) estima uma incidência

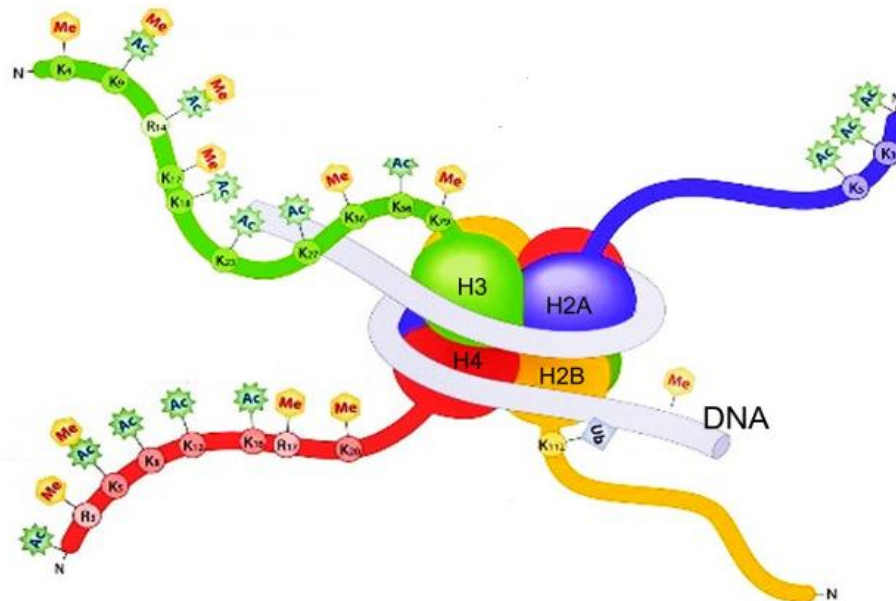
de 600 mil novos casos para 2018. No Brasil as maiores incidências foram o de próstata entre os homens com estimativa de mais de 68 mil casos e o de mama entre as mulheres com estimativa de aproximadamente 60 mil novos casos, enquanto o câncer de colorretal e de pulmão apresentam grande incidência em ambos os sexos (GLOBOCAN, 2018b; INCA, 2017).

3.2 Epigenética do câncer

Epigenética é o termo usado para se referir as mudanças na expressão gênica que não são causadas por mudanças na sequência de DNA. Os mecanismos mais estudados desta regulação são metilação do DNA e as modificações pós-transcricionais das histonas (GREENBERG et al., 2014).

As proteínas denominadas de histonas são as estruturas que formam o núcleo do nucleossoma, que é a estrutura formada a partir do DNA em duas espirais e 4 pares de proteínas histonas, chamadas de H2A, H2B, H3 e H4 (REECE; CAMPBELL, 2002). As histonas apresentam um domínio globular C-terminal e uma cauda N-terminal não estruturada (RICHMOND et al., 1997). A parte N-terminal das histonas são regiões que podem sofrer vários tipos de modificações covalentes pós-tradução as quais incluem metilação, acetilação, ubiquitilação, sumoilação e fosforilação, todos em resíduos específicos (Figura 2). As modificações descritas são utilizadas para regular os principais processos celulares, entre os quais a transcrição, replicação e reparo (KOUZARIDES, 2007). As modificações nas histonas são utilizadas para alterar a acessibilidade da cromatina, recrutando e/ou ocluindo as proteínas efetoras não histônicas responsáveis pela decodificação da mensagem criadas pelos padrões específicos de modificação (JENUWEIN; ALLIS, 2001).

Figura 2: Estrutura do nucleossoma e resíduos disponíveis para modificações pos-traducionais.



Fonte: (PASCHON; ALCARAZ; KIHARA, 2014)

As modificações das histonas têm a capacidade de levar à ativação ou repressão da transcrição ou expressão gênica, dependendo de quais resíduos e qual o tipo de modificações ocorreu. A acetilação da Lisina, por exemplo, se correlaciona com a ativação transcricional (HEBBES; THORNE, 1988; KOUZARIDES, 2007), enquanto a metilação de uma Lisina pode levar à ativação ou a repressão transcricional, dependendo apenas de qual resíduo foi modificado e do grau de metilação (isto é, quantas metilações ocorreu no resíduo). Um bom exemplo deste fato é que a trimetilação da Lisina 4 na histona H3 que pode ser denominada utilizando a sigla H3K4me3, está relacionado a promotores de genes transcionalmente ativos, isto quer dizer que estas metilações são usados como sinais para a ativação da transcrição gênica (LIANG et al., 2004).

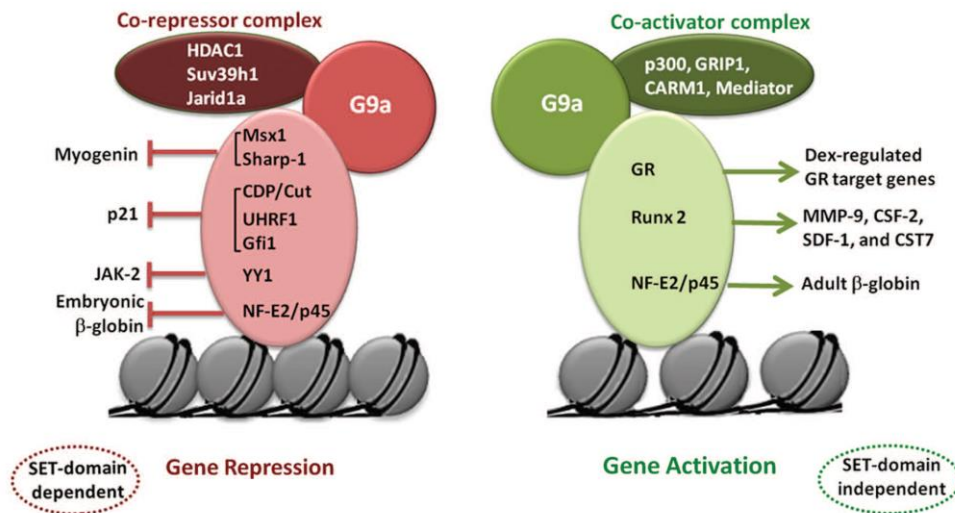
Por outro lado, a trimetilação da Lisina 9 na histona H3 (H3K9me3) e da Lisina 27 na histona H3 (H3K27me3) estão relacionados aos promotores gênicos que são transcionalmente reprimidos, ou seja, essas reprimem a transcrição dos genes que estão nas histonas que sofrem estas metilações (KOUZARIDES, 2007). Estas são duas das principais modificações para o mecanismo de silenciamento, porém existe um vasto conjunto de modificações das histonas ativas e repressivas que formam uma grande e complexa rede reguladora de genes essenciais, podendo agir também de

maneira conjunta, com mais de um sistema de histonas, para assim regular a expressão gênica e a identidade celular (BARKSI et al., 2007; BERNSTEIN; MEISSNER; LANDER, 2007; KOUZARIDES, 2007; WANG et al., 2008)

Estes padrões de modificações das histonas são regulados por enzimas que podem adicionar ou remover as modificações covalentes às proteínas histonas. As histonas acetiltransferases (HATs) adicionam grupos acetil; as histonas metiltransferases (HMTs) adicionam grupos de metila; as histonas deacetilases (HDACs) removem grupos acetil e as histonas desmetilases (HDMs) removem os grupos metila (HABERLAND; MONTGOMERY; OLSON, 2009; SHI, 2007). As células cancerosas apresentam várias mudanças de forma generalizada nos padrões de metilação das histonas. Estas alterações nos padrões de metilação, por exemplo, na H3K9 e H3K27 estão associadas a um silenciamento gênico de modo aberrante em várias formas de câncer (NGUYEN et al., 2002; VALK-LINGBEEK; BRUGGEMAN; LOHUIZEN, 2004).

Assim, existe uma distinção na função entre a quantidade de metilações da H3K9, onde a primeira metilação ativa a transcrição genica enquanto a segunda metilação reprime a transcrição (Figura 3) (VERMEULEN et al., 2010). A proteína G9a é responsável pela mono- e di-metilação da histona H3 na Lisina 9. Esta proteína apresenta dois resíduos com particular importância para o processo de catálise. O primeiro é um resíduo de Tirosina no domínio pós-SET na posição 1154 (Y1154), o qual é um componente essencial para a ligação da Lisina, enquanto o seu grupo hidroxilo participa da reação de catálise; a mutação neste resíduo causa a perda da atividade catalítica (QIAN; ZHOU, 2006; SMITH; DENU, 2010). O segundo resíduo importante é a Tirosina 1067 (Y1067) onde o grupo hidroxila tem a função de criar a orientação entre a Lisina que irá receber o grupo metil e a molécula de SAM que irá doar o grupo metil (SMITH; DENU, 2010).

Figura 3: Complexo de ativação e repressão com a proteína G9a



Fonte: (SHANKAR et al., 2013)

3.3 Cinética Enzimática

As enzimas, termo utilizado pela primeira vez por Wilhelm Kühne em 1878, são proteínas com a capacidade de catalisar reações químicas, através da redução da energia de ativação destas reações, convertendo assim os reagentes em produtos. A redução na velocidade de reação causada pelas enzimas é na ordem de 5 a 17 vezes a ordem de magnitude, entretanto, assim como um catalizador, as enzimas não mudam o equilíbrio químico da reação por ela catalisada (NELSON; COX, 2013).

A atividade enzimática é diretamente ligada ao pH do sistema, podendo este resultar em mudanças na atividade através da modificação da ionização da proteína e/ou do substrato. Por este motivo, cada família de enzimas apresenta uma faixa ótima de pH, onde a reação acontece com eficiência máxima. Além disso, outros fatores também podem influenciar na atividade da enzima, como a temperatura e cofatores (NELSON; COX, 2013; VOET, DONALD; VOET, 2011).

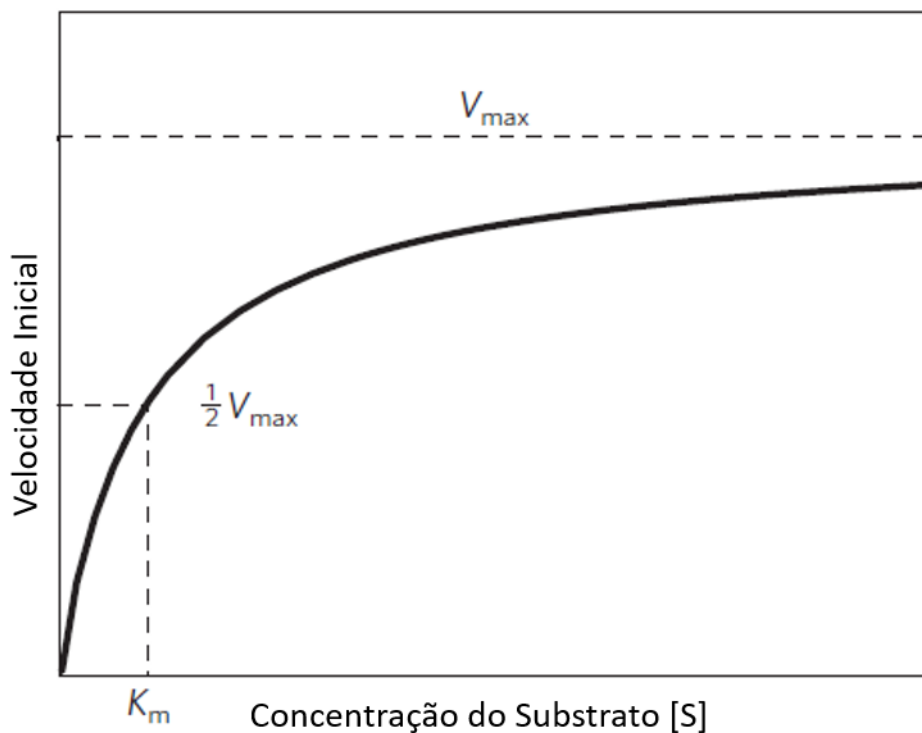
A fim de descrever inicialmente a especificidade das ligações enzima substrato, Fischer formulou em 1894 a teoria do modelo chave-fechadura, que dizia que a enzima responsável pela catalise apresentava uma estrutura complementar ao substrato, sendo assim apenas o substrato padrão desta proteína poderia se ligar a ela (FISCHER, 1894). Entretanto, como este modelo falhava em descrever certas

reações ou mesmo o surgimento dos estados de transição, em 1958, Koshland sugeriu que as proteínas não apresentam um sítio ativo rígido, mas que este se molda ao substrato que a ele vai interagir (KOSHLAND, 1958).

Com esta especificidade, as enzimas conseguem reagir com mais eficiência o substrato, e para isso apresenta algumas “estratégias” para reduzir a barreira de ativação, que podem ser: estabilizar o estado de transição, favorecendo assim que o substrato adote esta conformação; através de uma via alternativa de reação, usando os resíduos do sítio para interagir ou ligar com o substrato e reduzindo a entropia do sistema através da orientação dos substratos de modo a facilitar a reação enzimática (FERSHT, 1985).

As reações enzimáticas no seu geral seguem a cinética de Michaelis–Menten (MICHAELIS et al., 1913), onde a velocidade inicial depende da concentração do substrato ($[S]$) e quanto mais a concentração do substrato aumenta, mais próximo a reação chega da sua velocidade máxima (V_{\max}) devido ao saturamento das enzimas (Figura 4).

Figura 4: Velocidade Enzimática baseada utilizando a equação de Michaelis-Menten



Fonte: Adaptado de (NELSON; COX, 2013)

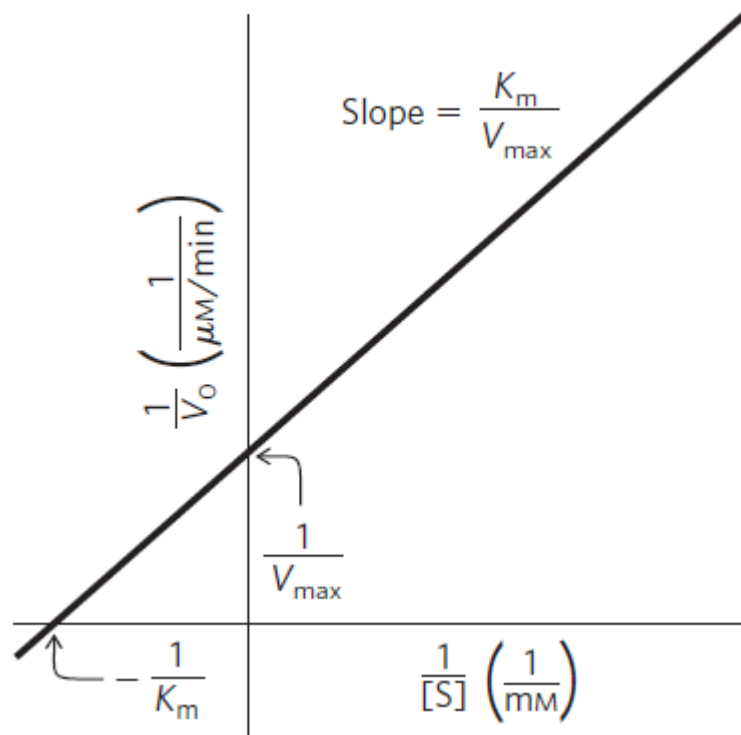
Esta cinética pode ser descrita utilizando a equação de Michaelis-Menten (Equação 2.1), onde a velocidade Inicial (V_0) é definida usando a velocidade máxima (V_{max}), a concentração de substrato ($[S]$) e a constante de Michaelis (K_M) que é específico para cada enzima e substrato.

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (2.1)$$

A equação de Michaelis-Menten pode ser descrita também como a representação de duplo recíproco ou equação de Lineweaver-Burk, o qual faz um rearranjo matemático que converte a equação da cinética enzimática para uma equação de primeiro grau, facilitando a análise, a equação é mostrada como Equação 2.2 e o gráfico gerado é observado na Figura 5.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.2)$$

Figura 5: Cinética enzimática usando a equação de Lineweaver-Burk



Fonte: (NELSON; COX, 2013)

3.4 Proteínas Lisina Metiltransferase

As proteínas da família Lisina metiltransferase (KMT) ou histona metiltransferase (HMT) contém um domínio SET que é evolutivamente conservado, este domínio é composto por uma sequência de 130 aminoácidos contendo as duas regiões mais conservadas. Estas proteínas catalisam a metilação específica de diferentes resíduos de Lisina e apresenta especificidades de substrato relativamente altas. Para esta família de proteínas, foram identificados ao total 52 membros, sendo 51 HMTs contendo o domínio SET e 1 HMT não contendo o domínio SET, conhecido como DOT1L (QIAN; ZHOU, 2006).

Os estudos nas histonas demonstram que as Lisinas 4, 9, 27, 36 e 79 da histona H3 (H3K4, H3K9, H3K27, H3K36 e H3K79) e a Lisina 20 da histona H4 (H4K20) são resíduos que podem ser metilados. Estas metilações podem ser de três formas: mono-metilação (me1), di- (me2) e tri- (me3). A especificidade das metilações nas histonas criam diferenças na função, na regulação da transcrição e na conformação da cromatina. As metilações H3K4me2/3, H3K9me1, H3K27me1, H3K36me3, H3K79me3 e H4K20me1 são geralmente encontrados em regiões que apresentam ativação genética, enquanto H3K9me2/3, H3K27me2/3 e H4K20me3 estão associados à repressão genética (VERMEULEN et al., 2010).

A metilação das Lisinas nas histonas desempenham um papel central em uma ampla variedade de processos celulares, os quais incluem a formação da heterocromatina, inativação do cromossomo X e regulação da transcrição (MARTIN; ZHANG, 2005). Demonstrou-se que diferentes estados de metilação de múltiplas histonas Lisinas apresenta distribuições biológicas distintas na cromatina. Por exemplo, a monometilação de H3-K27 e a tri-metilação de H3-K9 são encontradas com grande frequência na heterocromatina pericêntrica, enquanto a trimetilação de H3-K27 junto com a di-metilação de H3-K9 são ditas como impressões epigenéticas do cromossomo X inativo (PETERS et al., 2003; RICE et al., 2003).

A metilação da histona H3K9 é um conhecido marcador epigenético e este é bem conservado tendo como função o silenciamento transcricional (PETERSON; LANIEL, 2004). Uma das proteínas responsáveis pela metilação da H3K9 é a G9a a qual apresenta uma função crítica para o silenciamento de genes e o desenvolvimento embrionário

Além das histonas, novos estudos mostram que as proteínas que apresentam o domínio SET podem catalisar a metilação da Lisina de proteínas celulares, incluindo o citocromo C, Rubisco (TRIEVEL et al., 2002), p53 e Taf10 (CHUIKOV et al., 2004; KOUSKOUTI et al., 2004). Assim, as proteínas do domínio SET funcionam geralmente como proteínas Lisina metiltransferases.

As estruturas resolvidas que apresentam o domínio SET revelam que este domínio apresenta uma região conservada e possui uma dobra estrutural única que é diferente de outras classes de metiltransferases e de proteínas que tem a molécula S-adenosil-l-metionina (SAM) como doador do grupo metila. O domínio SET contém uma série de folhas β que se dooram em três folhas discretas que circundam uma estrutura semelhante a um nó (TAYLOR et al., 2003). Esta estrutura incomum é formado a partir do segmento C-terminal do domínio SET que passa por um loop formado por região precedente da sequência. Estas duas regiões são as que contêm a sequência mais conservada dos domínios SET, consistindo em ELxF/YDY e NHS/CxxPN (onde X é qualquer aminoácido).

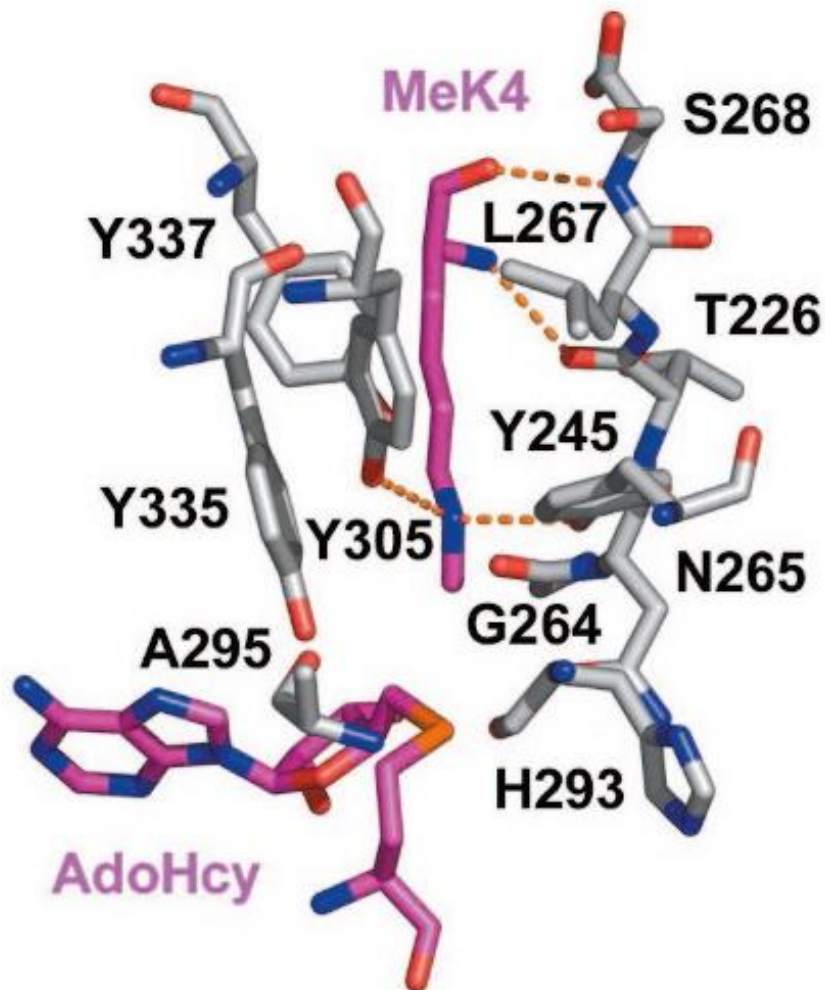
Nos mamíferos cujas estruturas foram obtidas, o domínio SET é flanqueado pelas sequências pré-SET (ou nSET) e pós-SET (ou cSET). A região pré-SET ajuda a manter a estabilidade estrutural, interagindo com diferentes superfícies do domínio SET principal (TRIEVEL et al., 2002; WILSON et al., 2002). No domínio pós-SET faz parte do site ativo, tendo um resíduo aromático responsável por compactar o domínio SET principal construindo um canal hidrofóbico (ZHANG et al., 2002).

Vários mecanismos para a metilação da Lisina foram discutidos na literatura, mas não houve um consenso na compreensão do mecanismo catalítico. As estruturas até agora desvendadas apoiam a noção de que a transferência do grupo metila do SAM para o ϵ -amino da Lisina alvo provavelmente se dá através de um ataque nucleofílico S_N2 , e esse mecanismo ganhou força usando um estudo teórico recente com a proteína SET7/9 (HU; ZHANG, 2006; XIAO; WILSON; GAMBLIN, 2003).

Embora se acredite que apenas um resíduo desprotonado que contém um par de elétrons livre seja capaz de atacar nucleofilicamente o grupo metil da molécula SAM, o primeiro mecanismo está relacionado às ligações de hidrogênio formadas no site ativo do domínio SET (TRIEVEL et al., 2003).

A ligação de hidrogênio entre o carbono do grupo δ -metil e vários grupos carbonila da cadeia principal e o hidroxil do resíduo de Tirosina próximo podem aumentar o caráter eletrofílico do grupo δ -metil do SAM e assim facilitar a transferência (Figura 6). Entretanto, a interação entre o carbono e o oxigênio não é observado em alguns domínios SET visto que os resíduos ao redor do sítio ativo não são absolutamente conservados (QIAN; ZHOU, 2006).

Figura 6: resíduos presentes no sítio ativo que apresentam interações com a molécula de SAM e com a Lisina 9 metilada para a proteína SET7/9. As tirosinas Y245 e Y305 são responsáveis por facilitar a transferência do grupo metil.



Fonte: (DILLON et al., 2005)

O segundo mecanismo é de uma catálise básica, onde um resíduo do sítio ativo desprotona a Lisina da histona antes da transferência do grupo metila; porém, a evidência de suporte para esse mecanismo não é conclusiva. Por exemplo, o único resíduo de Tirosina no domínio SET7/9 (TYR 335) ou TYR 283 no domínio SET Dim-

5 que poderiam atuar como base para a desprotonação da Lisina é separado do grupo ϵ -aminônio da Lisina em mais de 3 ou 4 Å nas estruturas experimentais (TAYLOR et al., 2003; ZHANG et al., 2003). Uma característica da estrutura do domínio SET que é consistente com esse mecanismo catalítico proposto é que a Lisina alvo pode perder um próton para o solvente, pois a sequência C-terminal do domínio SET é flexível e pode expor a Lisina alvo ao solvente (XIAO et al., 2005).

Os dados experimentais relacionados a metilação da Lisina 9 na histona 3 apresentado por Wu e colaboradores em 2010, mostra que a proteína G9a apresenta um K_{cat} de $65 \pm 5 \text{ min}^{-1}$, o qual a partir da teoria do estado de transição pode ser convertido para encontrar a barreira de ativação para a reação que é de aproximadamente $17,4 \pm 0,04 \text{ Kcal/mol}$ (WU et al., 2010). Para a transferência do próton, esta não é a reação determinante e tem uma barreira de ativação aproximadamente de 8.4 Kcal/mol para a proteína SET7/9 que é responsável pela reação de metilação da Lisina 4 na histona 3, além de ser um processo exotérmico com energia livre de $-18,5 \text{ Kcal/mol}$ (ZHANG; BRUICE, 2007), sendo uma análoga da G9a, esta barreira é mais de 11 Kcal/mol menor que a barreira da metilação que para esta proteína é de $20,9 \text{ Kcal/mol}$ (HU; WANG; ZHANG, 2008)

3.5 Química computacional

A química computacional começou a surgir no século XIX com a formulação da teoria da mecânica estatística por Ludwig Eduard Boltzmann. Essa teoria utiliza o comportamento e as interações dos átomos de modo individual ou em moléculas para descrever ou prever determinados fenômenos macroscópicos. A teoria de Boltzmann foi posteriormente utilizada para descrever a equação para os gases ideais, $PV=nRT$, a qual continua sendo um dos fundamentos para os cálculos de simulação molecular de átomos e moléculas. Porém, somente no século XX foram desenvolvidas as teorias necessárias para modelar a interação dos átomos entre si devido ao advento da mecânica quântica. Neste contexto, Max Planck sugeriu que o espectro de emissão era quantificado e não simplesmente perdido em emissões de alta frequência como era descrito pelos modelos clássicos existentes até este momento, levando assim a uma melhor correlação entre os dados experimentais e os obtidos pelas simulações,

melhorando drasticamente o entendimento sobre a mecânica quântica e a influência desta nos sistemas macromoleculares (JENSEN, 1999; LIPKOWITZ; BOYD, 1991).

3.6 Mecânica Estatística

A mecânica estatística foi desenvolvida e é utilizada para prever o comportamento de macromoléculas, descritas mais comumente utilizando o número de Avogadro ($6,022 \times 10^{23}$ átomos), criando-se a ideia de ensemble (MCQUARRIE, 1973). Quando se considera um sistema com um número N de partículas (Onde N é o número de magnitude relacionado com o número de Avogadro) este sistema possui um grau de liberdade igual a $6N$, o qual está relacionado às posições espaciais de cada átomo no espaço tridimensional. Este espaço é relacionado ao espaço de fase e apresenta restrições termodinâmicas, dentre as quais podemos destacar como exemplo o volume ou a energia, os quais representam um ensemble (MCQUARRIE, 1973). A relação entre o ensemble e as medidas experimentais foi primeiramente realizada por Josiah Gibbs. Podemos calcular a média do ensemble conhecendo a probabilidade de encontrar um membro deste ensemble em um conjunto de propriedades através da equação 2.1.

$$\langle A \rangle = \frac{\sum_a W_a A_a}{\sum_a W_a} = \sum_a P_a A_a \quad (2.1)$$

Para a equação 2.1, o W_a é o número de estados do ensemble com o mesmo valor de A . O P_a é a probabilidade normalizada para o estado, sendo o $\sum_a W_a$ é o fator de normalização da equação (MCQUARRIE, 1973).

O *ensemble* mais comumente utilizado nas simulações é chamado de “ensemble canônico”, o qual restringe cada membro com o mesmo número de partículas, volume e temperatura (NVT). Os outros ensembles que são utilizados são o microcanônico (NVE), o grande canônico (μ VT), e o isobárico-isotérmico (NPT), sendo E a energia constante, μ o potencial químico e P a pressão. Em determinadas

temperaturas e densidades os ensembles são matematicamente equivalentes, podendo-se utilizar o modelo mais conveniente para o sistema (MCQUARRIE, 1973).

3.7 Mecânica Molecular

A mecânica molecular é principalmente utilizada para sistemas que apresentam um grande número de átomos, ou seja, esta técnica é utilizada como forma de poder calcular com determinada precisão sistemas grandes, apresentando um menor custo computacional e arquivos de tamanho relativamente menor. Os métodos oriundos da mecânica molecular utilizam funções do potencial da molécula para descrever as interações intramoleculares. Este ganho de performance é devido ao fato de que os métodos moleculares não resolvem diretamente as equações de Schroedinger, sendo necessário assim a adição de parâmetros predefinidos ao sistema de interesse, os quais são definidos como campos de força (LIPKOWITZ; BOYD, 1991).

3.7.1 Campos de força

Os campos de força apresentam uma grande quantidade de parâmetros, sendo os mais comuns os parâmetros de ligação, ângulo, torções e interações entre átomos. Tais parâmetros são considerados partículas individuais com parâmetros pré-definidos (JENSEN, 1999).

3.7.2 Ligações

As ligações são normalmente tratadas de dois modos distintos nos campos de força. Pode-se utilizar a série de Taylor, a qual relaciona a ligação entre átomos como um simples oscilador harmônico que obedece ao potencial descrito na equação 2.2, onde \vec{x}_{eq} é o comprimento de ligação (LIPKOWITZ; BOYD, 1991).

$$U(\vec{x}) = \frac{1}{2}k(\vec{x} - \vec{x}_{eq}) \quad (2.2)$$

O outro modo que é normalmente utilizado para descrever as ligações químicas é o potencial de Morse (KOŁOS; WOLNIEWICZ, 1964). Tal modelo tem como principal vantagem o fato de poder calcular a dissociação atômica, o que não se pode obter na

série de Taylor. O potencial de Morse é mostrado na equação 2.3 e o termo relacionado a dissociação atômica e representado por $D_{\vec{x}}$.

$$U(\vec{x}) = D_{\vec{x}}[1 - e^{\alpha_{\vec{x}}(\vec{x} - \vec{x}_{eq})}]^2 \quad (2.3)$$

3.7.3 Ângulos

Os ângulos de átomos separados por duas ligações são chamados de ângulos de valência (θ). São tratados e comportam-se como osciladores harmônicos simples quando estão na sua fase de equilíbrio e assim são podem ser descritos como uma função de potencial quadrático, como mostrado na equação 2.4 (LIPKOWITZ; BOYD, 1991).

$$U(\vec{\theta}) = \frac{1}{2}k(\vec{\theta} - \vec{\theta}_{eq})^2 \quad (2.4)$$

3.7.4 Torções

As torções, assim como os ângulos, são baseadas nas ligações entre átomo. Uma torção e formada entre quatro átomos conectados por três ligações consecutivas. O ângulo de torção (ϕ) é formado entre a ligação central, ou seja, entre o segundo e o terceiro átomo da sequência. A série de Fourier é mais adequada para descrever os potenciais de uma torção, visto que esta apresenta funções de base periódicas. A equação para as torções é descrita na equação 2.5 (KOŁOS; WOLNIEWICZ, 1964; LIPKOWITZ; BOYD, 1991).

$$U(\vec{\phi}) = \sum_i^N k_i [1 + \cos(n_i \phi + \psi_i)] \quad (2.5)$$

O potencial de torção é representado como o somatório de N termos com barreiras k_i , periodicidade N e um desvio de fase igual a ψ_i . Estes são parâmetros de destaque dentro da equação pois a torção é o parâmetro que apresenta maior importância dentro de um campo de força. As torções apresentam uma menor barreira

energética no sistema, além de originar uma grande variedade de mudanças conformacionais significativas na proteína.

3.7.5 Interações eletrostáticas

As interações eletrostáticas são originadas a partir das interações carga-carga entre os átomos do sistema. Estas cargas são comumente relacionadas a eletronegatividade dos átomos, tendo assim um modo de cálculo de carga baseado em cada campo de força. Outro método utilizado para a determinação das cargas atômicas é atribuir cargas parciais a cada átomo, quando estas cargas já foram previamente calculadas e adicionadas ao banco de dados. Também são utilizados restrições rotacionais para garantir que átomos com mesmo perfil (ligados ao mesmo átomo) tenham a mesma carga; tal método é conhecido como potencial eletrostático contido (*Restrained Electrostatic Potential-RESP*) (BAYLY et al., 1993; CORNELL et al., 1993).

As interações carga-carga apresentam dois principais modelos que são utilizados nos campos de força atuais: o modelo carga-fixa e o modelo polarizado. O modelo de carga fixa é o mais utilizado pois mantém todas as cargas dos átomos constantes independentemente do seu entorno e das simulações, reduzindo assim o custo computacional. Por outro lado, o modelo polarizado apresenta uma variação de cargas para os átomos de acordo com a sua vizinhança, tornando-o assim um modelo mais flexível à parametrização, porém com um grau de complexidade maior o qual eleva o custo computacional. A equação 2.6 mostra como é definido o potencial eletrostático, sendo k a constante eletrostática, q_1 e q_2 as cargas parciais dos átomos e $r_{i,j}$ a distância entre os átomos (JENSEN, 1999; LIPKOWITZ; BOYD, 1991).

$$U(r_{i,j}) = k \frac{q_i q_j}{r_{i,j}} \quad (2.6)$$

3.7.6 Interações de Van de Waals

As interações de Van de Waals são compostas por dois componentes principais, um termo repulsivo que é referente aos impedimentos histéricos e um termo atrativo que se refere às interações de dispersão. Assim, o modelo funcional mais utilizado para descrever as interações de Van de Waals é o potencial de Leannard-

Jones, mostrado na equação 2.7 (JENSEN, 1999; LIPKOWITZ; BOYD, 1991; RAMACHANDRAN; DEEPA; NAMBOORI, 2008a).

$$U_{Lj} = (r_{ij}) = 4\varepsilon_{ij} \left[\frac{1}{4} \left(\frac{R_{min,ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \frac{1}{2} \left(\frac{R_{min,ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (2.7)$$

Onde r_{ij} é a distância entre os átomos i e j , porem devido a sua eficiência computacional, a equação 2.7 pode ser escrita como

$$U_{Lj} = \frac{a_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{b_{ij}}{r_j^6}$$

Onde

$$R_{min,ij} = 2^{1/6} \sigma_{ij}$$

$$a_{ij} = \varepsilon_{ij} R_{min,ij}^{12}$$

$$b_{ij} = 2\varepsilon_{ij} R_{min,ij}^6$$

3.8 Mecânica Quântica

A mecânica quântica foi desenvolvida com o objetivo de explicar a dualidade da matéria, semelhante as ondas, em sistemas atômicos. Assim, a função de onda (Ψ) é o principal postulado para a mecânica quântica. A função de onda está relacionada a qualquer sistema químico que determinadas funções atuam sobre a função de onda e retornam assim propriedades observáveis. Esta relação pode ser observada pela equação 2.8 (BARREIRO; FRAGA, 2015; RAMACHANDRAN; DEEPA; NAMBOORI, 2008a).

$$\partial\Psi = e\Psi \quad (2.8)$$

Onde o operador é determinado pelo \mathfrak{H} enquanto o valor escalar da propriedade é dada por e . Assim, para obter o operador que retorna o valor de energia do sistema, podemos reescrever a equação substituindo o \mathfrak{H} por H , obtendo assim o operador Hamiltoniano.

$$H\Psi = E\Psi \quad (2.9)$$

Esta nova equação é chamada de equação de Schrödinger (SCHRÖDINGER, 1926). Nesta equação o hamiltoniano é definido através da contribuição de cinco diferentes parâmetros que se relacionam com a energia total do sistema: a energia cinética (dos eletros e dos núcleos) a atração dos elétrons com os núcleos, a repulsão intranucleares e intraeletrônicos. Ao levar em consideração esses termos, podemos escrever o Hamiltoniano como descrito na equação 2.10.

$$H = -\sum_i \frac{\hbar^2}{2m_e} \nabla_i^2 - \sum_k \frac{\hbar^2}{2m_k} \nabla_k^2 - \sum_i \sum_k \frac{e^2 Z_k}{r_{ik}} - \sum_{i<j} \frac{e^2}{r_{ij}} - \sum_{i<l} \frac{e^2 Z_k Z_l}{r_{kl}} \quad (2.10)$$

Nesta equação, os elementos i e j representam dois elétrons enquanto k e l representam dois prótons, \hbar é a constante de Planck dividida por 2π , a massa do elétron é denominada de m_e , a massa do próton e denominada de m_k , ∇^2 representa o operador laplaciano (isto é, a carga do elétron), Z é o número atômico e r_{ik} é relativo à distância entre as partículas i e k . Como a função de onda é uma função espacial em direções cartesianas x , y e z , podemos escrever o laplaciano em função das coordenadas de cada partícula do sistema, sendo escrito como:

$$\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial x_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial y_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial z_i^2} \quad (2.11)$$

Assim, podemos reescrever a equação 2.9 utilizando as coordenadas cartesianas para a energia do sistema.

$$E\Psi(\vec{x}, t) = \hat{H}\Psi(\vec{x}) = \left(-\frac{\hbar^2}{2m}\nabla^2 + V(\vec{x})\right)\Psi(\vec{x}) \quad (2.12)$$

Nesta equação E é a energia total do sistema, $\Psi(\vec{x}, t)$ é a função de onda a qual apresenta todas as propriedades e informações do sistema e \hat{H} é o operador hamiltoniano. A equação descrita representa o valor para o estado estacionário do sistema, porem a utilização da função de onda torna a resolução da equação mais difícil à medida que novas partículas são adicionadas ao sistema.

3.9 Métodos Híbridos

Os métodos híbridos, são comumente conhecidos como QM/MM, isto é, o método utiliza tanto as abordagens quânticas quanto as abordagens clássicas ao mesmo tempo e isto é feito para que as deficiências de uma possam ser compensadas com a outra. Neste método, a parte quântica é restrita ao sitio ativo ou a reação que se deseja estudar dentro de uma macromolécula, como as proteínas, enquanto o resto do sistema é tratado de modo clássico e assim obtém-se uma velocidade de cálculo maior enquanto se obtém um resultado mais preciso para a reação. Esta teoria foi efetivamente posta em pratica pela primeira vez por Warshell e Levitt com a introdução de dois modos diferentes de cálculos os quais utilizam uma equação que relaciona a energia dos dois estados, sendo assim utilizado um novo modo hamiltoniano, como na equação 2.13. (WARSHEL; LEVITT, 1976).

$$H_{eff} = H_{QM} + H_{MM} + H_{QM/MM} \quad (2.13)$$

Os métodos QM/MM são definidos e distintos no modo como o hamiltoniano da região hibrida ($H_{(QM/MM)}$) é descrita. Se este termo é definido de modo clássico então

este termo é denominado de acoplamento mecânico, de outro lado, se o termo for definido em modo quântico então temos o acoplamento eletrostático.

O acoplamento mecânico é o mais fácil de ser implementado, porém este método apresenta limitações quanto as interações entre a parte clássica e a quântica, o que pode em alguns casos gerar problemas para o sistema, pois a fronteira entre as regiões está sendo tratado de modo clássico visto que os átomos são tratados como esferas rígidas. O acoplamento eletrostático, por outro lado, cria uma polarização na região de fronteira, favorecendo assim as interações entre as regiões, porém isto acaba por elevar o custo computacional para a resolução do sistema (BARREIRO; FRAGA, 2015).

Outra divisão que existe nos métodos QM/MM é feita de acordo com a região de corte do sistema, que pode ser feito de dois modos distintos. O primeiro modo de realizar o corte é em regiões de baixa densidade eletrônica, isolando assim uma molécula toda ou grandes partes da molécula. O segundo modo de corte do sistema é quando o corte é realizado em regiões de alta densidade eletrônica, ou seja, quando o corte ocorre em uma ligação, deixando assim orbitais de valência na molécula (BARREIRO; FRAGA, 2015; JENSEN, 1999).

Estes métodos permitem que processos de formação e quebra de ligações químicas possam ser modeladas, o qual pode incluir o tratamento de sistemas muito maiores do que aqueles que seriam possíveis utilizando apenas os métodos quânticos ou que não possuam parametrizações parciais ou totais (GAO et al., 2006; SENN; THIEL, 2009). Este método é realizado definindo a uma região central, aqueles de interesse para a reação, são definidos com os métodos QM enquanto no restante do sistema é utilizado o MM

3.9.1 Moléculas inteiras na região quântica

Esta metodologia considera apenas as interações mais fracas que são mais facilmente modeladas utilizando sistemas clássicos ou semiclássicos. Uma aproximação realizada para esta metodologia consiste de considerar todo o soluto como região quântica, enquanto o solvente se torna a região clássica, deste modo, a região de fronteira é constituída apenas de soluto; assim a interação entre o soluto e

o solvente pode ser descrito pela equação 2.14 e é composta apenas de interações intermoleculares.

$$H_{QM/MM} = \sum_a \sum_b 4\epsilon_{ab} \left[\left(\frac{\sigma_{ab}}{r_{ab}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ab}}{r_{ab}} \right)^6 \right] + \sum_a \sum_b \frac{q_a q_b}{r_{ab}} \quad (2.14)$$

Nesta equação o termo a é relacionado ao soluto, ou seja, a região QM; o termo b é relacionado ao solvente, neste caso, ao solvente ou região MM; o termo q_a é relacionado às cargas parciais do soluto; esta carga é calculada com níveis quânticos. Este método foi implementado por Kaminski e Jorgensen (KAMINSKI; JORGENSEN, 1998). Porém, este é um método computacional de alto custo, pois é necessária a realização de cálculos quânticos para todo o sistema a cada mudança conformacional do sistema ou do soluto, o que gera uma demanda de cálculos muito elevada.

3.9.2 Cortando ligações químicas

Este método, apesar de ser mais complexo de ser realizado, é muitas vezes a única solução possível para se chegar a uma resolução do problema. Por exemplo, quando se quer estudar uma reação química, porém não é possível definir toda a proteína como região quântica, torna-se necessário realizar um corte, onde parte será tratado de forma quântica e o restante será tratado de forma clássica.

Esta região onde é feito o corte acaba por gerar duas dificuldades extras, que são onde realizar o corte e como fazer a interação quântico-clássico. Por este modo, a escolha de corte muitas vezes é realizada entre carbonos com ligações simples ou entre moléculas pouco polares.

3.9.3 Métodos semi-empíricos

A primeira vez que o termo semi-empíricos foi utilizado na química teórica foi em 1931 por Michael Polanyi e Henry Eyring. Esta abordagem tinha como objetivo a utilização mesclada de métodos teóricos e experimentais para o desenvolvimento de superfícies de energia potencial para reações químicas, o que contribuiu também para um melhor estudo dos estados de transição e complexos ativados nas reações adiabáticas (EYRING, 1931). Posteriormente, métodos mais modernos foram criados

com o objetivo de reduzir o tempo computacional em tratamentos como as propriedades cinéticas, termodinâmicas, cálculos de energia potencial, entre outros (THIEL, 1996). O método semi-empírico é utilizado em várias situações, porém em três delas esta técnica acaba por se desacatar: para cálculos de moléculas pequenas, porém em grande quantidade; para cálculos repetidos de um mesmo tipo de sistema; e por último, para cálculos de moléculas grandes onde não é possível utilizar o método quântico.

3.9.3.1 AM1

Após o advento do método semi-empírico buscou-se o aperfeiçoamento dos métodos, até que em 1985 surgiu o método AM1 (Austin Model 1) que trouxe como inovação a inclusão de funções gaussianas esféricas (DEWAR et al., 1985). O método AM1 foi desenvolvido depois com o objetivo de corrigir erros presentes no método MNDO em estimar as repulsões dos átomos de carbono alfa nas Distâncias de Van der Waals. Para corrigir este problema, novos termos foram adicionados usando funções gaussianas. Neste contexto, o formalismo utilizado para o método AM1 é igual ao utilizado no método a qual este é derivado (MNDO) porém com diferenças apenas nos novos parâmetros de repulsão citados anteriormente.

Esta nova parametrização resulta em uma melhora no método na determinação dos mínimos de energia, e na determinação das barreiras de energia visto que os novos expoentes orbitais têm grande impacto nesta determinação, sobretudo os parâmetros relacionados as camadas s e p. Esta nova parametrização elevou o número e parâmetros de cada átomo de 7 para 13 ou 16 no AM1. Esta melhora no método comparado com o MNDO se deu sem um aumento no tempo computacional e reduziu falhas específicas e o erro médio. Um dos principais pontos do método AM1 é a capacidade de reproduzir ligações de hidrogênio e as melhoras na estimativa das barreiras de energias de ativação. Estes termos levam uma melhora nas interações intermoleculares e isto leva a um melhor uso deste método para aplicações biológicas (DEWAR et al., 1985; LOPEZ, 2003; STEWART, 2007).

3.9.3.2 PM3

O método PM3 (método paramétrico 3) é a terceira parametrização do método MNDO e utilizando uma estratégia de parametrização distinta do seu original e do AM1, além de usar duas funções gaussianas que servem para corrigir as repulsões núcleo-núcleo dos sistemas e o ajuste dos parâmetros se deu baseando-se em reproduzir os resultados experimentais. Assim, este método acaba sendo mais rápido que o MNDO a qual é baseado e que o método AM1 que foi a segunda parametrização. Inicialmente o PM3 foi parametrizado para 12 elementos mais utilizados em sistemas químicos e sendo assim apropriado para o estudo destes sistemas (CHRISTENSEN et al., 2016; STEWART, 1989).

O método PM3 apresenta um formalismo na parte eletrônica igual ao método MNDO que se baseia em negligenciar a aproximação diatômica e a sua sobreposição, exceto para as repulsões núcleo-núcleo onde as funções gaussianas adicionadas reduzem essa repulsão em regiões fora das Distâncias de ligação e por reproduzir um grande número de propriedades moleculares, o que acaba por melhorar o modo como as interações intramoleculares são descritas. Estes termos não apresentem um significado físico bem definido, porém permitem as melhorias no método principalmente para aplicações em sistemas biológicos pois permitem uma melhor descrição das ligações de hidrogênio e das reações de transferência de prótons. Entretanto, esta parametrização resulta em problemas quando analisa-se as interações intermoleculares ou moléculas muito flexíveis. O método PM3 tem uma melhor precisão que o AM1 quando se trata de prever características termoquímicas das moléculas e é utilizado para estimar as propriedades moleculares (LOPEZ; YORK, 2003; RAMACHANDRAN; DEEPA; NAMBOORI, 2008b).

3.9.3.3 PM6

O método PM6 (método paramétrico 6) desenvolvido em 2007 apresenta a maioria dos parâmetros de aproximação idênticos aos do PM3, entretanto apresenta diferenças nas interações Core-Core, d-orbitais em elementos do grupo principal, núcleo não polarizável, correções individuais Core-Core e pirimidização do nitrogênio SP². O PM6 apresenta parâmetros para um total de 70 átomos. Este método foi

desenvolvido principalmente com mudanças nos grupos de treinamento para a otimização dos parâmetros, tendo poucas mudanças nas aproximações usadas em métodos anteriores. Com este método de treinamento, o PM6 consegue definir as informações químicas como uma função que não envolve uma molécula única, enquanto os outros métodos o grupo de treinamento usava apenas dados de referência padrão. O método PM6 apresentou uma melhoria na precisão quando comparado com os métodos anteriores baseados no NDDO. A exatidão do PM6 em prever o calor de formação de moléculas bioquímicas é dito como melhor do que os previstos usando Hartree Fock ou B3LYP DFT com a base 6-31G (d) (STEWART, 2007).

O PM6 baseia-se no formalismo NDDO, porém com as seguintes modificações comparados com o PM3:

- 1- Os orbitais d para os metais e átomos hipervalentes como CL, S ou P;
- 2- Uma função de erro diferente foi minimizada para reproduzir os valores do calor de formação;
- 3- Os dados usados como referência foram baseados em resultados experimentais e cálculos de alto nível;
- 4- A função utilizada para descrever as interações núcleo-núcleo foi modificada de acordo com obrigações específicas;
- 5- A função utilizada para descrever a repulsão do núcleo-núcleo usa parâmetros diatômicos e uma função simples baseada no primeiro termo do potencial de Lennard-Jones;
- 6- A parametrização foi realizada para 70 átomos na tabela periódica.

Outra modificação realizada no PM6 foi a introdução de várias melhorias nos termos Core-Core substituindo as correções do núcleo-núcleo de funções gaussianas usadas no PM3 para um termo da correção do núcleo-núcleo introduzido originalmente por Voityuk e por Rösch, que utiliza parâmetros emparelhados e parâmetros específicos para cada elemento sendo entre 10 a 20 parâmetros para cada elemento (CHRISTENSEN et al., 2016; LIMA et al., 2018).

3.9.3.4 AM1/d

O método AM1/d foi desenvolvido para descrever o ataque nucleofílico de fosfatos em reações biológicas, como as hidrolises de fosfato. Para isto os parâmetros foram desenvolvidos a partir da derivação de um conjunto de dados quânticos que foram calculados utilizando a teoria de funcionalidade de densidade híbrida [B3LYP / 6-311 ++ G (3df, 2p) // B3LYP / 6-31 ++ G (d, p)] para vários estados, cargas e estados de transição do ataque nucleofílico de fosfatos e fosforanos. Além disto, também foram utilizados métodos de otimização não-linear para o desenvolvimento dos parâmetros semi-empíricos baseados nos algoritmos evolutivos (genéticos), simulação simulada de Monte Carlo e algoritmos de minimização de direção. Deste modo o modelo AM1/d apresentou resultados que são comparados com os obtidos utilizando o método de densidade funcional oferecendo assim uma boa ferramenta para o estudo de reações e problemas biológicos em larga escala (LOPEZ, 2003).

O hamiltoniano utilizado no método AM1/d foi desenvolvido se afastando do formalismo encontrado no MNDO/d e utiliza termos núcleo-núcleo como os encontrados no AM1 e no PM3. Os parâmetros específicos de reação desenvolvidos para este método conseguem reproduzir as geometrias, momentos de dipolo e energias relativas com precisão que são obtidos de banco de dados quânticos onde se encontram os estados de transição e estruturas com mínimo de energia estáveis (LOPEZ, 2003).

Deste modo, o método AM1/d é adequado para se calcular sistemas grandes e com precisão com um baixo custo computacional onde os orbitais d recebem um tratamento balanceado em reações com formação de sistemas penta valentes e tetravalentes de fósforo e quando o fosfato está nos três estados de carga (dianiônico, monoaniônico e neutro) (LOPEZ, 2003).

3.9.3.5 RM1

O modelo RM1 (Recife Model 1) é uma nova parametrização do método AM1 onde as propriedades parametrizadas para este método foram os calores de

formação, momento de dipolo, potencial de ionização e geometrias. O modelo de treinamento utilizado para este método contém os átomos de C, H, N, O, P, S, F, Cl, Br e I que representam os átomos mais comumente utilizados para as pesquisas farmacêuticas e todos os 191 parâmetros foram otimizados assim como acontece no PM3. Esta otimização inclui as integrais de repulsão de elétrons que foram removidas dos dados experimentais no AM1 e as Distâncias interatômicas que foram revistas no método RM1 através de uma regressão linear dos mínimos quadrados entre os valores do RM1 e os valores de Distâncias interatômicas encontradas nos valores de referência. Uma das principais vantagens do RM1 é que este possui o mesmo número de parâmetros e a construção analítica de cada átomo semelhantes ao encontrado no AM1, sendo assim fácil de implementar o RM1 nos programas que já apresentam o AM1, sendo necessário apenas modificar os valores dos parâmetros em si. Estas mudanças permitiram uma melhoria na precisão do método até quando comparado com o método PM3 (ROCHA et al., 2006).

O método RM1 consegue reproduzir diversas propriedades experimentais como a entalpia de formação, o momento dipolo, as cargas eletrônicas, os potenciais de ionização, o comprimento e os ângulos de ligação. O método RM1 passou por diversas melhorias que expandiram o escopo deste método levando a uma ampla gama de aplicações para química orgânica, química física, química analítica, química inorgânica, medicina, biologia e ciência dos materiais (LIMA et al., 2018).

3.10 Teoria do Estado de Transição

A teoria do estado de transição é utilizada para explicar as taxas de reação de reações químicas elementares. Esta teoria assume um tipo especial de equilíbrio químico (que pode ser denominado de quasi-equilíbrio) entre os reagentes e os estados de transição ativados (MCNAUGHT; WILKINSON, 1997). Essa teoria foi desenvolvida em 1935 por Henry Eyring, Meredith Gwynne Evans e Michael Polanyi (LAIDLER; KING, 1998).

A teoria é utilizada principalmente para entender qualitativamente como as reações químicas ocorrem, esta teoria consegue calcular a entalpia padrão de ativação (ΔH^\ddagger , também escrito $\Delta^\ddagger H^\circ$), a entropia padrão de ativação (ΔS^\ddagger ou Δ^\ddagger

S^o) e a energia padrão de ativação de Gibbs (ΔG^\ddagger ou $\Delta^\ddagger G^\circ$) para uma reação específica (O \ddagger refere-se ao valor de interesse no estado de transição; ΔH^\ddagger é a diferença entre a entalpia do estado de transição e a dos reagentes.) (TRUHLAR et al., 1996).

A teoria do estado de transição, utilizando a equação de Eyring, consegue descrever e resolver os problemas parâmetros que não eram bem descritos na equação de Arrhenius, como quando existem um ou mais intermediários reativos (ANSLYN; DOUGHERTY, 2006).

Mesmo que a teoria do estado de transição possa ser usado em vários casos, está ainda apresenta falhas, principalmente quando aplicada a cada etapa de uma reação quando esta apresenta várias etapas, a teoria pressupõe que cada intermediário tenha um vida longa o suficiente para alcançar uma distribuição de energias de Boltzmann antes de assim continuar para a próxima etapa. Quando isto não acontece e os intermediários são de curta duração, o método falha em descrever a reação. Outra limitação da teoria, se baseia na suposição de que os núcleos se comportam de acordo com a mecânica clássica (EYRING, 1935). Assim, a menos que os átomos ou as moléculas colidam com energia suficiente para formar a estrutura de transição, a reação não irá ocorrer.

3.11 Superfície de Energia Potencial

O conceito de Superfície de Energia Potencial foi sugerido pela primeira vez em 1913 por Marcelin (LEWARS, 2011), entretanto, a primeira vez que um cálculo semi-empírico para o SEP foi calculado pela primeira vez por Eyring em 1931 (EYRING; M, 1931) e em 1935 (EYRING, 1935) foi calculado a taxa de reação usando a teoria do estado de transição.

Quando o átomo ligados quimicamente são distorcidos, as ligações são esticadas ou comprimidas, o que aumenta a energia potencial de seu sistema. Quando as novas geometrias são formadas, a molécula permanece estacionária. Portanto, a energia para este sistema não é gerada a partir da energia cinética, mas dependem da posição dos átomos (potencial). Assim, a relação entre essa energia

molecular e a geometria molecular (posição) é mapeada criando a superfície de energia potencial.

A aproximação de Born-oppenheimer é usada para separar os movimentos eletrônicos e nuclear. Esta aproximação é útil na análise de propriedades de estruturas compostas por átomos. A SEP normalmente tem a mesma dimensionalidade que o número de graus de liberdade da molécula ($3N-6$) onde N é o número de átomos e este tem que ser maior que 2.

A aproximação de Born-Oppenheimer utilizada na SEP, afirma que os núcleos de uma molécula apresentam o estado estacionários em comparação aos elétrons. Esta aproximação é importante pois simplifica a aplicação da equação de Schrodinger nas moléculas, tratando assim os núcleos de forma clássica. ("Potential Energy Surface", 2019).

A SEP pode definir a energia como uma função de uma ou mais coordenadas, onde se houver apenas uma coordenada, esta superfície é chamada de curva de energia potencial ou perfil de energia. Este método representa os conceitos de que a geometria dos átomos das moléculas em uma reação está associada a uma energia potencial característica.

A energia de um sistema de dois átomos é dependente da distância entre eles. Quando temos uma grande distância, a energia entre os átomos é zero, isto significa que não existe interação entre estes átomos. Na maioria das distancias presentes em um sistema, a energia atrativa é a predominante, exceto quando os átomos se aproximam muito, neste caso a força se torna repulsiva e isto aumenta a energia do sistema (LOWER, 2016).

3.12 Potencial de Força Média

Quando o objetivo do estudo é obter informações sobre reação ou a estrutura do estado de transição (TS) é necessário utilizar uma modelagem explícita da reação. Utilizando uma coordenada de reação apropriada, utilizar os métodos de cálculo de energia livre baseados em amostragem se torna uma alternativa para os estudos de processos de reação se os cálculos QM forem suficientemente rápidos. Tendo esse objetivo em mente, em 1935 Kirkwood desenvolveu o potencial de força média (PMF)

de $W(\xi)$ ao longo de alguma coordenada ξ (KIRKWOOD, 1935). Este método se tornou um conceito chave na teoria estatística moderna e é definido a partir da função de distribuição média:

$$W(\xi) = W(\xi^*) - K_B T \ln \left[\frac{\langle \rho(\xi) \rangle}{\langle \rho(\xi^*) \rangle} \right]$$

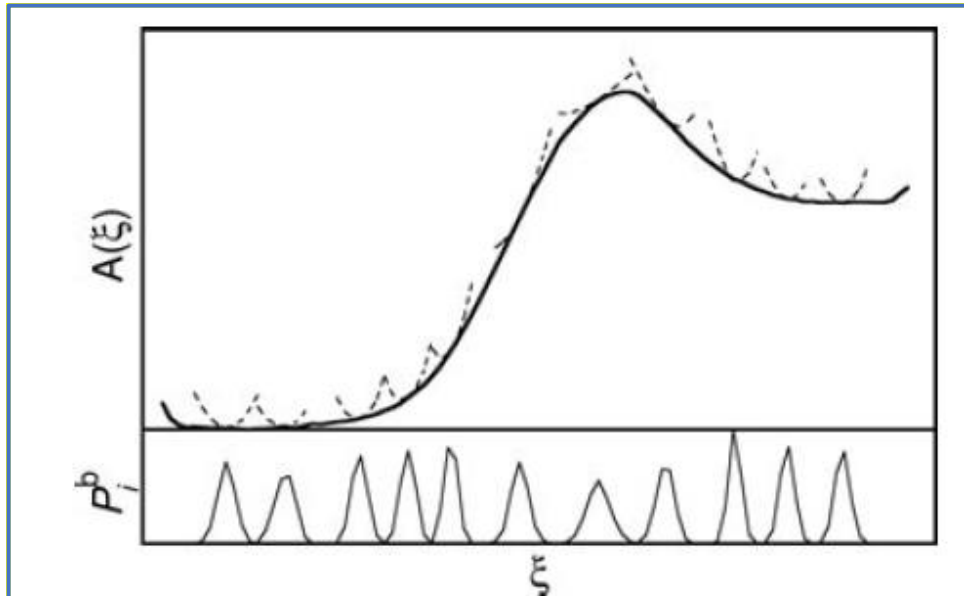
Onde ξ^* e $W(\xi^*)$ são as constantes arbitrárias. A função de distribuição média ao longo da coordenada ξ é obtida da média ponderada de Boltzmann:

$$\langle \rho(\xi) \rangle = \frac{\int d\mathbf{R} \delta(\xi'[\mathbf{R}] - \xi) e^{-\frac{U(\mathbf{R})}{K_B T}}}{\int d\mathbf{R} e^{-\frac{U(\mathbf{R})}{K_B T}}}$$

Onde, $U(\mathbf{R})$ é a energia total do sistema como função das coordenadas \mathbf{R} e o termo $\xi'[\mathbf{R}]$ é uma função que depende dos graus de liberdade presentes no sistema. Como, as propriedades presentes no equilíbrio conformacional ou a taxa de transição de processos dinâmicos podem ser expressas em termos da função $W(\xi)$, o PMF apresenta uma boa quantidade e qualidade para os estudos de sistemas macromoleculares.

Entretanto, nem sempre é possível ter a amostragem necessária para que o PMF possa ser empregado de modo eficaz, sendo assim, é necessário utilizar uma abordagem diferente, com uma amostragem mais aprimorada, este seria o método de *Umbrella Sampling* (US). Neste método, define-se uma coordenada de reação, que pode ser tanto um ângulo diedro, ângulo de ligação ou mesmo a distância entre dois átomos, onde restringe-se o sistema ao longo desta coordenada de reação usando uma série de potenciais harmônicos (Figura 7).

Figura 7: Energia livre global (curva sólida espessa) e as contribuições A_i de algumas das janelas (curvas tracejadas finas). Na parte inferior, as distribuições de polarização P_i obtidas da simulação são mostradas (curvas sólidas finas).



Os potenciais harmônicos são usados para restringir o sistema antes de calcular a energia livre final que pode ser feita usando o método de análise de histograma ponderado (WHAM, do inglês *Weighted Histogram Analysis Method*). Os resultados obtidos nas diferentes janelas durante a reação, são agrupados e a influência do potencial “guarda-chuva” é removida para que o PMF seja obtido.

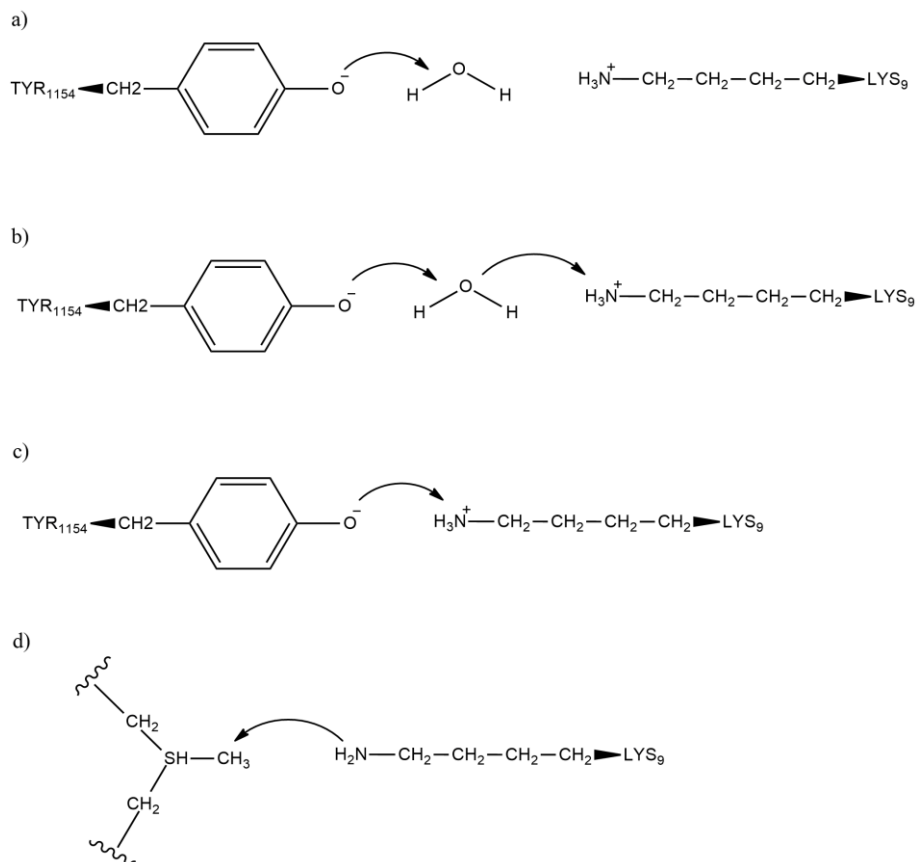
Deste modo, para calcular a energia livre de ativação ao longo da reação, cada sistema deve ser dividido em uma série de janelas ao longo da coordenada de reação e a amostragem obtida nessas janelas deve ser conseguida através de um potencial de polarização externo. Assim, a amostragem em cada janela deve ter uma sobreposição com janelas adjacentes para que o PMF possa ser reproduzido removendo-se o potencial de polarização. O potencial de polarização externo u_i na janela i é uma função harmônica $u_i = k_i(r - r_i)^2$, onde r_i é a posição de referência, e k_i é a constante de força harmônica.

4 METODOLOGIA

4.1 Reações

O estudo do mecanismo foi dividido em duas etapas. A primeira foi a identificação do modo de reação para a primeira reação, que é a desprotonação da Lisina 9, o qual poderia ser uma reação por etapas, sendo a primeira reação estudada a transferência do átomo de hidrogênio da água para a Tirosina 1154 como mostrado na Figura 8a ou uma reação onde a transferência ocorre simultaneamente entre a água e a Tirosina 1154 e da Lisina 9 para a água como mostrado na Figura 8b, a terceira reação estudada para esta transferência foi quando esta acontece de modo direto da Lisina 9 para a Tirosina 1154 como mostrado na Figura 8c. A Figura 8d mostra a reação de transferência do grupo metil da molécula de SAM para a Lisina 9.

Figura 8: Reação da transferência a) do Hidrogênio da água para a TYR1154, b) do Hidrogênio da LYS9 para a molécula de água e da água para a TYR 1154, c) do átomo de Hidrogênio da LYS9 para a TYR1154 e d) do metil da molécula de SAM para a LYS9



Para uma melhor descrição das reações e das coordenadas utilizadas, a reação de transferência do hidrogênio da água para a TYR1154 (Figura 8a) foi denominada de R1. A transferência LYS9 para água e da água para a TYR1154 (Figura 8b) foi chamada de R2. A reação de transferência do hidrogênio da LYS9 para a TYR1154 (Figura 8c) foi chamada de R3 e a reação de transferência do metil foi denominada de R4 (Figura 8d). Para as coordenadas, as reações R1 e R2 tiveram 4 coordenadas monitoradas: a distância do átomo de hidrogênio da molécula de água para o resíduo de Tirosina (H2-OH); a distância entre os átomos de hidrogênio e o oxigênio da própria água (H2-OH2); a distância entre o oxigênio da água e o hidrogênio da Lisina (OH2-HZ1) e a distância entre o hidrogênio e o nitrogênio na Lisina 9 (HZ1-NZ). Na reação R3, duas distâncias apenas foram monitoradas, a distância do Hidrogênio da LYS9 para o Oxigênio da TYR1154 (HZ1-OH) e a distância do hidrogênio para o Nitrogênio da LYS9 (HZ1-NZ). Na reação R4, duas distâncias apenas foram monitoradas a distância entre o carbono do grupo metil e o enxofre da molécula de SAM (CE-SD) e a distância entre o carbono do grupo metil e o nitrogênio da Lisina (CE-NZ).

4.2 Preparação do sistema

Para a realização dos cálculos das reações de transferência do hidrogênio e da metilação da Lisina 9 da histona H3 as estruturas do ligante e da proteína foram adquiridas no banco de dados PDB (*Protein Data Bank*) (BERMAN et al., 2002) onde a estrutura cristalografia da proteína G9a e encontra-se com o código 2O8J (WU et al., 2010). Nesta estrutura encontramos além da proteína que foi determinada utilizando a cristalografia de raio X com resolução de 1.8 Å, também encontramos o peptídeo referente a região de alça da histona H3 que sofre as modificações de metilação e/ou acetilação e a molécula de S-Adenosyl-L-Homocysteine (SAH) (WU et al., 2010).

A proteína G9a foi submetida ao cálculo de pKa no servidor PropKa (DOLINSKY et al., 2004), para obter os valores de protonação de cada resíduo de amino ácido, esta verificação é importante para a preparação das corretas

protonações de cada resíduo, principalmente daqueles na região próximas ao sítio ativo.

A molécula de SAM e a Tirosina desprotonada tiveram as suas cargas calculadas utilizando o programa gaussian09 (FRISCH et al., 2009) com método Hartree–Fock (HARTREE; HARTREE, 1935) e a base 6-31G*. Este cálculo foi usado posteriormente para gerar os parâmetros dos ligantes para os sistemas.

Para a obtenção dos sistemas para o programa pDynamo (FIELD, 2008) foi necessário obter os parâmetros para a proteína e para os ligantes de acordo com o campo de força CHARMM22 (MACKERELL et al., 1998; MACKERELL; FEIG; BROOKS, 2004) utilizando o servidor Charmm-Gui (BROOKS et al., 2009; JO et al., 2008; LEE et al., 2016). Durante a criação do sistema, o mesmo foi solvatado utilizando moléculas de água em uma caixa octaédrica com um raio de 12 Å a partir do centro de massa do sistema e contra íons para neutralizar as cargas do sistema.

A preparação do sistema para a realização do mecanismo no programa amber (CASE et al., 2018), foi realizado utilizando o pacote AMBERTOOLS18 (CASE et al., 2018). Os resultados obtidos com os cálculos de carga dos ligantes foram utilizados para a criação dos arquivos de biblioteca, contendo os parâmetros necessários para o cálculo, utilizando o campo de força gaff (WANG et al., 2004) no AMBERTOOLS18 e os arquivos com os parâmetros impróprios para os ligantes foram criados utilizando o antechamber (WANG et al., 2006). Os parâmetros criados foram para a molécula de SAM e para a Tirosina desprotonada, estes foram usados para a transferência do átomo de hidrogênio da LYS9 para a TYR1154. Para a transferência do grupo metil da molécula de SAM, foi usado os parâmetros desta molécula e o resíduo de Lisina foi denominado LYN, nomenclatura usada pelo campo de força Amber para a forma desprotonada deste resíduo. Com os arquivos de biblioteca dos ligantes, o sistema foi montado contendo os ligantes e a proteína, para isto o complexo foi criado utilizando os campos de força ff14SB (MAIER et al., 2015) para a proteína e o gaff para os ligantes, foi adicionado também os parâmetros criados pra os ligantes. Os átomos de hidrogênio foram então adicionados e o sistema foi solvatado utilizando moléculas de água do tipo TIP3P (JORGENSEN et al., 1983) em uma caixa octaédrica com um raio de 12 Å e contra íons foram adicionados para neutralizar as cargas do sistema.

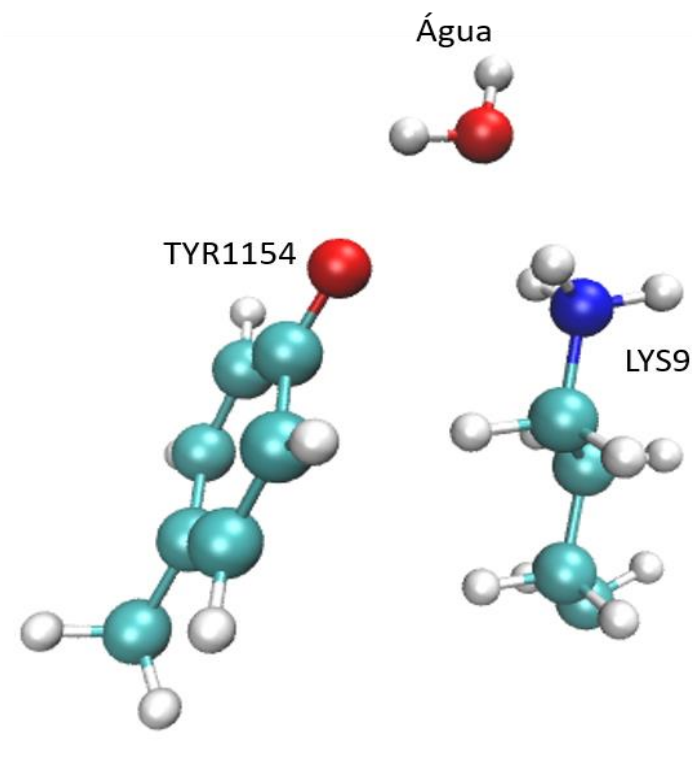
Ambos os sistemas já solvatados e neutralizados foram então minimizados em 3 etapas, onde as duas primeiras etapas foram realizadas com 10000 ciclos sendo 2000 com gradiente conjugado (HESTENES; STIEFEL, 1952), sendo a primeira minimizando apenas os hidrogênios, a segunda as águas e contra íons, a última minimização, para todos os átomos do sistema foi realizado com 10000 ciclos sendo 8000 com gradiente conjugado. Após a minimização, os sistemas foram então aquecidos de modo gradual até a temperatura de 300 K e equilibrado durante um tempo de 500 ps a volume constante, o raio de corte para as interações de longa distância foi de 10 Å.

4.3 SEP

Os cálculos com a técnica de SEP realizado no programa pDynamo foram feitos para todas as reações, o sistema inicial usado foi o gerado no servidor Charmm-gui. Para todos os sistemas uma força de $500 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ foi utilizada na coordenada de reação para forçar o movimento das coordenadas. As reações foram realizadas utilizando os métodos AM1, AM1D, PM3, PM6 e RM1

Na transferência do átomo de hidrogênio para a Tirosina o incremento entre os passos foi de $-0,05 \text{ \AA}$ e o raio de corte utilizado foi de 14 \AA e o sistema passou por uma etapa de minimização inicial usando 9000 passos. A região quântica para a transferência do hidrogênio foi a molécula de água, a Lisina 9 e a Tirosina 1154 (Figura 9).

Figura 9: Região definida como quântica para as reações de transferência do átomo de Hidrogênio usando o pDynamo.

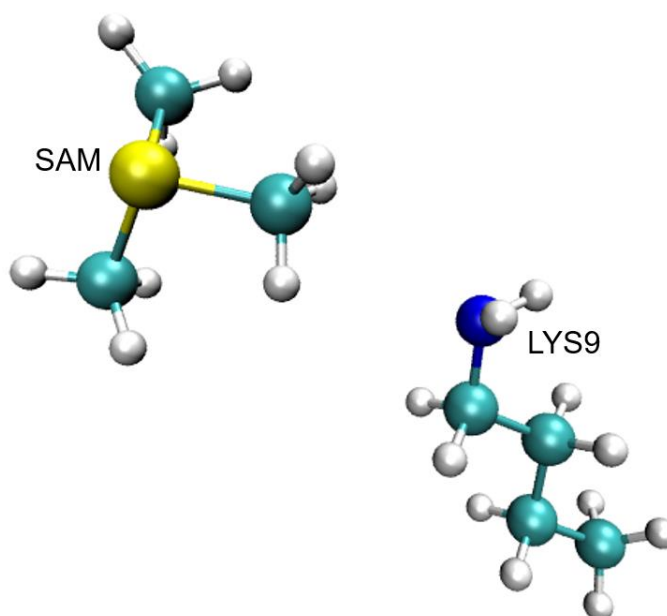


A reação de transferência do hidrogênio H2 da água para o oxigênio (OH) da Tirosina 1154 foi realizado com 50 passos de reação e a distância inicial entre a molécula de água e a Tirosina 9 foi definida em 3,4 Å e os hidrogênios do nitrogênio NZ da Lisina 9 foram fixados com uma força de $300 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$. Para a transferência do hidrogênio da Lisina 9 para a água enquanto ocorre a transferência da molécula da água para a Tirosina 1154 foi realizado um total de 2000 pontos, sendo 50 pontos na coordenada da água para a Tirosina com distância inicial de 3,4 Å e 40 pontos da Lisina 9 para a água com distância inicial de 2,0 Å. Para a transferência do hidrogênio direto da Lisina 9 para a Tirosina 1154 foi calculado 120 pontos (exceto o método AM1D que precisou só de 80 pontos), a distância inicial foi definida em 3,0 Å. Nestas reações, o átomo HZ3 foi selecionado como o hidrogênio a ser transferido, os outros hidrogênios foram fixados com uma força de $300 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ e uma distância de 1 Å.

No cálculo de reação da transferência do grupo metil da molécula de SAM para a Lisina 9, a distância inicial foi definida em 2,0 Å. Para esta reação a força utilizada na coordenada de reação foi de $500 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ e o incremento na coordenada de reação foi definida em -0,1 Å durante 50 passos, o raio de corte utilizado foi de 14 Å e

o sistema passou por uma etapa de minimização inicial usando 9000 passos. A região quântica utilizada para a transferência do grupo metil foi definida sendo a Lisina 9 e os átomos CE,SD,CG,C5' da molécula SAM (Figura 10).

Figura 10: Região definida como quântica para a transferência do grupo metil.



4.4 PMF

Os cálculos com a técnica de PMF realizado no programa pDynamo foram feitos para as reações de transferência do hidrogênio da Lisina 9 para a Tirosina 1154 e do metil da molécula de SAM para a Lisina 9, o sistema inicial usado foi o mesmo usado para o cálculo de SEP. Para todos os sistemas uma força de $500 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ foi utilizada na coordenada de reação. As reações foram realizadas utilizando os métodos AM1, AM1D, PM3, PM6 e RM1

Na transferência do átomo de hidrogênio para a Tirosina o incremento entre os passos foi de $-0,05 \text{ \AA}$ e o raio de corte utilizado foi de 14 \AA e o sistema passou por diversas etapa de minimização usando 9000 passos com os algoritmos *steepest descent* (HOLTZER, 1954) e gradiente conjugado, após o fim da minimização, o sistema foi aquecido até 300 K e posteriormente equilibrado durante 5 ps . Os dados de trajetória foram coletados em um período de 10 ps de dinâmica molecular . A região quântica para a transferência do hidrogênio foi a molécula de água, a Lisina 9 e a Tirosina 1154 (Figura 9).

Para a transferência do hidrogênio direto da Lisina 9 para a Tirosina 1154 foi calculado 80 pontos e a distância inicial foi definida em 2,2 Å. Nesta reação, o átomo HZ1 foi selecionado como o hidrogênio a ser transferido, os outros hidrogênios foram fixados com uma força de $300 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ e uma distância de 1 Å.

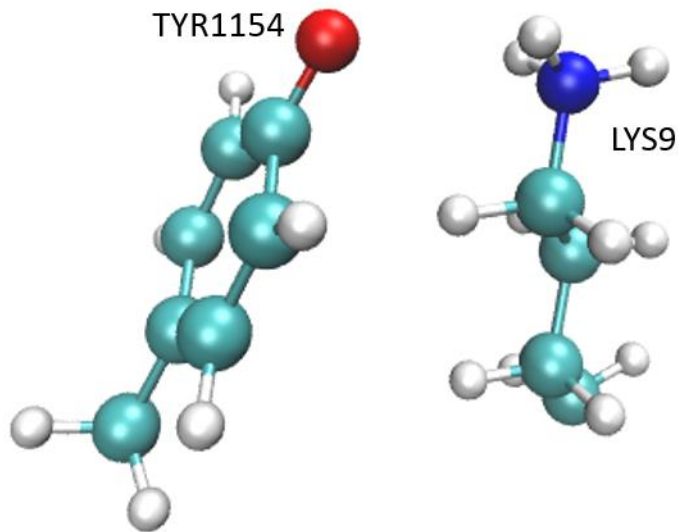
No cálculo de reação da transferência do grupo metil da molécula de SAM para a Lisina 9, a distância inicial foi definida em 2,0 Å. Para esta reação a força utilizada na coordenada de reação foi de $500 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ e o incremento na coordenada de reação foi definida em -0,1 Å durante 40 passos, o raio de corte utilizado foi de 14 Å e o sistema passou por diversas etapas de minimização usando 9000 passos com os algoritmos *steepest descent* e gradiente conjugado, o sistema foi então aquecido até 300 K e posteriormente equilibrado durante 5 ps. Os dados de trajetória foram coletados em um período de 10 ps de dinâmica molecular. A região quântica utilizada para a transferência do grupo metil foi definida sendo a Lisina 9 e os átomos CE,SD,CG,C5' da molécula SAM (Figura 10).

Os resultados foram analisados utilizando o método de análise de histograma ponderado utilizando o programa WHAM.(GROSSFIELD)

4.5 AMBER

A simulação da transferência do hidrogênio do resíduo de Lisina para a Tirosina foi realizada com um total de 80 passos onde o incremento em cada passo foi de 0.05 Å e a distância inicial foi determinada a -2,5 Å. Para cada passo desta reação, a temperatura foi definida em 300 K a pressão constante. Em cada um dos passos foi realizado 5000 passos de dinâmica molecular com um intervalo de tempo de 1 fs e as trajetórias foram escritas a cada 100 passos e região de corte de 12 Å. A região quântica foi definida envolvendo todo o resíduo de Lisina e da Tirosina (Figura 11), com a região de corte de 8 Å para a região quântica, e o algoritmo Shake (RYCKAERT; CICCOTTI; BERENDSEN, 1977) foi removido durante o cálculo QM/MM para estes átomos e os valores de distância e energia foram salvos a cada ponto. Cada reação foi realizada utilizando os métodos AM1, AM1/d, PM3, PM6 e RM1.

Figura 11: Região definida como quântica para a transferência do hidrogênio no programa AMBER18



Para a simulação do mecanismo da transferência do grupo de metil da molécula de SAM para o resíduo de Lisina, foram realizados 50 passos de reação com intervalo de -0.1 \AA onde a distância inicial foi de $2,5 \text{ \AA}$. Os parâmetros utilizados nesta reação foram os mesmos utilizados para a transferência do hidrogênio, a parte quântica definida para a reação de metilação foi a cadeia lateral da LYS9 e parte da molécula de SAM (átomos CE,SD,CG,C5') (Figura 10). Cada reação foi realizada utilizando os métodos AM1, AM1/d, PM3, PM6 e RM1.

Os resultados foram analisados utilizando o método de análise de histograma ponderado utilizando o programa WHAM

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho foram baseados considerando os valores de barreira e energia livre obtidas por HU em 2008 realizado para a proteína SET7/9 que apresentou uma barreira de ativação de 35,15 kJ/mol para a desprotonação da Lisina 4 com uma energia livre de -77,4 kJ/mol determinada por Zhang em 2007 e uma barreira de 87,45 kJ/mol para a transferência do grupo metil. Usando esta proteína análoga como base, usamos como valor de referência para a transferência do grupo metil o valor de 72,8 kJ/mol baseando-se no valor experimental de kCat calculado, e o valor para a desprotonação da Lisina 9 com barreira de 25,1 kJ/mol.

O primeiro teste realizado foi determinar o modo de reação para a transferência do hidrogênio do resíduo de Lisina para a Tirosina, a reação de transferência do hidrogênio da água para o resíduo TYR1154 (R1) usando os métodos AM1, AM1D, PM3, PM6 e RM1, estes métodos foram usados com a técnica de superfície de energia potencial (SEP) para analisar esta teoria para a desprotonação da Lisina 9. Deste modo, foi testado esta etapa de uma possível reação por etapas.

Os cálculos realizados no programa pDynamo como descrito, apresentaram os resultados mostrados na figura 12 onde os gráficos referentes a cada um dos métodos foram postados juntos, a tabela 1 apresenta os valores de energia para cada um destes métodos. Os gráficos e os valores de energia apresentados por esta reação, mostraram que apenas o método PM6 apresentou um valor de energia negativa, com uma energia livre de -26,32 kJ/mol, entretanto, este método é também aquele que apresentou a maior barreira de energia, com um valor de 83,09 kJ/mol, o qual é muito maior do que o esperado baseando-se nos valores experimentais. Os outros métodos todos apresentaram valores de energia positivas, sendo que para sistemas análogos observamos que a desprotonação da Lisina é um processo que libera energia, deste modo estes sistemas não apresentaram uma boa descrição da reação.

Figura 12: Gráfico de energia para a transferência do átomo H2 da água para a o átomo OH da Tirosina usando o SEP.

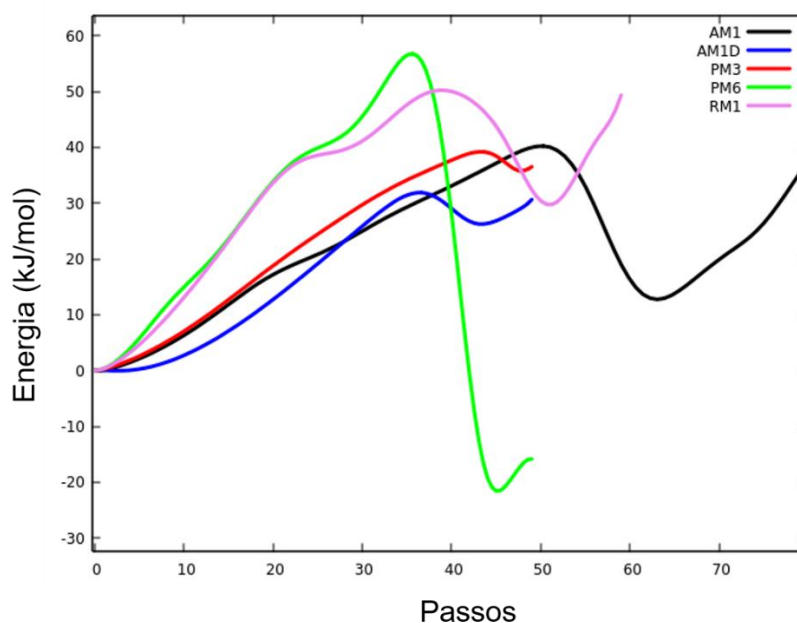


Tabela 1: Valores de barreira de energia e energia livre para a reação de transferência do hidrogênio da água para a Tirosina em kJ/mol.

Método	E_a	ΔH
AM1	55,56	5,48
AM1D	37,91	35,82
PM3	43,05	41,17
PM6	83,09	-26,32
RM1	58,07	58,07

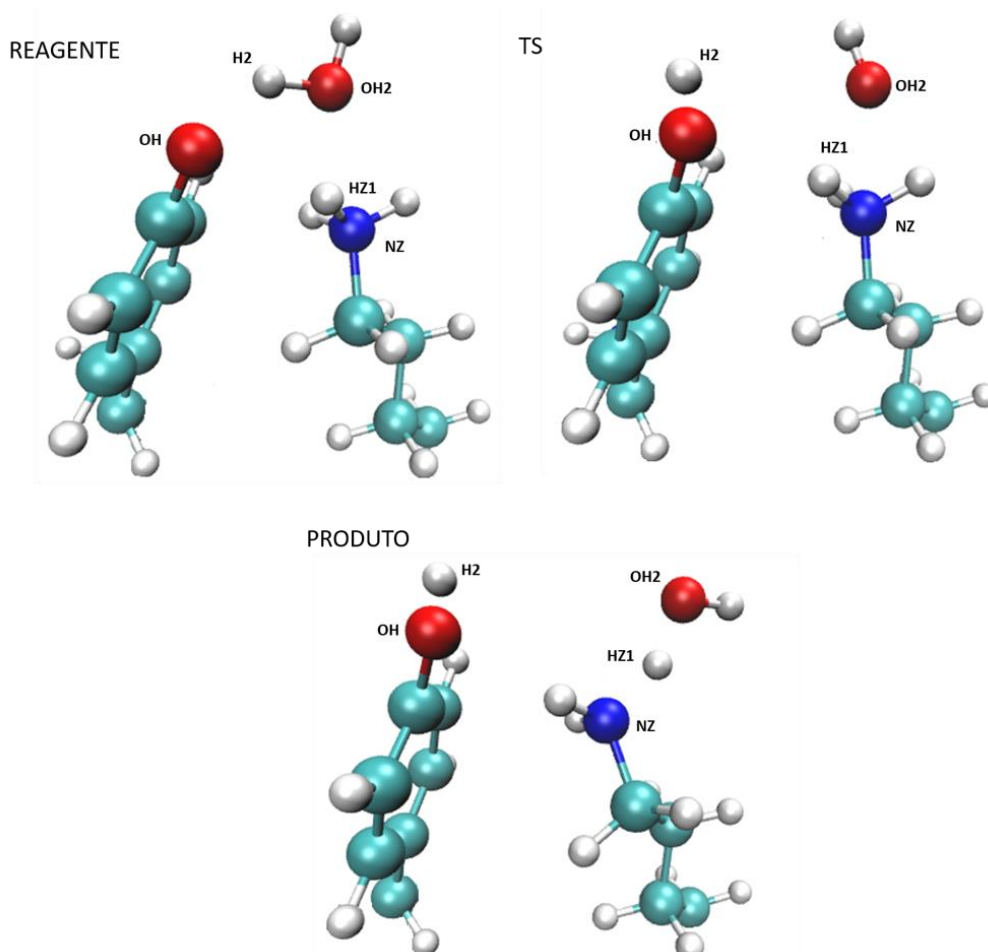
Ao observarmos as estruturas para o método PM6, que foi o que apresentou o melhor resultado, observamos que as coordenadas O1-H1 e H1-O2 tiveram uma grande variação entre o reagente e o TS, enquanto a coordenada O2-H2 teve uma pequena aproximação entre estes mesmos estados, a coordenada H2-N se manteve praticamente inalterada entre os estados. Quando observamos a variação para chegar no produto, ocorreu mais um afastamento entre a coordenada H1-O2 e um afastamento na coordenada H2-N, para a coordenada O2-H2, ocorreu uma aproximação entre estes átomos e a coordenada O1-H1 a distância se manteve

constante, essa variação das coordenadas pode ser observada na figura 13 e na Tabela 2

Tabela 2: Distâncias observadas durante a reação da transferência do hidrogênio da água para a Tirosina com o método PM6 no Reagente, TS e produto (valores em Å).

	H2-OH	H2-OH2	OH2-HZ1	HZ1-NZ
Reagente	1,7	1,0	2,2	1,0
TS	1,0	3,0	1,8	1,1
Produto	1,0	3,9	1,2	1,3

Figura 13: Estruturas de Reagente, TS e produto para a transferência do hidrogênio da água para a Tirosina com o método PM6 na SEP



A figura 13 mostra que ocorreu a quebra de ligação do átomo HZ1 após o estado de transição, esta quebra e a formação da ligação do átomo HZ1 da Lisina com o átomo OH2 da molécula de água, foi a responsável pela redução da energia do

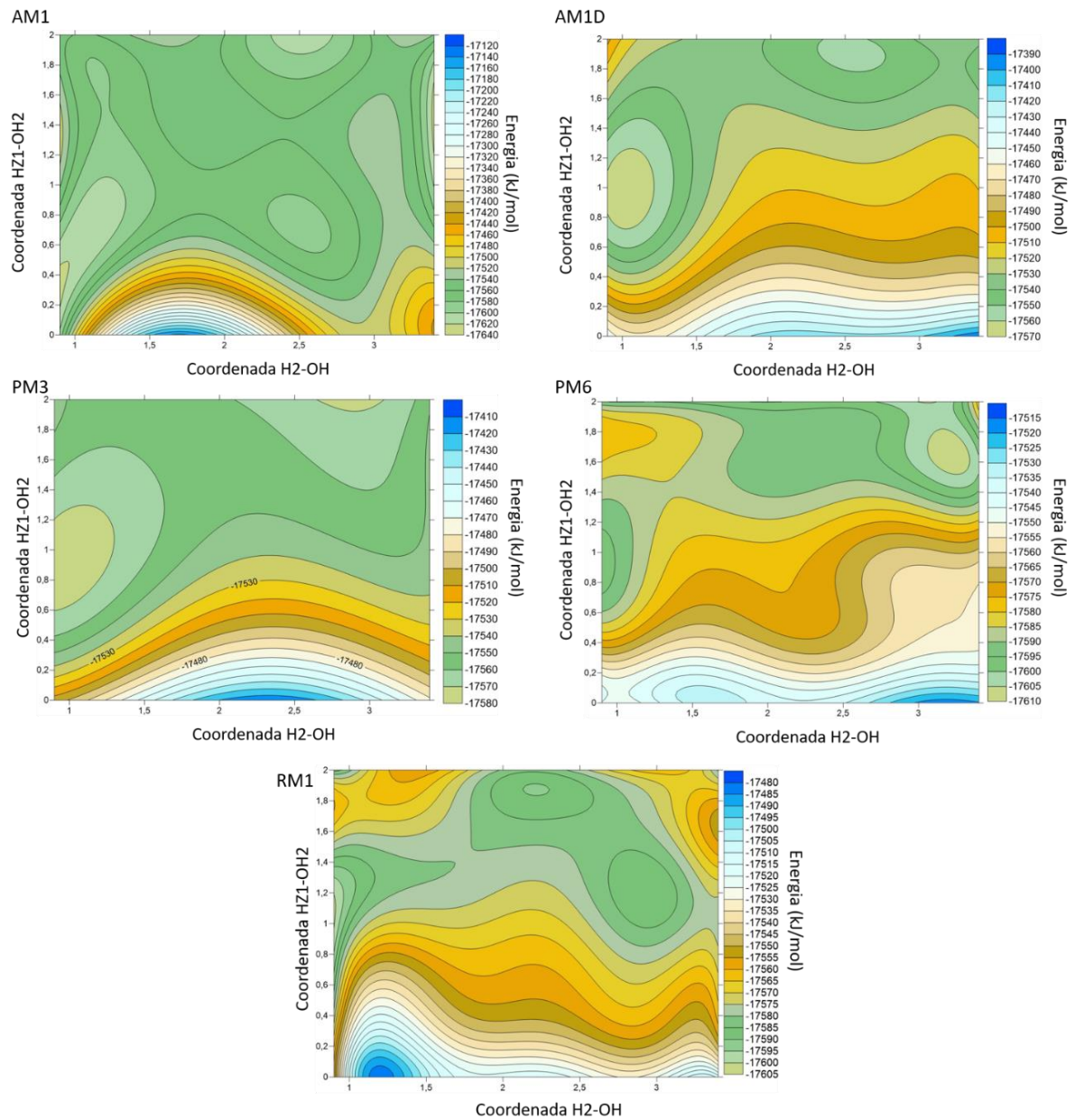
sistema. Um fator a se observar é que a ligação do átomo HZ1 com o átomo NZ foi fixado com uma energia de 300 kJ/mol, o que mostra que este sistema não foi eficaz de descrever esta reação, sendo assim a reação de desprotonação por etapas não é viável. Com esta informação, foi testado uma a reação de desprotonação de modo concertado, quando ocorre a transferência simultaneamente do átomo da água para a Tirosina e da Lisina para a água.

Esta reação foi calculada utilizando o SEP em 2D, ou seja, movendo as duas coordenadas simultaneamente. O resultado mostrou que os métodos AM1D, PM3 e RM1 foram aqueles que apresentaram uma liberação de energia no sistema, sendo os três com valores de energia negativas, como observados na tabela 3. A figura 14 mostra os gráficos relacionados a cada uma das reações, para este sistema concertado, é necessário que o sistema apresente um vale para os reagentes, um topo para o TS e um novo vale para os produtos, esta característica é melhor observado no método AM1D. A região onde está o reagente neste gráfico é nas coordenadas de 2.6 Å para a coordenada H2-OH e 2.7 Å para a coordenada OH2-HZ1 e os produtos na coordenada aproximada a 1 Å. Observando os valores de energia mostrados na tabela 3 vemos que o método AM1D apresentou um valor de barreira bem elevado enquanto o método PM3 foi aquele que apresentou um valor mais próximo ao esperado para a reação de transferência do hidrogênio, com um valor de 35,73 kJ/mol, que é um pouco maior que o esperado como descrito no começo dos resultados, que é de 25,10 kJ/mol.

Tabela 3: Valores de barreira de energia e energia livre para a reação de transferência do hidrogênio usando a SEP 2D em kJ/mol.

Método	E_a	ΔH
AM1	90,96	94,10
AM1D	69,33	-77,07
PM3	35,73	-84,01
PM6	35,82	16,82
RM1	124,52	-30,33

Figura 14: Gráfico de energia para a desprotonação da LYS9 com a molécula de água e usando o SEP 2D



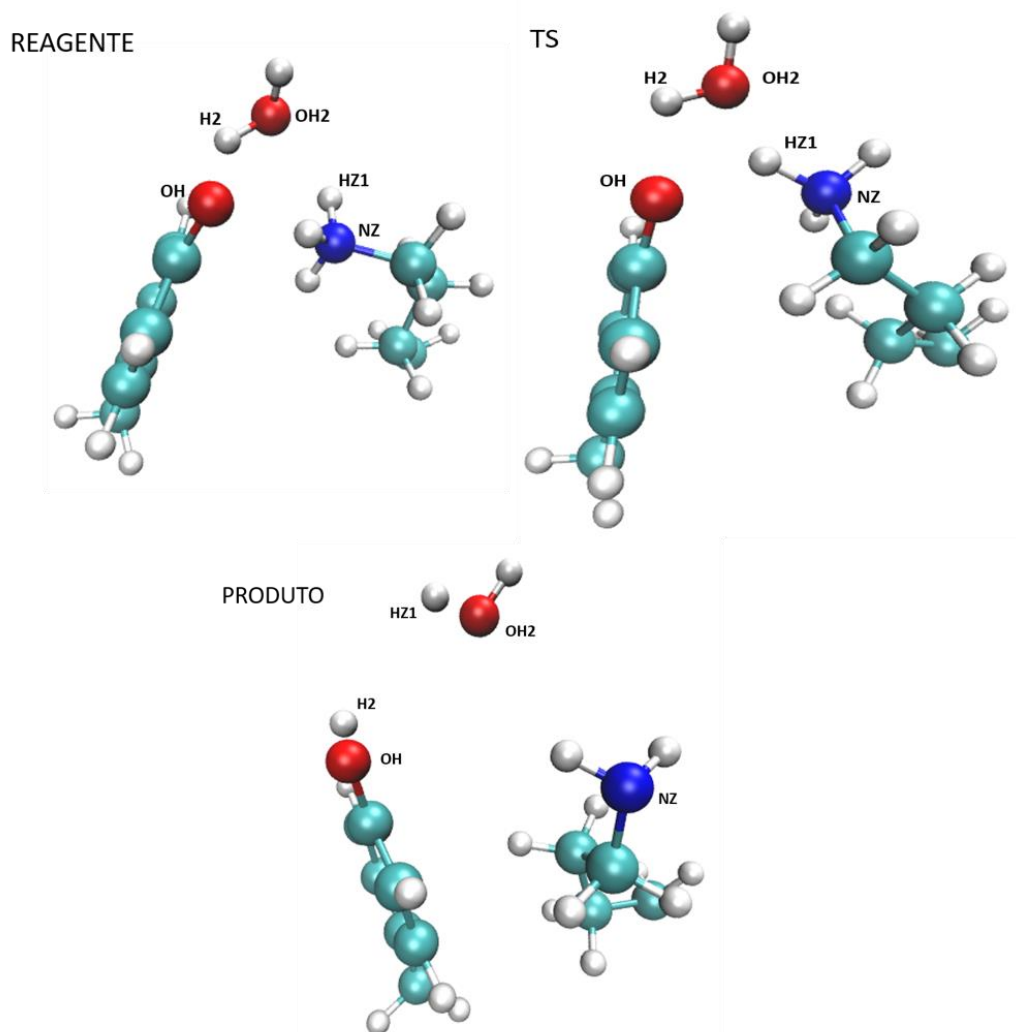
Ao observarmos a figura 15 e a tabela 4, observamos que a molécula de água se aproxima dos amino ácidos e se orienta de modo a ter o hidrogênio H2 orientado para o oxigênio da Tirosina. Este sistema se aproxima ainda mais quando a reação se move em direção ao estado de transição, isto é observado na tabela 4, visto que as distâncias nas coordenadas H2-OH e OH2-HZ1 diminuem de 2,8 Å e 2,0 Å para 1,8 Å e 1,5 Å respectivamente, esta aproximação cria a orientação para a transferência

dos átomos de hidrogênios que continua, ligados as suas moléculas. O produto por outro lado, mostra um afastamento da molécula de água após a transferência dos átomos de hidrogênio, porém é possível observar que os átomos de hidrogênios foram transferidos quando observamos as distâncias nesta etapa.

Tabela 4: Distâncias observadas durante a reação da transferência do hidrogênio usando a SEP 2D com o método PM6 no Reagente, TS e produto (valores em Å).

	H2-OH	H2-OH2	OH2-HZ1	HZ1-NZ
Reagente	2,8	1,0	2,0	1,0
TS	1,8	1,0	1,5	1,0
Produto	1,0	3,2	1,0	4,8

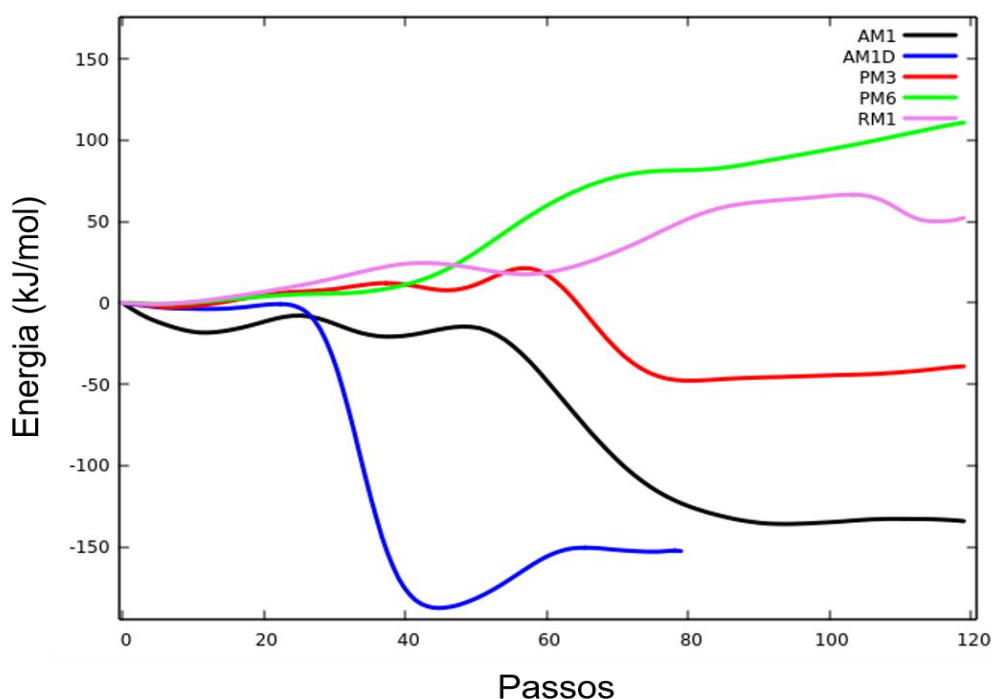
Figura 15: Estruturas de Reagente, TS e produto para a transferência do hidrogênio usando a SEP 2D com o método PM6.



A transferência do átomo de hidrogênio via uma molécula de água se mostrou um resultado promissor usando o método PM3, porém, foi observado que o átomo de hidrogênio da Lisina se aproximou da Tirosina e poderia ser transferido diretamente, deste modo, esta teoria foi testada. A reação testada posteriormente para a desprotonação da Lisina foi a transferência direta para a Tirosina, neste sistema foi realizados cálculos usando a SEP, o PMF e o cálculo de mecanismo no programa AMBER.

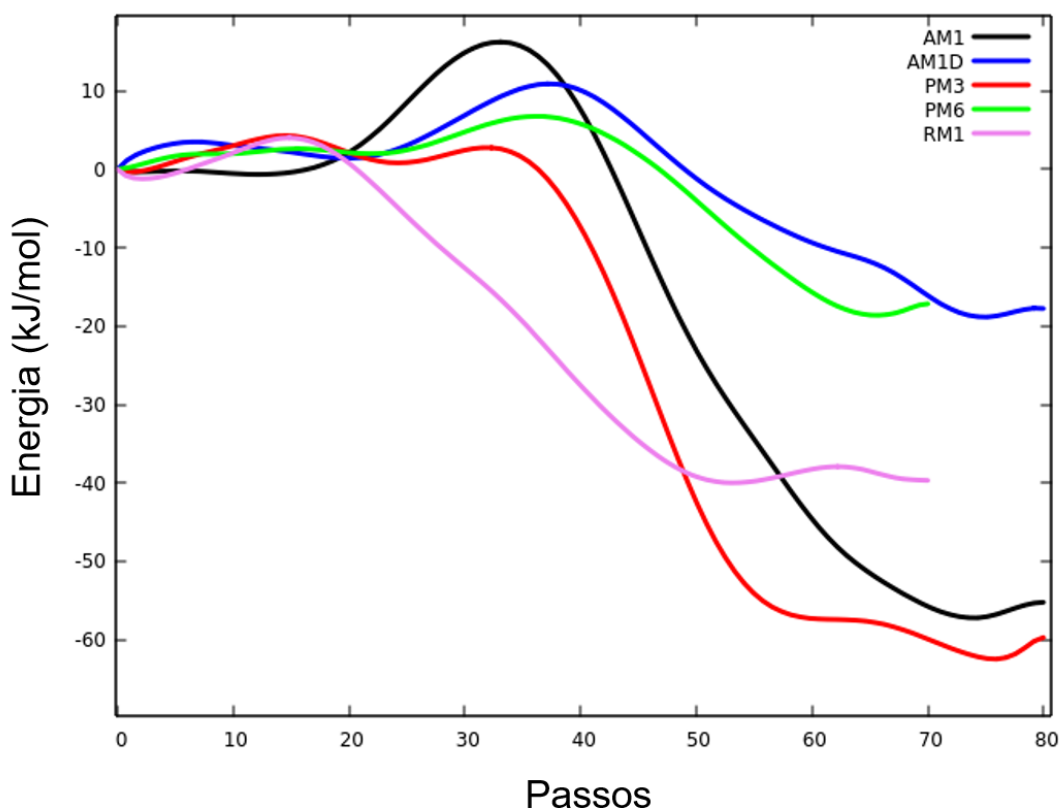
A reação de desprotonação da Lisina com a transferência do próton pra Tirosina demonstrou que os métodos PM6 e RM1 não apresentaram uma boa descrição do sistema usando a SEP. O método PM6 não apresentou uma redução na energia, se elevando até o fim da simulação, enquanto o RM1 apresentou uma redução que poderia ser um produto, porém com uma energia muito maior que o reagente, por outro lado o método PM3 foi o melhor resultado (Figura 16). O método PM3 na SEP apresentou uma barreira de energia de 55,06 kJ/mol e uma energia livre de -39,79 kJ/mol (Tabela 5), estes valores foram bem maiores que o esperado para esta reação, entretanto, os resultados mostraram que esta reação foi possível utilizando a técnica SEP.

Figura 16: Gráfico de energia para a desprotonação da LYS9 diretamente para a Tirosina usando a SEP



Após a realização dos cálculos com a SEP, os mesmos sistemas foram usados para refazer o cálculo só que desta vez usando a técnica de PMF. Para o PMF, o sistema que apresentou um melhor resultado foi o realizado com o método AM1, que apresentou uma barreira de 23,39 kJ/mol, que é próxima aos 25 kJ/mol que é o valor esperado para esta reação, este sistema apresentou também uma energia livre de -57,53 kJ/mol (Figura 17). Os outros métodos todos apresentaram valores de energia negativas para a energia livre de reação, e as barreiras foram menores que a encontrada no método AM1 (tabela 5), deste modo, o PMF descreveu a reação, mas não conseguiu descrever corretamente os valores de barreira de energia, mas estes resultados levantam mais informações quanto a esta reação de forma direta, e para ter um resultado a mais, o sistema foi executado utilizando o programa AMBER.

Figura 17: Gráfico de energia para a desprotonação da LYS9 diretamente para a Tirosina usando a PMF



Os resultados utilizando o programa AMBER mostrou que todos os métodos descreveram a reação, observamos na figura 19 e 20 que todos os métodos apresentaram o caminho de reação. Os valores de energia mostrados na tabela 6

mostram que os sistemas PM6 e RM1 foram aqueles que apresentaram um melhor valor, sendo ambos muito próximos do esperado para esta desprotonação (25 kJ/mol). Entretanto, o valor de energia livre do método PM6 se apresentou de maneira anormal quando comparada com os outros métodos, com -303 kJ/mol de energia livre. Ao observar as outras barreiras de energia (métodos AM1, AM1D e PM3), estes apresentaram um padrão semelhante no gráfico de energia (Figura 18) e obtiveram barreiras de energia próximas umas às outras. Este fato, demonstra que o amber conseguiu descrever bem as reações de transferência do átomo de hidrogênio, mesmo que falhe em descrever com tanta precisão a energia livre, visto que o método PM6 se mostrou bem discrepante (Figura 19).

Figura 18: Gráfico de energia para a desprotonação da LYS9 diretamente para a Tirosina usando o AMBER

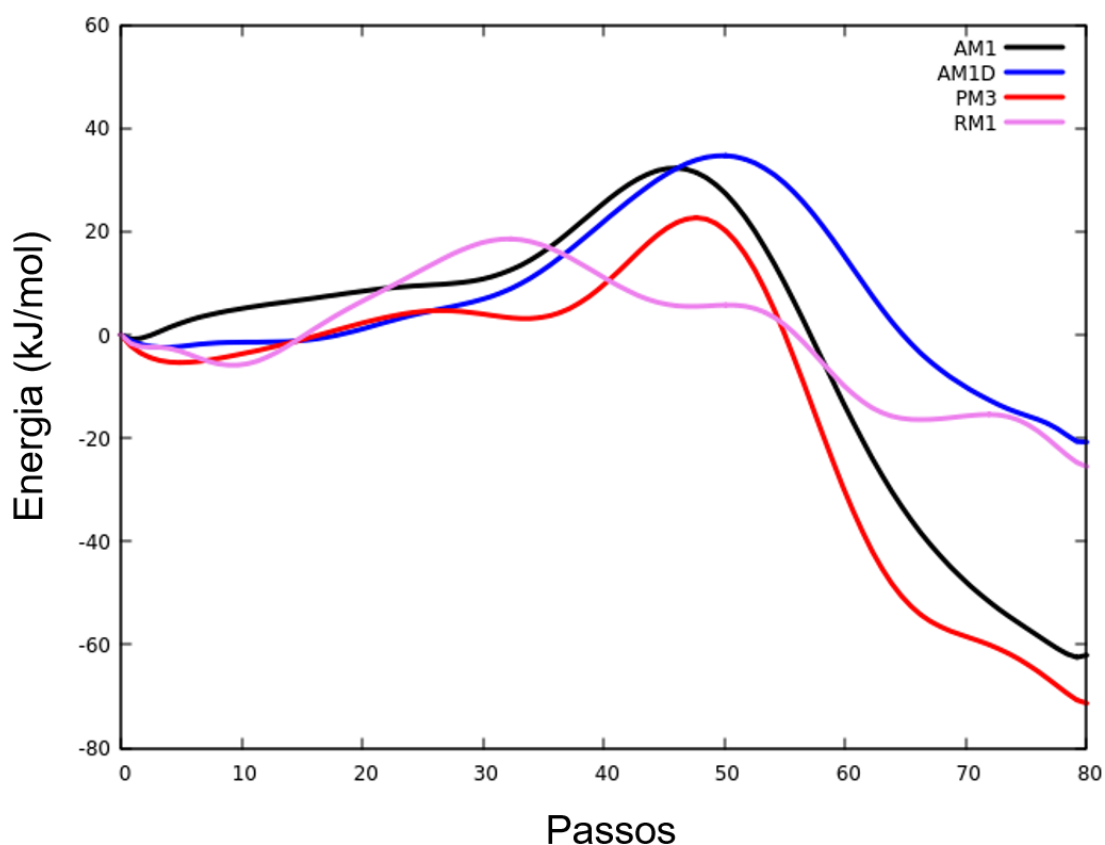


Figura 19: Gráfico de energia para a desprotonação da LYS9 diretamente para a Tirosina usando o AMBER e o método PM6

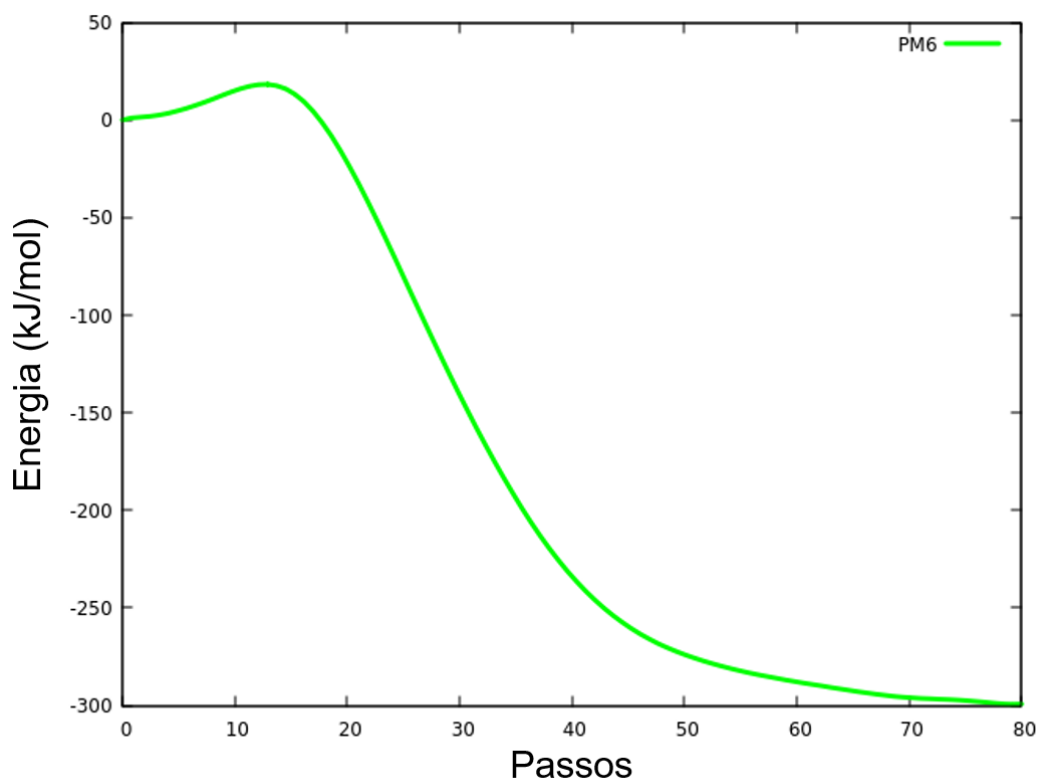


Tabela 5: Valores de barreira de energia e energia livre para a reação de transferência do hidrogênio direto da Lisina para a Tirosina em kJ/mol.

Método	SEP		PMF		AMBER	
	E_a	ΔH	E_a	ΔH	E_a	ΔH
AM1	13,01	-138,62	23,39	-57,53	40,92	-61,71
AM1D	7,82	-193,38	12,64	-21,88	45,15	-18,87
PM3	55,06	-39,79	6,95	-63,30	38,79	-65,35
PM6	87,19	87,19	8,16	-20,25	27,82	-303,72
RM1	70,50	49,04	7,87	-39,79	27,15	-22,30

As estruturas selecionadas destes resultados mostraram que a descrição da reação de desprotonação da Lisina teve a mesma característica usando as diferentes técnicas nos diferentes programas e métodos. Foi observado em todos os sistemas que o átomo de hidrogênio se orienta para o átomo OH da Tirosina, para que ocorra a transferência (Figura 20,21 e 22). Na tabela 6 os valores das distâncias entre os

átomos são mostrados e vemos que usando a SEP, a distância inicial entre os átomos HZ1 da Lisina com o átomo OH da Tirosina foi a menor entre os resultados, com uma distância inicial de 1.8 Å (Figura 20). Quando é observado as estruturas selecionadas do PMF (Figura 21) e do programa AMBER (Figura 22), observamos que ambos os programas apresentaram características bem próximas quanto as distâncias, tendo tanto a distância inicial quanto a final bem próximas em ambos os resultados. A tabela 6 mostra estes valores de distância.

Figura 20: Estruturas de Reagente, TS e produto para a transferência do hidrogênio diretamente da Lisina para a Tirosina com o método PM3 usando a SEP.

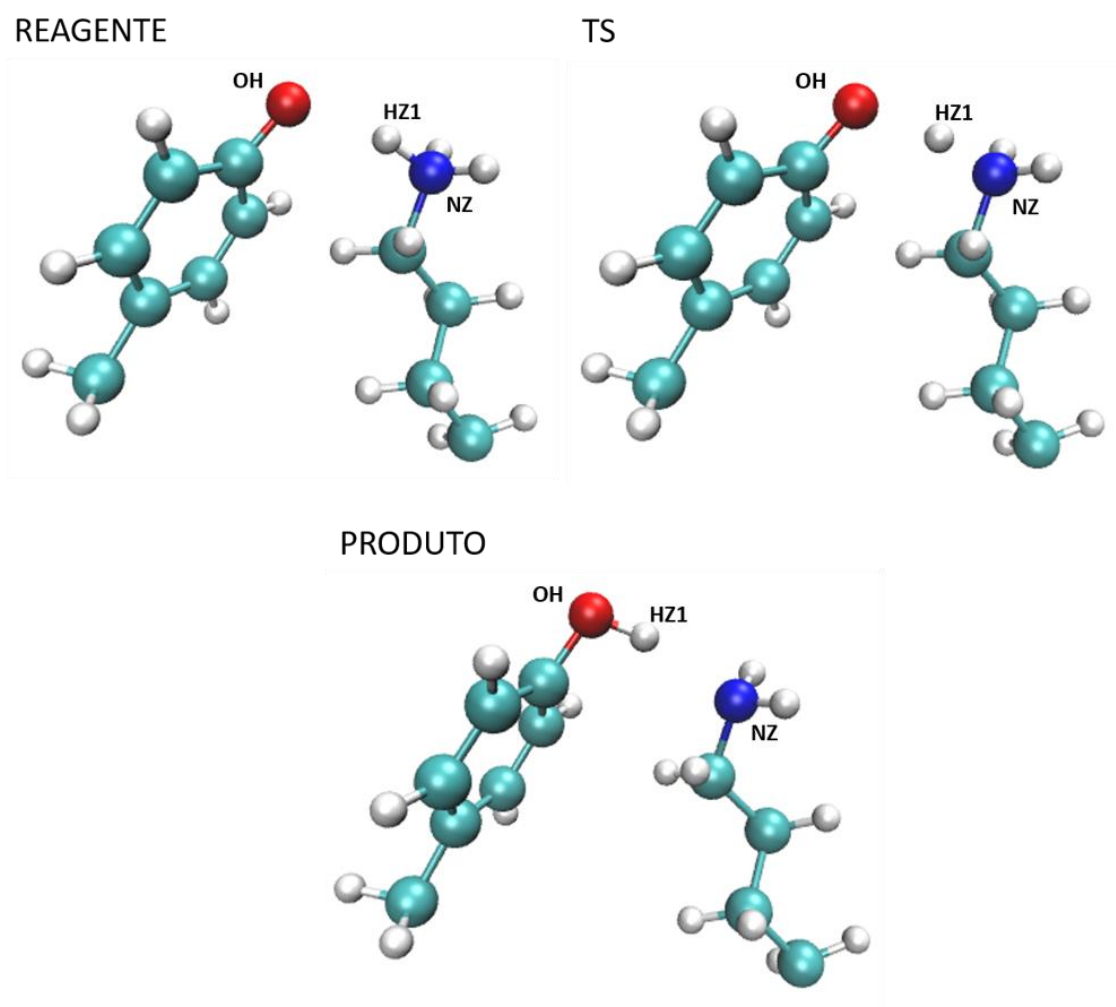


Figura 21: Estruturas de Reagente, TS e produto para a transferência do hidrogênio diretamente da Lisina para a Tirosina com o método AM1 usando o PMF.

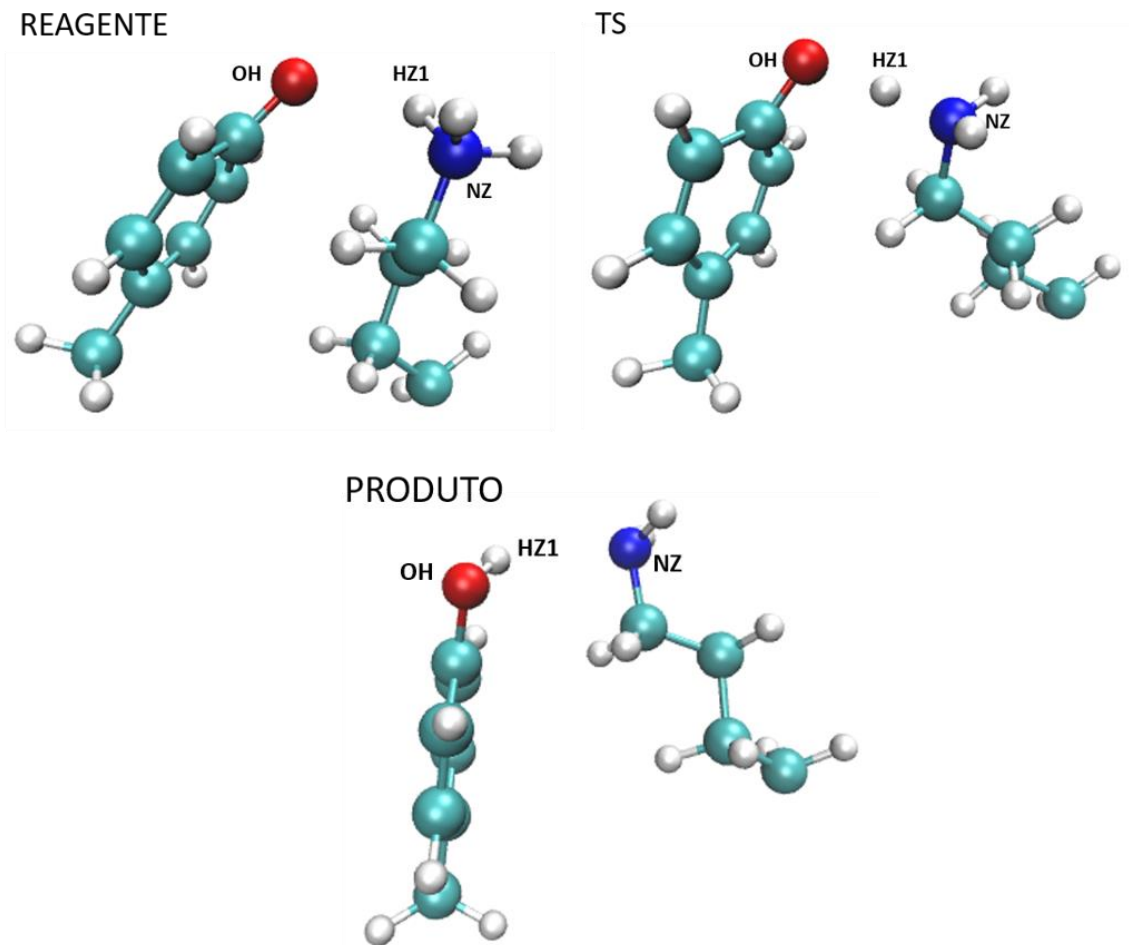
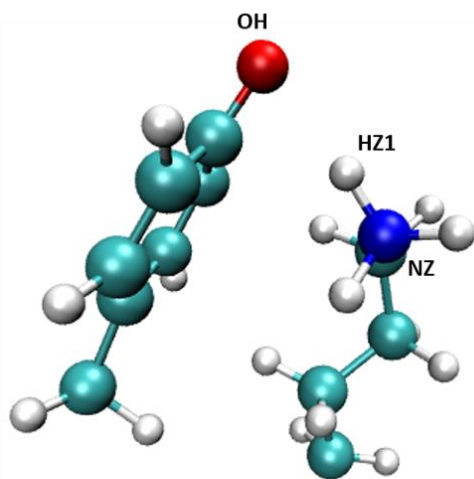
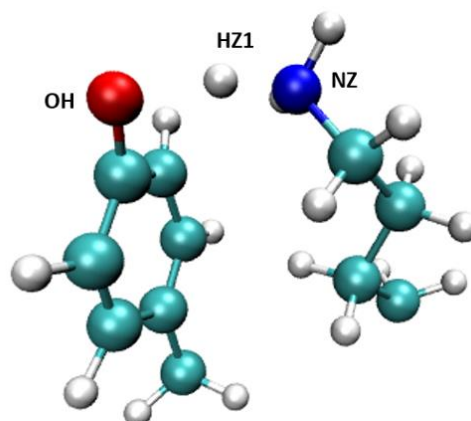


Figura 22: Estruturas de Reagente, TS e produto para a transferência do hidrogênio diretamente da Lisina para a Tirosina com o método AM1 usando o programa AMBER

REAGENTE



TS



PRODUTO

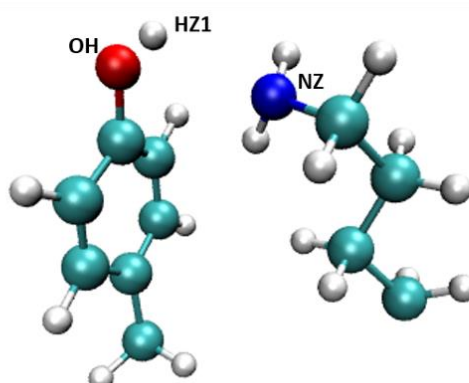


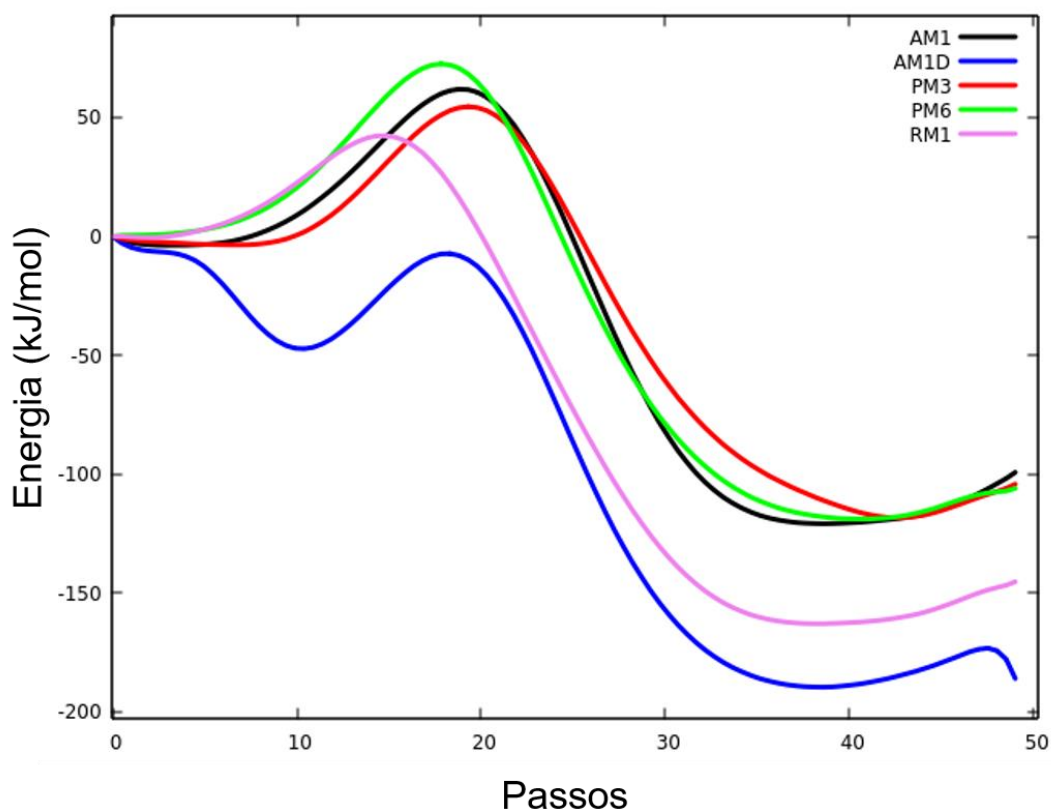
Tabela 6: Distâncias observadas durante a reação da transferência do hidrogênio diretamente da Lisina para a Tirosina no Reagente, TS e produto (valores em Å).

		OH-HZ1	HZ1-NZ
SEP	Reagente	1,8	1,0
	TS	1,5	1,2
	Produto	1,0	1,9
PMF	Reagente	3,2	1,0
	TS	1,5	1,2
	Produto	1,0	2,5
AMBER	Reagente	3,4	1,0
	TS	1,4	1,3
	Produto	1,0	2,4

Os resultados obtidos demonstraram que esta é uma possível reação para a desprotonação da Lisina, visto que as estruturas obtidas foram bem consistentes e com valores de energia próximas ao esperado, principalmente as obtidas no programa AMBER e no método AM1 do PMF. Com estes resultados, foi realizado o cálculo para a transferência do grupo metil da molécula de SAM para a Lisina desprotonada.

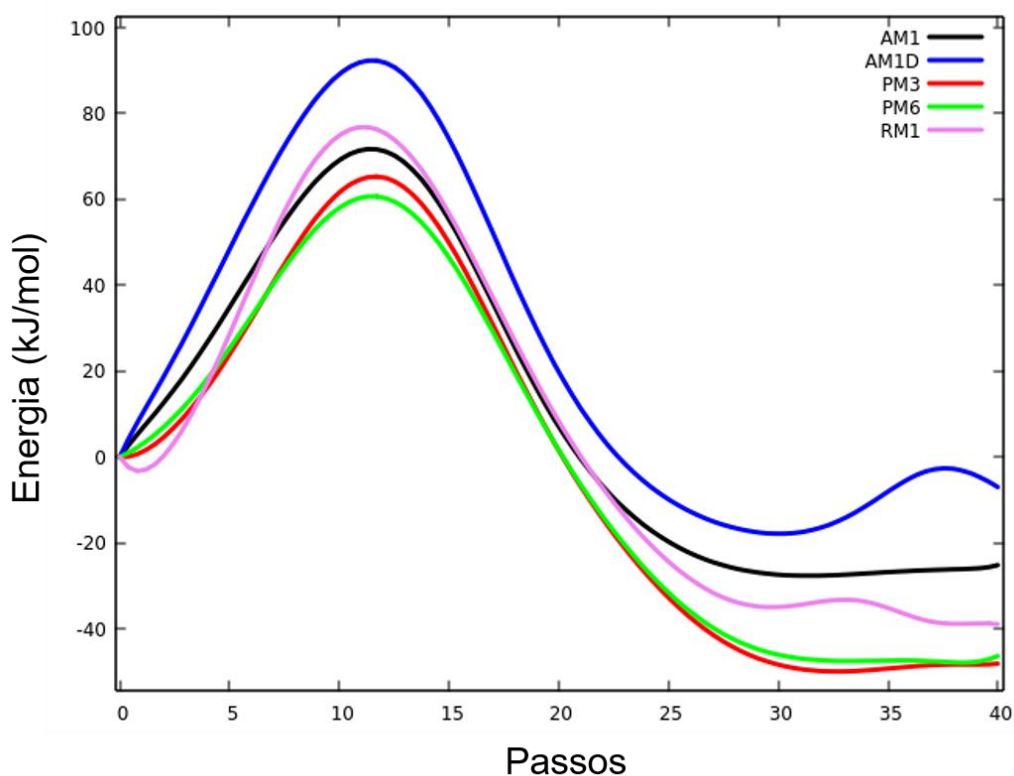
A reação de transferência do grupo metil da molécula de SAM para a Lisina desprotonada com a SEP mostrou que todos os métodos foram efetivos para descrever a reação. O método AM1D foi aquele que apresentou o melhor resultado (Figura 23) com uma barreira de energia de 69,33 kJ/mol e uma energia livre de -77,07 kJ/mol (Tabela 7), este valor de energia foi bem próximo ao esperado baseando-se nos resultados experimentais, que seria de 72,8 kJ/mol. Os outros métodos usados conseguiram descrever a reação, entretanto com um valor maior de energia para a barreira.

Figura 23: Gráfico de energia para a transferência do grupo metil usando a SEP.



Com estes resultados, os mesmos sistemas foram usados para refazer o cálculo usando a técnica de PMF. Os resultados para o PMF foi que o sistema que apresentou um melhor resultado foi o realizado com o método PM6, que apresentou uma barreira de 73,14 kJ/mol, o qual é extremamente próxima aos 72,8 kJ/mol calculados utilizando o valor de kCat experimental (Figura 24), o valor de energia livre para este resultado foi de -50,12 (tabela 7). Os outros métodos apresentaram uma variação tanto nos valores da barreira quanto na energia livre, entretanto, todos descreveram bem a reação, tendo o PM3 apresentado valores próximos ao PM6 e consequentemente ao experimental (tabela 7), deste modo, o PMF descreveu a reação, com uma boa precisão nos resultados, principalmente para o método PM6, com um valor bem próximo ao experimental.

Figura 24: Gráfico de energia para a transferência do grupo metil usando o PMF.



Os resultados utilizando o programa AMBER mostrou que, assim como o SEP e o PMF, todos os métodos apresentaram o caminho de reação e descreveram a reação. Os valores de energia mostrados na tabela 7 mostra que o sistema PM6 foi aqueles que apresentaram um melhor valor, entretanto o valor de 52,30 kJ/mol foi bem menor do que o esperado baseando-se no valor experimental e a energia livre deste sistema foi de -228,45 kJ/mol. Ao observar as barreiras dos demais métodos, estes

apresentaram uma grande variação na energia (Figura 25) e todos apresentaram valores de energia livre com uma grande variação e com valores bem distintos dos observados no PMF (tabela 7). Este fato, demonstra que o amber conseguiu realizar as reações de transferência do grupo metil porem os valores energéticos para os sistemas não foram satisfatórios quando comparados com as outras técnicas usadas e com o experimental.

Figura 25: Gráfico de energia para a transferência do grupo metil usando o programa AMBER.

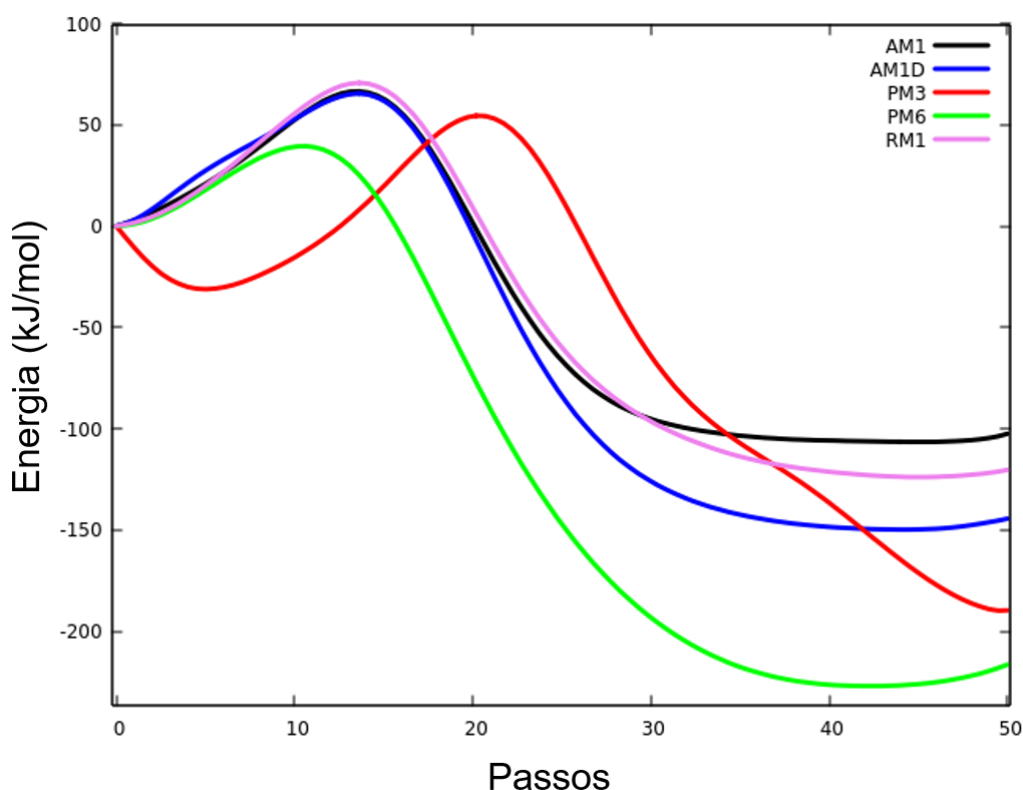


Tabela 7: Valores de barreira de energia e energia livre para a reação de transferência do grupo metil em kJ/mol.

Método	SEP		PMF		AMBER	
	E_a	ΔH	E_a	ΔH	E_a	ΔH
AM1	107,07	-123,93	86,11	-28,83	99,54	-107,11
AM1D	69,33	-77,07	111,17	-20,59	103,51	-150,71
PM3	91,04	-123,39	82,42	-53,35	138,91	-156,82
PM6	120,25	-122,80	73,14	-50,12	52,30	-228,45
RM1	90,79	-166,94	91,84	-40,63	104,85	-124,85

As estruturas selecionadas dos resultados de transferência do grupo metil mostraram que a descrição da reação mostra diferenças entre as metodologias utilizadas. Na SEP e no PMF, as estruturas de reagente, TS e produto foram similares, como visto nas figuras 26 e 27, em ambos os casos, a estrutura de transição está com o grupo metil próximo ao meio da coordenada entre os átomos NZ da Lisina e SD da molécula de SAM. Além disso, o grupo metil apresenta uma estrutura mais planar neste ponto de transição e os átomos SD, CE e NZ estão alinhados para a transferência do grupo metil, as distâncias são mostradas na tabela 8. Para o resultado do AMBER foi observado que o grupo metil se deslocou durante a reação, e o estado de transição ficou mais distante do átomo SD da molécula SAM como observado na figura 28, este deslocamento foi responsável por uma mudança nas coordenadas da reação, e por isto o programa AMBER não descreveu bem as energias para o sistema.

Figura 26: Estruturas do Reagente, TS e produto para a transferência do grupo metil com o método AM1D usando a SEP.

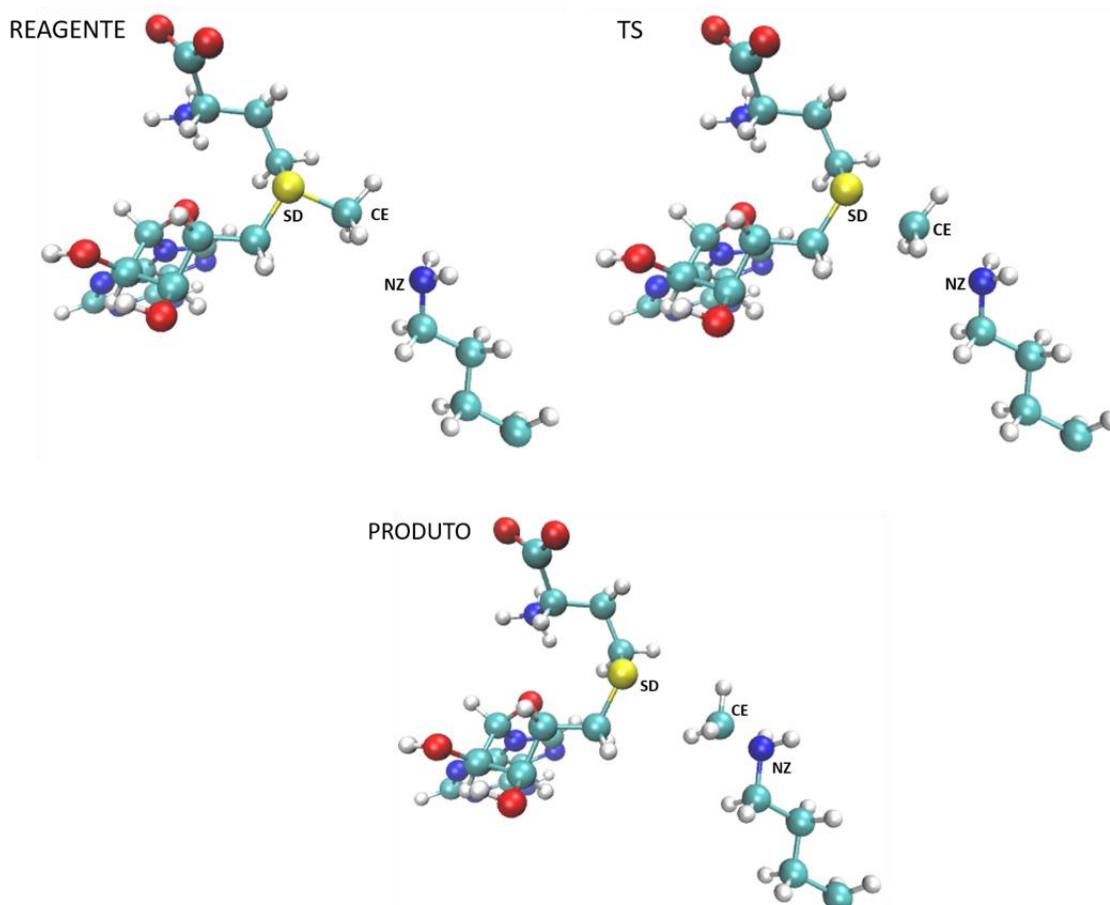


Figura 27: Estruturas do Reagente, TS e produto para a transferência do grupo metil com o método PM6 usando a PMF.

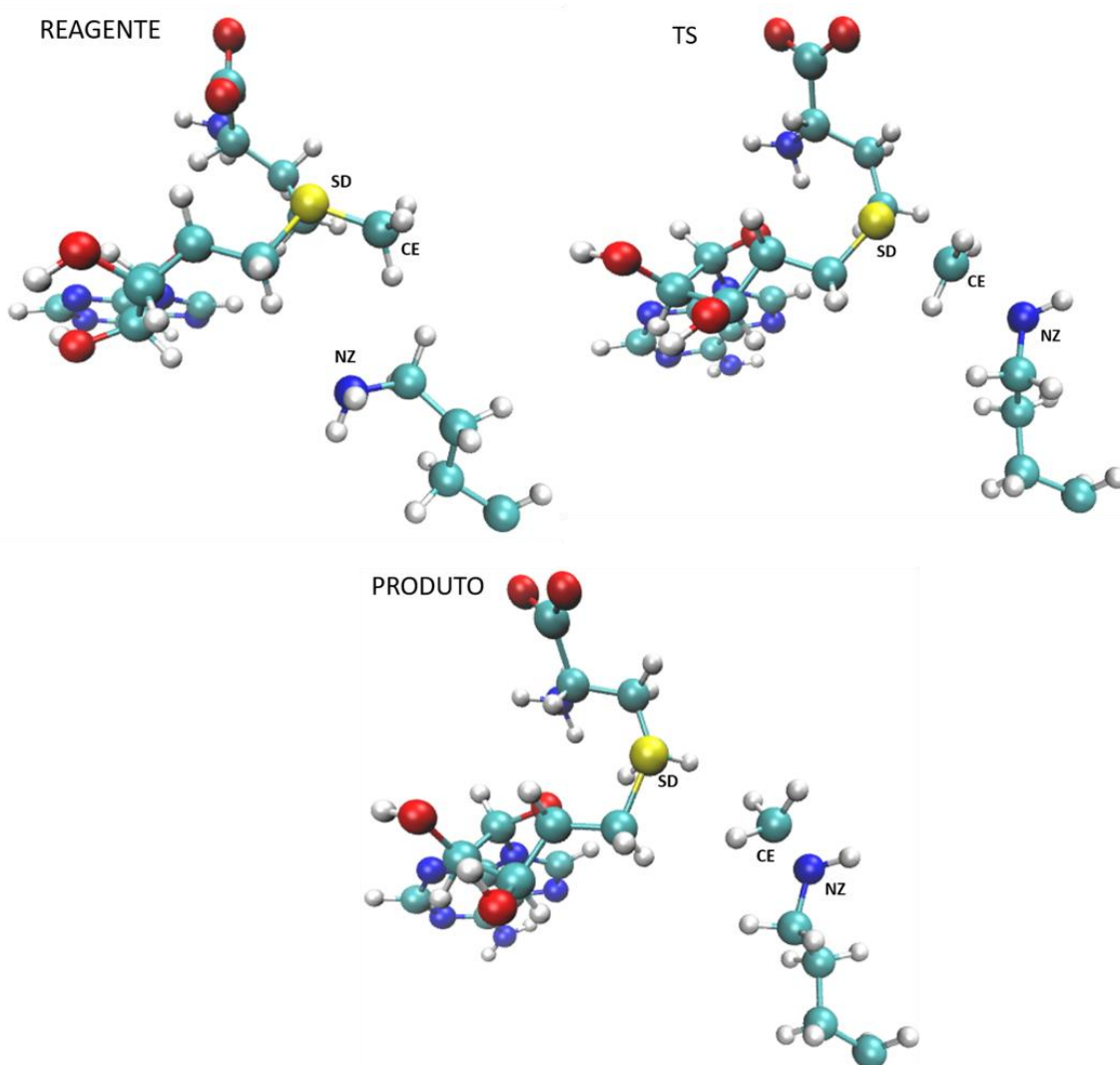


Figura 28: Estruturas do Reagente, TS e produto para a transferência do grupo metil com o método PM6 usando o programa AMBER

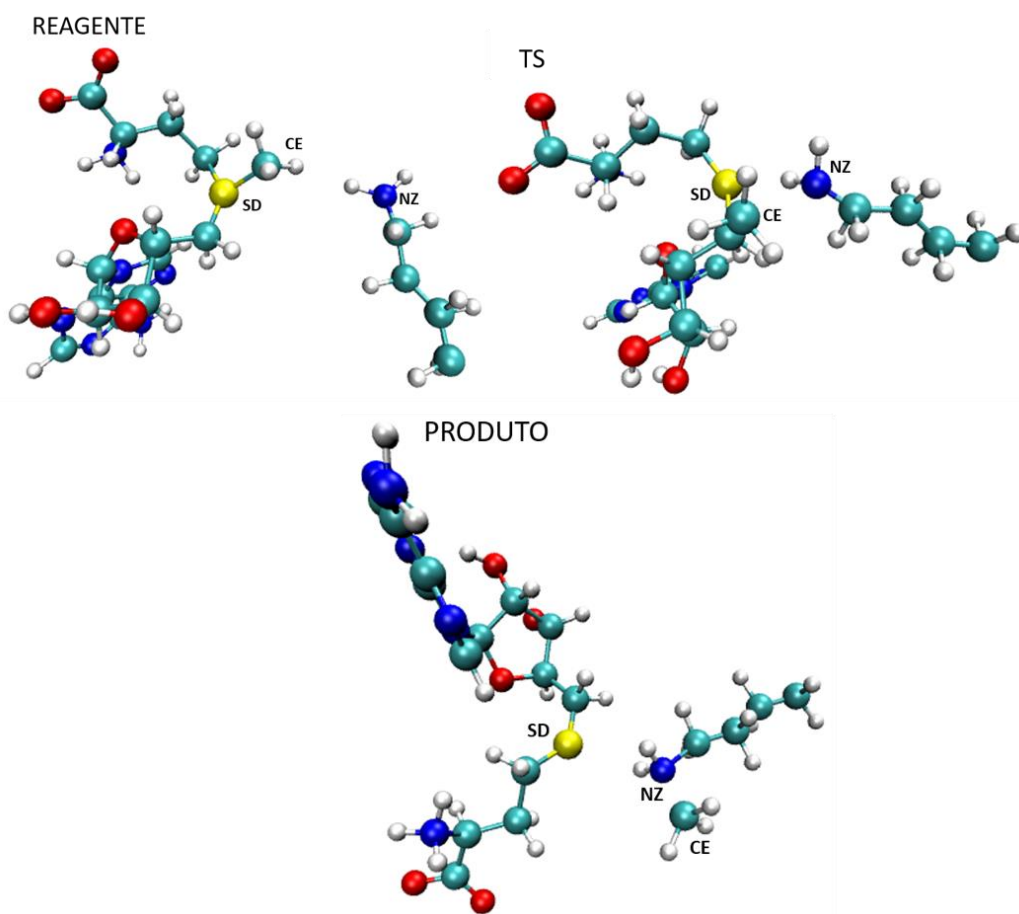


Tabela 8: Distâncias observadas durante a reação da transferência do grupo metil no Reagente, TS e produto (valores em Å).

		SD-CE	CE-NZ
SEP	Reagente	1,7	2,9
	TS	2,2	2,4
	Produto	3,2	1,4
PMF	Reagente	1,7	3,7
	TS	2,1	2,2
	Produto	3,4	1,5
AMBER	Reagente	1,7	4,1
	TS	2,9	2,2
	Produto	4,1	1,5

6 CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo estudar a reação de metilação da Lisina 9 da histona H3, e foi estudado as reações de desprotonação da Lisina 9 através do estudo de 3 possíveis reações, por etapas ou concertada através de uma molécula de água e a transferência direta para o resíduo de Tirosina 1154, e a posterior metilação deste mesmo aminoácido onde a molécula de SAM foi o doador do grupo metil.

Os resultados mostraram que para a desprotonação da Lisina, o sistema não foi satisfatório para a reação por etapas, visto que os sistemas não apresentaram valores de energia coerentes quando comparados com a literatura. Para a reação concertada, foi observado que este sistema pode ser um caminho de reação, entretanto, a energia observada ($E_a = 35,73$ kJ/mol) foi maior que a esperada baseada na literatura ($E_a = -25$ kJ/mol). O último sistema testado foi a transferência direto e este mostrou um bom valor para a reação quando o sistema foi executado usando o programa AMBER com o método RM1 ($E_a = -27,15$ kJ/mol), deste modo, o resultado para a desprotonação mostrou que a melhor possibilidade para esta reação é uma transferência direta da Lisina 9 para a Tirosina 1154 e que o programa amber é o melhor para descrever esta reação. Para a reação de metilação da Lisina, os resultados mostraram que o método PM6 com a técnica de PMF conseguiu descrever bem a reação, com uma barreira de $-73,14$ kJ/mol enquanto a literatura mostra que a barreira é de $-77,40$, obtido através do kCat da reação.

Este resultado mostra que os métodos computacionais descreveram bem estas reações e assim podem ser usados para análises das reações de metilação tanto da proteína G9a quanto para outras proteínas metiltransferase. Outro ponto de importância para estes resultados é ajudar no entendimento das reações de desprotonação do amino ácido de Lisina das Histonas e para a metilação, o qual pode ser utilizado para o desenvolvimento de novos estudos para esta família de proteínas e possíveis fármacos para estas proteínas.

7 BIBLIOGRAFIA

ANSLYN, E. V.; DOUGHERTY, D. A. **Transition State Theory and Related Topics**. [s.l.] Modern Physical Organic Chemistry. University Science Books, 2006.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

BARSKI, A. et al. Resource High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. **Cell**, v. 129, p. 823–837, 2007.

BAYLY, C. I. et al. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: The RESP model. **Journal of Physical Chemistry**, v. 97, n. 40, p. 10269–10280, 1993.

BERMAN, H. M. et al. The protein data bank. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 58, n. 6 I, p. 899–907, 2002.

BERNSTEIN, B. E.; MEISSNER, A.; LANDER, E. S. Review The Mammalian Epigenome. **Cell**, v. 128, p. 669–681, 2007.

BROOKS, B. R. et al. CHARMM: The biomolecular simulation program. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 10, p. 1545–1614, 2009.

CASE, D. A. et al. **AMBER 2018** San Francisco University of California, , 2018.

CHRISTENSEN, A. S. et al. Semiempirical Quantum Mechanical Methods for Noncovalent Interactions for Chemical and Biochemical Applications. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 9, p. 5301–5337, 2016.

CHUIKOV, S. et al. Regulation of p53 activity through lysine methylation. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 353–360, 2004.

CORNELL, W. D. et al. Application of RESP Charges To Calculate Conformational Energies, Hydrogen Bond Energies, and Free Energies of Solvation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 21, p. 9620–9631, 1993.

COUTURE, J.-F. et al. Structural origins for the product specificity of SET domain protein methyltransferases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 52, p. 20659–20664, 2008.

DEWAR, M. J. S. et al. Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 13, p. 3902–3909, 1985.

DILLON, S. C. et al. The SET-domain protein superfamily: Protein lysine methyltransferases. **Genome Biology**, v. 6, n. 8, p. 1–10, 2005.

DOLINSKY, T. J. et al. PDB2PQR: An automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 665–667, 2004.

EYRING, H. The energy of activation for bimolecular reactions involving hydrogen and the halogens, according to the quantum mechanics. **Journal of the American Chemical Society**, v. 53, n. 7, p. 2537–2549, 1931.

EYRING, H. The Activated Complex in Chemical Reactions. **The Journal of Chemical Physics**, v. 3, p. 107, 1935.

EYRING, H.; M, P. Über Einfache Gasreaktionen. **Zeitschrift für Physikalische Chemie**, v. 12, p. 279–311, 1931.

FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. . **Oncologia Molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004.

FERSHT, A. **Enzyme Structure and Mechanism**. 2nd editio ed. [s.l.] W H Freeman & Co (Sd), 1985.

FIELD, M. J. The pDynamo program for molecular simulations using hybrid quantum chemical and molecular mechanical potentials. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 7, p. 1151–1161, 2008.

FISCHER, E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. **Ber. Dtsch. Chem.**, v. 27, n. 3, p. 2985–2993, 1894.

FRISCH, M. J. et al. **Gaussian 09 A.02Gaussian, Inc. Wallingford CT**, 2009.

GAO, J. et al. Mechanisms and free energies of enzymatic reactions. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 8, p. 3188–3209, 2006.

GLOBOCAN. **Cancer**.

GLOBOCAN. **Population fact sheets**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/fact->

sheets-populations>. Acesso em: 22 dez. 2018b.

GREENBERG, E. S. et al. Epigenetic biomarkers in skin cancer. **Cancer Letters**, v. 342, n. 2, p. 170–177, 2014.

GROSSFIELD, A. **WHAM: the weighted histogram analysis method**, [s.d.].

HABERLAND, M.; MONTGOMERY, R. L.; OLSON, E. N. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. **national institutes of health**, v. 10, n. 1, p. 32–42, 2009.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HARTREE, D. R.; HARTREE, W. Self-consistent field, with exchange, for beryllium. **Proceedings of the Royal Society of London. Series A - Mathematical and Physical Sciences**, 1935.

HEBBES, T. R.; THORNE, A. W. transcriptionally active chromatin. **The EMBO Journal**, v. 7, n. 5, p. 1395–1402, 1988.

HESTENES, M. R.; STIEFEL, E. Methods of conjugate gradients for solving linear systems. **Journal of Research of the National Bureau of Standards**, v. 49, n. 6, p. 409, 1952.

HOLTZER, A. M. The collected papers of Peter J. W. Debye. Interscience. **Journal of Polymer Science**, v. 13, n. 72, p. 548, 1954.

HU, P.; WANG, S.; ZHANG, Y. How do SET-domain Protein Lysine Methyltransferases Achieve the Methylation State Specificity? Revisited by ab initio QM/MM Molecular Dynamics Simulations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 12, p. 3806–3813, 2008.

HU, P.; ZHANG, Y. Catalytic mechanism and product specificity of the histone lysine methyltransferase SET7/9: An ab initio QM/MM-FE study with multiple initial structures. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 4, p. 1272–1278, 2006.

INCA. **Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil**. [s.l: s.n.].

JENSEN, F. **introduction to computer chemistry**. 2. ed. [s.l.] John Wiley & Sons,

1999.

JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. Translating the Histone Code. **science**, v. 293, p. 1074–1081, 2001.

JO, S. et al. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. **Journal of Computational Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1859–1865, 2008.

JORGENSEN, W. L. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, v. 79, n. 2, p. 926–935, 1983.

KAMINSKI, G. A.; JORGENSEN, W. L. A Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Method Based on CM1A Charges: Applications to Solvent Effects on Organic Equilibria and Reactions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 10, p. 1787–1796, 1998.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. November, p. 316–323, 2004.

KHANNA, K. K.; JACKSON, S. P. DNA double-strand breaks : signaling , repair and the cancer connection. **Nature**, v. 27, n. 3, p. 247–254, 2001.

KIRKWOOD, J. G. Statistical mechanics of fluid mixtures. **The Journal of Chemical Physics**, v. 3, n. 5, p. 300–313, 1935.

KOŁOS, W.; WOLNIEWICZ, L. Accurate Adiabatic Treatment of the Ground State of the Hydrogen Molecule. **The Journal of Chemical Physics**, v. 41, n. 12, p. 3663–3673, 1964.

KOSHLAND, D. E. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 44, n. 2, p. 98–104, 1958.

KOUSKOUTI, A. et al. Gene-specific modulation of TAF10 function by SET9-mediated methylation. **Molecular Cell**, v. 14, n. 2, p. 175–182, 2004.

KOUZARIDES, T. Review Chromatin Modifications and Their Function. **Cell**, v. 128, p. 693–705, 2007.

LAILER, K.; KING, C. A lifetime of transition-state theory. **The Chemical Intelligencer**, v. 4, n. 3, p. 39, 1998.

LEE, J. et al. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 12, n. 1, p. 405–413, 2016.

LEWARS, E. G. **Computational chemistry: introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics**. 2nd ed ed. [s.l.] Springer, 2011.

LI, J. et al. Role of several histone lysine methyltransferases in tumor development. **Biomedical Reports**, v. 4, n. 3, p. 293–299, 2016.

LIANG, G. et al. Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in the human genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 19, p. 7357–7362, 2004.

LIMA, N. et al. RM1 Semiempirical Model: Chemistry, Pharmaceutical Research, Molecular Biology and Materials Science. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 4, p. 683–716, 2018.

LIPKOWITZ, K. B.; BOYD, D. B. **Reviews in Computational Chemistry 11**. 2. ed. Indianapolis: Wiley-VCH, 1991.

LOPEZ, X.; YORK, D. M. Parameterization of semiempirical methods to treat nucleophilic attacks to biological phosphates: AM1/d parameters for phosphorus. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 109, n. 3, p. 149–159, 2003.

LOWER, S. **Potential Energy Surfaces**. Disponível em: <https://chem.libretexts.org/Courses/University_of_California_Davis/UCD_Chem_107B%3A_Physical_Chemistry_for_Life_Scientists/Chapters/2%3A_Chemical_Kinetics/2.06%3A_Potential_Energy_Surfaces>. Acesso em: 15 set. 2019.

MACKERELL, A. D. et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 18, p. 3586–3616, 1998.

MACKERELL, A. D.; FEIG, M.; BROOKS, C. L. Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: Limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulation.

Journal of Computational Chemistry, v. 25, n. 11, p. 1400–1415, 2004.

MAIER, J. A. et al. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 11, n. 8, p. 3696–3713, 2015.

MARTIN, C.; ZHANG, Y. The diverse functions of histone lysine methylation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 838–849, 2005.

MCNAUGHT, A. D.; WILKINSON, A. **IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the “Gold Book”)**. 2nd ed ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997.

MCQUARRIE, D. A. **Statistical Thermodynamics**. 1. ed. [s.l: s.n.].

MICHAELIS, L. et al. Die Kinetik der Invertinwirkung/ The kinetics of invertase action. **Biochemistry**, v. 49, p. 333–369, 1913.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition**. [s.l: s.n.].

NGUYEN, C. T. et al. Advances in Brief Histone H3-Lysine 9 Methylation Is Associated with Aberrant Gene Silencing in Cancer Cells and Is Rapidly Reversed by 5-Aza-2⁻-deoxycytidine 1. **CANCER RESEARCH**, v. 62, n. 323, p. 6456–6461, 2002.

PASCHON, V.; ALCARAZ, A. C.; KIHARA, A. H. FORMAÇÃO DA MEMÓRIA ESTÁ ASSOCIADA COM MECANISMOS EPIGENÉTICOS QUE SÃO PASSADOS DE GERAÇÃO PARA GERAÇÃO (CÉREBRO LAMARKIANO). **Nanocell News**, v. 1, n. 11, 2014.

PETERS, A. H. F. . et al. Partitioning and Plasticity of Repressive Histone Methylation States in Mammalian Chromatin. **Molecular cell**, v. 12, p. 1577–1589, 2003.

PETERSON, C. L.; LANIEL, M. A. Histones and histone modifications. **Current biology : CB**, v. 14, n. 14, p. 546–551, 2004.

Potential Energy Surface. Disponível em:

<https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Text

book_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Quantum_Mechanics/11%3A_Molecules/Potential_Energy_Surface>. Acesso em: 18 set. 2019.

QIAN, C.; ZHOU, M. M. SET domain protein lysine methyltransferases: Structure, specificity and catalysis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 23, p. 2755–2763, 2006.

RAMACHANDRAN, K. I.; DEEPA, G.; NAMBOORI, K. **Computational chemistry and molecular modeling: Principles and applications**. 1. ed. [s.l.] Springer, 2008a.

RAMACHANDRAN, K. I.; DEEPA, G.; NAMBOORI, K. Computational chemistry and molecular modeling: Principles and applications. **Computational Chemistry and Molecular Modeling: Principles and Applications**, p. 1–397, 2008b.

REECE, J. B.; CAMPBELL, N. A. **Biology**. 6. ed. Boston: Benjamin Cummings, 2002.

RICE, J. C. et al. Histone Methyltransferases Direct Different Degrees of Methylation to Define Distinct Chromatin Domains. **Molecular Cell**, v. 12, n. 6, p. 1591–1598, 2003.

RICHMOND, R. K. et al. Crystal structure of the nucleosome σ resolution core particle at 2.8 Å. **Nature**, v. 389, p. 251–260, 1997.

ROCHA, G. B. et al. RM1: A reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I. **Journal of Computational Chemistry**, v. 27, n. 10, p. 1101–1111, 2006.

RYCKAERT, J. P.; CICCOTTI, G.; BERENDSEN, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. **Journal of Computational Physics**, v. 23, n. 3, p. 327–341, 1977.

SCHRÖDINGER, E. An undulatory theory of the mechanics of atoms and molecules. **Physical Review**, 1926.

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

SHANKAR, S. R. et al. G9a, a multipotent regulator of gene expression.

Epigenetics, v. 8, n. 1, p. 16–22, 2013.

SHI, Y. Histone lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and disease. **nature reviews**, v. 8, p. 829–833, 2007.

SMITH, B. C.; DENU, J. M. Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications. **national institutes of health**, v. 1789, n. 1, p. 45–57, 2010.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method. **Journal of Computational Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 209–220, 1989.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **Journal of Molecular Modeling**, v. 13, n. 12, p. 1173–1213, 2007.

TAYLOR, W. R. et al. A knot or not a knot? SETting the record “straight” on proteins. **Computational Biology and Chemistry**, v. 27, n. 1, p. 11–15, 2003.

THIEL, W. **Perspectives on Semiempirical Molecular Orbital Theory**. [s.l: s.n.]. v. XCIII

TRIEVEL, R. C. et al. Structure and catalytic mechanism of a SET domain protein methyltransferase. **Cell**, v. 111, n. 1, p. 91–103, 2002.

TRIEVEL, R. C. et al. Mechanism of multiple lysine methylation by the SET domain enzyme Rubisco LSMT. **Nature Structural Biology**, v. 10, n. 7, p. 545–552, 2003.

TRUHLAR, D. G. et al. Current Status of Transition-State Theory. **Journal of Physical Chemistry**, v. 100, n. 31, p. 12771–12800, 1996.

VALK-LINGBEEK, M. E.; BRUGGEMAN, S. W. M.; LOHUIZEN, M. VAN. Stem Cells and Cancer : The Polycomb Connection. **Cell**, v. 118, p. 409–418, 2004.

VERMEULEN, M. et al. Quantitative Interaction Proteomics and Genome-wide Profiling of Epigenetic Histone Marks and Their Readers. **Cell**, v. 142, n. 6, p. 967–980, 2010.

VOET, DONALD; VOET, J. Biochemistry, 4th edition. In: **Biochemistry, 4th edition**. Porto Alegre: Artmed, 2011. p. 1482.

WANG, J. et al. Development and testing of a general amber force field. **Journal of**

Computational Chemistry, v. 25, n. 9, p. 1157–1174, 2004.

WANG, J. et al. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 25, n. 2, p. 247–260, 2006.

WANG, Z. et al. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. **national institutes of health**, v. 40, n. 7, p. 897–903, 2008.

WARSHEL, A.; LEVITT, M. Theoretical studies of enzymic reactions: Dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. **Journal of molecular biology**, v. 103, n. 2, p. 227–249, 1976.

WHO. **Cancer**. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 18 nov. 2018a.

WHO. **Cancer**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 22 dez. 2018b.

WILSON, J. R. et al. Crystal structure and functional analysis of the histone methyltransferase SET7/9. **Cell**, v. 111, n. 1, p. 105–115, 2002.

WU, H. et al. Structural biology of human H3K9 methyltransferases. **PLoS ONE**, 2010.

XIAO, B. et al. Specificity and mechanism of the histone methyltransferase Pr-Set7. **Genes and Development**, v. 19, n. 12, p. 1444–1454, 2005.

XIAO, B.; WILSON, J. R.; GAMBLIN, S. J. SET domains and histone methylation. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 13, n. 6, p. 699–705, 2003.

ZHANG, X. et al. Structure of the Neurospora SET domain protein DIM-5, a histone H3 lysine methyltransferase. **Cell**, v. 111, n. 1, p. 117–127, 2002.

ZHANG, X. et al. Structural basis for the product specificity of histone lysine methyltransferases. **Molecular Cell**, v. 12, n. 1, p. 177–185, 2003.

ZHANG, X.; BRUICE, T. C. Histone lysine methyltransferase SET7/9: Formation of a water channel precedes each methyl transfer. **Biochemistry**, v. 46, n. 51, p. 14838–14844, 2007.