



Estudio teórico de la primera etapa del mecanismo de reacción catalizada por la CD38

**Escuela Superior de Ciencias y Tecnologías
Experimentales**

Máster en Química Aplicada y Farmacológica
Trabajo Final de Máster

Autor: Ágata del Carmen Llobet Mut

Tutora: Raquel Castillo Solsona

Castellón de la Plana, julio 2023

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecerle a mi tutora la doctora Raquel Castillo Solsona por su paciencia y dedicación a la hora de enseñarme todos aquellos conceptos nuevos que desconocía durante la realización del Trabajo Final de Máster. También al coordinador de máster, el doctor Pedro Miguel Carda Usó por su asesoramiento e interés en el bienestar de todos los alumnos.

Agradecer también a mis padres por haberme apoyado y aconsejado durante mi trayectoria académica. En especial a mi hermana, por haber sido mi pequeño espacio de paz y tranquilidad al hacerme siempre reír por muy agobiada que estuviera.

Por último, quiero agradecerle a mi pareja por haber sido ese pilar fundamental cada vez que lo necesitaba y, sobre todo por ser mi principal fuente de alegría, ya que ha presenciado y celebrado conmigo todos mis logros a lo largo de este camino.

Gracias a todos ellos, hoy soy la persona que soy.

RESUMEN

El cáncer sigue suponiendo un gran problema en la sociedad, siendo una de las principales causas de muerte en el mundo.

Las investigaciones en torno al tratamiento de esta enfermedad buscan encontrar nuevas estrategias innovadoras, con mayor eficiencia y menores efectos secundarios. Entre las estrategias más prometedoras se encuentra la inmunoterapia. El sistema inmunológico del cuerpo humano es capaz de eliminar las células que producen el cáncer, pero los mecanismos de estos tumores lo desactivan.

La CD38 humana es una glicoproteína transmembrana de tipo II, identificada por primera vez como antígeno de superficie de los linfocitos. Desde entonces se ha observado que posee muchas funciones celulares. En particular, la enzima CD38 parece desempeñar un papel importante en la regulación del metabolismo y la inmunomodulación del microambiente tumoral.

Entre las estrategias utilizadas en el estudio de la primera etapa del mecanismo de reacción catalizada por la CD38 se encuentra la Química Computacional. Esta rama de la química utiliza simulaciones por ordenador para estudiar las propiedades atómicas, reduciendo el tiempo y los recursos necesarios para el descubrimiento de nuevos fármacos.

La Mecánica Molecular (MM) utiliza aproximaciones clásicas para la resolución de los cálculos necesarios. Este método entiende a los átomos como esferas con carga parcial en un espacio concreto y unidas entre sí mediante muelles teóricos, esta aproximación no considera los electrones de los átomos, lo que reduce mucho la dificultad de los cálculos. Este método por sí solo no es suficiente. El núcleo de este trabajo es la Dinámica Molecular (MD), la cual otorga libertad a los átomos de un sistema para que evolucionen a posiciones de mínima energía más estables. Con el objetivo de estudiar el mecanismo de reacción, se han usado simulaciones híbridas de mecánica cuántica/mecánica molecular (QM/MM). En los métodos QM/MM, la región del sistema en la que tiene lugar el proceso químico se trata a un nivel apropiado de la teoría de la química cuántica, mientras que el resto se describe mediante un campo de fuerzas de mecánica molecular. Este enfoque permite estudiar la reactividad química en sistemas de gran tamaño.

El objetivo final de este trabajo es la observación de la formación del intermedio de reacción y la obtención de los perfiles de energía de dicha reacción y finalmente, mediante un análisis visual del entorno, sacar conclusiones sobre este mecanismo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Sistema inmunitario</i>	1
1.2 <i>El sistema inmunitario y el cáncer</i>	1
1.3 <i>Tipos de inmunoterapia</i>	3
1.4 <i>Inhibidores de punto de control inmunitario</i>	4
1.6 <i>La enzima CD38</i>	5
1.7 <i>Estructura y mecanismo de la CD38</i>	7
2. METODOLOGÍA	10
2.1 <i>Obtención del PDB</i>	10
2.2 <i>Preparación del sistema</i>	10
2.3 <i>Protocolo de simulación</i>	12
2.4 <i>Dinámica molecular</i>	12
2.5 <i>Obtención de perfiles de energía</i>	12
2.6 <i>Análisis de resultados</i>	14
3. RESULTADOS	15
3.1 <i>Análisis del PDB</i>	15
3.2 <i>Simulación de dinámica molecular</i>	15
3.3 <i>Perfiles de energía</i>	24
4. CONCLUSIONES	30
4.1 <i>Dinámica molecular</i>	30
4.2 <i>Perfiles de energía</i>	31
5. BIBLIOGRAFÍA	32

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Sistema inmunitario

El sistema inmunitario o sistema inmunológico es un conjunto de células, tejidos y moléculas que realizan procesos biológicos en pos de la defensa contra microorganismos y la inmunovigilancia contra la emergencia de tumores, enfermedades autoinmunes y alérgicas [1].

Desde el punto de vista funcional se puede clasificar en sistema inmune innato y sistema inmune adquirido (o específico) (Figura 1) y ambos sistemas trabajan de forma coordinada para una mayor eficiencia [1].

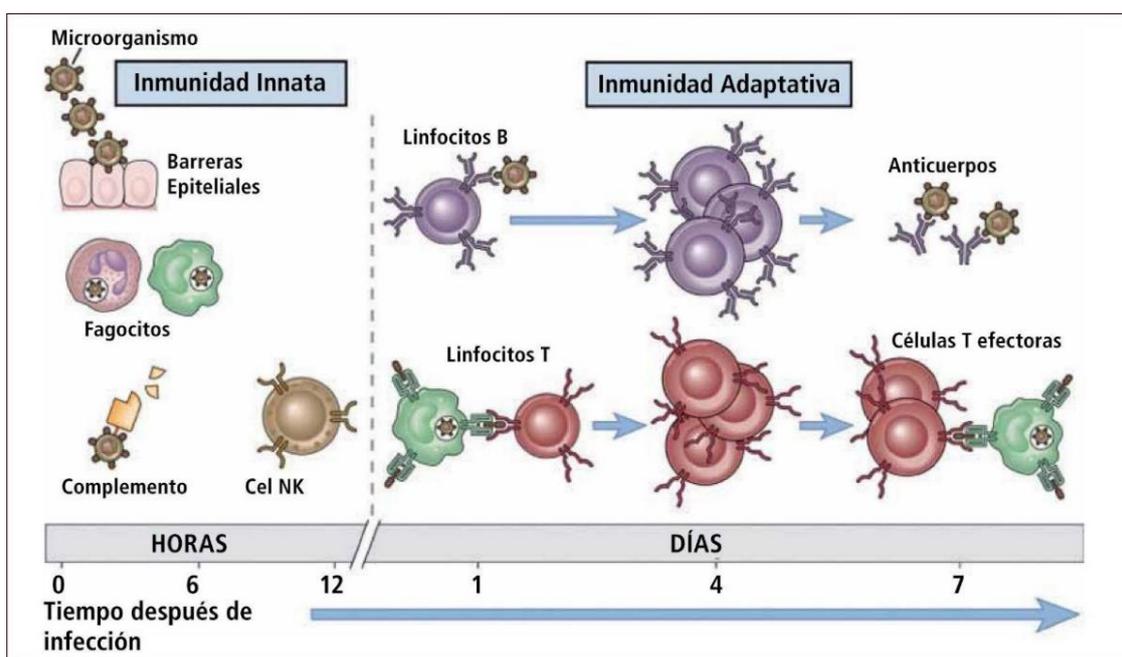


Figura 1: Tiempo de actuación del sistema inmune innato y adaptativo. Los linfocitos maduros se desarrollan a partir de las células madre de la médula ósea en los órganos linfoides generativos, y las respuestas inmunitarias a los antígenos extraños se producen en los tejidos linfoides periféricos. Paola, T. P. (2012). Visión panorámica del sistema inmune. Revista Médica Clínica Las Condes, 23(4), 446-457. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(12\)70335-8](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(12)70335-8)

1.2 El sistema inmunitario y el cáncer

Como parte de su función normal, el sistema inmunitario detecta y destruye las células anormales e impide el crecimiento de muchos cánceres. Las células tumorales son células del cuerpo que han mutado, pero que expresan unos antígenos que hace que las células inmunes las reconozca como un agente perjudicial para el organismo [2].

La inmunoección del cáncer es un proceso dinámico compuesto por tres fases distintas (Figura 2): eliminación, equilibrio y escape [2].

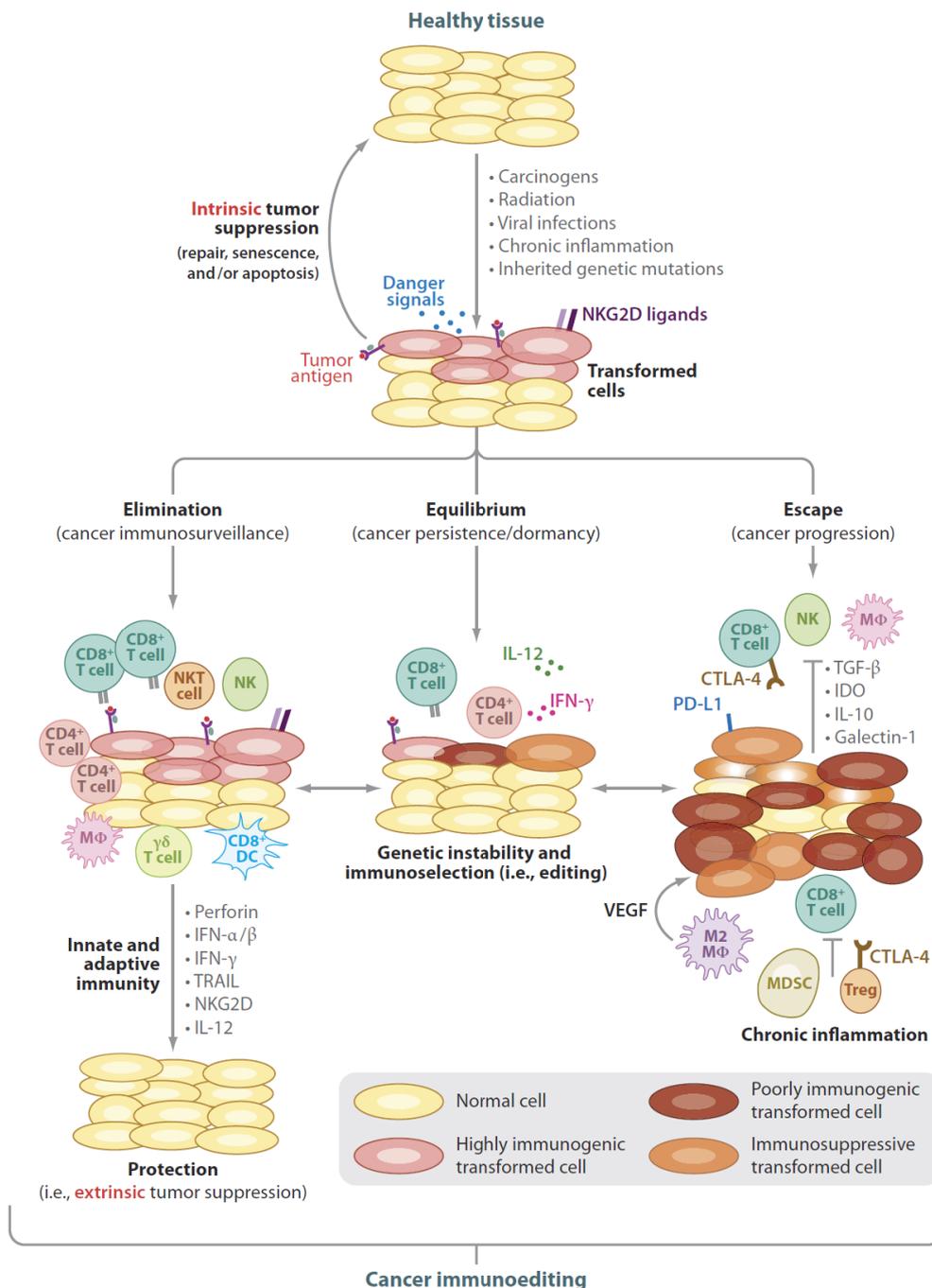


Figura 2: Las tres fases de la inmunoección del cáncer. La inmunoección del cáncer es el resultado de tres procesos que funcionan independientemente o en secuencia para controlar y moldear el cáncer. Una vez que las células normales se transforman en tumorales por la combinación de oncogenes adquiridos y mecanismos supresores de tumores intrínsecos fallidos, el sistema inmunitario puede actuar como supresor de tumores extrínseco eliminando las células tumorales o impidiendo su crecimiento. En la primera fase, la eliminación, antes conocida como inmunovigilancia del cáncer, las células y moléculas inmunitarias innatas y adaptativas reconocen las células transformadas y las destruyen, con lo que se recupera el tejido fisiológico normal. Sin embargo, si la inmunidad antitumoral es incapaz de eliminar por completo las células transformadas, las variantes tumorales supervivientes pueden entrar en la fase de equilibrio, en la que las células y moléculas de la inmunidad adaptativa impiden el crecimiento del tumor. Estas variantes pueden adquirir nuevas mutaciones que les permitan eludir el reconocimiento, la destrucción o el control de las células tumorales por parte de las células inmunitarias y progresar a neoplasias malignas clínicamente detectables en la fase de escape. Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2011). Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101324>

Numerosos estudios han demostrado que tanto la inmunidad innata como la adquirida son capaces de reconocer muchos antígenos del tumor y desencadenar una respuesta antitumoral frente a tumores en desarrollo. Estas respuestas antitumorales son mediadas sobre todo por linfocitos T, con la contribución mínima de una respuesta mediada por anticuerpos [3].

Sin embargo, las células tumorales, pobremente inmunogénicas, escapan de la inmunovigilancia haciendo al hospedador incapaz de producir una respuesta inmune adecuada, dirigida hacia la metástasis del tumor. Debido a esto se requiere de terapias externas. Estas terapias son las denominadas inmunoterapias [4].

1.3 Tipos de inmunoterapia

La inmunoterapia es un tipo de tratamiento que ayuda al sistema inmunitario a combatir el cáncer. Se usan varios tipos de inmunoterapia para tratar el cáncer [5]:

- **Inhibidores de puntos de control inmunitario**, son fármacos que bloquean los puntos de control inmunitarios. Estos puntos de control son un componente normal del sistema inmunitario y hacen que las respuestas inmunitarias no sean muy fuertes. Al bloquearlas, estos fármacos permiten que las células inmunitarias respondan con más fuerza al cáncer.
- **Terapia de transferencia de células T**, es un tratamiento que fortalece la capacidad natural de las células T para combatir el cáncer. En este tratamiento, las células inmunitarias se extraen del tumor del paciente. Las células que son más activas contra el cáncer se seleccionan o manipulan en el laboratorio para que sean más eficientes contra las células cancerosas, se multiplican en grupos más grandes y se regresan al cuerpo por medio de una infusión.
- **Anticuerpos monoclonales**, son proteínas del sistema inmunitario creadas en el laboratorio con el propósito de unirse a blancos específicos en las células cancerosas. Algunos anticuerpos monoclonales marcan las células cancerosas para que puedan ser vistas mejor y destruidas por el sistema inmunitario.
- **Vacunas de tratamiento** contra el cáncer, funcionan al fortalecer la respuesta del sistema inmunitario contra las células cancerosas.
- **Inmunomoduladores**, son sustancias que intensifican la respuesta inmunitaria del cuerpo contra el cáncer. Unas de estas sustancias afectan partes específicas del sistema inmunitario, mientras que otras afectan al sistema inmunitario en una forma más general.

1.4 Inhibidores de punto de control inmunitario

Los puntos de control inmunitarios (*immune checkpoints*) son una parte normal del sistema inmunitario. Su papel es impedir que la respuesta inmunitaria sea tan fuerte que destruya las células sanas en el cuerpo [3].

Los puntos de control inmunitario, son una serie de proteínas presentes en la superficie de las células sanas y en la superficie de las células inmunitarias, llamadas células T. Cuando las proteínas de puntos de control se unen, envían una señal de inactivación a las células T, impidiendo el daño a estas células sanas. Las células cancerosas pueden aprovechar estos puntos para impedir que el sistema inmunitario destruya el cáncer [3].

Los medicamentos llamados inhibidores de puntos de control, funcionan al bloquear las proteínas de puntos de control para que no se unan a las células cancerosas. Esto impide que se envíe la señal de inactivación, para permitir que las células T destruyan las células cancerosas [3].

1.5 Inmunoterapia contra el cáncer

En los últimos años, la inmunoterapia contra el cáncer ha resultado ser una herramienta básica en los tratamientos oncológicos. La inmunoterapia es un tipo de tratamiento que estimula las defensas naturales del cuerpo para combatir la enfermedad, bien ralentizando o deteniendo el crecimiento de las células cancerosas, o bien ayudando al sistema inmunológico a destruirlas. La mayoría de estos avances se han producido debido al descubrimiento y bloqueo de los puntos de control inmunitarios (*immune checkpoints*) [6].

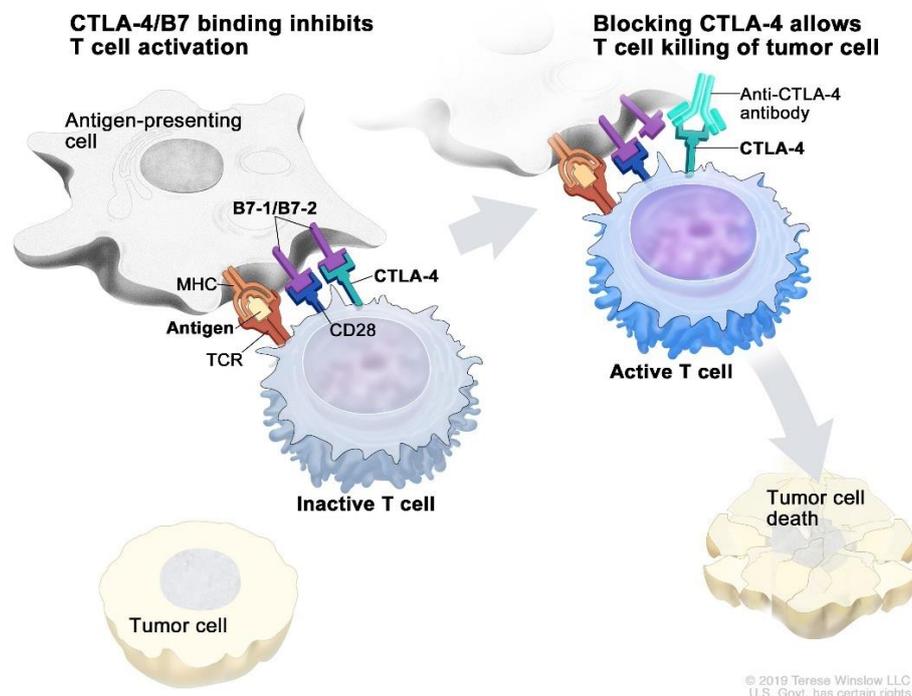


Figura 3: Representación esquemática de cómo funciona la inmunoterapia en células cancerígenas al inhibir el punto de control CTLA-4. Inhibidores de puntos de control inmunitario - NCI. Retrieved July 12, 2023, from <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia/inhibidores-de-puntos-de-control>

Los primeros puntos de control bloqueados por anticuerpos monoclonales fueron las moléculas de CTLA-4 y PD-1/PD-L1 para tratar inicialmente el melanoma metastásico y, posteriormente otros entornos tumorales como pulmón, riñón, vejiga, cabeza y cuello (Figura 3). A pesar de los éxitos obtenidos, hay pacientes que no presentan una respuesta satisfactoria ya que no abordan adecuadamente las alteraciones que se producen en los tumores o producen efectos secundarios molestos y, se necesita explorar nuevos puntos de control [7].

Una de las búsquedas de nuevos puntos de control se centra en la vía adenosinérgica y, concretamente, en su metabolito adenosina, ya que limita la funcionalidad de las células T que forman parte del sistema inmunitario [8].

Recientemente, se ha descubierto una nueva ruta de obtención de adenosina en el microentorno tumoral que se produce a partir de NAD^+ en una reacción catalítica entre otras proteínas, por la transmembrana multifuncional CD38 [9].

1.6 La enzima CD38

La CD38 humana es una glicoproteína transmembrana de tipo II identificada por primera vez como antígeno de superficie de los linfocitos. Desde entonces se ha observado que posee muchas funciones celulares [10].

En particular, la enzima CD38 parece desempeñar un papel importante en la regulación del metabolismo y la inmunomodulación del microambiente tumoral [11]. El microambiente tumoral es vital para el desarrollo, la progresión y la persistencia del cáncer ya que desencadena procesos biológicos como la hipoxia, la angiogénesis, la resistencia a la apoptosis y la reprogramación metabólica [12]. Además, la CD38 es el mayor consumidor de NAD^+ en los mamíferos y se considera un objetivo prometedor para los inhibidores de moléculas pequeñas, ya que las células altamente proliferantes, como son las células T y muchas células tumorales, dependen energéticamente en gran medida del NAD^+ [13].

La CD38 es una proteína bien caracterizada con múltiples funciones, tanto como proteína enzimática como receptor expresado en la superficie celular [14]. Como enzima, posee actividad glucosidolasa sobre el NAD^+ siendo capaz de catalizar diferentes reacciones.

En la primera reacción, la CD38 funciona como ciclasa catalizando la síntesis de la adenosina difosfato ribosa cíclica (cADPR). Pero también es capaz de catalizar como hidrolasa la reacción para obtener adenosina difosfato ribosa (ADPR) a partir tanto de NAD^+ como de cADPR [15], disminuyendo la cantidad de NAD^+ extracelular y, por tanto, limitando la capacidad energética de la célula (Figura 4). Además, el ADPR puede alimentar la ruta de producción de adenosina, proporcionando una vía secundaria para obtener adenosina extracelular.

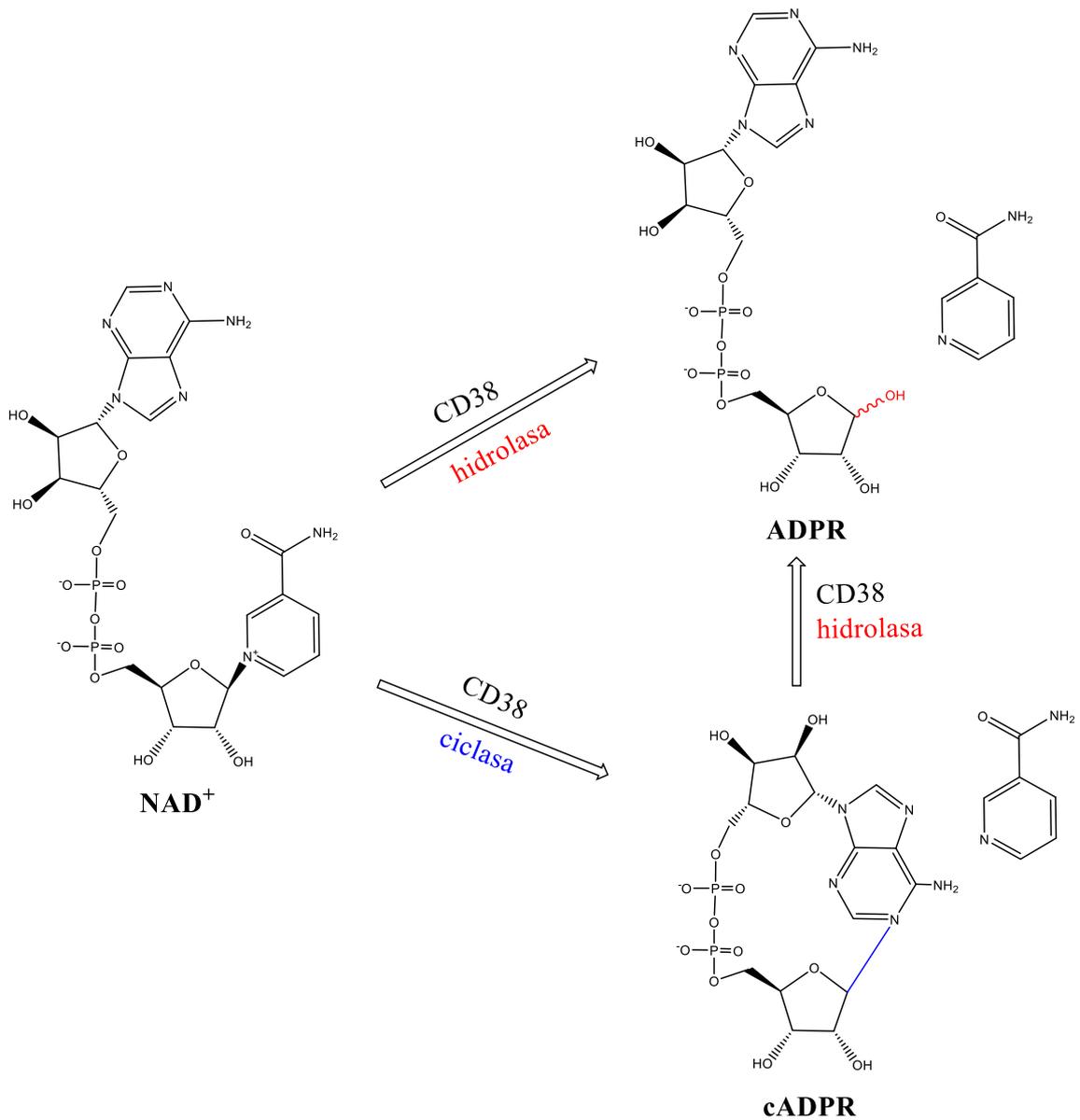


Figura 4: Reacciones catalizadas por la enzima CD38.

Catalíticamente, la CD38 es bastante diferente de otras ciclasas, ya que, aunque ambas utilizan NAD^+ como sustrato, la CD38 produce solo una pequeña cantidad de cDPR, mientras que el producto principal es el ADPR [16]. Además, es una enzima multifuncional, ya que también puede utilizar NADP^+ como sustrato, y en presencia de ácido nicotínico, puede producir ácido nicotínico adenina dinucleótido fosfato (NAADP⁺) [17]. A pH ácido, esta enzima es capaz de catalizar la hidrólisis de NAADP⁺ a ADPRP [18].

Esta proteína está expresada, casi de manera ubicua, en múltiples poblaciones inmunitarias, incluidas las células T, NK y dendríticas. Por todo ello, la inhibición de la actividad enzimática de CD38 se ha postulado como un buen sistema para tratar diferentes enfermedades humanas como son el cáncer y otras enfermedades metabólicas. Además, el metabolismo del NAD^+ está implicado en el proceso de envejecimiento y la inhibición de esta enzima podría aumentar la longevidad.

1.7 Estructura y mecanismo de la CD38

La glucoproteína transmembrana CD38 contiene una pequeña cola N-terminal situada en el citosol, un dominio transmembrana de un solo paso y un dominio grande C-terminal extracelular (Figura 5).

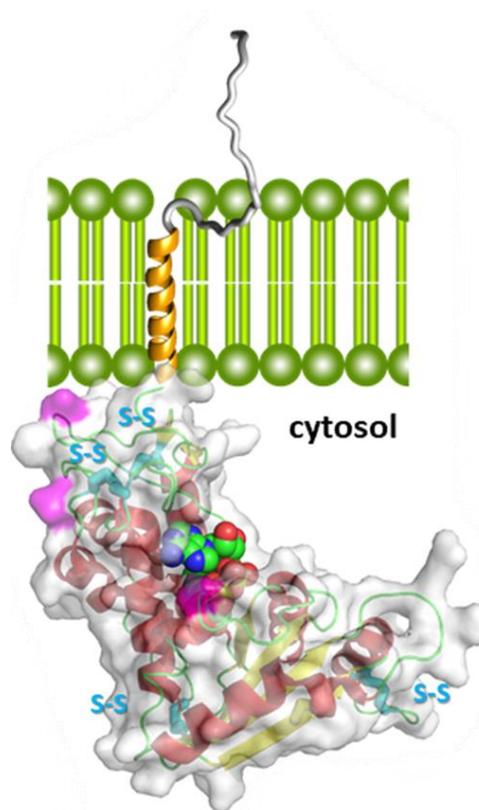


Figura 5: Estructura de la CD38. Representación del dominio intracelular y extracelular. LEE, H. C., DENG, Q. W., & ZHAO, Y. J. (2022). The calcium signaling enzyme CD38 - a paradigm for membrane topology defining distinct protein functions. *Cell Calcium*, 101, 102514. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2021.102514>

Este último dominio fuera de la célula es el encargado de catalizar la formación de cADPR y ADPR a partir del NAD⁺. El mecanismo propuesto para este tipo de enzimas, las ciclasas [19], tendría lugar a través de un intermedio estabilizado en el centro activo por el residuo Glu226, siendo esta la etapa limitante.

A continuación, podrían tener lugar dos posibles reacciones nucleofílicas:

- Una vía intermolecular donde atacaría una molécula de agua (actividad glucohidrolasa).
- Una reacción intramolecular para formar el ADPR ciclado (actividad ciclasa).

La naturaleza química del intermedio propuesto está en controversia. Por un lado, se ha propuesto un intermedio covalente donde el residuo catalítico Glu226 formaría un enlace éster con el C1D del NAD⁺ [20], y por otro, un intermedio no covalente estabilizado por interacciones polares con el residuo Glu226 [21].

Recientemente, se ha propuesto la existencia de los dos intermedios dependiendo de los sustratos (Figura 6), concretamente dependería del sustituyente de la posición 2' del anillo de pentosa del sustrato. En concreto, el intermedio no covalente se formaría cuando se utilizaran sustratos naturales como el NAD⁺ o NMN y sería más efectivo que el intermedio covalente que se formaría con posibles inhibidores. En contrapartida, el intermedio covalente es dinámico y se puede someter a un movimiento rotacional grande inducido por un nucleófilo (en concreto, la nicotinamida) necesario para poder ciclarse [22].

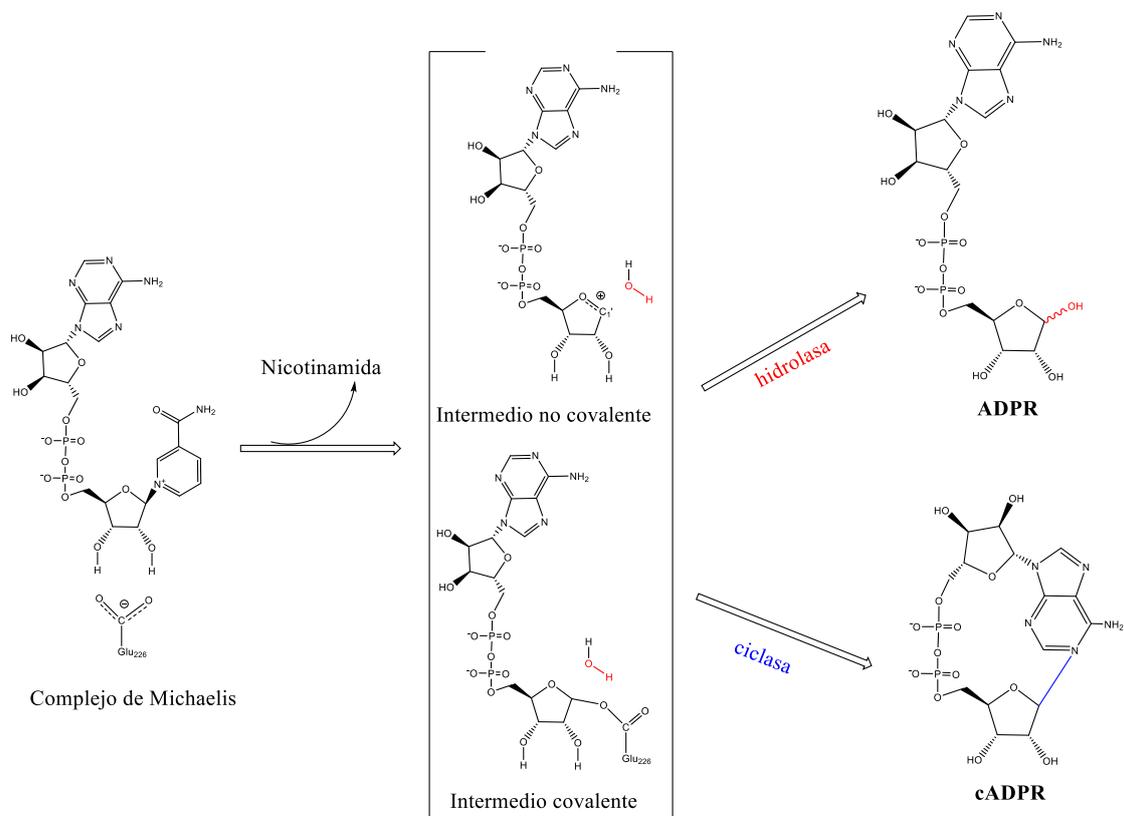


Figura 6: Representación esquemática de los posibles mecanismos de acción catalizados por la CD38.

La forma activa de la enzima es un homodímero y todas las reacciones que cataliza las hace en el mismo centro activo situado cerca de la mitad de cada monómero (Figura 7). El centro activo está cargado negativamente con residuos ácidos. En concreto, el residuo Glu226 estaría implicado directamente en la formación del intermedio catalítico propuesto y su mutación elimina la actividad catalítica ^[23]. Los residuos Trp125, Asp155, Trp189 y Ser193 parecen estar implicados en el reconocimiento del sustrato con interacciones hidrofóbicas ^[24], el residuo Glu226 tendría una función importante regulando las actividades glucohidrolasa y ciclasa ^[25] y la Lys129 parece ser esencial en la hidrólisis del cADPR.

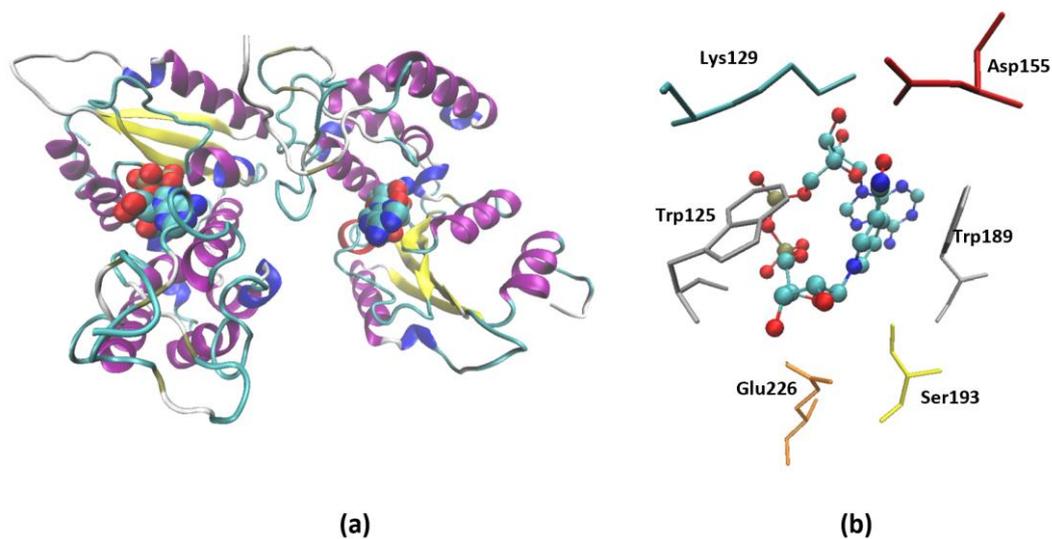


Figura 7: Estructura de la enzima CD38 humana (PDB: 2I65) coordinado con NAD⁺ (a) y su centro activo (b). A. Tohgo, H. Munakata, S. Takasawa, K. Nata et al. Lysine 129 of CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase) participates in the binding of ATP to inhibit the cyclic ADP-ribose hydrolase. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 3879-3882.

2. METODOLOGÍA

2.1 Obtención del PDB

La secuencia nucleotídica de la CD38 de *Homo Sapiens* se ha obtenido de la base de datos *Protein Data Bank* (fecha de obtención de la estructura 27 de enero de 2023).

Esta proteína posee dos cadenas, formadas por 262 amino ácidos cada cadena y 2 moléculas de NAD⁺.

La estructura presenta regiones no resueltas. De los 524 residuos depositados en el modelo solamente están presentes 501. Estos 23 residuos restantes pertenecen a residuos tipo *coil* de los extremos de la proteína. Los residuos faltantes en la cadena A son los aminoácidos del 39 al 47 y del 297 al 300. Mientras que los aminoácidos de la cadena B comprenden desde el aminoácido 39 al 44 y del 297 al 300.

2.2 Preparación del sistema

Antes de iniciar con las simulaciones de dinámica moléculas se debe hacer unas modificaciones en la estructura de la proteína. En primer lugar, en el PDB original alguno de los residuos aminoacídicos posee mutaciones que originalmente no deberían estar en esta proteína, estas mutaciones están presentes en ambas cadenas de la proteína. Los cambios realizados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Mutaciones realizadas en el archivo PDB original para la preparación del sistema.

Pdb original (con mutaciones)	Pdb (modificado)
GLN49	THR49
ASN100	ASP100
ASN164	ASP164
ASN209	ASP209
ASN219	ASP219
GLU226	GLN226

Seguidamente se añaden 6 enlaces disulfuro (S-S) en cada cadena, tanto en A como en B. Los cambios realizados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Puentes disulfuro añadidos al PDB original para la preparación del sistema.

Enlaces S-S	
Cadena A	Cadena B
67 – 82	272 – 287
99 – 180	304 – 406
119 – 201	324 - 406
160 – 173	365 – 378
254 – 275	459 – 480
287 – 296	492 - 501

Finalmente queda mirar el estado de protonación de las histidinas para definir las en el PDB. El estado de protonación de las histidinas se muestra en la Tabla 3.

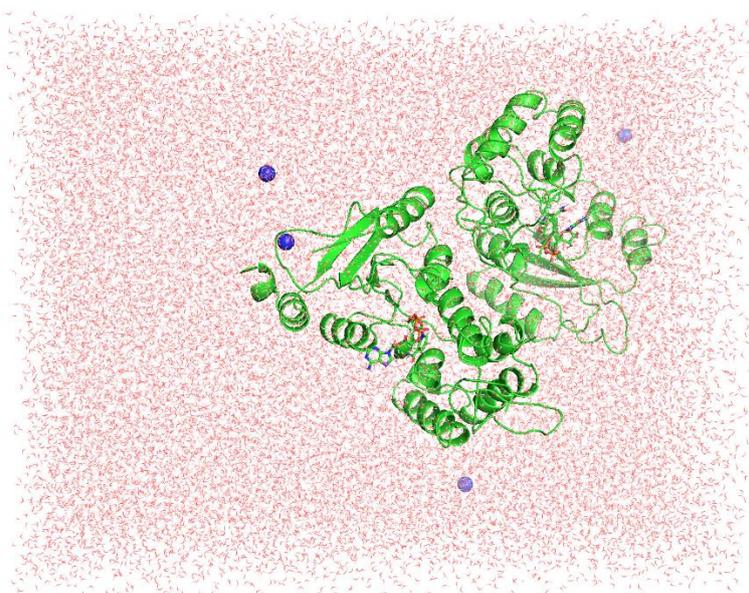
Tabla 3: Estado de protonación de las histidinas del PDB 2I65.

	A	B
HIS74	NE	NE
HIS79	NE	NE
HIS97	NE	NE
HIS133	Protonada	
HIS205	NE	NE
HIS228	ND	ND
HIS244	Protonada	

Una vez obtenidos los modelos de la proteína CD38 se procede a la preparación del sistema para la realización de simulaciones de dinámica molecular. Los sistemas se han simulado utilizando NAMD ^[26] con el campo de fuerzas AMBER ^[27] para la proteína y el campo de fuerzas AmberTools ^[27] para el NAD⁺. Las simulaciones se han realizado en las GPUs del grupo de investigación de Bioquímica Computacional de la Universitat Jaume I. Se ha escogido el campo de fuerzas AMBER ^[27], ya que permite describir correctamente la estructura secundaria y presenta alta transferibilidad entre sistemas con diferentes características estructurales (hélice ala, lámina beta y *loop*).

Con tal de preparar el sistema se ha utilizado TLEAP ^[27] (un módulo software de AmberTools^[27]) que, partiendo de los ficheros en formato PDB obtenidos en el apartado anterior, utiliza la información contenida en el campo de fuerzas AMBER ^[27] y AmberTools ^[27] para generar dos ficheros necesarios en el inicio de la simulación con el programa NAMD ^[26]. El fichero (prmtop) contiene la topología, es decir, los tipos de átomos y los parámetros que se utilizan para calcular la energía del sistema. El otro (inpcrd) contiene las coordenadas del sistema. Además, el TLEAP ^[27] adiciona iones de sodio (Na⁺) con los parámetros estándar de AMBER ^[27] hasta la neutralización y solvata el sistema en una caja ortorrómbica de agua de 15 Å a partir de la proteína (Figura 8), con el campo de fuerzas TIP3P ^[28], con tal de simular el entorno característico de la proteína.

El número total de iones y aguas adicionadas a los sistemas se muestra en la Tabla 4.


Figura 8: Proteína CD38 rodeada de una caja de aguas de 15 Å y 4 iones Na⁺

2.3 Protocolo de simulación

Para empezar propiamente la simulación de dinámica molecular (MD), hace falta equilibrar previamente el sistema a las condiciones de simulación. El proceso de equilibrado consta de tres fases:

- **Minimización** → Proceso que se lleva a cabo en dos pasos: i) en el primero se optimiza la posición del solvente (agua) y de los iones con la estructura proteica fija, ii) en el segundo, se optimiza la posición de los átomos del sistema completo con tal de obtener una conformación inicial más estable.
- **“Heating”** → Proceso que consiste en aumentar progresivamente la temperatura de 0K a 300K, dando energía cinética al sistema minimizado con tal de iniciar el movimiento de los átomos que componen el sistema dinámico. Este proceso se realiza en condiciones de volumen constante.
- **Equilibrado** → Proceso que se realiza a presión constante permitiendo que el volumen cambie de forma que la densidad del solvente (agua) se relaje y se adapte a las condiciones del sistema (temperatura 300K).

2.4 Dinámica molecular

Una vez el sistema está equilibrado, se procede a realizar propiamente la simulación de dinámica molecular. Esta fase es equivalente al equilibrado realizado anteriormente, pero se realiza a volumen constante y por un periodo de tiempo de simulación mayor. En este paso, se pretende relajar la estructura obtenida a partir del modelo inicial hasta llegar a una conformación más estable para la proteína.

Se envían diversas simulaciones de dinámica molecular de 100ns. En base al elevado número de residuos del sistema y el coste computacional asociado, 200ns resultaría suficientes para obtener estructuras relajadas de la proteína, pero con el fin de intentar buscar de forma natural el intermedio de la reacción, se extendió la dinámica a 300ns.

Tabla 4: Parámetros de la proteína CD38. Número de residuos, número de moléculas de agua e iones adicionados para la preparación del sistema y tiempo de simulación de dinámica molecular para el sistema.

Sistema	Nº residuos	Nº aguas	Nº iones (Na ⁺)	MD (ns)
CD38	501	35922	4	300

2.5 Obtención de perfiles de energía

Para la obtención de los perfiles de energía de ambos intermedios se utilizó el programa QM3^[29]. *QMCube* (QM3) es una suite escrita en el lenguaje de programación Python, inicialmente centrado en simulaciones QM/MM^[30] multiescala de sistemas biológicos. Permite al usuario combinar programas QM y MM, proporcionando un acceso unificado a una amplia gama de métodos computacionales^[29].

Para la obtención de estos perfiles de energía son necesarias dos estructuras iniciales, los reactivos de los que se parte (PDB:2I65) y los productos (intermedios). Se inicia con una optimización de los reactivos. En este tipo de cálculos, el modelo se divide, en una región QM que comprende los átomos implicados en el paso químico (NAD⁺ de la cadena A y la cadena lateral del GLU226) y una región MM donde el resto de los átomos a partir de los 18Å estarán fijos.

La parte QM se ha realizado con el campo de fuerzas AM1 ^[31] y el programa MOPAC ^[32], mientras que la parte MM se ha hecho con el campo de fuerzas AMBER ^[27] y el programa OpenMM ^[33]. Comprendiendo así 79 átomos en la parte QM y en la MM 15161 átomos.

Una vez se han optimizado los reactivos, se debe obtener la estructura de los intermedios, estos se obtienen manualmente mediante la manipulación de las distancias entre los átomos del NAD⁺ y el aminoácido GLU226 (GLU179 en el archivo debido a la falta de residuos) del CD38 (distancia de 3,5Å - 4Å) (Figura 9).

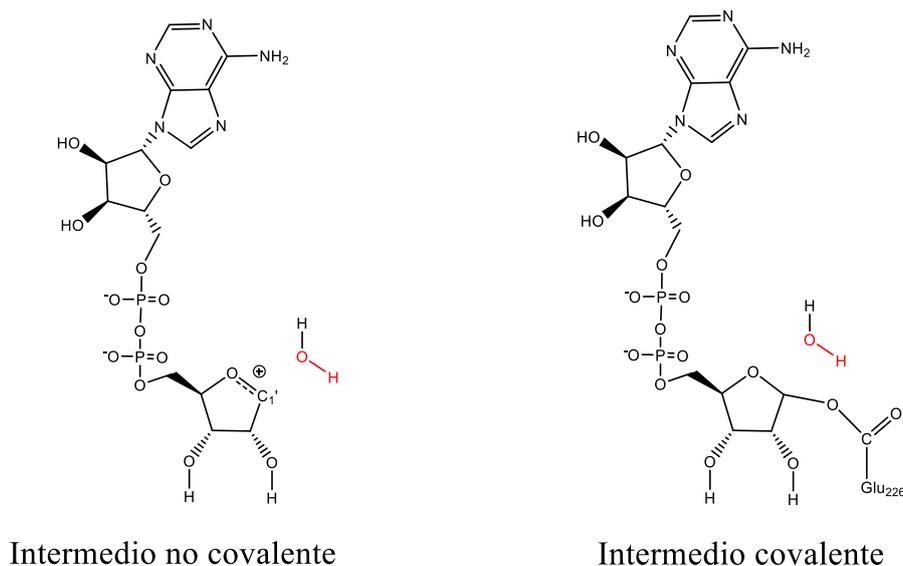


Figura 9: Estructura del intermedio covalente y no covalente para la obtención de los perfiles de energía.

Una vez se tienen los reactivos y los productos se procede al lanzamiento de algoritmo NEB ^[34] (*Nudged Elastic Band*) para encontrar el camino de mínima energía entre estas dos estructuras.

El método funciona optimizando una serie de imágenes intermedias a lo largo de la ruta de reacción. Cada imagen encuentra la energía más baja posible manteniendo el mismo espaciado con las imágenes vecinas. Esta optimización restringida se realiza añadiendo fuerzas de resorte a lo largo de la banda entre imágenes y proyectando el componente de la fuerza debido al potencial perpendicular a la banda ^[34].

Este algoritmo devuelve 41 puntos de valor energético, entre ellos el valor numérico de TS (punto de mayor energía) del perfil energético y el valor energético del punto inicial. Con el valor del TS y el valor inicial de energía del sistema se puede calcular manualmente la energía de activación del sistema.

2.6 Análisis de resultados

Se han utilizado diversos métodos para el análisis de los resultados. Primero se ha realizado un análisis visual, en el que se ha visualizado las trayectorias con el programa PyMol ^[35], diseñado para modelar, visualizar y analizar sistemas biológicos.

Para la modificación manual de la proteína con el objetivo de la obtención de los productos necesarios para el cálculo del perfil de energía, se ha utilizado el programa PyMol ^[35].

Finalmente, con tal de graficar los resultados de las dinámicas y los perfiles de energía, se ha usado el programa Microsoft Excel ^[36].

3. RESULTADOS

Como la capacidad catalítica de una enzima depende de la estructura del intermedio de la reacción, es importante caracterizar la naturaleza química de este intermedio.

3.1 Análisis del PDB

Para estudiar la estructura de la enzima CD38 se ha utilizado el PDB 2I65 (*Protein Data Bank*, fecha de obtención de la estructura 27 de enero de 2023) (Figura 10), este ha sido visualizado con el programa PyMol ^[35].

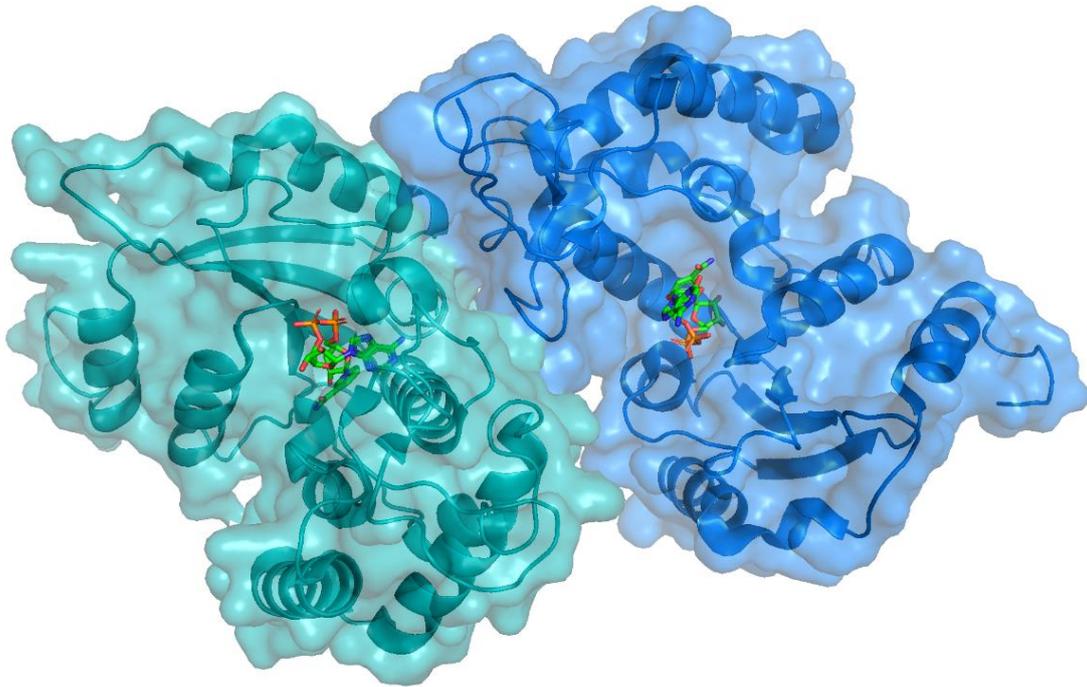


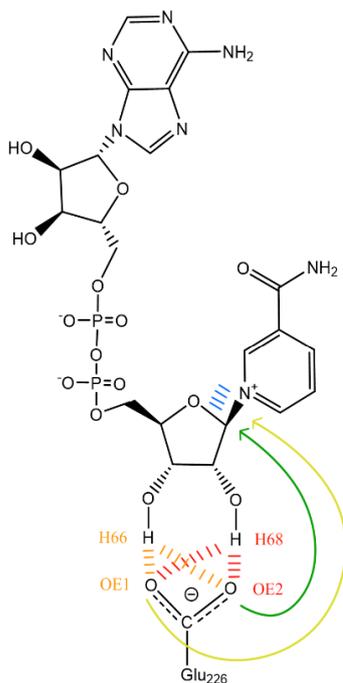
Figura 10: Estructura 3D de la proteína CD38 junto con NAD⁺

3.2 Simulación de dinámica molecular

Para describir el mecanismo de reacción, se empleó la dinámica molecular sobre el sistema esperando que de forma autónoma este adquiriera en alguno de los pasos de la simulación la estructura del intermedio de menor coste energético.

Se empezó con una simulación inicial de 100ns para equilibrar el sistema y seguidamente a partir de este paso se hicieron unos 100ns más, para finalmente calcular otros 100ns. En total se simularon 300ns. Para saber si el sistema adoptaba de forma autónoma la conformación de intermedio covalente o no covalente se analizaron los resultados de estas simulaciones.

A continuación, se analizaron a través de gráficos de Excel, las distancias entre diversos átomos para ver si en algún momento de la dinámica se había logrado alcanzar la conformación de alguno de los dos intermedios propuestos.



Según la información que se posee de los intermedios (Figura 11), las distancias relevantes a analizar serían la distancia entre el C1D y el N de la nicotinamida ya que, si se forma el intermedio, estos dos átomos se separarían rompiendo el enlace. Otra distancia relevante, es la existente entre el H del NAD⁺ y el O del residuo GLU226. En este caso tenemos varias opciones, se analizaron las distancias del H66 con el OE1 y OE2 al igual que se analizaron también las del H68 con el OE1 y OE2. Esto es debido a que no se sabe cuál de los dos H es el preferido por el sistema para formar el intermedio ya que cuando el carbonilo está unido a dos oxígenos, el H puede interactuar con cualquiera de los dos. Finalmente se analizaron también las distancias entre el C1D y el OE1 y OE2, ya que si se llegase a formar el intermedio covalente se vería que la distancia entre alguno de estos dos átomos se acorta.

Figura 11: Resumen de todas las distancias calculadas con el fin de ver si se formaba alguno de los dos intermedios propuestos.

A continuación, se adjuntan las gráficas Excel con las distancias analizadas.

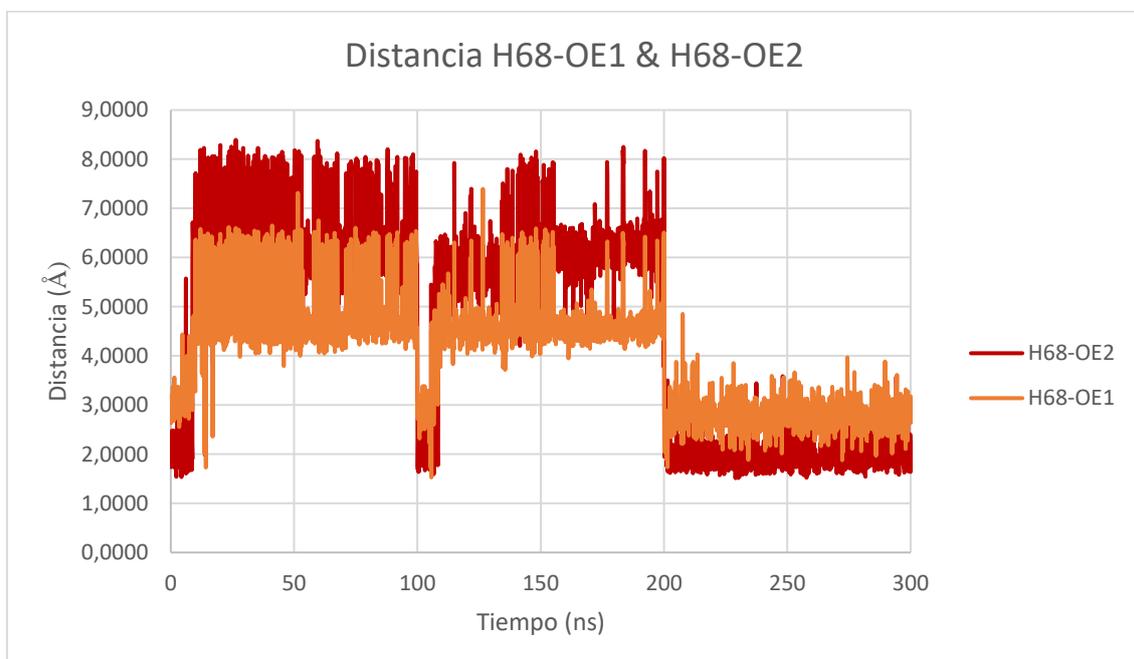


Figura 12: Distancias a lo largo de 300ns entre el H68 del NAD⁺ y el OE1 y OE2 del residuo GLU226. En el eje de las ordenadas (y) se encuentra el valor de la distancia en Å y en el de las abscisas (x) el tiempo de simulación en ns.

Según lo que se puede observar durante los primeros 100ns (Figura 12), el H68 parece estar inicialmente suficientemente cerca tanto de OE1 como de OE2 con tal de forma un enlace de tipo hidrógeno, pero acto seguido ambos átomos se distancian. En los siguientes 100ns sucede algo similar, al inicio de los 100ns parece que se vuelven a acercarse para luego alejarse de nuevo. Finalmente, a partir de los 200ns parece ser que el acercamiento entre estos átomos es estable. Pudiendo indicar así que el enlace por puente de hidrógeno entre alguno de estos dos átomos de oxígeno se ha dado.

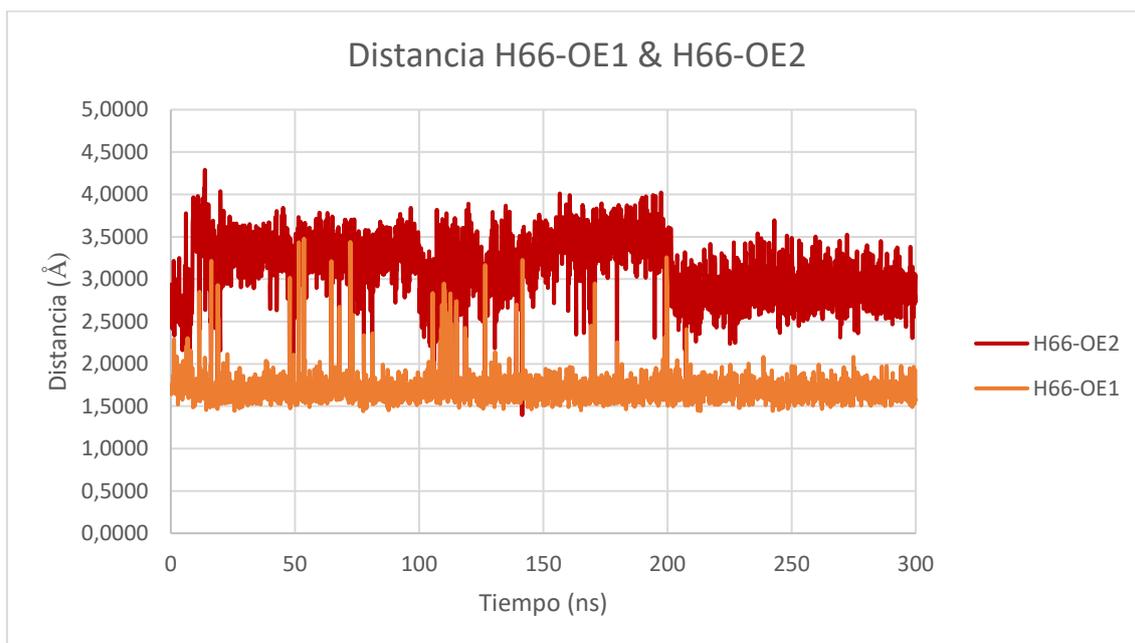


Figura 13: Distancias a lo largo de 300ns entre el H66 del NAD^+ y el OE1 y OE2 del residuo GLU226. En el eje de las ordenadas (y) se encuentra el valor de la distancia en Å y en el de las abscisas (x) el tiempo de simulación en ns.

Según lo que se puede observar durante los 300ns de dinámica (Figura 13), la distancia entre H66 del con OE1 y OE2 se mantiene bastante estable a lo largo del tiempo. Siendo el H66 del NAD^+ más cercano con el OE1 del residuo aminoacídico. Esta distancia entre H66 y OE1 tan estable puede sugerir que se ha formado un enlace de puente de hidrógeno entre estos dos átomos del sistema.

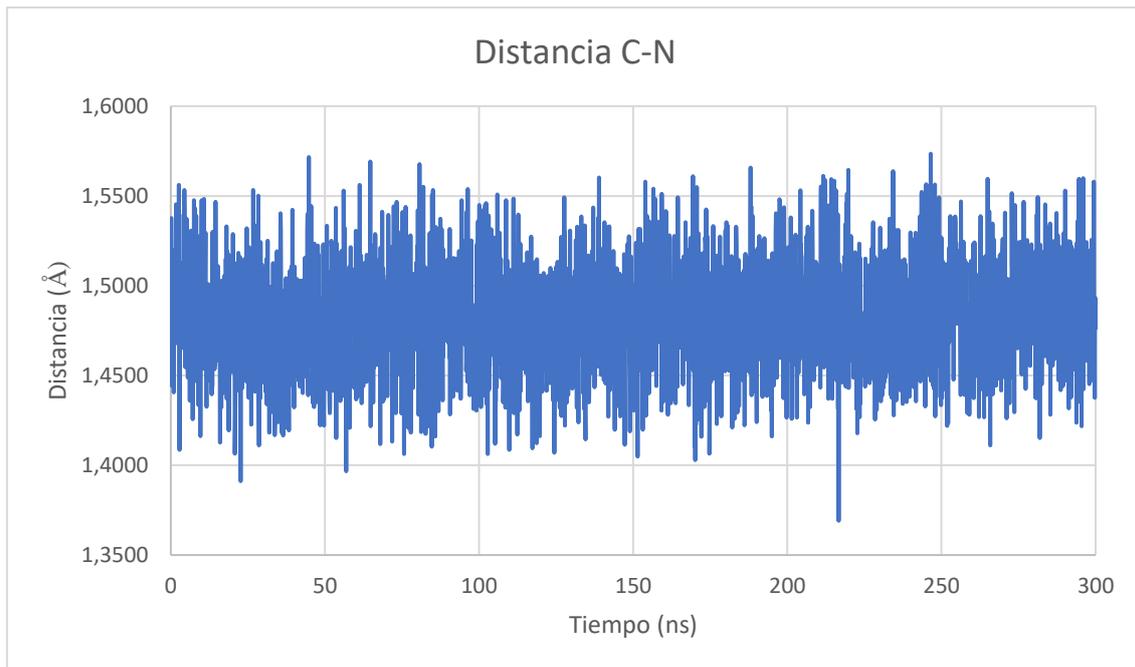


Figura 14: Distancias a lo largo de 300ns entre el C1D y el N de la nicotinamida de NAD^+ . En el eje de las ordenadas (y) se encuentra el valor de la distancia en Å y en el de las abscisas (x) el tiempo de simulación en ns.

Durante los 300ns de dinámica (Figura 14), la distancia entre el C1D y el N de la nicotinamida se mantiene estable. En ningún momento se ve un alejamiento de más de 1,6Å. Por lo que se puede afirmar que durante la dinámica no se han separado estos dos átomos y, por tanto, no se ha llegado a obtener ninguna de las dos estructuras de los intermedios propuestos.

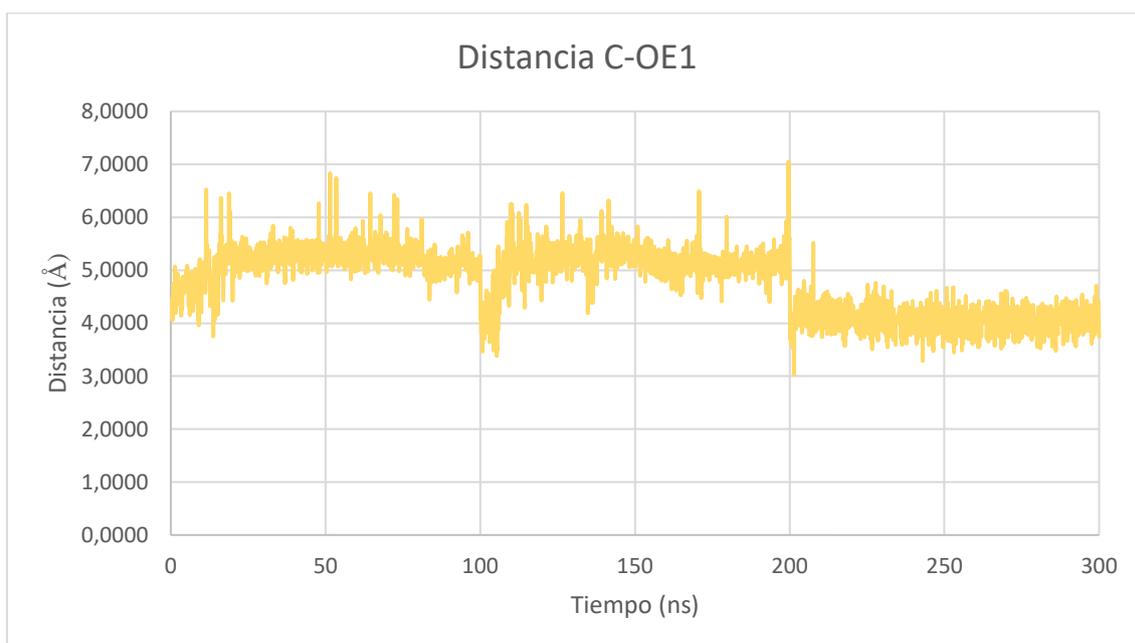


Figura 15: Distancias a lo largo de 300ns entre el C1D del NAD^+ y el OE1 del residuo GLU226. En el eje de las ordenadas (y) se encuentra el valor de la distancia en Å y en el de las abscisas (x) el tiempo de simulación en ns.

Según lo que se puede observar durante los 300ns de dinámica (Figura 15), la distancia entre el C1D y el OE1 del residuo GLU226 se mantiene a una distancia estable de entre $4\text{Å} - 6\text{Å}$, con pequeños acercamientos/alejamientos puntuales. En ningún momento se ve un acercamiento que pueda suponer una nueva formación de enlace por puente de hidrógeno. Por lo que se puede afirmar que, durante la dinámica, el C no interactúa con el OE1 del residuo aminoacídico para formar el intermedio covalente.

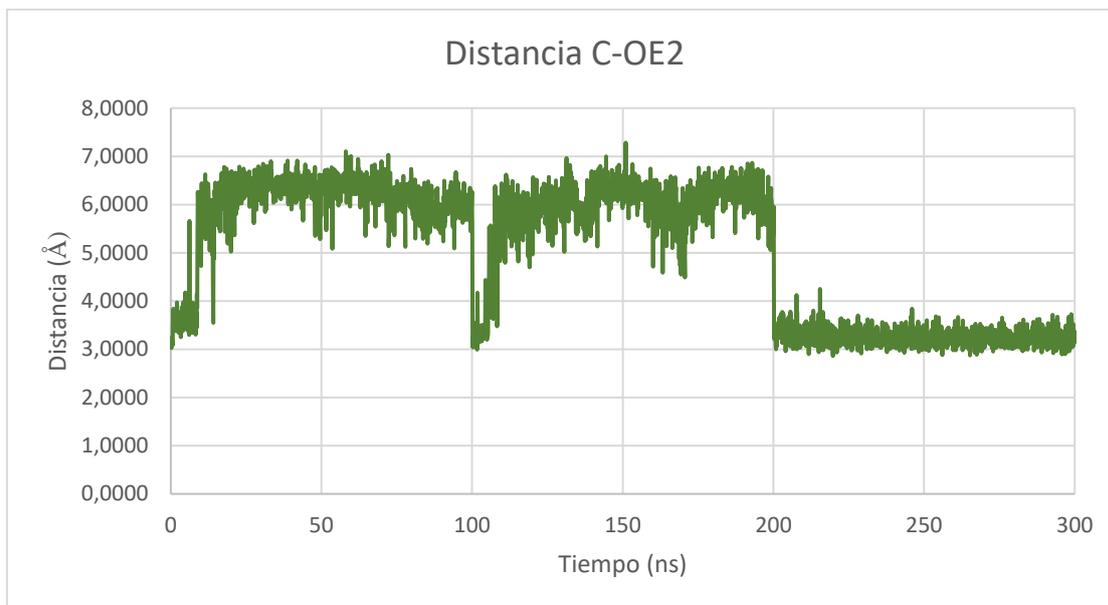


Figura 16: Distancias a lo largo de 300ns entre el C1D del NAD^+ y el OE2 del residuo GLU226. En el eje de las ordenadas (y) se encuentra el valor de la distancia en Å y en el de las abscisas (x) el tiempo de simulación en ns.

Según lo que se puede observar durante los 300ns de dinámica (Figura 16), la distancia entre el C1D y el OE2 del residuo GLU226 se mantiene a una distancia estable de entre $5\text{Å} - 7\text{Å}$, con pequeños acercamientos/alejamientos puntuales. Hasta llegar a los 200ns de dinámica donde la distancia entre estos dos átomos se estabiliza ($3\text{Å} - 4\text{Å}$). Esto puede suponer que el C del NAD^+ se une con el OE2 del residuo aminoacídico para formar el intermedio covalente.

Debido a la gran libertad conformacional del sistema se volvieron a repetir las simulaciones, pero esta vez durante los primeros 200ns se mantiene el H68 fijo a una distancia de 2,4Å del OE2 y durante los 100ns finales se prescinde de la restricción a la espera de que se haya podido formar el intermedio.

A continuación, se adjuntan las gráficas Excel con las distancias analizadas.

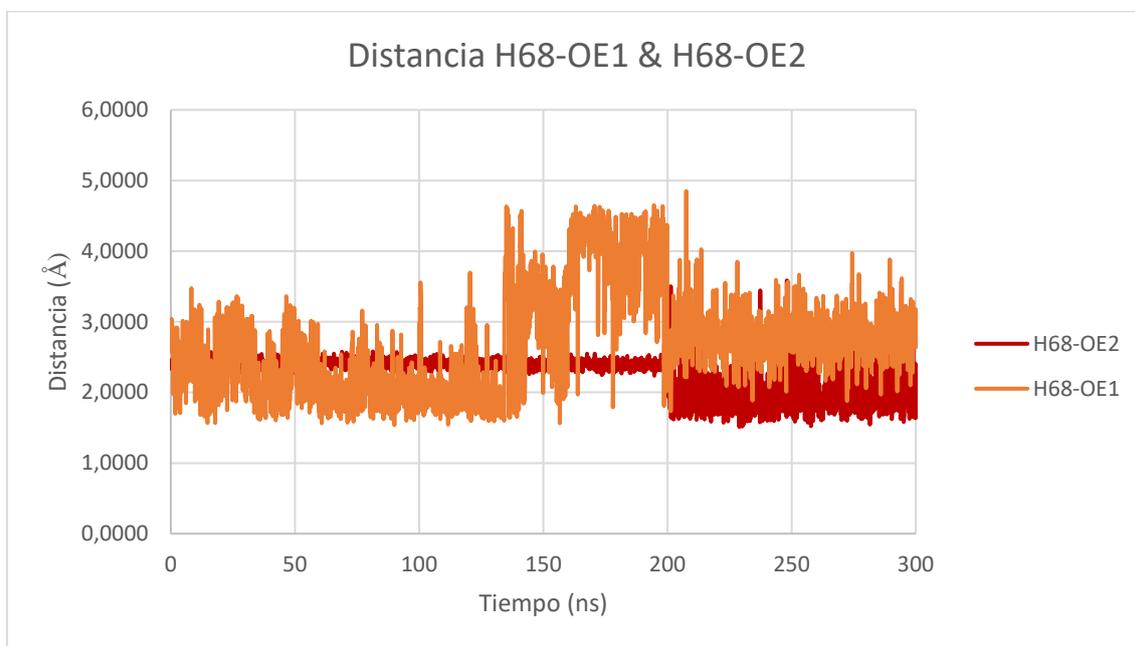


Figura 17: Distancias a lo largo de 300ns entre el H68 del NAD⁺ y el OE1 y OE2 del residuo GLU226. En el eje de las ordenadas (y) se encuentra el valor de la distancia en Å y en el de las abscisas (x) el tiempo de simulación en ns.

Según lo que se puede observar durante los primeros 200ns (Figura 17), la gráfica del H68 y OE2 se mantiene estable a la distancia fijada (2,4Å) mientras que la distancia entre H68 y OE1 también se mantiene bastante estable a lo largo de la dinámica. A partir de los 140ns la distancia con OE1 aumenta y vuelve a disminuir a los 200ns. En cuanto a H68 y OE2, a partir de los 200ns (eliminación de la restricción) parece que también se mantiene a una distancia estable de entre 2Å - 3Å. Esto podría significar que se ha dado la interacción por puente de hidrógeno entre estos dos átomos.

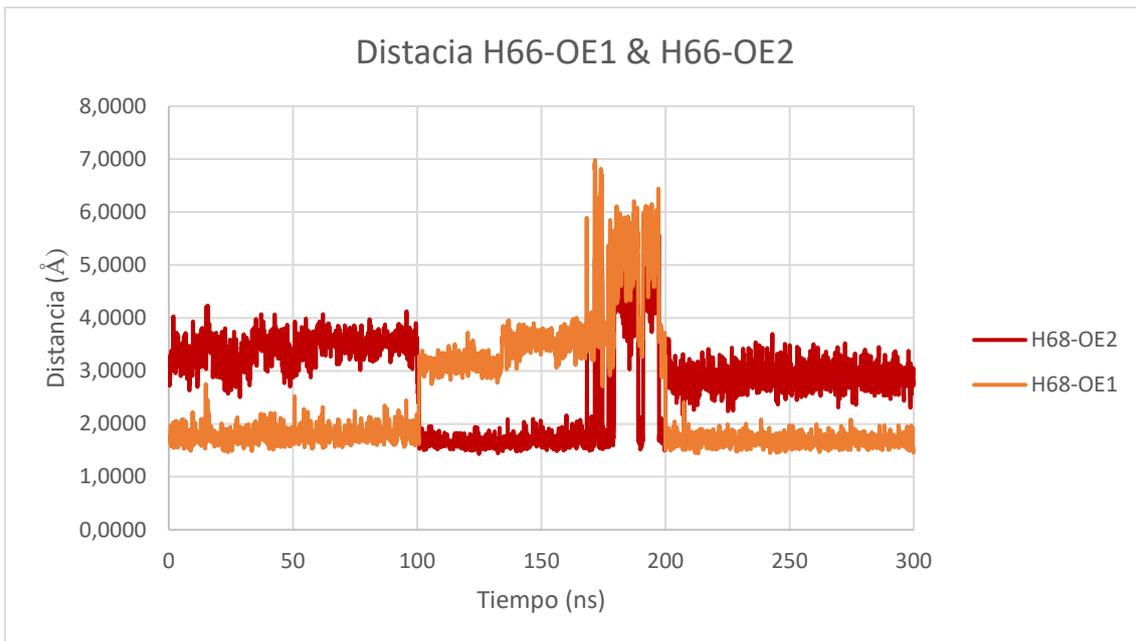


Figura 18: Distancias a lo largo de 300ns entre el H66 del NAD⁺ y el OE1 y OE2 del residuo GLU226. En el eje de las ordenadas (y) se encuentra el valor de la distancia en Å y en el de las abscisas (x) el tiempo de simulación en ns.

En la imagen se puede observar un alejamiento y acercamiento variable entre ambos pares de átomos (Figura 18), estos alejamientos/acercamientos suceden de forma simétrica en intervalos de 100ns. Para poder añadir alguna afirmación se necesitaría calcular otros 100ns y así ver si el patrón se repite o se ha llegado a un punto de equilibrio dinámico.

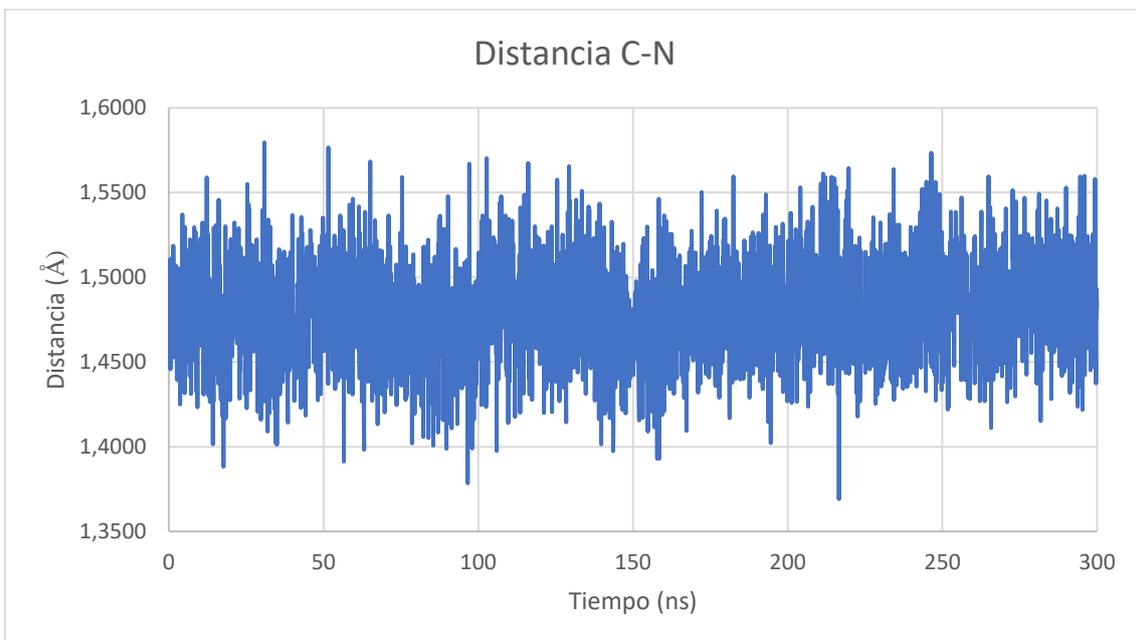


Figura 19: Distancias a lo largo de 300ns entre el C1D y el N de la nicotinamida de NAD⁺. En el eje de las ordenadas (y) se encuentra el valor de la distancia en Å y en el de las abscisas (x) el tiempo de simulación en ns.

Durante los 300ns de dinámica la distancia entre el C1D y el N de la nicotinamida se mantiene estable (Figura 19). En ningún momento se ve un alejamiento de más de 1,6Å. Por lo que se puede afirmar que durante la dinámica no se han separado estos dos átomos y, por tanto, no se ha llegado a obtener ninguna de las dos estructuras de los intermedios propuestos.

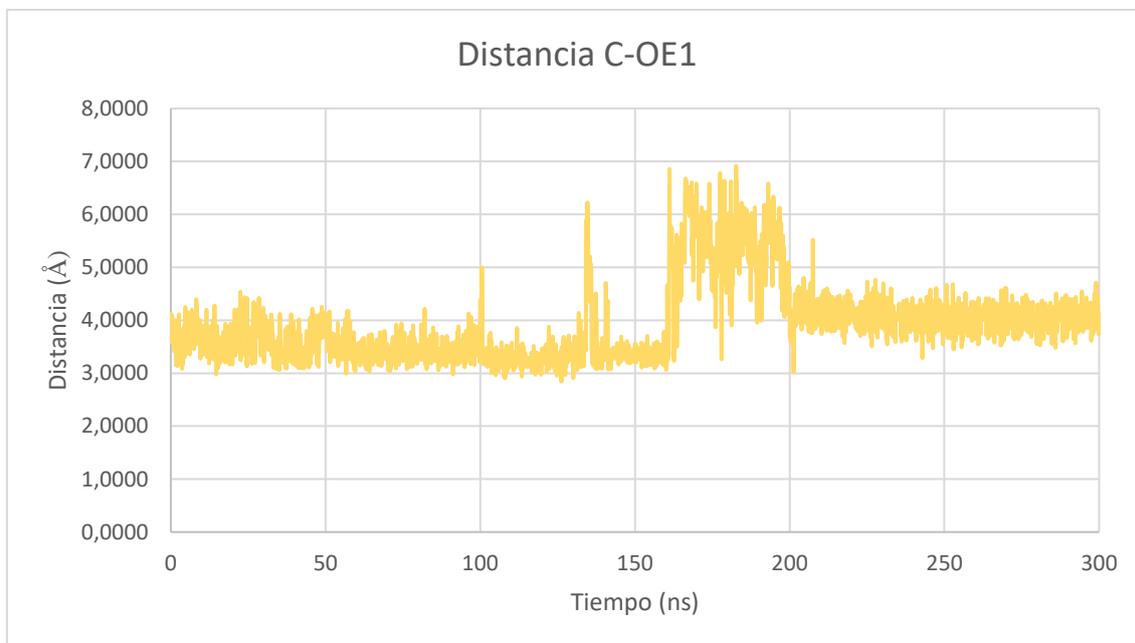


Figura 20: Distancias a lo largo de 300ns entre el C1D del NAD⁺ y el OE1 del residuo GLU226. En el eje de las ordenadas (y) se encuentra el valor de la distancia en Å y en el de las abscisas (x) el tiempo de simulación en ns.

Durante la dinámica (Figura 20), la distancia entre el C1D y el OE1 del residuo GLU226 se mantiene estable durante los 160ns de entre 4Å – 4,5Å, con un alejamiento de 7Å puntual en los 140ns. Durante los 160 – 200ns esta distancia aumenta y disminuye entre los 3,5Å - 7Å y finalmente parece estabilizarse a partir de los 200ns a una distancia de 4,5Å. Esta última distancia de 4,5Å es muy grande para la formación de un nuevo enlace por puente de hidrógeno.

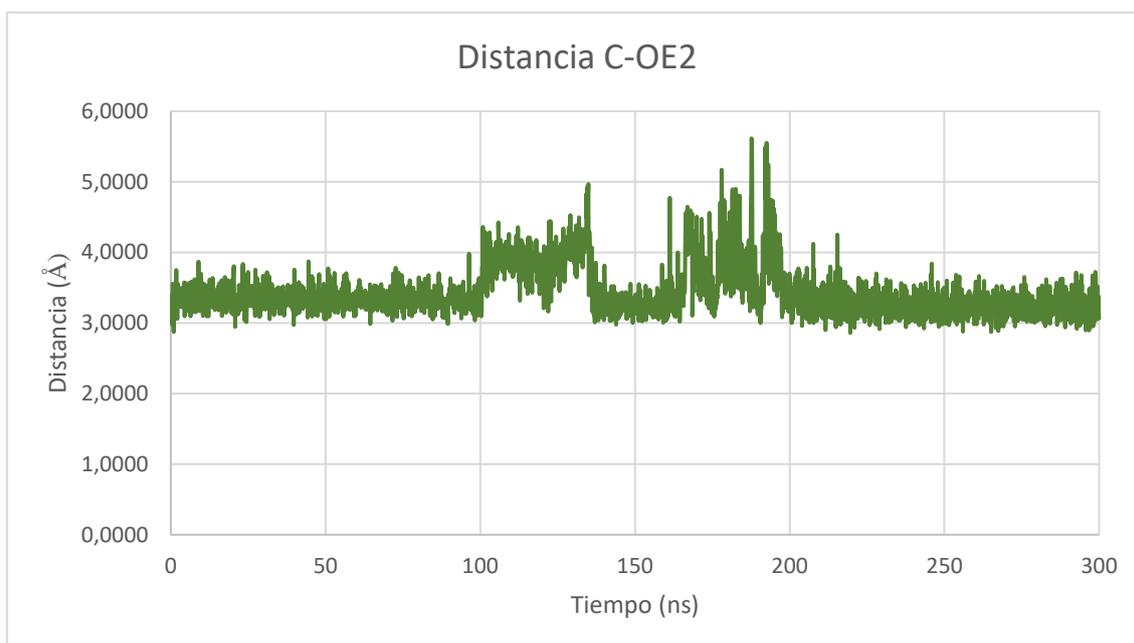


Figura 21: Distancias a lo largo de 300ns entre el C1D del NAD y el OE2 del residuo GLU226. En el eje de las ordenadas (y) se encuentra el valor de la distancia en Å y en el de las abscisas (x) el tiempo de simulación en ns.

Durante la dinámica (Figura 21), la distancia entre el C y el OE1 del residuo GLU226 se mantiene estable de 3,5Å durante los 100ns. Durante los 100 – 140ns esta distancia aumenta y disminuye entre los 3,5Å – 4,5Å, lo mismo sucede a los 160 – 200ns donde las distancias varían entre 3Å – 5,5Å y finalmente parece estabilizarse a partir de los 200ns a una distancia de 3,5Å. Esta última distancia de 3,5Å podría indicar la formación de un enlace por puente de hidrógeno entre el C1D y el OE2, sugiriendo así la preferencia por la formación del intermedio covalente.

3.3 Perfiles de energía

Antes de proceder con el cálculo de la energía se ha realizado un cálculo del RMSD (desviación media cuadrática). Este valor es la distancia media entre los átomos de proteínas superpuestas ^[37]. Es decir, es un valor que sirven para determinar si la molécula tiene poco movimiento entre un paso de simulación y otro, y así determinar si el sistema está estabilizado. Se ha realizado este cálculo para los últimos 100ns de la simulación.

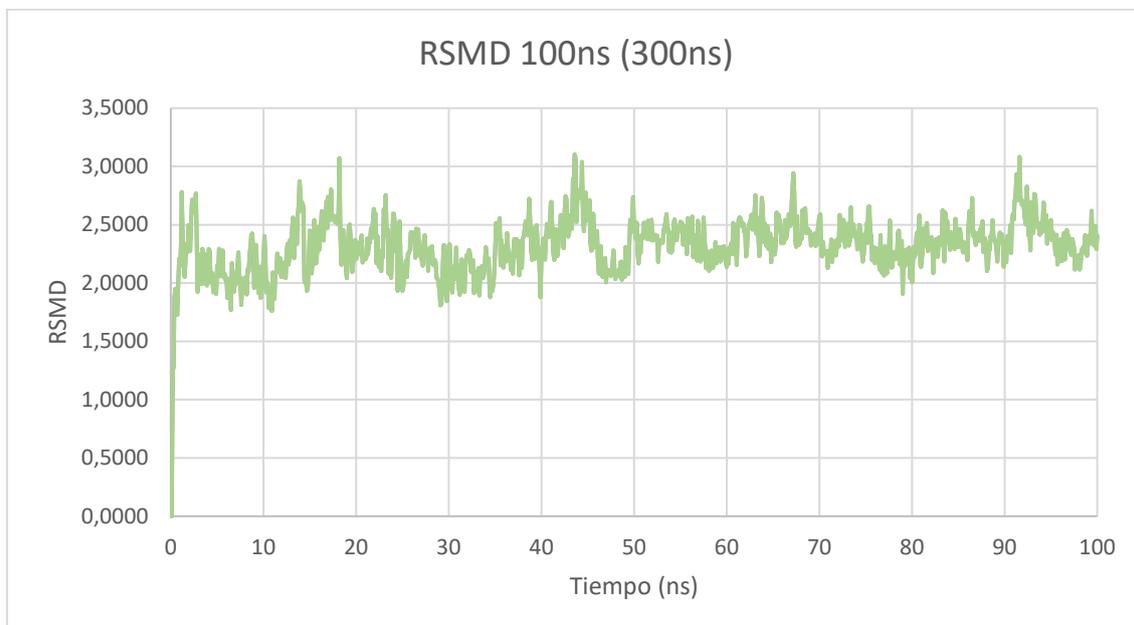


Figura 22: Valores de RMSD de la proteína durante los 100ns de simulación final de 300ns.

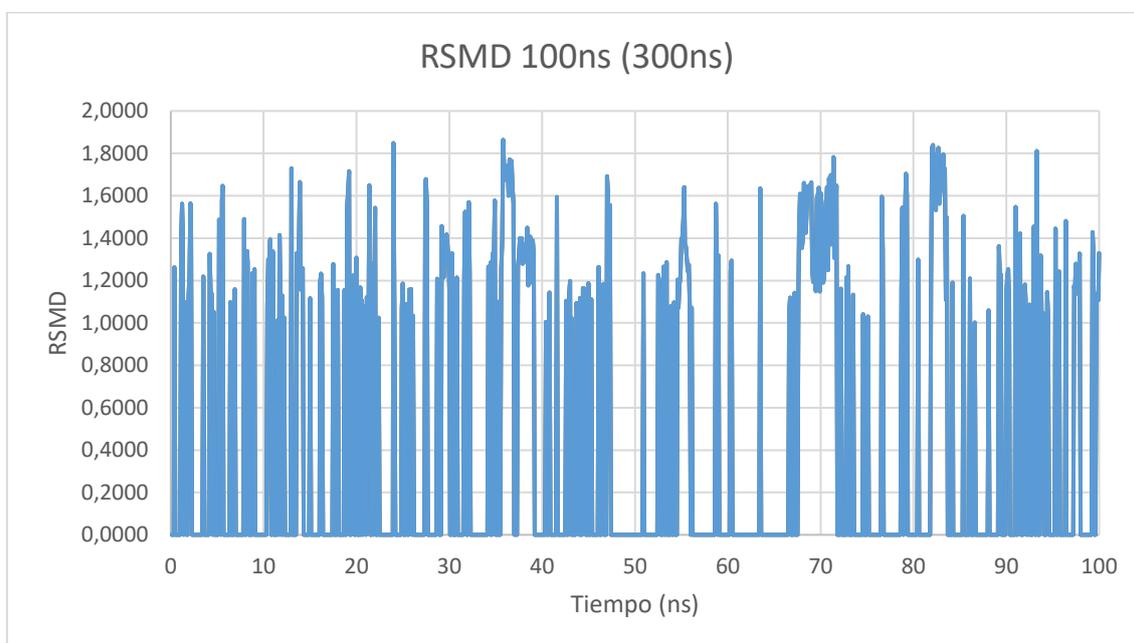


Figura 23: Valores de RMSD del NAD⁺ durante los 100ns de simulación final de 300ns.

Como se puede observar (Figura 22 y 23), los valores de RMSD de la proteína se mantienen estables entre 2 y 3. Estos valores indican que la proteína sigue oscilando, pero dicho movimiento no es suficientemente grande para ser significativo. Lo mismo sucede con NAD^+ donde se estabiliza a valores aun menores de entre 0 y 2. En base a estos valores, se puede concluir que el sistema es estable.

Para describir el mecanismo de reacción, se empleó el programa QM3^[29], el archivo PDB del sistema inicial (reactivos) (Figura 24 y 26) y los archivos PDB de los dos posibles intermedios (productos) (Figura 25 y 28), para así calcular el perfil de energía que sigue este sistema con el fin de alcanzar la conformación de menor energía.

Para el perfil de energía del intermedio covalente se usaron estas dos estructuras.

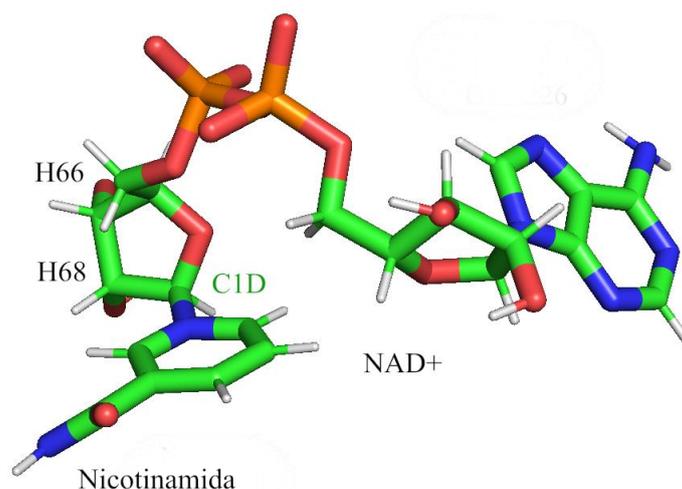


Figura 24: Estructura inicial (reactivo) para el cálculo del perfil de energía del intermedio covalente. Se observa que la nicotinamida está unida al residuo de NAD^+ y el residuo GLU226 no está unido al C del NAD^+ .

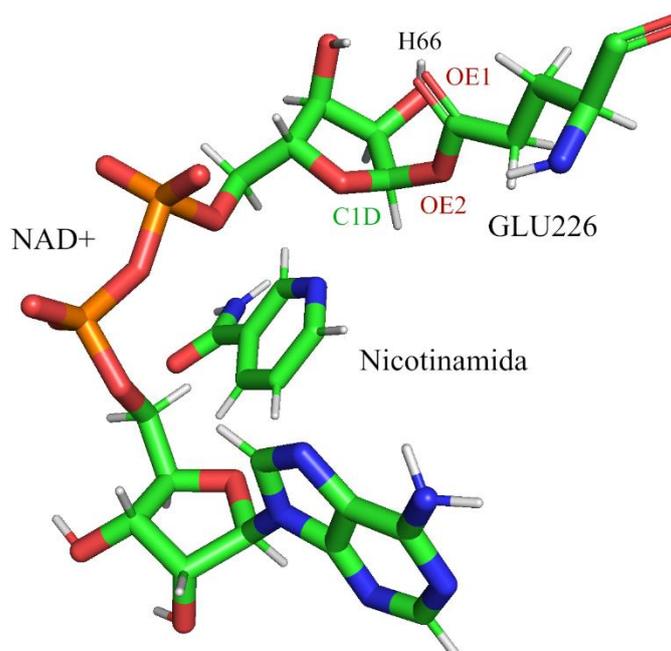


Figura 25: Estructura final (producto) para el cálculo del perfil de energía del intermedio covalente. Se observa que el residuo de nicotinamida se ha separado de la estructura del NAD^+ y que el residuo aminoacídico GLU226 está formando un enlace con el C del este NAD^+

El perfil de energía de este sistema se puede ver en la siguiente imagen (Figura 26).

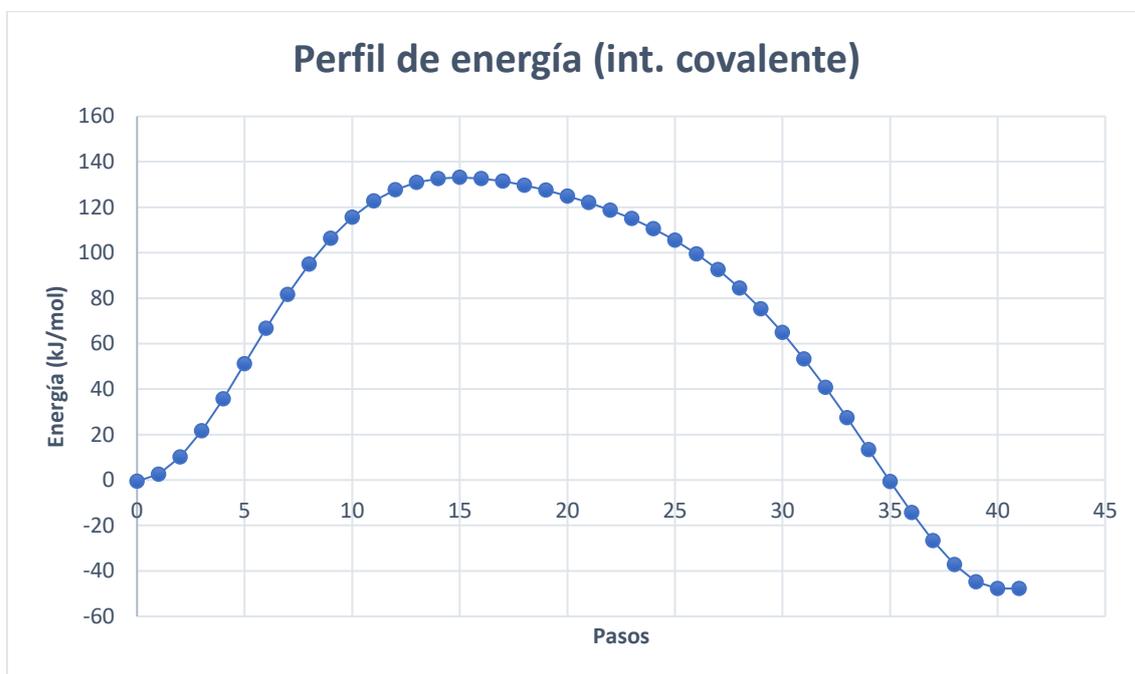


Figura 26: Perfil de energía calculado para la formación del intermedio covalente. En el eje de las ordenadas (y) se encuentra el valor de la energía en kJ/mol y en el de las abscisas (x) la cantidad de pasos calculados hasta hallar el intermedio de interés.

La energía de activación para esta reacción es de 133,645 (kJ mol⁻¹).

$$\text{Energía de activación} = \text{Energía máxima (TS)} - \text{Energía inicial}$$

$$\text{Energía de activación} = 133,645 - (0) = 133,645 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$$

Dividiendo este valor entre 4,184 se consigue pasar de kJ/mol a kcal/mol.

$$\text{Energía de activación} = 133,645 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} * \frac{1000 \text{ J}}{1 \text{ kJ}} * \frac{1 \text{ cal}}{4,186 \text{ J}} * \frac{1 \text{ kcal}}{1000 \text{ cal}} = 31,927 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$$

Para el perfil de energía del intermedio no covalente se usaron estas dos estructuras (Figura 27 y 28).

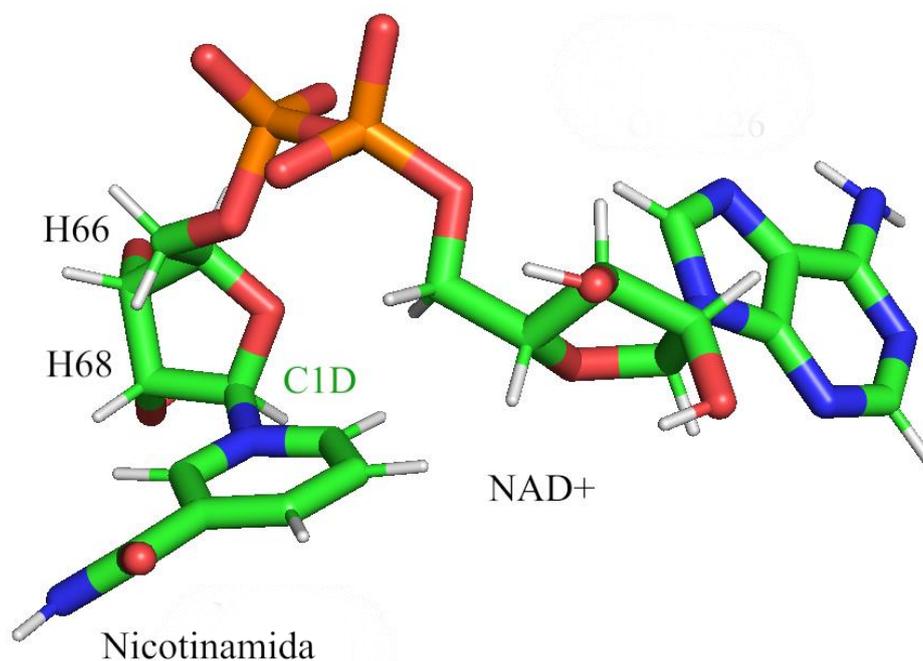


Figura 27: Estructura inicial (reactivo) para el cálculo del perfil de energía del intermedio no covalente. Se observa que la nicotinamida está unida al residuo de NAD⁺ y el residuo GLU226 no está unido al C del NAD⁺.

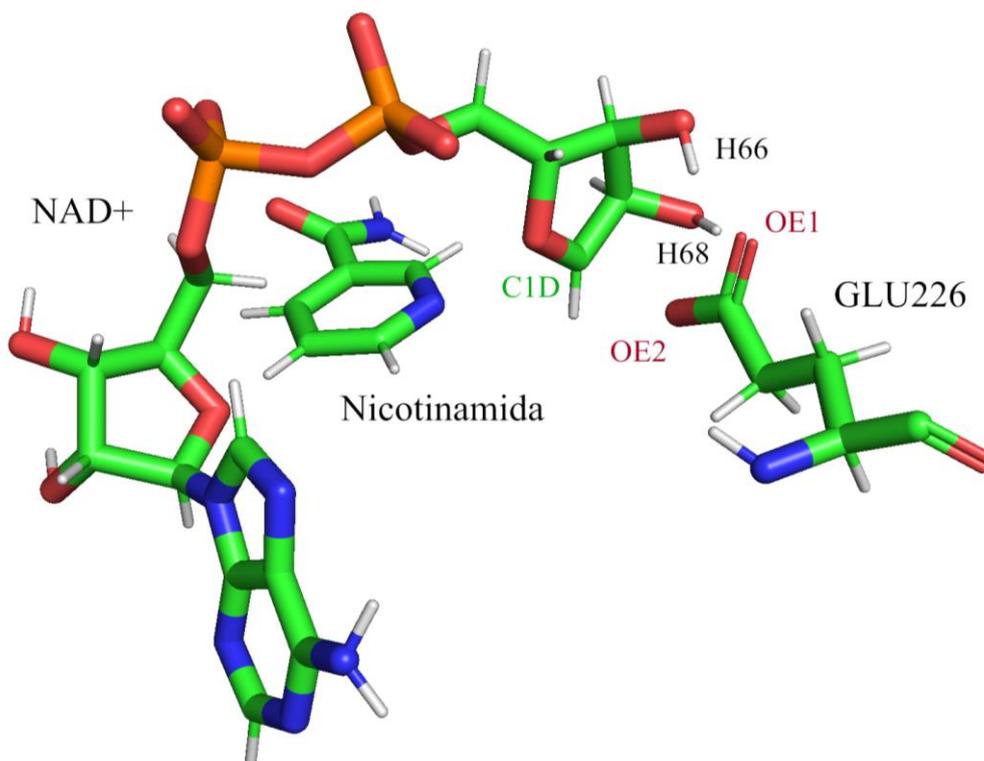


Figura 28: Estructura final (producto) para el cálculo del perfil de energía del intermedio no covalente. Se observa que el residuo de nicotinamida se ha separado de la estructura del NAD⁺ y que el residuo aminoacídico GLU226 no está formando un enlace con el C de este NAD⁺.

El perfil de energía de este sistema se puede ver en la siguiente imagen (Figura 29).

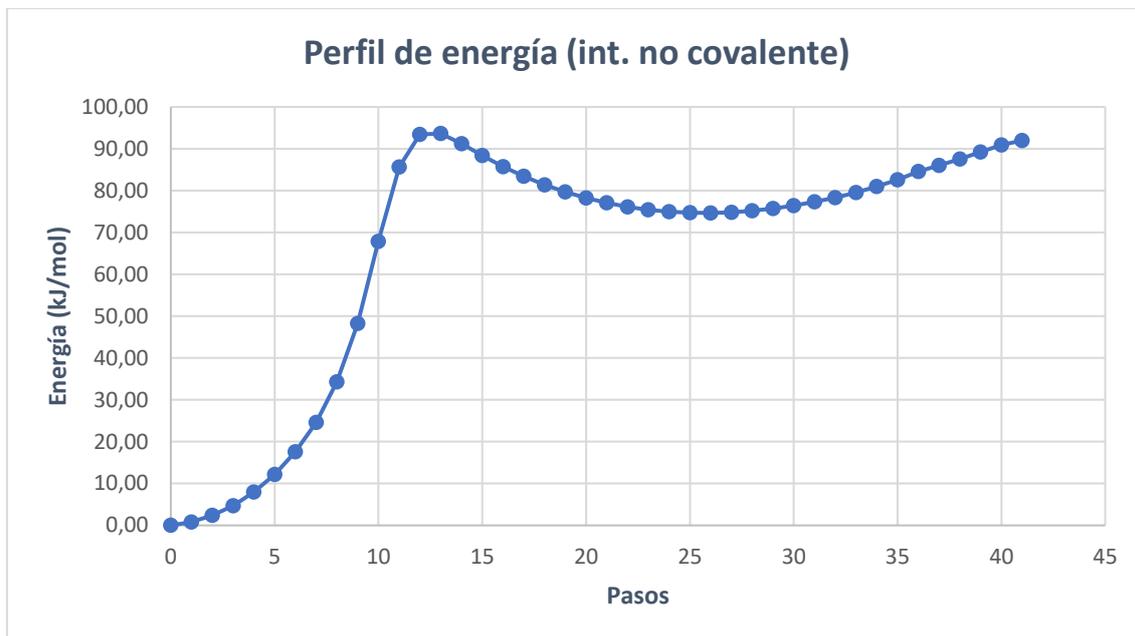


Figura 29: Perfil de energía calculado para la formación del intermedio no covalente. En el eje de las ordenadas (y) se encuentra el valor de la energía en kJ/mol y en el de las abscisas (x) la cantidad de pasos calculados hasta hallar el intermedio de interés.

La energía de activación para esta reacción es de 93,649 (kJ mol⁻¹).

$$\text{Energía de activación} = \text{Energía máxima (TS)} - \text{Energía inicial}$$

$$\text{Energía de activación} = 93,649 - (0) = 93,649 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$$

Dividiendo este valor entre 4,184 se consigue pasar de kJ/mol a kcal/mol.

$$\text{Energía de activación} = 93,649 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} * \frac{1000 \text{ J}}{1 \text{ kJ}} * \frac{1 \text{ cal}}{4,186 \text{ J}} * \frac{1 \text{ kcal}}{1000 \text{ cal}} = 22,372 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$$

Finalmente se añade un gráfico comparativo de ambas energías de activación juntas (Figura 30).

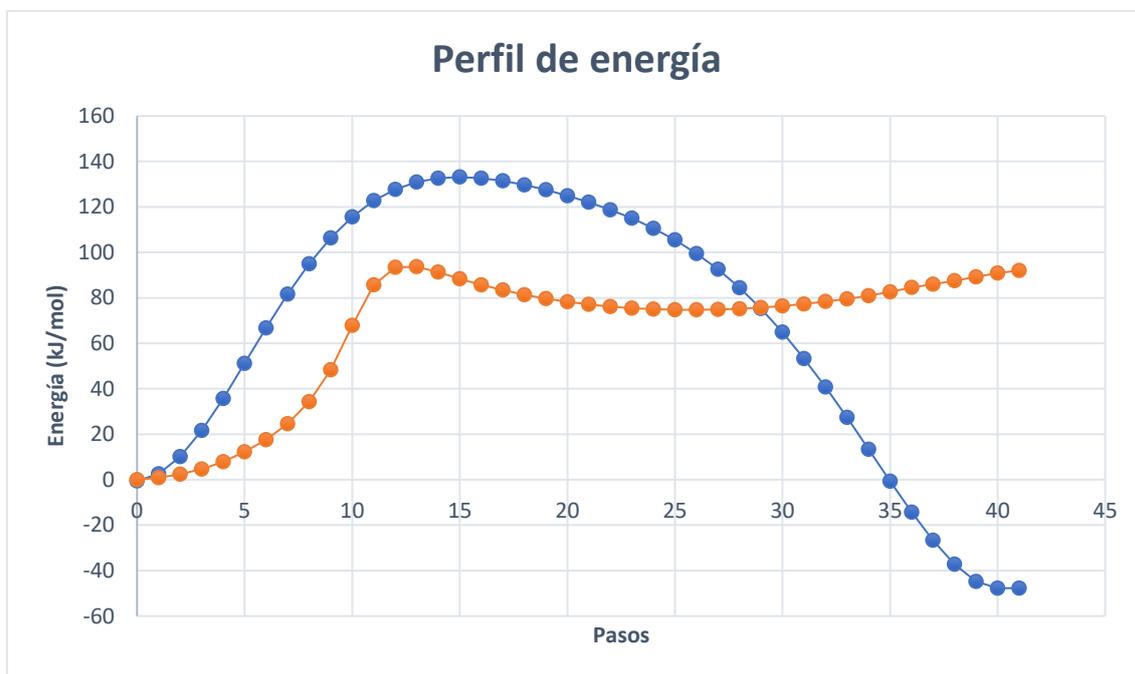


Figura 30: Perfil de energía calculado para la formación del intermedio covalente y el intermedio no covalente. En el eje de las ordenadas (y) se encuentra el valor de la energía en kJ/mol y en el de las abscisas (x) la cantidad de pasos calculados hasta hallar el intermedio de interés.

En este gráfico se puede observar que la energía de activación para la formación del intermedio no covalente es menor que para la del covalente.

El intermedio no covalente sería el producto cinéticamente controlado ya que se forma más rápidamente que el intermedio covalente, debido a que la energía de activación de este es menor. En este caso el intermedio covalente sería el producto termodinámicamente controlado, ya que es más estable que el intermedio no covalente.

4. CONCLUSIONES

4.1 Dinámica molecular

En base a lo observado en los resultados de la dinámica molecular (Figura 31), tanto en el sistema sin restricción conformacional como con el restringido, se puede concluir que tanto H68 como H66 del residuo aminoacídico GLU226, debido a su cercanía, podrían formar un enlace por puente de hidrógeno con el residuo OE1 del NAD⁺.

En ninguno de los dos casos se ha roto el enlace entre el C1D y el N de la nicotinamida. Por lo que no se ha llegado a formar el intermedio.

Finalmente, se observa el acercamiento, en ambas dinámicas, entre el C1D del NAD⁺ y el OE2 del residuo aminoacídico GLU226, significando la posible futura formación de un enlace, favoreciendo así la formación del intermedio no covalente.

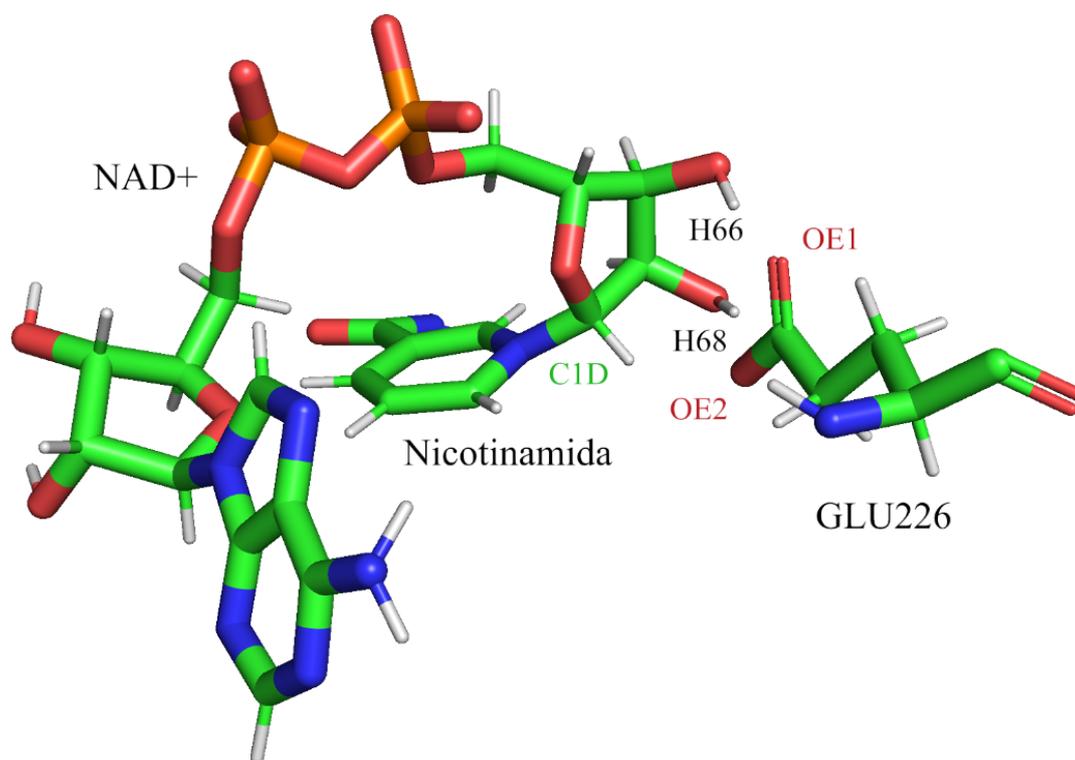


Figura 31: Posición de los átomos al final de la dinámica de 300ns.

Como conclusión se puede afirmar que 300ns de dinámica no son suficientes para lograr la formación natural del intermedio de reacción.

Un posible objetivo para la continuación de este estudio sería el lanzamiento de nuevas dinámicas para ampliar el tiempo de simulación y así poder hallar el punto en el que se da la formación del intermedio.

4.2 Perfiles de energía

Tal y como se observa en el gráfico (Figura 32), la formación del intermedio no covalente está más favorecida energéticamente. Haciendo que este sea el producto cinéticamente controlado y el intermedio covalente, el producto termodinámicamente controlado.

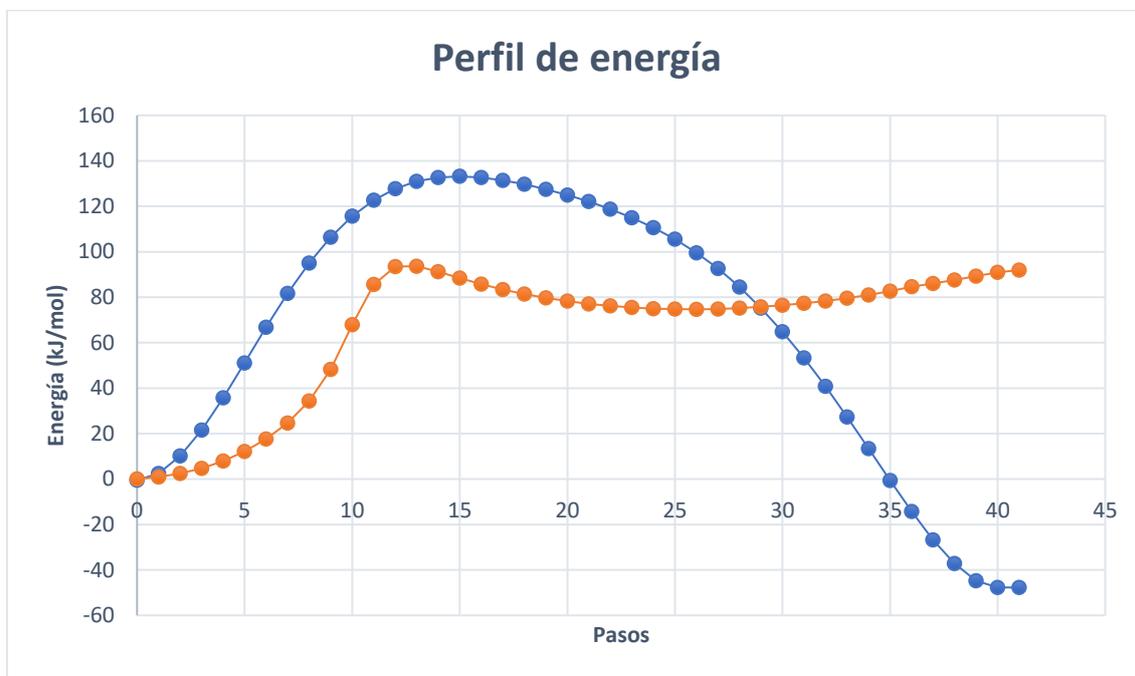


Figura 32: Perfil de energía calculado para la formación del intermedio covalente y el intermedio no covalente. En el eje de las ordenadas (y) se encuentra el valor de la energía en kJ/mol y en el de las abscisas (x) la cantidad de pasos calculados hasta hallar el intermedio de interés.

Como conclusión final, se puede decir que el intermedio no covalente parece formarse cuando se utilizaran sustratos naturales como el NAD^+ .

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Paola, T. P. (2012). Visión panorámica del sistema inmune. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(4), 446–457. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(12\)70335-8](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(12)70335-8)
- [2] Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2011). *Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer*. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101324>
- [3] Abbas Abul K., Litchman Andrew General Propieties of Immune Responses. Cellular and Molecular Immunology, Fifth, pp. 3-16 USA Elsevier Science, Chapter 1
- [4] Martín-aragón Paloma Bermejo-bescós, S. Y. *INMUNOTERAPIA Y TRATAMIENTO ONCOLÓGICO UNA ESTRATEGIA PROMETEDORA* (Vol. 30).
- [5] *Inmunoterapia para el cáncer - NCI*. Retrieved July 12, 2023, from <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia>
- [6] S. P. Kubli, T. Berger, D. V. Araujo, L. L. Siu et al. Beyond immune checkpoint blockade: emerging immunological strategies. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2021, 20 899-919.
- [7] D. Donini, L. D'Ambrosio, G. Grignani, M. Aglietta, D. Sangiolo. Next generation immune-checkpoints for cancer therapy. *J. Thorac. Dis.* 2018, 10 (S.13), S1581-S1601.
- [8] S. Dwivedi, E. P. Rendón-Huerta, V. Ortiz-Navarrete, L. F. Montaña. CD38 and Regulation of the Immune Response Cells in Cancer. *J. Oncol.* 2021, 6630295.
- [9] A. L. Horenstein, A. Chillemi, G. Zaccarello, S. Bruzzone et al. A CD38/CD203a/CD73 ectoenzymatic pathway independent of CD39 drives a novel adenosinergic loop in human T lymphocytes. *OncImmunity* 2013, 2, e26246
- [10] Liu, Q., Kriksunov, I. A., Graeff, R., Munshi, C., Cheung Lee, H., & Hao, Q. (2006). Structural Basis for the Mechanistic Understanding of Human CD38-controlled Multiple Catalysis * and the. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 32861–32869. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606365200>
- [11] R. M. Shallis, C. M. Terry, S. H. Lim. The multi-faceted potential of CD38 antibody targeting in múltiple mieloma. *Cancer Immunol. Immunother.* 2017, 66, 697-703.
- [12] D. C. Hinshaw, L. A. Shevde. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. *Cancer Res.* 2019, 79, 4557-4566.
- [13] E. N. Chini. C. C. S. Chini. J. M. E. Netto, G. C. de Oliveria, W. van Schooten. The Pharmacology of CD38/NADase: An Emerging Target in Cancer and Diseases of Aging. *Trends Pharmacol. Sci.* 2018, 39, 424-436.
- [14] F. Malavasi, S. Deaglio, A. Funaro, E. Ferrero, A. L. Horenstein, E. Ortolan, T. Vaisitti, S. Aydin. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in phsiology and pathology. *Physiol. Rev.* 2008, 88, 841-886.
- [15] H. C. Lee, T. F. Walseth, G. T. Bratt, R. N. Hayes, D. L. Clapper. Structural determination of a cyclic metabolite of NAD⁺ with intracellular Ca²⁺- mobilizing activity. *J. Biol. Chem.* 1989, 264, 1608-1615.

- [16] H. Kim, E. L. Jacobson, M. K. Jacobson. Synthesis and degradation of cyclic ADP-ribose by NAD glycohydrolases. *Science* 1993, 261, 31330-1333.
- [17] R. Aarhus, R. M. Graeff, D. M. Dickey, T. F. Walseht, H. C. Lee. ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 30327-30333.
- [18] R. Graeff, Q. Liu, I. A. Kriksunov, Q. Hao, H. C. Lee. Acidic Residues at the Active Site of CD38 and ADP-ribosyl Cyclase Determine Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) Synthesis and Hydrolysis Activities. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 28951-28957.
- [19] H. C. Lee. A unified mechanism for enzymatic synthesis of two calcium messengers, cyclic ADP-ribose and NAADP. *Biol. Chem.* 1999, 380, 785-793.
- [20] A. A. Sauve, H. T. Deng, R. H. Angeletti, V. L. Schramm. A covalent intermediate in CD38 is responsible for ADP-ribosylation and cyclization reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 7855-7859.
- [21] Q. Liu, I. A. Kriksunov, R. Graeff, C. Munshi, H. C. Lee, Q. Hao Structural basis for the Mechanistic Understanding of Human CD38-controlled Multiple Catalysis *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 32861-32869.
- [22] Q. Liu, I. A. Kriksunov, H. Jiang, R. Graeff et al. Covalent and Noncovalent Intermediates of an NAD Utilizing Enzyme, Human CD38. *Chem. Biol.* 2008, 15, 1068-1078.
- [23] Q. Liu, I. A. Kriksunov, R. Graeff, C. Munshi, H. C. Lee, Q. Hao Structural basis for the Mechanistic Understanding of Human CD38-controlled Multiple Catalysis *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 32861-32869.
- [24] C. Munshi, R. Aarhus, R. Graeff, T. F. Walseht, D. Levitt, H. C. Lee. Identification of the enzymatic active site of CD38 by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 21566-21571.
- [25] R. Graeff, C. Munshi, R. Aarhus, M. Johns, H. C. Lee. A single residue at the active site of CD38 determines its NAD cyclizing and hydrolyzing activities. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 12169-12173.
- [26] James C. Phillips, David J. Hardy, Julio D. C. Maia, John E. Stone, João V. Ribeiro, Rafael C. Bernardi, Ronak Buch, Giacomo Fiorin, Jérôme Hémin, Wei Jiang, Ryan McGreevy, Marcelo C. R. Melo, Brian K. Radak, Robert D. Skeel, Abhishek Singharoy, Yi Wang, Benoît Roux, Aleksei Aksimentiev, Zaida Luthey-Schulten, Laxmikant V. Kalé, Klaus Schulten, Christophe Chipot, Emad Tajkhorshid; Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *J. Chem. Phys.* 28 July 2020; 153 (4): 044130. <https://doi.org/10.1063/5.0014475>
- [27] D.A. Case, H.M. Aktulga, K. Belfon, I.Y. Ben-Shalom, J.T. Berryman, S.R. Brozell, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, G.A. Cisneros, V.W.D. Cruzeiro, T.A. Darden, N. Forouzes, G. Giambaşu, T. Giese, M.K. Gilson, H. Gohlke, A.W. Goetz, J. Harris, S. Izadi, S.A. Izmailov, K. Kasavajhala, M.C. Kaymak, E. King, A. Kovalenko, T. Kurtzman, T.S. Lee, P. Li, C. Lin, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, M. Machado, V. Man, M.

Manathunga, K.M. Merz, Y. Miao, O. Mikhailovskii, G. Monard, H. Nguyen, K.A. O'Hearn, A. Onufriev, F. Pan, S. Pantano, R. Qi, A. Rahnamoun, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, S. Schott-Verdugo, A. Shajan, J. Shen, C.L. Simmerling, N.R. Skrynnikov, J. Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, J. Wang, H. Wei, X. Wu, Y. Wu, Y. Xiong, Y. Xue, D.M. York, S. Zhao, Q. Zhu, and P.A. Kollman (2023), Amber 2023, University of California, San Francisco.

[28] Mark, P., & Nilsson, L. (2001). Structure and Dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E Water Models at 298 K. *Journal of Physical Chemistry A*, 105(43), 9954–9960. <https://doi.org/10.1021/JP003020W>

[29] Martí, S. (2021). QMCube (QM3): An all-purpose suite for multiscale QM/MM calculations. *Journal of Computational Chemistry*, 42(6), 447–457. <https://doi.org/10.1002/jcc.26465>

[30] Groenhof, G. (2013). Introduction to QM/MM simulations. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 924, 43–66. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-017-5_3

[31] Jakalian, A., Jack, D. B., & Bayly, C. I. (2002). Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. *Journal of computational chemistry*, 23(16), 1623–1641. <https://doi.org/10.1002/jcc.10128>

[32] Stewart, J. J. P. (2007). Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *Journal of Molecular Modeling*, 13(12), 1173–1213. <https://doi.org/10.1007/S00894-007-0233-4>

[33] P. Eastman, J. Swails, J. D. Chodera, R. T. McGibbon, Y. Zhao, K. A. Beauchamp, L.-P. Wang, A. C. Simmonett, M. P. Harrigan, C. D. Stern, R. P. Wiewiora, B. R. Brooks, and V. S. Pande. “OpenMM 7: Rapid development of high performance algorithms for molecular dynamics.” *PLOS Comp. Biol.* 13(7): e1005659. (2017)

[34] Henkelman, G., Uberuaga, B. P., & Jónsson, H. (2000). A climbing image nudged elastic band method for finding saddle points and minimum energy paths. *The Journal of Chemical Physics*, 113(22), 9901–9904. <https://doi.org/10.1063/1.1329672>

[35] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.

[36] Microsoft Corporation. (2018). Microsoft Excel. Retrieved from <https://office.microsoft.com/excel>

[37] "Molecular docking, estimating free energies of binding, and AutoDock's semi-empirical force field". Sebastian Raschka's Website. 2014-06-26.