

**ESTUDO TEÓRICO DA ATIVIDADE CATALÍTICA**  
**DA SERINA PROTEASE DO**  
**CITOMEGALOVÍRUS HUMANO**

*César Augusto Fernandes de Oliveira*

Tese de Doutorado desenvolvida no Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob orientação do Professor

Ricardo Bicca de Alencastro

e dos Doutores

Cristiano Ruch Werneck Guimarães

Gabriela Barreiro.

Rio de Janeiro

setembro 2005

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**ESTUDO TEÓRICO DA ATIVIDADE CATALÍTICA**  
**DA SERINA PROTEASE DO CITOMEGALOVÍRUS HUMANO**

*César Augusto Fernandes de Oliveira*

Tese de Doutorado desenvolvida no Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob orientação do Professor

Ricardo Bicca de Alencastro

e dos Doutores

Cristiano Ruch Wernneck Guimarães

Gabriela Barreiro

**Aprovada em 2 de setembro de 2005 pelos professores**

---

Ricardo Bicca de Alencastro (DQO-IQ-UFRJ) (Presidente)

---

Sylvio Roberto Accioly Canuto(IF-USP)

---

José Daniel Figueroa Villar (IME)

---

Lúcia Moreira Campos Paiva (DBQ-IQ-UFRJ)

---

Pierre Mothé Esteves (DQO-IQ-UFRJ)

---

Edilson Clemente da Silva (DFQ-IQ-UFRJ) (Suplente)

Esta tese foi realizada sob a orientação do Prof. Ricardo Bicca de Alencastro com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

## FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, César Augusto Fernandes

**ESTUDO TEÓRICO DA ATIVIDADE CATALÍTICA  
DA SERINA PROTEASE DO CITOMEGALOVÍRUS HUMANO**

Rio de Janeiro, UFRJ, Instituto de Química, 2005. xx, 163 f.

Tese: Doutor em Ciências (Química Orgânica)

1. Citomegalovírus Humano.
2. Método Híbrido QM/MM.
3. Dinâmica Molecular.
4. Teses

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Química

II. Títulos

*A meus pais*

## **AGRADECIMENTOS**

A meus pais, pelo amor incondicional, dedicação, paciência e incentivo.

À Ricardo, Augusto, Neto, Edivaldo e Edilene, meus queridos irmãos

Aos meus grandes amigos Cristiano e Gabriela, pelo carinho, incentivo, apoio nos momentos mais difíceis, e pela enorme contribuição dada à minha formação.

Ao amigo Prof. Ricardo Bicca, pelos seus ensinamentos, pela confiança, liberdade, incentivo e pelo grande apoio.

À minha grande amiga e companheira Débora Malta.

Aos meus “quase irmãos” Wagner, Miranda e Mário.

Ao laboratório 609, em especial, Fleming, Bruno, Édson, Paulo e Jair.

À Carlota, pelas melhores e mais divertidas aulas de inglês.

À André Gustavo, Pierre e Rodrigo, pelo grande incentivo.

Ao Departamento de Química Orgânica.

Ao CNPQ e, em especial, à FAPERJ pelo apoio financeiro.

## RESUMO

O citomegalovírus humano (HCMV), que pertence à família Herpesviridae, é o principal agente patogênico oportunista responsável por diversos problemas de saúde e até a morte de indivíduos com o sistema imunológico suprimido ou comprometido. Todos os herpesvírus codificam uma serina protease essencial para a produção de partículas infecciosas. Estudos bioquímicos mostram que a forma dimérica desta enzima é a espécie cataliticamente ativa. Além disto, sua tríade catalítica é singular, sendo composta pelos resíduos Ser132, His63 e His157 no HCMV; nas serinas proteases clássicas, o terceiro membro da tríade é Asp ou Glu. O objetivo central deste trabalho é investigar os requisitos estruturais e energéticos que governam a ativação do dímero através de simulações de dinâmica molecular (DM) e métodos híbridos que combinam cálculos quantomecânicos (QM) e de mecânica molecular (MM). As simulações de DM mostraram que tanto a forma dimérica quanto a monomérica da serina protease do HCMV operam via mecanismo de encaixe induzido. Os cálculos QM/MM para a reação de formação do complexo tetraédrico inibidor-enzima revelaram que a barreira de energia no dímero é 7,3 kcal/mol menor que no monômero, fruto de uma estabilização eletrostática mais eficiente do estado de transição. Os cálculos QM/MM indicam também que o terceiro membro da tríade catalítica (His157) contribui para a catálise através de uma interação eletrostática mais favorável com o cátion imidazólio incipiente do resíduo His63 no estado de transição. Isto explica a cinética lenta das proteases dos herpesvírus frente às serinas proteases clássicas, que possuem um resíduo com carga negativa (Glu e Asp) como terceiro membro da tríade catalítica.

## ABSTRACT

Human cytomegalovirus from the Herpesviridae family is a pathogenic agent responsible for severe morbidity and mortality in immunocompromised and immunosuppressed individuals. All herpesviruses encode a serine protease that is essential for the production of infectious virions. Experimental studies show that the dimer is the catalytically active form of this enzyme. In addition, this protease has a unique catalytic triad in which the third member is a histidine residue (Ser132, His63, and His157), whereas classical serine proteases have an Asp or Glu. The central objective of this work is to investigate the structural and energetic factors that are responsible for the catalytic activity of the enzyme dimer through molecular dynamics (MD) simulations and quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) calculations. The MD simulations showed that both the dimeric and monomeric forms of the protease operate by an induced-fit mechanism. The QM/MM calculations for the formation of the covalent complex between the peptidyl-activated carbonyl inhibitor and the protease revealed an energy barrier for the dimer that is 7.3 kcal/mol lower than for the monomer; this is derived from more favorable electrostatic interactions between the dimer and the transition state. Also, the QM/MM calculations indicated that the third member of the catalytic triad (His157) stabilizes the transition state through stronger electrostatic interactions with the incipient His63 imidazolium cation. Since classical serine proteases have a negatively charged residue (Glu or Asp) as the third member of the catalytic triad, the weaker electrostatic interactions for the herpesvirus proteases may be the basis for their slower catalysis.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>viii</b>
<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>ix</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>xx</b>
<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
1. Aspectos Gerais dos Vírus.....	21
2. Biossíntese Viral.....	22
3. Os Herpesvírus Humanos.....	26
4. Biossíntese Viral dos Herpesvírus Humano.....	29
5. Fármacos Anti-Herpesvírus.....	31
5.1. Inibidores do HSV e VZV.....	32
5.2. Inibidores do HCMV.....	36
6. O Citomegalovírus Humano.....	40
7. O Papel da Protease no Ciclo de Vida dos Herpesvírus.....	41
8. Estrutura da Protease do Citomegalovírus.....	43
9. Uma Nova Tríade Catalítica.....	46
10. Mecanismo de Catálise .....	48
<b>II. OBJETIVO .....</b>	<b>51</b>
<b>III. DETALHES COMPUTACIONAIS .....</b>	<b>54</b>

1. Construção dos Modelos.....	54
2. Otimização, Solvatação e Relaxação dos Modelos.....	57
3. Condições de Simulação.....	59
4. Cálculos QM/MM.....	60
4.1. Preparação do Sistema.....	60
4.2. Partição do Sistema nas Regiões QM e MM.....	62
4.3. Definição da Coordenada de Reação.....	64
4.4. Condições Empregadas nos Procedimentos de Otimização QM/MM.....	65
5. Dinâmica Molecular (DM).....	65
6. O Método Híbrido QM/MM.....	68
6.1. Formulação.....	68
6.2. O Uso de Átomos <i>Link</i> .....	72
6.3. Determinação do Caminho de Reação.....	74
<b>IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>76</b>
1. Análise da Estabilidade e do Comportamento Dinâmico da Protease do HCMV.....	76
2. Mudanças Conformacionais Ocorridas na Formação do Complexo Protease-Inibidor.....	85
2.1. O Mecanismo de Encaixe Induzido.....	92
3. Movimentos Coletivos Entre Monômeros.....	94
4. Interações Protease-Inibidor .....	99
5. Cálculo do Caminho de Reação de Mínimo de Energia.....	109
6. Correção da Contribuição QM.....	112
7. Reação de Formação do Complexo Tetraédrico Inibidor-Enzima.....	118
8. Estabilização Eletrostática QM/MM.....	122

9. O Papel do Segundo Resíduo de Histidina na Tríade Catalítica.....	126
<b>V. CONCLUSÕES .....</b>	<b>133</b>
<b>VI. ARTIGOS PRODUZIDOS DURANTE A VIDA ACADÊMICA .....</b>	<b>135</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>138</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Diagrama esquemático dos componentes de uma partícula viral ou vírion.....21
- Figura 2: Ciclo replicativo de um vírus de DNA de fita dupla.....26
- Figura 3 : Biossíntese dos HSV. 1) Adsorção do vírion à membrana plasmática da célula hospedeira. 2) Penetração do vírion. 3) Liberação do nucleocapsídeo e das proteínas virais (A-  $\alpha$ -TIF e B- VHS) no citoplasma. 4) Migração do nucleocapsídeo para o núcleo da célula. 5) Liberação do ácido nucléico no interior do núcleo celular. 6) Circularização do DNA viral. 7) Transcrição e tradução dos genes  $\alpha$  em RNAm $\alpha$ ,  $\beta$  em RNAm $\beta$  e  $\gamma$  em RNAm $\gamma$ . 8) Replicação do genoma viral pela DNA polimerase viral. 9) Montagem dos capsídeos. 10) Saída do vírus, a) o vírus adquire o envelope na membrana nuclear e é conduzido até a membrana citoplasmática onde é liberado da célula por exocitose. b) o nucleocapsídeo perde o envelope parcialmente adquirido ao atravessar a membrana nuclear. O vírion é liberado por brotamento após aquisição do envelope na membrana citoplasmática.30
- Figura 4: Mecanismo de ação do aciclovir (ACV). Fosforilações intracelulares são necessárias para que o ACV possa interferir na síntese viral. No caso do HSV-1, a primeira fosforilação é catalisada pela timidina quinase viral (TK), garantindo assim que o ACV atue somente nas células infectadas. ....33
- Figura 5: Agentes anti-herpesvírus.....39
- Figura 6: Processo de maturação da protease do HCMV e da proteína precursora. A proteína precursora é idêntica à porção C-terminal da protease codificada pelo gene

UL80. Os sítios de clivagem M (maturação), R (liberação) e I (interno) estão indicados.....	42
Figura 7: Nomenclatura utilizada na denominação dos sítios de interação das serina proteases e dos respectivos resíduos no substrato ou inibidor.....	44
Figura 8: Estrutura tridimensional da protease do HCMV. a) Monômero. a) Dímero....	46
Figura 9: O mecanismo de catálise envolve na primeira etapa o ataque nucleofílico da Ser132 ao átomo de carbono da carbonila da ligação peptídica a ser clivada para formar um intermediário tetraédrico. Na segunda etapa ocorre a decomposição do intermediário tetraédrico no intermediário acil-enzima, seguido da perda do produto amina e sua substituição por uma molécula de água. Por fim, ocorre o ataque nucleofílico da molécula de água ao carbono da carbonila do intermediário acil-enzima para formar um novo intermediário tetraédrico que será decomposto no produto carboxilado da reação e na enzima ativa.....	50
Figura 10: Estrutura química do inibidor peptídomimético BILC821 .....	52
Figura 11: Em vermelho: Resíduos presentes na estrutura cristalográfica de um dos monômeros da protease do HCMV. Em azul: $\alpha$ N e alças adicionadas.....	56
Figura 12: Modelo do dímero da protease (em amarelo) em solução. ....	58
Figura 13: Visão superior (esquerda) e lateral (direita) do modelo do complexo não covalente inibidor-dímero da protease utilizado nos cálculos QM/MM. Somente as moléculas de água situadas a uma distancia inferior a 22 Å do oxigênio do resíduo de serina 132 foram mantidas no modelo.....	61

Figura 14: Região QM utilizada nos esquemas de partição ESQ1 e ESQ2. Em ESQ1, a região QM é composta pelos átomos indicados em azul. Em ESQ2, a região QM é composta pelos átomos indicados em azul e a cadeia lateral do resíduo His157 (em vermelho).....	63
Figura 15: Ilustração da coordenada de reação (RC) escolhida para a reação de formação do intermediário tetraédrico, $RC = d_{O-H} - d_{C-O} - d_{N-H}$ .....	64
Figura 16: Partição do sistema nas regiões quantomecânica (QM) e de mecânica molecular (MM). .....	69
Figura 17: Regiões QM e MM definidas na mesma molécula. A figura mostra a cadeia lateral do íon glutamato em uma proteína. HLA corresponde ao átomo de hidrogênio adicionado para completar a valência do átomo C $\beta$ nos cálculos quantomecânicos. ....	73
Figura 18: Valores de RMSD calculados em relação a estrutura inicial para os modelos a) <b>D</b> , b) <b>DI</b> , c) <b>D-I</b> , d) <b>M</b> , e) <b>MI</b> e f) <b>M-I</b> .....	77
Figura 19: a) — Fator-B calculado para D, - - - - - Fator-B experimental para D; b) — Fator-B calculado para DI, - - - - - Fator B experimental para D-BILC 821; c) — Fator-B calculado para D-I, - - - - - Fator B experimental para D-BILC 821; d) — Fator-B calculado para M, - - - - - Fator-B calculado para o monômero A de D; e) — Fator-B calculado para MI, - - - - - Fator-B calculado para o monômero A de DI; f) — Fator-B calculado para M-I, - - - - - Fator-B calculado para o monômero A de D-I; g) — Fator-B calculado para DI, - - - - - Fator-B	

calculado para D; h) — Fator-B calculado para MI, - - - - - Fator-B calculado para M.....80

Figura 20: Representação em *cartoon* dos segmentos 35-90 e 130-160 do modelo D. As linhas tracejadas correspondem às ligações de hidrogênio com ocupância maior que 50% ao longo da trajetória presentes no modelo D, mas ausentes em DI. O inibidor, representado em *stick*, superposto ao modelo D serve apenas como referência para localização do sítio ativo da protease. ....82

Figura 21: Amplitude dos movimentos realizados pelas formas dimérica e monomérica da protease do HCMV. Sobreposição das 15 estruturas selecionadas em intervalos regulares de 100 ps dos 1,5 ns finais da trajetória dos modelos a) **D** (monômero A), b) **DI** (monômero A), c) **D-I** (monômero A), d) **M**, e) **MI**, f) **M-I**.....84

Figura 22: Principais alterações estruturais ocorridas na formação do complexo não covalente protease-inibidor. Sobreposição das estruturas médias obtidas dos últimos 500 ps da trajetória de DM. a) Monômero A de DI (preto) e Monômero A de D (cinza), b) MI (preto) e M (cinza), c) Monômero A de DI (preto) e MI (cinza), d) Monômero A de D (preto) e M (cinza). ....87

Figura 23: Sobreposição das estruturas médias obtidas nos últimos 500 ps das simulações em DM para os modelos DI e D. Sobreposição do monômero A do dímero da protease.....89

Figura 24: Os gráficos a), b), c) e d) correspondem a variação temporal dos seguintes parâmetros geométricos :a) distancia entre o centro de massa dos monômeros A e B. b) ângulo definido pelos vetores  $V_1$  e  $V_2$ . c) ângulo definido entre o centro de massa do monômero A, das hélices  $\alpha F$  e do monômero B. d) ângulo diedro

definido pelo centro de massa do monômero A, pelo carbono  $\alpha$  do resíduo Ser 225 na hélice  $\alpha$ F do monômero A, pelo carbono  $\alpha$  do resíduo equivalente à Ser 225 na hélice  $\alpha$ F do monômero B e pelo centro de massa do monômero B. e) representação esquemática dos vetores  $V_1$ ,  $V_1'$  e  $V_2$ . f) esquerda: representação esquemática do ângulo definido em c). f) direita: representação esquemática do ângulo definido em d). Nos gráficos a, b, c e d, a linha contínua preta se refere ao modelo DI, e a linha tracejada ao modelo D. ....92

Figura 25: Superfície molecular próxima ao sítio ativo para a) **DI** e b) **MI**. Os sítios de interação  $S_1$  e  $S_3$  estão indicados pelos círculos brancos.....93

Figura 26: a) Representação bidimensional dos elementos da matriz de correlação dinâmica cruzada calculados para o modelo D. Os eixos horizontal e vertical correspondem aos resíduos dos monômeros A e B, respectivamente. b) Os resíduos marcados em amarelo e vermelho possuem movimentos entre monômeros altamente correlacionados. ....97

Figura 27: a) Representação bidimensional dos elementos da matriz de correlação dinâmica cruzada calculados para o modelo DI. Os eixos horizontal e vertical correspondem aos resíduos dos monômeros A e B, respectivamente. b) Os resíduos marcados em amarelo e vermelho possuem movimentos entre monômeros altamente correlacionados. ....98

Figura 28: a) Representação esquemática para a primeira etapa do mecanismo de reação aceito para as serinas proteases clássicas. b) Interações relevantes entre o inibidor peptídil de carbonila ativada e a protease.....100

Figura 29: Distribuição do ângulo Arg <sub>165</sub> <b>N</b> -Arg <sub>165</sub> <b>H</b> -oxiânion ao longo das simulações de DM para os estados dimérico e monomérico dos complexos protease-inibidor não covalente (cinza) e covalente (cinza claro).....	103
Figura 30: Energia de interação de van der Waals de cada resíduo com o subsistema composto pelos resíduos Ser132 e His63 e os átomos do inibidor.....	104
Figura 31: Energia de interação eletrostática de cada resíduo com o subsistema definido pelos resíduos Ser132 e His63 e os átomos do inibidor. ....	105
Figura 32: Representação dos resíduos Asn62, His63, Asp227, Leu231 e P1' do inibidor. A linha tracejada azul indica a distância entre as cadeias laterais dos resíduos Asn62 e Asp227. a) <b>DI</b> e b) <b>MI</b> . ....	107
Figura 33: Representação em <i>Ball Stick</i> das cadeias laterais dos resíduos Glu28, Glu29, Glu31, Arg137, Arg165 e Arg232. Os resíduos Glu31, Arg137 e Arg165 pertencem ao sítio S <sub>3</sub> . A molécula em verde corresponde ao inibidor peptidil de carbonila ativada complexado à protease. a) modelos <b>D-I</b> , e b) modelo <b>M-I</b> .....	108
Figura 34: Caminho de reação para a formação do intermediário tetraédrico entre o inibidor peptidil de carbonila ativada e a protease nas formas dimérica (preto) e monomérica (vermelha).....	110
Figura 35: Ilustração do procedimento de correção da parcela quantomecânica do Hamiltoniano efetivo $H_{eff}$ . Em vermelho, estão representados os átomos <i>Links</i> adicionados aos átomo QM da fronteira QM/MM região. ....	113

Figura 36: O sistema utilizado no cômputo da contribuição puramente quantomecânica no esquema ESQ1 compreende os 33 átomos da região QM (em azul) e os átomos <i>Link</i> (em vermelho), no caso 4 átomos de hidrogênio.....	114
Figura 37: Variação da contribuição quantomecânica ao longo da coordenada de reação calculada pelo método Hartree-Fock usando diferentes bases. O perfil mostrado foi obtido a partir dos pontos extraídos do caminho de reação calculado no dímero da protease.....	115
Figura 38: Caminho de reação para a formação do intermediário tetraédrico entre o inibidor peptídil de carbonila ativada e a protease nas formas dimérica (preto) e monomérica (vermelha) calculado a nível RHF/6-311+G(2d,p)//AM1/AMBER.	116
Figura 39: Representação bidimensional da variação das distâncias Ser <sub>132</sub> HG-Ser <sub>132</sub> OG e inibidorC-Ser <sub>132</sub> OG na reação na formação do complexo covalente inibidor-protease.....	119
Figura 40: Estruturas finais otimizadas para o reagente, estado de transição e produto obtidas do perfil RHF/6-311+G(2d,p)//AM1/AMBER para o dímero e o monômero da protease.....	120
Figura 41: Perfis obtidos para contribuição QM/MM <sub>ELE</sub> no caminho mínimo de reação das formas dimérica (azul) e monomérica da protease.....	123
Figura 42: Contribuição eletrostática de cada resíduo na estabilização da barreira de energia da reação de formação do complexo tetraédrico inibidor-dímero da protease.....	124

Figura 43: a) Interação entre os Ala159, Ser134 e os resíduos Ser132 e His157 da tríade catalítica. b) Interação entre os resíduos Arg165 e Arg167 e o complexo covalente tetraédrico inibidor-protease.....126

Figura 44: Caminho reação para a formação do intermediário tetraédrico entre o inibidor peptídil de carbonila ativada e a protease na forma dimérica da protease calculado a nível RHF/6-311+G(2d,p)//AM1/AMBER com ESQ1 (preto) e ESQ2 (vermelho).  
.....129

Figura 45: Caminho de reação para a transferência de próton entre os resíduos His63 e His157 calculado a nível RHF/6-311+G(2d,p)//AM1/AMBER para o reagente (preto), estado de transição (vermelho) e produto (verde) na reação de formação do complexo tetraédrico inibidor-protease.....131

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Energias em kcal/mol do reagente, estado de transição e produtos obtidas nos cálculos AM1/AMBER e RHF/6311+G(2d,p)//AM1/AMBER para o dímero e o monômero da protease. <sup>a</sup> .....	117
--	-----

## I. INTRODUÇÃO

### 1. Aspectos Gerais dos Vírus.

Os vírus são organismos subcelulares que possuem um ciclo de replicação exclusivamente intracelular. Uma entidade viral completa e infecciosa (vírion) é composta basicamente por uma molécula de ácido nucléico envolvida por um capsídio, ou capa de proteína (Figura 1). O conjunto capsídio e ácido nucléico constitui o denominado nucleocapsídeo, que em alguns vírus é empacotado por um envelope lipídico. A matriz protéica existente entre o envelope e o capsídio, o tegumento, consiste de um grupo de proteínas não glicosiladas que tem como principal finalidade sinalizar a montagem de alguns vírus e conferir maior rigidez à estrutura [Voet, 1995; Oliveira, 1994; Fields, 1990].

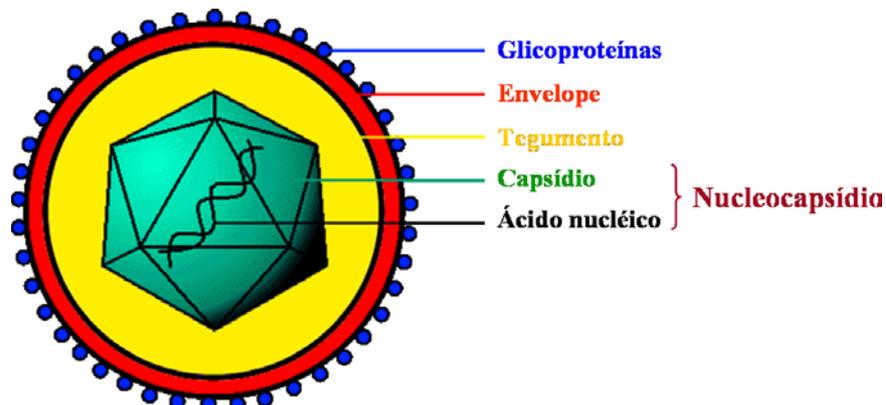


Figura 1: Diagrama esquemático dos componentes de uma partícula viral ou vírion.

[<http://www.medicine.uiowa.edu/groslab/virion.htm>]

A função básica do vírion é carrear o genoma viral para dentro da célula a fim de ser replicado e amplificado. A maior parte dos genomas virais é composta de uma única cópia de ácido nucléico e pode ser em fita dupla ou fita simples, circular ou linear, com exceção dos genomas dos retrovírus que possuem duas cópias idênticas. Os genomas compostos de moléculas de ácido desoxiribonucléico (DNA) podem se apresentar em fitas duplas ou simples. Os genomas compostos de moléculas de ácido ribonucléico (RNA) que se apresentam na forma de uma fita simples podem ser de polaridade positiva, isto é, apresentam a seqüência genômica semelhante a do RNAm (RNA mensageiro), ou podem ser de polaridade negativa, anticomplementar ao RNAm. Além disto, os genomas do tipo RNA também podem se apresentar na forma de fita dupla. Quanto maior for o genoma, maior será a quantidade de proteínas codificadas por ele. Entretanto, quando o genoma é pequeno, normalmente uma única proteína adquire muitas funções. Apesar desta diversidade, todos os genomas virais contêm basicamente três tipos de proteínas: proteínas de replicação do genoma, proteínas de empacotamento do genoma e direcionamento da infecção em novas células e proteínas que modificam a estrutura ou a função da célula hospedeira visando a adequação às necessidades virais [Collier, 2003; Howley, 2001; Oliveira, 1994].

## 2. Biossíntese Viral.

Para que uma partícula viral dê origem a outras partículas é necessário que pelo menos uma célula seja infectada. Após a entrada do vírus na célula, o genoma (RNA ou DNA) é liberado no citoplasma e a síntese de proteínas se inicia. As primeiras proteínas a serem traduzidas são as de essencial importância para a replicação do genoma. As proteínas responsáveis pelo empacotamento do genoma em novos capsídeos e as

responsáveis pela alteração da estrutura e função da célula hospedeira são sintetizadas em seguida [Santos, 2002; Dimmock, 1994; White, 1994]. O ciclo reprodutivo de todos os vírus tem em comum as seguintes fases:

- Adsorção.

O primeiro passo no ciclo reprodutivo de qualquer patógeno intracelular é a adesão à superfície da célula hospedeira-alvo. No caso dos vírus, a adesão é realizada pela associação de uma proteína da superfície viral a um receptor específico na superfície da célula hospedeira. Os vírus que infectam animais geralmente utilizam moléculas receptoras da superfície celular que são extremamente abundantes, como oligossacarídeos, ou são encontradas exclusivamente nas células pelas quais os vírus tem tropismo. Os receptores não são necessariamente proteínas. O vírus do herpes simples, por exemplo, liga-se a proteoglicanas de heparan sulfato por meio de proteínas específicas de sua membrana viral.

- Penetração.

Após o reconhecimento e a ligação à superfície da célula hospedeira, o vírus deve penetrar na célula e liberar seu genoma. O processo de penetração ocorre imediatamente após a adsorção do vírus à parede celular e envolve um dos seguintes mecanismos: i) translocação de todo o vírus através da membrana citoplasmática (penetração direta); ii) endocitose mediada por receptores ou; iii) fusão direta do envelope do vírus com a membrana.

- Desnudamento.

Corresponde à fase posterior à penetração e nela ocorre a liberação do genoma viral.

- Estratégias de replicação.

No processo de replicação, algumas estratégias são utilizadas pelos vírus. Essas estratégias envolvem a codificação e organização dos genes virais para a completa expressão e replicação do genoma, com posterior montagem e maturação das partículas. Os retrovírus, que contém uma fita simples de polaridade positiva, podem ser traduzidos diretamente já que seu RNA age como RNA mensageiro. Após a penetração na célula hospedeira, o genoma viral se liga aos ribossomos levando à tradução das proteínas. A molécula de RNA é utilizada como molde para a geração de uma fita negativa complementar, que será novamente transcrita através da polimerase viral. Durante esse processo, a molécula de RNA é copiada muitas vezes assim como são sintetizadas as proteínas utilizadas na montagem das partículas virais. Os vírus de RNA de fita simples com polaridade negativa não podem ser traduzidos diretamente. Portanto, seu genoma por si só não é considerado infeccioso. Desta forma, existe a necessidade do genoma associar-se a uma transcriptase viral. A transcriptase viral converte o RNA com polaridade negativa em uma fita com polaridade positiva, permitindo o início do processo de tradução. Os vírus de RNA de fita dupla são transcritos em capsídeos parcialmente abertos através de uma polimerase empacotada no seu interior. Os vírus de DNA de fita dupla são transportados para o núcleo e são infecciosos. O genoma desses vírus é imediatamente transcrito em RNAm por enzimas celulares, e posteriormente

traduzido em proteínas virais regulatórias. Os vírus de DNA de fita simples são replicados no núcleo celular por polimerases celulares.

- Montagem, maturação e liberação das partículas virais.

Após a síntese de proteínas iniciais, transcrição do ácido nucléico e síntese de proteínas estruturais, o vírus passa por uma fase de montagem ou empacotamento antes de sair da célula. Os vírus não envelopados podem ser montados no citoplasma ou no núcleo. Todos os vírus não envelopados dependem da lise da célula para sua liberação. Os vírus envelopados adquirem o envelope nas membranas celulares, citoplasmáticas, nucleares ou das vesículas intracelulares. Estes saem por brotamento das membranas celulares ou por exocitose através de vesículas sem a necessidade de lise celular.

As etapas descritas acima estão exemplificadas na Figura 2 [Santos, 2002; Flint, 1999; Harper, 1999; Jawetz, 1998; Homa, 1997; Collier, 1993; David, 1990; Fields, 1990].

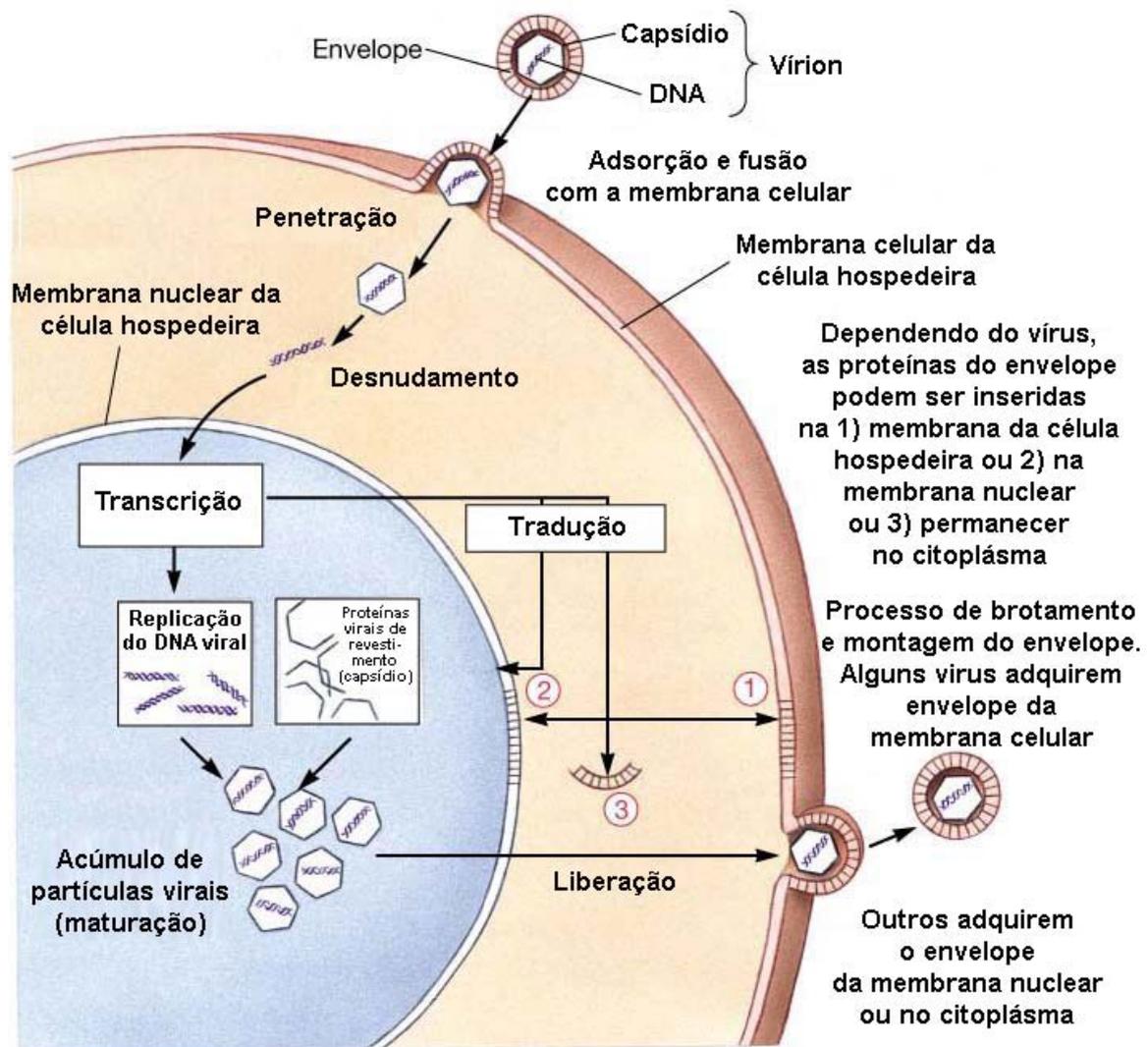


Figura 2: Ciclo replicativo de um vírus de DNA de fita dupla.

[<http://www.uccs.edu/~rmlamed/MicroFall2002/Chapter%2010/DNA%20Virus%20Replication.jpg>]

### 3. Os Herpesvírus Humanos.

Os herpesvírus infectam a maioria das espécies no reino animal e são responsáveis por diversas doenças em seres humanos. [Fields, 1990]. Os herpesvírus são membros de uma única família, Herpesviridae, e possuem como característica comum a capacidade de estabelecer infecção latente/persistente por toda a vida do hospedeiro [Roizman, 1992; Roizman 1990]. Dentre todos os tipos conhecidos atualmente, podemos

identificar oito capazes de infectar humanos [Collier, 1993]. Estes, denominados herpesvírus humanos, foram classificados segundo o *International Committèe on Taxonomy of Viruses* (ICTV) de acordo com suas propriedades físicas, químicas e biológicas em três subfamílias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gamaherpesvirinae* [Knipe, 2001]. Os herpesvírus humanos são responsáveis por diversas doenças, que vão desde manifestações subclínicas a infecções fatais em pacientes imunocomprometidos e imunossuprimidos [Ben, 1999; Veronesi, 1991].

A subfamília *Alphaherpesvirinae* inclui o vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1 ou HHV-1), o vírus herpes simplex tipo 2 (HSV-2 ou HHV-2) e o herpesvírus humano 3 (HHV-3) ou vírus da varicela-zóster (VZV). Membros da subfamília *Alphaherpesvirinae*, ou  $\alpha$ -herpesvírus, possuem características morfológicas e ciclo replicativo semelhantes aos de outros membros da família Herpesviridae. Um  $\alpha$ -herpesvírus pode produzir infecções líticas, possui um ciclo replicativo curto podendo infectar uma grande variedade de hospedeiros e estabelece infecções latentes e/ou persistentes em células neuronais sensoriais [Jones, 1998]. As duas cepas do HSV, HSV-1 e HSV-2, além de causarem diferentes manifestações clínicas e sintomas, também diferem segundo o local de ocorrência das lesões. O HSV-1 é responsável principalmente pelo herpes labial e o HSV-2 pelo herpes genital [Whitley, 1998; Corey, 1986]. Dentre as manifestações clínicas, a encefalite por HSV-1 e 2 é uma das infecções mais devastadoras dentre todas as causadas pelos herpesvírus. O vírus da varicela-zoster causa varicela ou catapora como infecção primária. Após a infecção primária, o vírus VZV ascende para o núcleo dos gânglios sensoriais onde permanece na forma latente, causando o herpes-zoster [Arvin, 1996]. A complicação mais comum do herpes-zoster consiste na neuralgia pós-herpética, que causa dores intensas e crônicas, até mesmo debilitantes.

A subfamília *Betaherpesvirinae*, ou  $\beta$ -herpesvírus, inclui o citomegalovírus humano (HCMV ou HHV-5) e o herpesvírus humano do tipo 6 e 7 (HHV-6 and HHV-7). Cada um dos  $\beta$ -herpesvírus possui um longo ciclo reprodutivo e um número restrito de hospedeiros. A latência é mantida nos glóbulos brancos, nos rins, nas glândulas de secreção, nas células linforeticulares e em outros tecidos [Ben, 1999]. Apesar da infecção por HCMV em crianças e adultos saudáveis ser normalmente assintomática, esta é a principal causa de anormalidades congênitas em recém nascidos e a maior causa de morbidez e mortalidade em indivíduos imunocomprometidos [Jong, 1998a]. O HHV-6 infecta preferencialmente linfócitos do tipo T. Recentemente, duas variantes do vírus foram identificadas como HHV-6A e HHV-6B. A infecção primária por HHV-6B é responsável pelo surgimento de *roseola infantum* em crianças. Em indivíduos imunocompetentes, a infecção por HHV-6B pode estar associada a várias patologias, incluindo a hepatite fulminante, as desordens auto-imunes, a fadiga crônica, a esclerose múltipla e a síndrome semelhante à mononucleose. É importante ressaltar que acima de 95% da população mundial possui anticorpos para a variação HHV-6B deste  $\beta$ -herpesvírus [Dockrell, 2003; Schirmer, 1991]. O HHV-7 causa infecção em células T gerando um efeito citopatogênico semelhante ao de outros membros da família. A infecção primária pelo HHV-7 pode levar ao desenvolvimento de *roseola infantum* e de doenças febris de origem inespecíficas. Visto que a replicação do HHV-7 pode ocorrer na mesma célula infectada por HHV-6, a patogênese do HHV-7 pode estar intrinsecamente correlacionada com o HHV-6 [Veronesi, 1991; Fields, 1990].

A subfamília *Gamaherpesvirinae*, a qual é específica para linfócitos B ou T, inclui o vírus Epstein-Bar (EBV ou HHV-4) e o herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KS), também conhecido como herpesvírus humano 8 (HHV-8) [Ben, 1999]. A infecção causada pelo vírus EBV normalmente ocorre na adolescência ou no início da fase adulta

e é manifestada na forma de mononucleose [Young, 2004]. Atualmente a causa mais comum para a manifestação do sarcoma de Karposi é a infecção pelo HIV (vírus da imunodeficiência humana) [Sanders, 2004].

#### 4. Biossíntese Viral dos Herpesvírus Humano.

Inicialmente, as partículas virais se adsorvem na superfície da célula através de interações com receptores celulares. Após entrar na célula, o nucleocapsídeo é transportado pelo citoesqueleto até as proximidades do núcleo; o capsídeo é deixado no citoplasma. Em seguida, o DNA e a proteína do tegumento  $\alpha$ -TIF, após se complexarem com as proteínas citoplasmáticas do hospedeiro, penetram no núcleo. No núcleo, onde corre a transcrição do ácido nucléico, a replicação e a montagem de novos capsídeos, o DNA viral é transcrito em RNAm pela RNA polimerase II da célula hospedeira. Na expressão gênica viral, ativada pelo complexo  $\alpha$ -TIF e proteínas celulares, o RNAm do tipo  $\alpha$  é traduzido nos ribossomos em proteínas  $\alpha$ . As proteínas  $\alpha$  acumuladas no citoplasma retornam ao núcleo para ativar a transcrição dos genes  $\beta$ , responsáveis pela replicação do ácido nucléico viral. As proteínas  $\beta$ , traduzidas do RNAm do tipo  $\beta$ , retornam ao núcleo para promover a ativação dos genes  $\gamma$ . Os genes  $\gamma$  são regulados pelas proteínas  $\alpha$  e  $\beta$  e codificam as proteínas virais estruturais, como as proteínas do tegumento e do capsídeo, necessárias para a montagem da partícula viral. As proteínas traduzidas do RNAm do tipo  $\gamma$  retornam ao núcleo para se integrarem às estruturas dos vírions. O DNA sintetizado pelas enzimas codificadas pelo gene  $\beta$  são empacotados em capsídeos que se encontram em diferentes estágios de maturação.

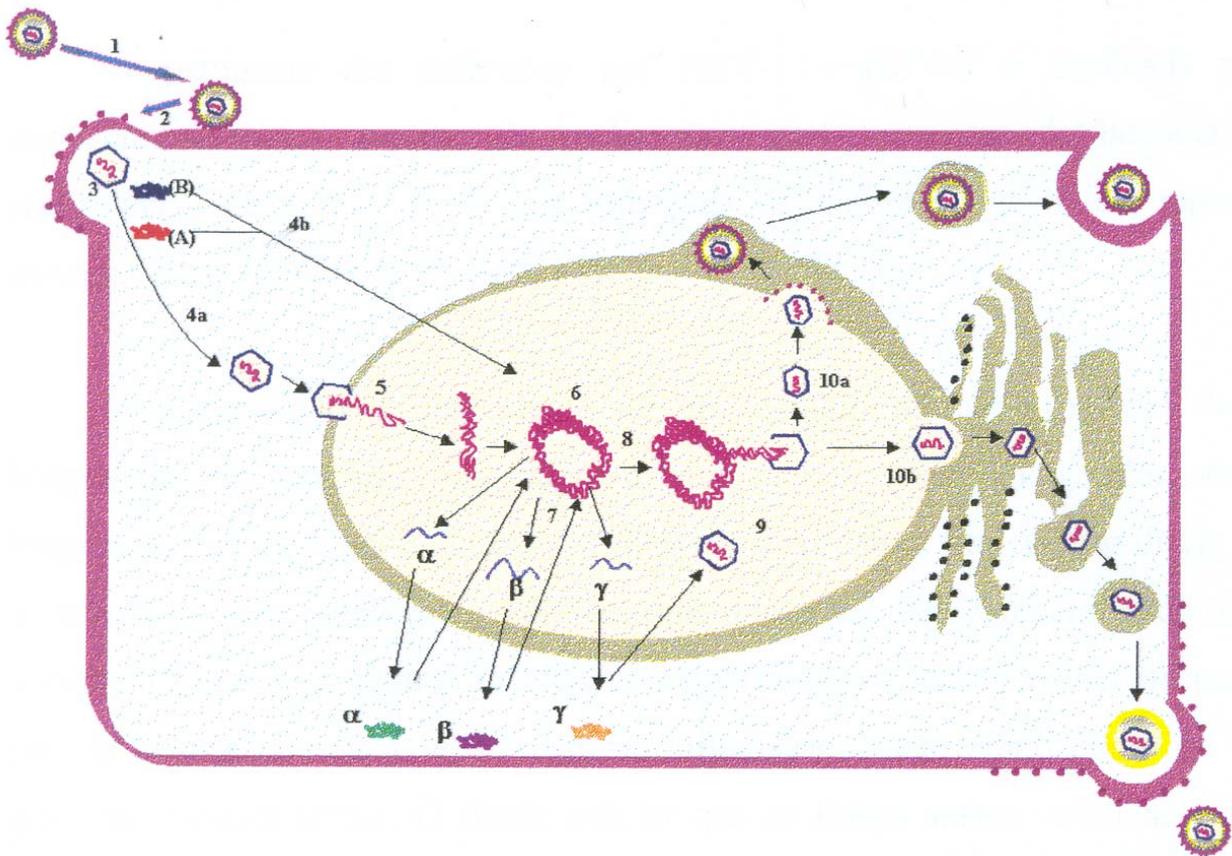


Figura 3 : Biossíntese dos HSV. 1) Adorção do vírion à membrana plasmática da célula hospedeira. 2) Penetração do vírion. 3) Liberação do nucleocapsídeo e das proteínas virais (A-  $\alpha$ -TIF e B- VHS) no citoplasma. 4) Migração do nucleocapsídeo para o núcleo da célula. 5) Liberação do ácido nucléico no interior do núcleo celular. 6) Circularização do DNA viral. 7) Transcrição e tradução dos genes  $\alpha$  em RNAm $\alpha$ ,  $\beta$  em RNAm $\beta$  e  $\gamma$  em RNAm $\gamma$ . 8) Replicação do genoma viral pela DNA polimerase viral. 9) Montagem dos capsídeos. 10) Saída do vírus, a) o vírus adquire o envelope na membrana nuclear e é conduzido até a membrana citoplasmática onde é liberado da célula por exocitose. b) o nucleocapsídeo perde o envelope parcialmente adquirido ao atravessar a membrana nuclear. O vírion é liberado por brotamento após aquisição do envelope na membrana citoplasmática.

Atualmente, duas hipóteses são aceitas para a aquisição do envelope viral. Na primeira, o vírion completo atravessaria a lamela interna da membrana nuclear e se acumularia em um sistema de canais tubulares formados a partir do retículo endoplasmático ou derivado da lamela externa do núcleo. Posteriormente, os vírions seriam transferidos para o complexo de Golgi para em seguida serem conduzidos à membrana citoplasmática e eliminados por exocitose. Na segunda hipótese, o vírion perderia o envelope inicialmente adquirido ao atravessar a membrana nuclear. Os capsídeos presentes no citoplasma adquiririam seus envelopes ao atravessarem o complexo de Golgi [Santos, 2002; Collier, 1993; Fields, 1990; Homa, 1997].

#### 5. Fármacos Anti-Herpesvírus.

A maior parte dos fármacos anti-herpesvírus consiste em análogos de nucleotídeos com ação inibitória contra polimerases virais, impedindo, assim, a transcrição do genoma viral. De um modo geral, as moléculas são pró-fármacos que precisam passar à forma nucleotídica ativa através da ação de quinases virais ou celulares. As quinases adicionam grupamentos fosfato ao nucleosídeo, transformando-o em nucleotídeo. O mecanismo de ação baseia-se na interação preferencial do fármaco com a DNA polimerase viral, em detrimento a interação com a polimerase celular (Figuras 4 e 5) [Boivin, 2005; De Clercq, 2004; De Clercq, 2003; Eizuru, 2003; De Clercq, 2002; Griffiths, 2002; De Clercq, 2001; Emery, 2001; Nichols, 2000; Snoeck, 2000; Jong, 1998a; Jong, 1998b; Weber, 1996].

### 5.1. Inibidores do HSV e VZV.

- Aciclovir (ACV): 9-(2-hidroxietoximetil)guanina, acicloguanosina (ACG), Zovirax<sup>®</sup>.

*Espectro de atividade:* HSV-1 e 2 e VZV.

*Mecanismo de ação:* O aciclovir é um derivado de guanosina que atua na inibição da DNA polimerase viral agindo como um “terminador” de cadeia na síntese do DNA viral. Inicialmente, o aciclovir converte-se em monofosfato (ACV-MP) por intermédio de uma timidina quinase codificada pelo herpesvírus. Após esta primeira fosforilação, que é crucial para a seletividade do aciclovir, o ACV-MP é fosforilado a aciclovir difosfato (ACV-DP) e trifosfato (ACV-TP) por quinases celulares. O derivado trifosfatado, a forma ativa do aciclovir, compete com a guanosina-TP pela DNA polimerase viral, que o incorpora à cadeia do DNA viral que está sendo sintetizada. Como o aciclovir não possui a hidroxila na posição 3', necessária para a ligação de outros nucleotídeos, a síntese de DNA é interrompida.

*Indicações principais:* infecções cutâneas, em mucosas e sistêmicas causadas pelo HSV-1 e HSV-2 (incluindo herpes labial e genital, herpes em neonatos e encefalite herpética), e infecções causadas pelo VZV.

*Administração:* Oral.

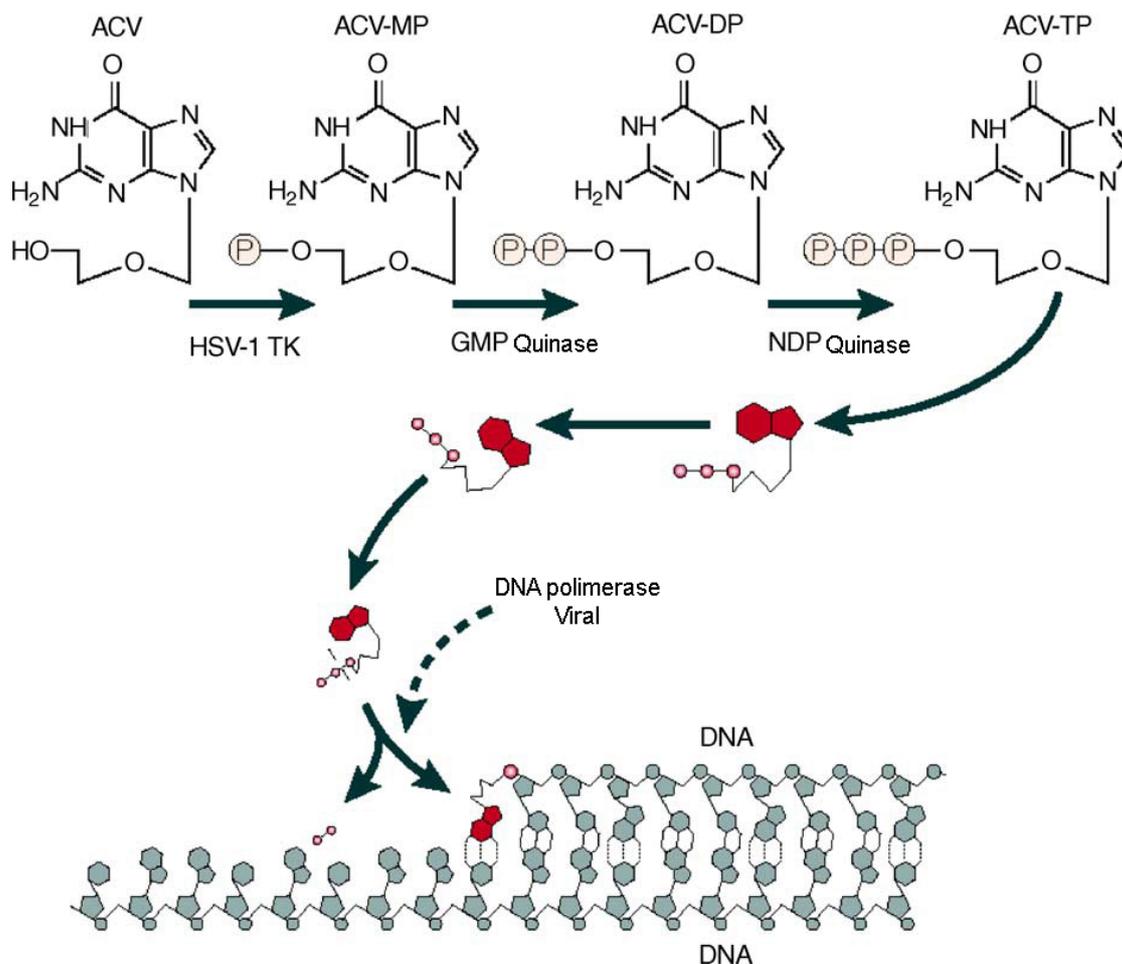


Figura 4: Mecanismo de ação do aciclovir (ACV). Fosforilações intracelulares são necessárias para que o ACV possa interferir na síntese viral. No caso do HSV-1, a primeira fosforilação é catalisada pela timidina quinase viral (TK), garantindo assim que o ACV atue somente nas células infectadas.

- Valaciclovir: éster de valina do aciclovir (VACV), Zelitrex<sup>®</sup>, Valtrex<sup>®</sup>.

*Espectro de atividade:* O mesmo do aciclovir.

*Mecanismo de ação:* Atua como um pró-fármaco do aciclovir. Possui o mesmo mecanismo de ação do aciclovir.

*Indicações principais:* Infecções causadas por HSV e VZV que podem ser tratadas por terapia oral (herpes genital e herpes zoster).

*Administração:* Oral.

- Penciclovir: 9-(4-hidróxi-3-hidroximetil-buta-1-il)guanina (PCV), Denavir<sup>®</sup>, Vectavir<sup>®</sup>.

*Espectro de atividade:* Idêntico ao aciclovir

*Mecanismo de ação:* Similar ao aciclovir.

*Indicações principais:* herpes labial

*Administração:* Uso tópico, creme.

- Famciclovir: diacetil éster de 9-(4-hidroxi-3-hidroximetil-buta-1-il)-6-deoxyguanina (FCV), Famvir<sup>®</sup>.

*Espectro de atividade:* Idêntico ao aciclovir

*Mecanismo de ação:* Atua como um pró-fármaco do Penciclovir. FCV é convertido em PCV após hidrólise de dois grupos acetila e oxidação da posição 6.

*Indicações principais:* Infecções causadas por HSV-1, HSV-2 e VZV.

*Administração:* Oral.

- Idoxuridina: 5-iodo-2'-deoxiuridina (IDU, IUdR), Herpid<sup>®</sup>, Stoxil<sup>®</sup>, Idoxene<sup>®</sup>, Virudox<sup>®</sup>.

*Espectro de atividade:* O mesmo do aciclovir

*Mecanismo de ação:* Incorporado ao DNA viral e/ou celular após fosforilação intracelular a IDU 5'-trifosfato.

*Indicações principais:* Ceratitise causada por HSV.

*Administração:* Uso tópicoe, creme oftálmico.

- Trifluoridina: 5-trifluometil-2'-deoxiuridina, trifluorotimidina (TFT), Viroptic®.

*Espectro de atividade:* O mesmo do aciclovir.

*Mecanismo de ação:* Inibe a conversão do dUMP (monofosfato de desoxiuridina) em dTMP (monofosfato desoxitimidina) pela timidilato sintase, após fosforilação intracelular a TFT 5'-monofosfato.

*Indicações principais:* Ceratitise causada por HSV.

*Administração:* Uso tópicoe, creme oftálmico.

- Brivudina: (E) 5-(2-bromovinil)-2'-deoxiuridina, bromovinildesoxiuridina (BVDU), Zostex®, Zonavir® e Zerpex®.

*Espectro de atividade:* HSV-1 e VZV.

*Mecanismo de ação:* Atua na inibição da DNA polimerase, competindo com o substrato natural dTTP (desoxitimidina trifosfato), após fosforilação intracelular a BVDU 5'-trifosfato. A primeira e segunda fosforilações são catalisadas pelas timidina quinases virais (HSV-1 e VZV), o que explica a grande especificidade do BVDU por estes vírus.

*Indicações principais:* Infecções causadas por HSV-1 e VZV, especialmente herpes zoster.

*Administração:* Oral.

## 5.2. Inibidores do HCMV.

- Ganciclovir: 9-(1,3-dihidroxi-2-propoximetil)guanina (DHPG), (GCV), Cymevene<sup>®</sup>, Cytovene<sup>®</sup>.

*Espectro de atividade:* infecções causada por HSV-1, HSV-2, HCMV e alguns outros herpesvírus.

*Mecanismo de ação:* Como no caso do aciclovir, o ganciclovir precisa ser ativado a trifosfato para competir com a guanosina trifosfato pela incorporação ao DNA viral. O fármaco suprime a replicação do DNA viral, mas diferentemente do aciclovir não atua como elemento “terminador” de cadeia. A especificidade do GCV pelos HSV e HCMV se deve à primeira fosforilação catalisada pelas enzimas codificadas pelo HSV e HCMV.

*Indicações principais:* Infecções causadas por HCMV, especialmente retinite em pacientes imunocomprometidos.

*Administração:* Intravenosa.

- Valganciclovir: éster de valina do ganciclovir (VGACV), Valcyte<sup>®</sup>.

*Espectro de atividade:* O mesmo do ganciclovir

*Mecanismo de ação:* Atua como um pró-fármaco do ganciclovir, possuindo o mesmo mecanismo de ação.

*Indicações principais:* Infecções causadas por HCMV.

*Administração:* Oral

- Foscarnet: é um *antisense* oligodeoxinucleodíto composto uma sequência de nucleosídios ligados por 21 fosforotioatos, Foscavir<sup>®</sup>.

*Espectro de atividade:* Herpesvírus e HIV.

*Mecanismo de ação:* O foscarnet é um análogo não nucleosídico sintético de pirofosfato que inibe ação da DNA polimerase viral em virtude da interação com o sítio de ligação do pirofosfato.

*Indicações principais:* Retinite causada por infecções do HCMV em pacientes com AIDS.

*Administração:* Intravenosa.

- Cidofovir: (S)-1-(3-hidróxi-2-fosfonilmetoxipropil)citosina (HPMPC), (CDV), Vistide<sup>®</sup>, Forvade<sup>®</sup>.

*Espectro de atividade:* Herpesvírus.

*Mecanismo de ação:* Inicialmente, o cidifovir sofre uma fosforilação através de uma quinase celular para se converter na forma difosfato (forma ativa). O cidofovir difosfato inibe a síntese do DNA viral competindo com incorporação da deoxicidina-TP à cadeia de DNA.

*Indicações principais:* Retinite causada por infecções do HCMV em pacientes com AIDS.

*Administração:* Intravenosa.

- Fermivirsen: consiste em um fosforotioato oligonucleodídico que inibe a replicação do HCMV por um mecanismo *antisense*. Vistide<sup>®</sup>, Forvade<sup>®</sup>.

*Espectro de atividade:* Infecção por HCMV.

*Mecanismo de ação:* A seqüência nucleodítica do formivirsen é complementar ao gene imediatamente inicial 2 (IE2) no RNAm do HCMV. Essa região do genoma codifica várias proteínas responsáveis pela regulação da expressão gênica. O formivirsen inibe a tradução do RNAm referente ao gene IE2, e conseqüentemente a replicação viral.

*Indicações principais:* Retinite causada por infecções do HCMV em pacientes com AIDS.

*Administração:* Intraocular.

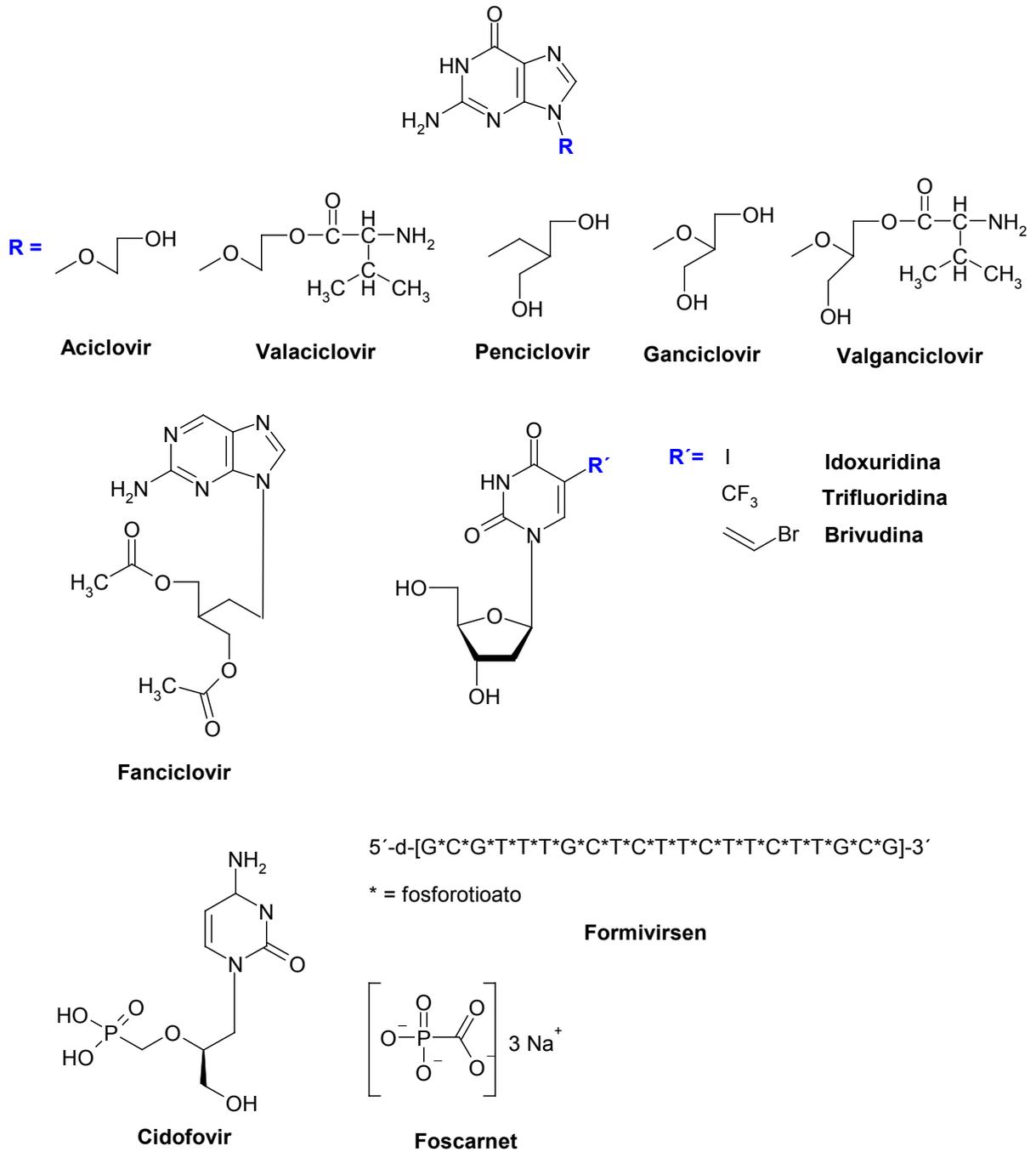


Figura 5: Agentes anti-herpesvírus.

## 6. O Citomegalovírus Humano.

O HCMV é um vírus de DNA altamente espécie-específico que infecta mais de 90% da população mundial. Entretanto, a maior parte dessas infecções são clinicamente assintomáticas [Jong, 1998a; Fields, 1990]. O HCMV é o principal agente patogênico oportunista responsável por diversos problemas de saúde como pneumonia e retinite, e pela morte de indivíduos com o sistema imunológico suprimido ou comprometido [Nichols, 2000; Jong, 1998a]. Como o número de transplantes de órgãos e de indivíduos infectados com o HIV tem crescido consideravelmente nas últimas décadas, a busca por tratamentos antivirais tornou-se de vital importância [Griffiths, 2002; Nichols, 2000; Bruggeman, 1999]. Antes da utilização da terapia HAART<sup>1</sup> (*highly active antiretroviral therapy*), as doenças causadas pelo HCMV eram extremamente comuns em pacientes com AIDS. Mais de 85% de pacientes com AIDS que apresentam infecção por HCMV desenvolvem retinites, infecções gastrointestinais e síndromes neurológicas [Nichols, 2000; Ogilvie, 1997]. O HCMV também é muito comum em neonatos, infectando 1% dos recém nascidos. Estima-se que 10% destes sejam sintomáticos e apresentem severas seqüelas como retardamento mental e distúrbios auditivos [Jong, 1998a; Jong, 1998b].

Como visto, as abordagens terapêuticas disponíveis para o tratamento clínico da infecção por HCMV incluem o uso do ganciclovir, valganciclovir, foscarnet, cidofovir e do formivirsen [Nichols, 2000]. Administração intravenosa do ganciclovir é o tratamento utilizado apenas para infecções potencialmente fatais ou com risco de cegueira em pacientes imunocomprometidos. Apesar da formulação oral do aciclovir ser utilizada em regime profilático para manutenção de pacientes com AIDS ou de indivíduos transplantados, sua biodisponibilidade ainda é muito baixa. O Foscarnet, administrado na forma de infusão intravenosa, é um fármaco de segunda linha para o

---

<sup>1</sup> HAART: Tratamento utilizado na infecção causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Consiste na combinação de inibidores nucleosídeos e/ou não nucleosídeos da transcriptase reversa e de inibidores da protease viral.

tratamento de infecções oculares por HCMV em pacientes imunocomprometidos. O cidofovir foi o primeiro análogo de nucleotídeos a ser licenciado e, como tem tempo de meia-vida relativamente longo, pode ser administrado em doses menos frequentes sem a necessidade de implantação por via venosa. A administração do cidofovir retarda a progressão da retinite casada pelo HCMV.

Apesar dos inibidores da DNA polimerase, ganciclovir, foscarnet e cidofovir, inibirem potencialmente a replicação do HCMV, estes compostos requerem administração intravenosa para alcançarem níveis terapêuticos, além de exibirem alta toxicidade. Além disto, o desenvolvimento de resistência do vírus a esses compostos é um dos mais sérios e preocupantes problemas relacionados às terapias com análogos de nucleosídeos [De Clercq, 2004; De Clercq, 2003; Eizuru, 2003; De Clercq, 2002; De Clercq, 2001].

## 7. O Papel da Protease no Ciclo de Vida dos Herpesvírus.

Todos os membros da família Herpesviridae codificam uma protease que participa do processo de maturação dos capsídeos virais, cuja atividade é essencial para a produção de partículas infecciosas [Holwerda, 1997; Gibson, 1995; Matusick-Kumar, 1995; Gao, 1994]. Apesar do papel exercido por esta protease ter sido reconhecido inicialmente para o vírus HSV-1 [Gao, 1994], assume-se que esta é essencial para a produção dos vírions em todos os outros herpesvírus. Portanto, torna-se um alvo atrativo para o desenvolvimento de agentes anti-herpes. [Batra, 2001a; Waxman, 2000; Patrick, 1998; Flynn, 1997; Gibson, 1995]. Isto pode ser visto pelo extenso número de artigos publicados visando o desenvolvimento de inibidores para esta enzima [Gopalsamy,

2004; Borthwick, 2002; Reefschlaegera, 2001; Borthwick, 2000; Dhanak, 2000; Guo, 2000; Chan, 1999; Smith, 1999; Déziel, 1998; Dhanak, 1998; Jong, 1998a; Jong, 1998b; Yoakim, 1998; Pinto, 1996].

O genoma viral do citomegalovírus contém uma sequência de leitura aberta UL80 (*Open Reading Frames – ORFs*) responsável pela codificação da protease completa de 80 kDA e de seu substrato [Gibson, 1995] (Figura 6). A protease completa do HCMV é composta por um domínio proteolítico de 256 resíduos em sua porção N-terminal, uma região de elo e um domínio estrutural na porção C-terminal denominado “domínio do arcabouço” [Gibson, 2001].

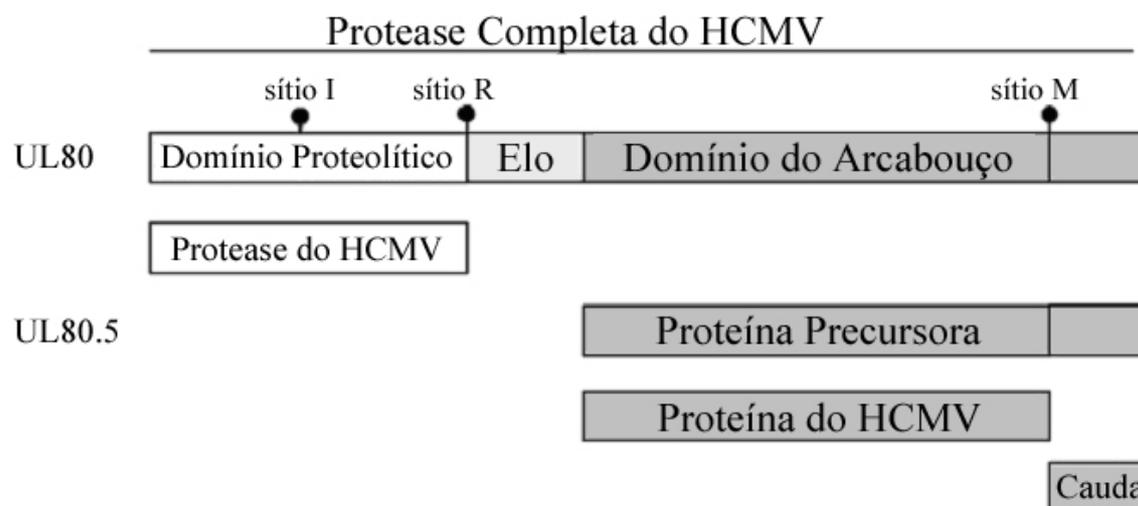


Figura 6: Processo de maturação da protease do HCMV e da proteína precursora. A proteína precursora é idêntica à porção C-terminal da protease codificada pelo gene UL80. Os sítios de clivagem M (maturação), R (liberação) e I (interno) estão indicados.

No HCMV, a proteína precursora, produto do gene UL80.5, interage com a principal proteína de capsídio e age como um arcabouço ao redor do qual as proteínas do capsídio serão agrupadas [Gibson, 2001, LaFemina, 1996]. Para permitir o empacotamento do

DNA viral, a protease, produto do gene UL80, sofre clivagem autoproteolítica em dois sítios distintos, no sítio de maturação (sítio M) e no sítio de liberação (sítio R) do domínio do arcabouço [Holwerda, 1997; Baum, 1993]. A clivagem no primeiro sítio (sítio M), localizado próximo à região C-terminal, é responsável pela remoção do término carboxilado do domínio do arcabouço e da proteína precursora. A clivagem no sítio R por sua vez, libera um fragmento contendo a porção N-terminal (domínio proteolítico) da protease completa que retém toda a atividade catalítica da protease codificada pelo gene UL80. Este fragmento está presente no processo de maturação das partículas virais em todos os herpesvírus humanos e é referido como a protease dos vírus herpes [Tong, 2002; Ben, 1999]. Além dos sítios M e R no caso do HCMV, a protease catalisa uma clivagem adicional no sítio I [O'Boyle, 1995; Holwerda, 1994]. Entretanto, a nova forma da protease produzida por esta clivagem (formada por duas cadeias polipeptídicas) ainda permanece cataliticamente ativa [O'Boyle, 1995; Holwerda, 1994].

## 8. Estrutura da Protease do Citomegalovírus.

Estudos bioquímicos e de mutagênese identificaram a protease dos herpesvírus humanos como uma serina protease [Gibson, 1995; Welch, 1993]. Entretanto, sua seqüência não possui homologia com qualquer outra serina protease ou outras proteínas em geral. Sua peculiar seqüência de amino ácidos e suas propriedades bioquímicas tornam a protease dos herpesvírus humanos um exemplo de uma nova classe de serinas proteases [Reling, 2000; Hoog, 1997; Qiu, 1997; Chen, 1996; Qiu, 1996; Shieh, 1996; Tong, 1996]. No presente trabalho, será empregada a nomenclatura de Schechter e Berger [Schechter, 1967] na denominação dos sítios de interação das serina proteases,

assim como dos respectivos resíduos nos substratos e inibidores. A partir da ligação peptídica do substrato clivada, os resíduos de aminoácidos presentes na porção N-terminal do substrato são denominados P1-P2-P3-..., enquanto que os resíduos presentes na porção C-terminal são P1'-P2'-P3' e assim por diante. Os respectivos sítios de interação são denominados, S1, S2, S3, ..., S1', S2', S3' ... (Figura 7).

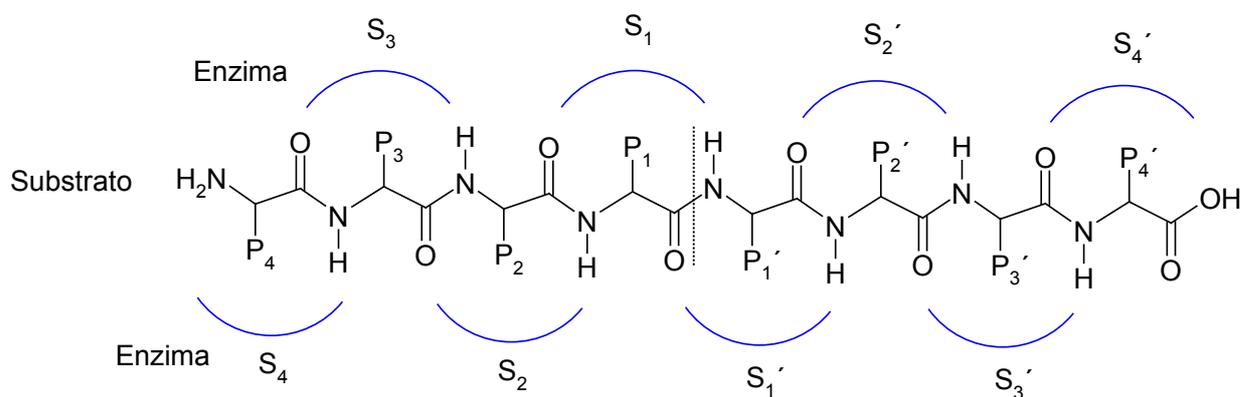


Figura 7: Nomenclatura utilizada na denominação dos sítios de interação das serina proteases e dos respectivos resíduos no substrato ou inibidor

Estudos de cristalografia de raios-X [Qui, 1996; Shieh, 1996; Tong, 1996] revelaram que a protease do HCMV possui um enovelamento único dentre todas as serina proteases conhecidas. A estrutura cristalográfica (código do PDB, *Protein Data Bank*, 2WPO) revela uma molécula homodimérica com dois sítios ativos separados por cerca de 30 Å e localizados em faces opostas do dímero. Somente a forma dimérica é cataliticamente ativa. Cada monômero é formado por sete fitas β, predominantemente antiparalelas (exceto pelas fitas β<sub>2</sub> e β<sub>6</sub>). Essas sete fitas β compõem o motivo barril β (β<sub>1</sub>-β<sub>7</sub>), que é rodeado por sete α-hélices (α<sub>A</sub>-α<sub>G</sub>) (Figura 8). Alternativamente, o barril β pode ser descrito em termos de duas folhas betas, com as fitas β<sub>3</sub>, β<sub>4</sub>, β<sub>1</sub> e β<sub>7</sub>

compondo uma folha e as fitas  $\beta_3$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_6$  e  $\beta_5$  compondo a segunda folha. A fita  $\beta_3$  participa da formação das duas folhas  $\beta$  em um dos lados do barril. Uma fita adicional, de três resíduos,  $\beta_8$ , interage por intermédio de uma ligação de hidrogênio com a fita  $\beta_3$ . Entretanto, esta fita não faz parte do motivo barril  $\beta$ . O arranjo adotado pelas duas folhas  $\beta$  é responsável pela presença de duas aberturas no motivo barril  $\beta$ , uma muito estreita e outra larga. Todos os aminoácidos cujas cadeias laterais apontam para dentro do barril  $\beta$  são hidrofóbicos e altamente conservados [Gibson, 1995]. Com relação às  $\alpha$  hélices, duas ( $\alpha_B$  e  $\alpha_C$ ) estão localizadas próximas à abertura estreita do barril, e quatro ( $\alpha_D$ ,  $\alpha_E$ ,  $\alpha_F$ , e  $\alpha_G$ ) estão dispostas ao redor das duas folhas  $\beta$ . A hélice  $\alpha_A$  representa os poucos resíduos da proteína situados próximos à abertura larga do barril  $\beta$ . Um outro núcleo hidrofóbico é formado pelo empacotamento das fitas  $\beta_3$ ,  $\beta_4$ ,  $\beta_1$  e  $\beta_7$  com as hélices  $\alpha_D$ ,  $\alpha_E$ , e  $\alpha_G$ . Os resíduos envolvidos neste núcleo hidrofóbico também são conservados entre as proteases dos herpesvírus. Cinco regiões conservadas foram identificadas na comparação entre as seqüências das proteases dos herpesvírus humanos [Gibson, 1995; Holwerda, 1994]. Estas regiões, em sua grande maioria, fazem parte das fitas  $\beta$  que compõem o barril  $\beta$ . Portanto, o padrão de conservação obtido pode ser entendido como uma exigência estrutural para a manutenção da estrutura terciária destas proteases [Holwerda, 1994].

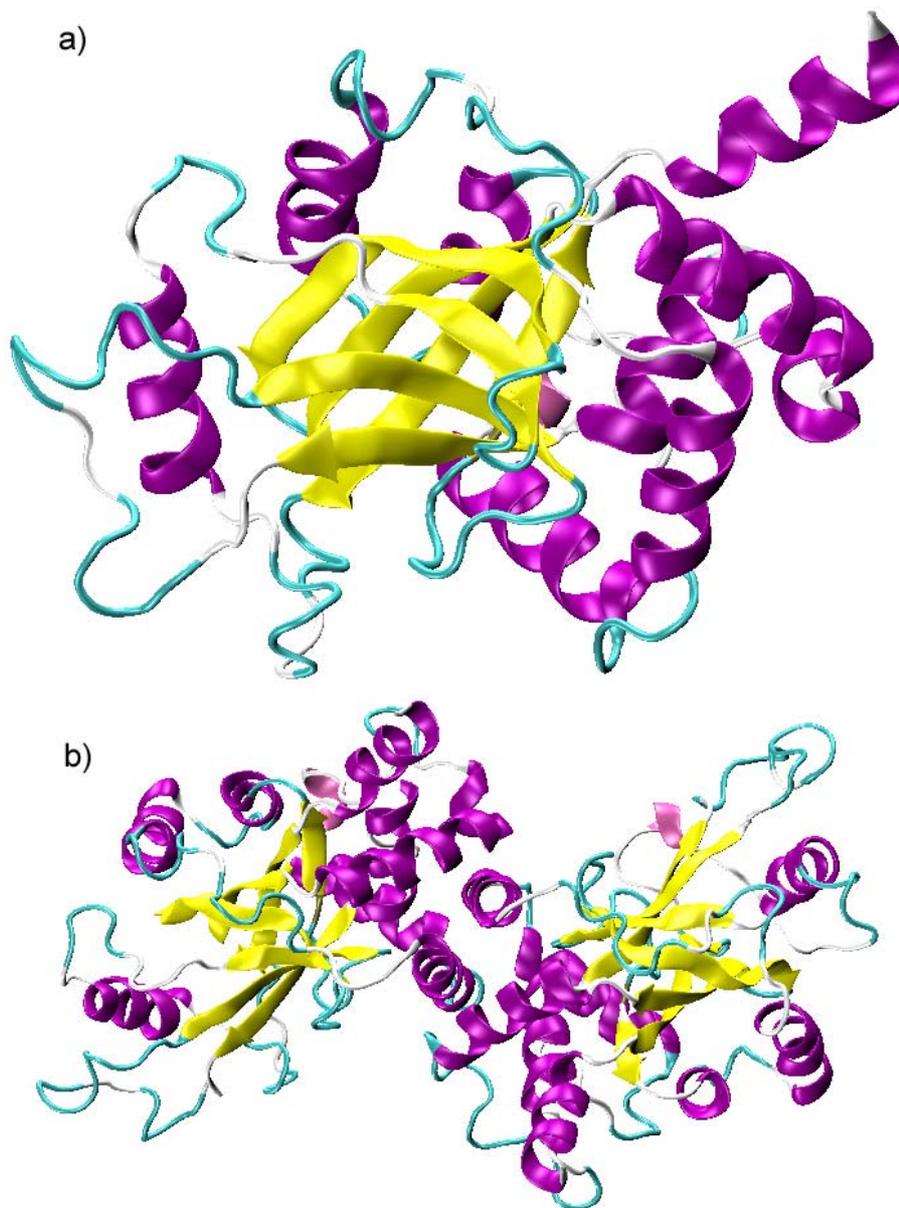


Figura 8: Estrutura tridimensional da protease do HCMV. a) Monômero. a) Dímero.

### 9. Uma Nova Tríade Catalítica.

Ao contrário de todas as serinas proteases conhecidas, em que a tríade catalítica é composta por uma serina, uma histidina e um ácido aspártico ou glutâmico [Kraut, 1977; Derewenda, 1994; Neurath, 1983], na protease dos herpesvírus a tríade catalítica é constituída por uma serina e duas histidinas. No caso do HCMV, esta tríade catalítica

é composta pelos resíduos Ser132, His63 e His157. Estudos de mutagênese identificaram os resíduos catalíticos serina e histidina na protease do citomegalovírus [Welch, 1993], mas falharam na identificação do terceiro membro da tríade catalítica. Nenhum dos resíduos Asp/Glu inicialmente propostos como terceiro membro da tríade catalítica foi encontrado próximo a His63. Somente após a determinação da estrutura cristalográfica da protease do HCMV [Chen, 1996; Qiu, 1996; Shieh, 1996; Tong, 1996] foi possível a identificação da nova tríade catalítica, com o resíduo His157 como o terceiro membro. Os resíduos da tríade são absolutamente conservados entre todas as proteases dos herpesvírus humanos [Holwerda, 1997]. A presença de uma segunda His na tríade catalítica é um fato sem precedentes entre as serina proteases [Tong, 2002].

Na estrutura cristalográfica do HCMV, o resíduo catalítico Ser132 está localizado na fita  $\beta$ 5 no lado externo do barril  $\beta$  e o resíduo His63, situado no loop L4, está localizado próximo da Ser132. A His157 (situado no loop L6), identificada por estudos de mutagênese como um resíduo importante mas não essencial para catálise [Gibson, 1995], está localizada próxima ao resíduo His63. As posições relativas das cadeias laterais dos resíduos Ser132, His63 e His157 são muito semelhantes às encontradas em outras serina/cisteína proteases [Perona, 1995; Yamamoto, 1992], especialmente na família da quimotripsina. A superposição da Ser132 e His63 com os resíduos equivalentes na quimotripsina resultou na sobreposição da His157 da protease do HCMV com o Asp 102 da quimotripsina. O sítio catalítico da protease do HCMV está situado na única região do motivo barril  $\beta$  que não está rodeada por hélices e alças. Além disto, o sítio ativo é raso com os resíduos catalíticos expostos ao solvente.

## 10. Mecanismo de Catálise

Assume-se que o mecanismo de clivagem de ligações peptídicas das proteases dos herpesvírus é muito semelhante ao mecanismo aceito atualmente para as serinas proteases clássicas como a quimiotripsina, tripsina e elastase. Dados estruturais e cinéticos sugerem que a clivagem da ligação peptídica ocorre em duas etapas principais (Figura 9) [Hedstrom 2002]. A primeira etapa é a formação da acil-enzima e a segunda sua hidrólise para restaurar o sítio ativo [Goldblum, 1997]. Na etapa de acilação, após a formação do complexo não covalente enzima-substrato, a Ser132 ataca o grupo carbonila da ligação peptídica do substrato a ser clivado. Esse ataque é assistido pela His63 (catálise básica geral), gerando um intermediário tetraédrico. O íon imidazol resultante, His63-H<sup>+</sup>, é então estabilizado por uma ligação hidrogênio com o resíduo His157. O resíduo Ser132 possui um  $pK_a$  relativamente alto, e portanto, é improvável que o ataque da Ser132 e a transferência do próton da Ser132 para o anel de imidazol da His63 ocorram em duas etapas distintas [Goldblum, 1997]. Acredita-se que o ataque nucleofílico à carbonila da ligação peptídica ocorra de forma concertada à transferência do próton [Hedstrom, 2002; Goldblum, 1997]. Especula-se que à medida que a carbonila da ligação peptídica a ser clivada se aproxima da Ser132, o carbono (com carga parcial positiva) da carbonila promoveria um aumento da acidez da Ser132. Assim, concomitante com a aproximação do carbono da carbonila do substrato a Ser132, o próton começaria ser transferido para a His63 e o nucleófilo ativado iniciaria a reação. Na próxima etapa, o intermediário tetraédrico colapsa com a expulsão do grupo de saída, assistido pelo íon His63-H<sup>+</sup>, gerando o intermediário acil-enzima.

Na etapa de deacilação, uma molécula de água passa exercer o papel desempenhado pelo resíduo Ser132 na primeira etapa da reação. À medida que a água se aproxima da

carbonila do grupo acila, um de seus prótons é transferido para a His63 ativando o nucleófilo, que, por sua vez, ataca de forma concertada a carbonila do intermediário acil-enzima para formar outro intermediário tetraédrico. Este intermediário se decompõe regenerando a tríade catalítica e expulsando o produto carboxilado da reação [Hedstrom, 2002; Goldblum, 1997].

Todas as serina proteases possuem um sitio de interação, denominado cavidade do oxiânion, que estabiliza o intermediário tetraédrico formado durante a catálise. [Fersht, 1999]. Na família da tripsina, a cavidade do oxiânion é formada pelo grupo N-H da cadeia principal dos resíduos 193 e 195 [Sobel, 1995], enquanto que na da subtilisina é composto pela cadeia lateral da asparagina 157 e pelo grupo N-H da cadeia principal da serina nucleofílica [Candau, 1996]. A sobreposição da tríade catalítica de qualquer uma das proteases dos herpesvírus com os respectivos resíduos da tripsina sugere que os resíduos absolutamente conservados arginina 165 e 166 (Arg165 e Arg166) estão envolvidos na estabilização do oxiânion e que exercem um papel semelhante aos resíduos Gly193 e Ser195 da tripsina. Na catálise, a tripsina utiliza o grupo N-H da cadeia principal dos resíduos Gly193 e Ser195 para estabilizar o oxiânion formado via interações por ligações de hidrogênio. Entretanto, a estrutura cristalográfica da protease do HCMV revelou que somente o resíduo Arg165 utiliza sua cadeia principal na cavidade do oxiânion. Liang *et al.* [Liang, 1998] verificaram em estudos cinéticos dos mutantes Arg165Ala e Arg166Ala que, diferentemente da Arg165, é a cadeia lateral da Arg166 que cumpre um papel essencial na catálise. Estudos de mutagênese e análise estrutural [Liang, 1998; Hoog, 1997; Qiu 1997; Qiu, 1996] sugerem que o resíduo Arg 166 utiliza uma ou duas molécula de água para mediar a interação do grupo guanidino da sua cadeia lateral com o oxiânion do intermediário.

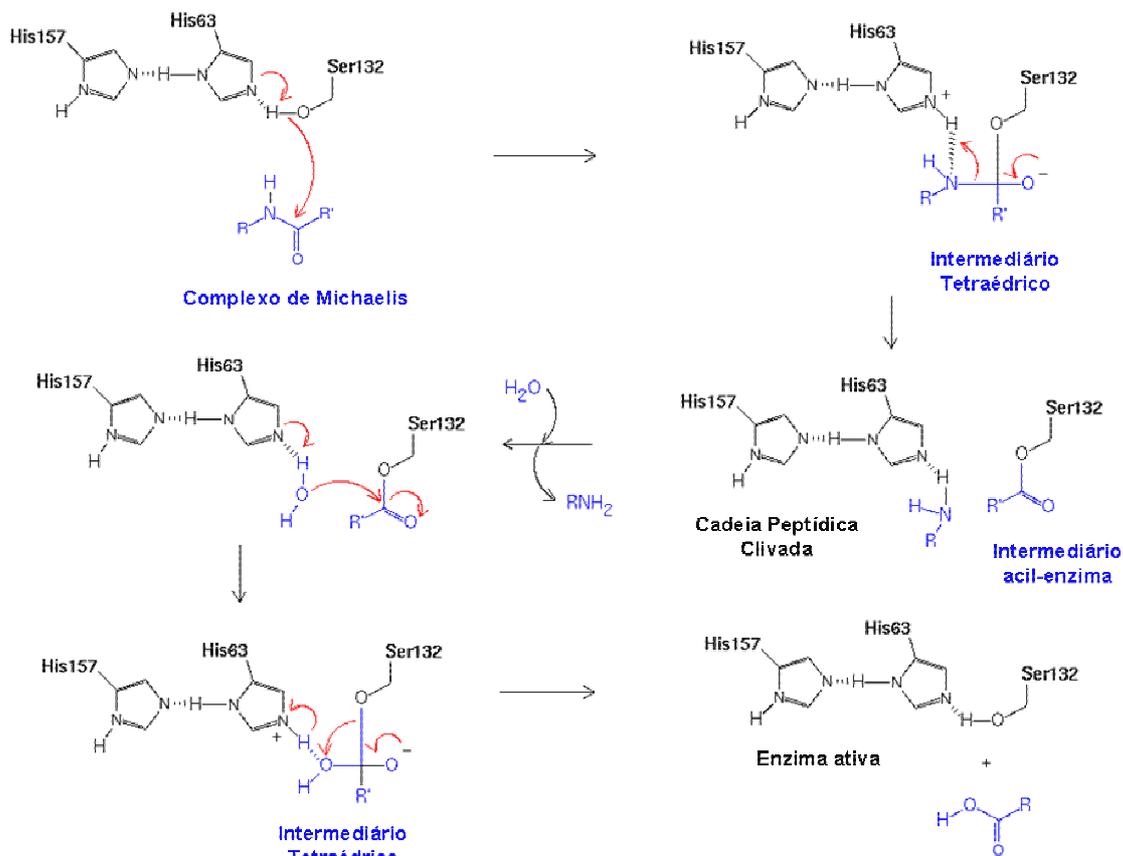


Figura 9: O mecanismo de catálise envolve na primeira etapa o ataque nucleofílico da Ser132 ao átomo de carbono da carbonila da ligação peptídica a ser clivada para formar um intermediário tetraédrico. Na segunda etapa ocorre a decomposição do intermediário tetraédrico no intermediário acil-enzima, seguido da perda do produto amina e sua substituição por uma molécula de água. Por fim, ocorre o ataque nucleofílico da molécula de água ao carbono da carbonila do intermediário acil-enzima para formar um novo intermediário tetraédrico que será decomposto no produto carboxilado da reação e na enzima ativa.

## II. OBJETIVO

A elucidação das estruturas cristalográficas da protease do HCMV livre em solução e complexada covalentemente com o inibidor peptidomimético BILC821 possibilitou o reconhecimento de grandes alterações estruturais induzidas pela formação do complexo. Estas observações são consistentes com estudos cinéticos e de fluorescência que indicam que uma porção considerável da energia livre de complexação é utilizada para promover a reorganização conformacional da protease. Já foi sugerido que a protease do HCMV seria um novo exemplo de serina protease que opera via mecanismo de encaixe induzido, ao contrário das serinas proteases clássicas em que a complexação do substrato tem pouca influência na conformação da enzima [Guimarães, 2004; Oliveira, 2003; LaPlante 1999, Tong, 1998; Bonneau, 1997]. Além disto, apesar da estrutura cristalográfica da protease do HCMV revelar um sítio ativo bem definido em cada unidade monomérica e a princípio independentes, estudos bioquímicos mostraram que as proteases dos herpesvírus existem em solução em um equilíbrio monômero-dímero e que a forma dimérica é a espécie cataliticamente ativa da enzima [Batra, 2001b; Waxman, 2000; LaPlante, 1999; Darke, 1996; Margosiak, 1996]. Assim, os objetivos do presente trabalho são:

1 – Estudar através de simulações de Dinâmica Molecular (DM) a estabilidade e o comportamento dinâmico das formas dimérica e monomérica da protease do HCMV, livre em solução e complexada, antes e após a formação do aduto covalente com o inibidor peptidil de carbonila ativada, muito semelhante ao BILC 821 (Figura 10).

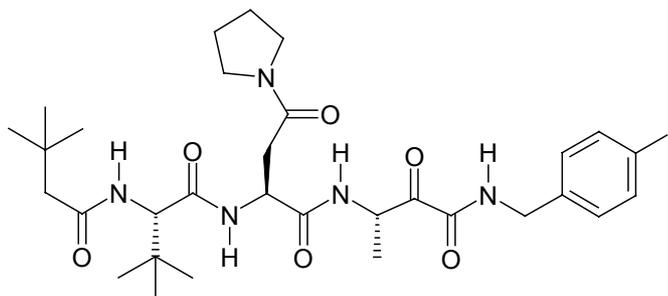


Figura 10: Estrutura química do inibidor peptídomimético BILC821

2 – Estudar através de simulações de DM o mecanismo de encaixe induzido, as mudanças conformacionais ocorridas na formação dos complexos e interações enzima-inibidor. Diferentes mudanças conformacionais e interações enzima-inibidor observadas para as formas monomérica e dimérica da enzima serão analisadas e discutidas.

3 – Determinar os requisitos estruturais e energéticos que governam a ativação do dímero da protease através de métodos híbridos que combinam cálculos quântico-mecânicos (QM) e de mecânica molecular (MM). Métodos QM/MM estendem o domínio dos cálculos QM a macromoléculas e permitem que reações químicas sejam simuladas diretamente no ambiente enzimático. Neste caso, uma pequena região (geralmente o sítio ativo) que participa diretamente da quebra e formação de ligações é tratada pelos métodos QM enquanto o resto do sistema é descrito por métodos MM [Field, 1990; Singh, 1986]. Tais métodos serão utilizados na obtenção do perfil energético da reação de formação do complexo tetraédrico entre o inibidor utilizado neste trabalho e as formas dimérica e monomérica da protease. Uma análise da interação por resíduo entre as regiões QM e MM ao longo da coordenada de reação será realizada para identificar os resíduos que mais contribuem para a eficiência catalítica do dímero da protease.

4 – Identificar através de cálculos QM/MM o papel do terceiro membro (His157) da tríade catalítica Ser132-His63-His157. Apesar da díade funcional (presente em todas as serinas proteases) participar diretamente do mecanismo proposto de hidrólise de ligações peptídicas, o terceiro resíduo da tríade catalítica é importante para a atividade catalítica e seu papel permanece uma questão a ser respondida [Hedstrom, 2002; Fersht, 1999]. Esta questão é particularmente interessante para as serinas proteases dos herpesvírus já que elas são as únicas que possuem uma histidina como terceiro membro da tríade catalítica, enquanto que as serinas proteases clássicas possuem um resíduo de ácido aspártico ou ácido glutâmico nesta posição.

### III. DETALHES COMPUTACIONAIS

#### 1. Construção dos Modelos.

A estrutura cristalográfica da protease do HVMC complexada com o inibidor peptidomimético BILC 821 (código do PDB: 2WPO) [Tong, 1998] foi utilizada como ponto de partida para a construção dos modelos. A estrutura contém os resíduos 4-46, 53-143, 152-200 e 210-256 para cada um dos monômeros da protease, ambos complexados covalentemente a uma molécula de inibidor. Nenhuma molécula de solvente foi incluída no modelo atômico. O módulo *protonate* do pacote AMBER7 [Case, 2002] foi utilizado para adição dos átomos de hidrogênio aos resíduos da protease, considerando-se o pH fisiológico (ca. 7.0) como referência. Assim, os resíduos arginina e lisina estão protonados, enquanto que os ácidos aspártico e glutâmico estão desprotonados. Devido ao seu  $pK_a$ , os resíduos de histidina foram considerados neutros nestas condições.

Como estamos interessados em determinar os (i) requisitos estruturais e energéticos que governam a ativação do dímero da protease do HCMV e (ii) as mudanças conformacionais que ocorrem na proteína antes e após a formação do aduto covalente entre a enzima e o inibidor peptídil de carbonila ativada utilizado neste trabalho, muito semelhante estruturalmente ao BILC 821 [Tong, 1998], seis modelos foram considerados: as formas dimérica (**DI**) e monomérica (**MI**) complexadas não covalentemente ao inibidor, as formas dimérica (**D-I**) e monomérica (**M-I**) complexadas covalentemente e as formas dimérica (**D**) e monomérica (**M**) livres em solução.

O modelo **D-I** foi construído diretamente do cristal do dímero da protease do HCMV. Os 26 resíduos não observados em cada monômero da estrutura cristalográfica

correspondem às seguintes regiões: resíduos 1-3 na região N-terminal da enzima, a qual forma uma pequena hélice denominada  $\alpha$ N, resíduos 47-52 na alça L3, resíduos 144-151 na alça L9 e os resíduos 201-209 na alça L13 [Tong, 1998]. No intuito de obter o conjunto completo de coordenadas atômicas, os resíduos 1-3 foram construídos manualmente em conformação  $\alpha$ -hélice e adicionados a cada um dos monômeros do modelo **D-I**. As alças ausentes foram construídas utilizando-se o módulo Build do programa Swiss PDB Viewer [Guex, 1997]. Neste programa, os modelos de alças são construídos usando-se como molde fragmentos da cadeia principal de várias proteínas, armazenados em um banco de dados de alças conhecidas. Utilizando-se dois aminoácidos como pontos de ancoragem, o programa percorre o banco de dados na busca por fragmentos compatíveis. Diversos fragmentos são apresentados como possíveis candidatos para as alças. As alças com energia de interação alça-proteína mais favorável, e com um número mínimo de contatos desfavoráveis e mínimos desvios com relação aos termos angular e de ligação foram selecionados e adicionados a cada monômero do modelo **D-I**. A Figura 11 mostra o modelo completo de um dos monômeros da protease do HCMV após da inserção das alças e  $\alpha$ N (em azul).

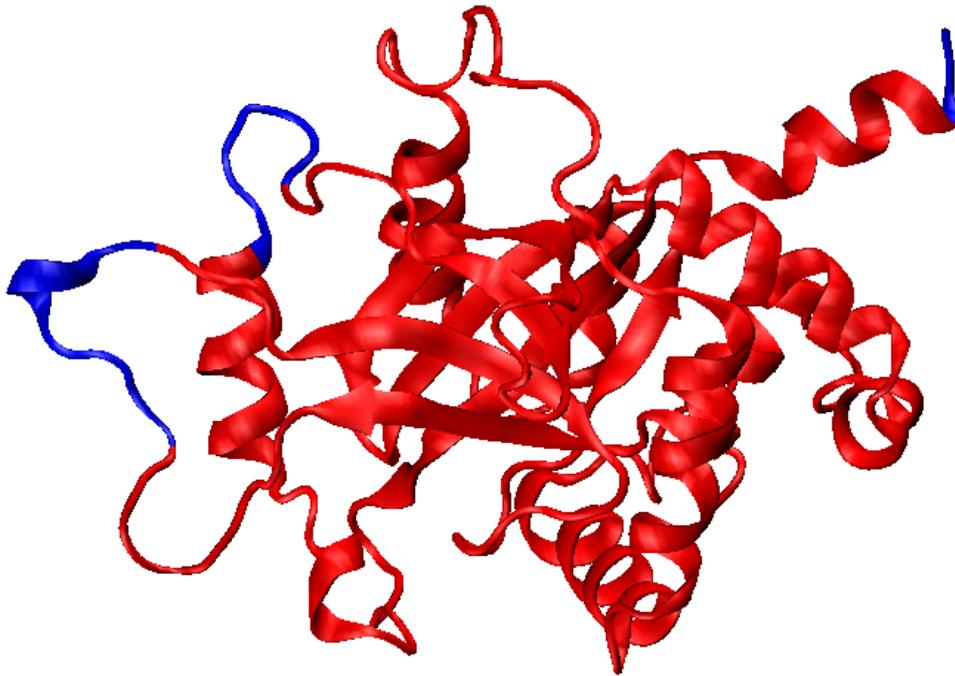


Figura 11: Em vermelho: Resíduos presentes na estrutura cristalográfica de um dos monômeros da protease do HCMV. Em azul:  $\alpha$ N e alças adicionadas.

O modelo **DI** foi construído a partir do modelo **D-I** através da quebra da ligação covalente existente entre o nucleófilo (Ser132) e o carbono da carbonila do inibidor. Um átomo de hidrogênio foi utilizado para completar a valência do átomo de oxigênio da Ser132 e a hibridização do átomo de carbono foi corrigida manualmente para  $sp^2$ . O modelo **D**, que corresponde ao dímero da protease livre em solução, foi obtido removendo-se os inibidores do modelo **DI**. Analogamente, os modelos **M**, **MI** e **M-I** foram obtidos considerando-se apenas as coordenadas atômicas referentes ao primeiro monômero dos modelos **D**, **DI** e **D-I**, respectivamente.

## 2. Otimização, Solvatação e Relaxação dos Modelos.

Inicialmente, as geometrias dos modelos **DI** e **MI** foram otimizadas energeticamente permitindo-se somente a movimentação dos átomos da Ser132 e do inibidor. 50 passos do algoritmo *conjugate gradient* foram utilizados nesta etapa sem raio de corte para as interações não-ligadas. Em seguida, mantendo-se todas as demais coordenadas fixas, somente as alças adicionadas aos modelos **M**, **D**, **MI**, **DI**, **M-I**, e **D-I** foram otimizadas energeticamente. Nesta etapa, a minimização da energia potencial do sistema foi realizada empregando-se 200 passos do algoritmo *steepest descent* e 2800 passos do algoritmo *conjugate gradient* para cada modelo. No intuito de aliviar contatos indesejáveis, as coordenadas de todos os sistemas foram então otimizadas empregando-se novamente 200 passos do algoritmo *steepest descent* e 2800 passos do algoritmo *conjugate gradient*. Para reduzir o custo computacional, um raio de corte de 22 Å para as interações não-ligadas foi utilizado nesta etapa. Todos os procedimentos de otimização descritos acima foram realizados no vácuo.

As estruturas finais foram então utilizadas como ponto de partida para a construção dos modelos com solvente explícito utilizando-se uma caixa retangular com moléculas de água pré-equilibradas (Figura 12). Os lados da caixa retangular adicionada estão a 8 Å do átomo mais externo da proteína. Para neutralizar os sistemas, foram adicionados 5 e 10 contra-íons de sódio ( $\text{Na}^+$ ) aos estados monomérico e dimérico da protease, respectivamente. O módulo *Leap* do programa AMBER7 [Case, 2002] foi empregado na inserção das moléculas de água e contra-íons.

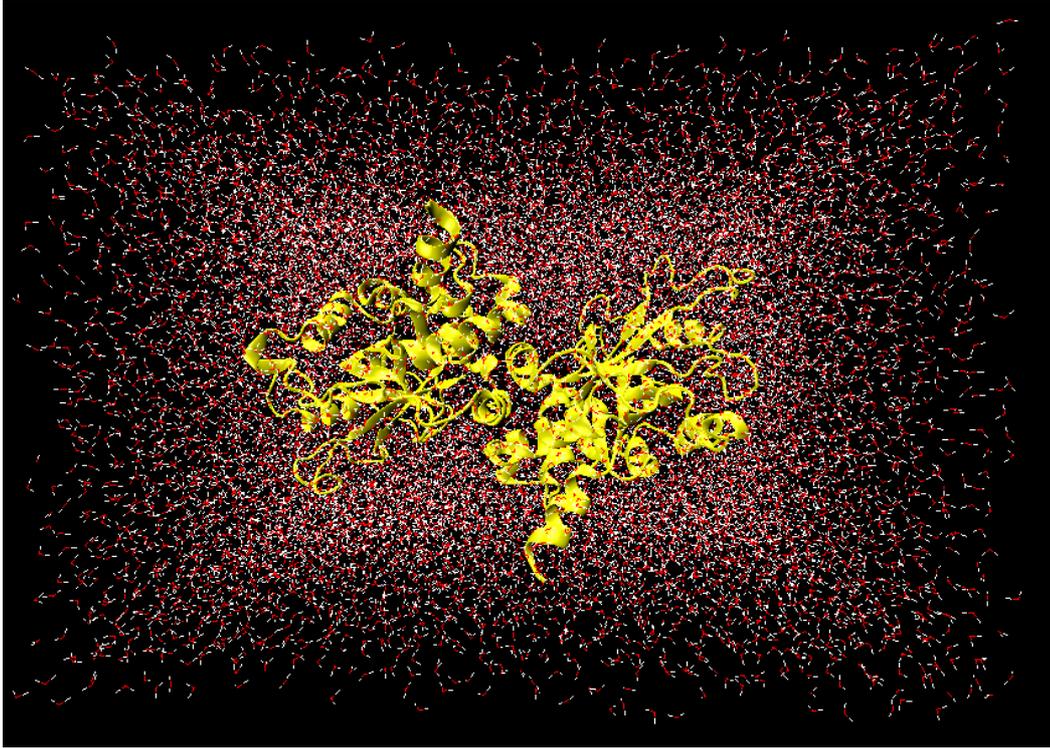


Figura 12: Modelo do dímero da protease (em amarelo) em solução.

A etapa inicial de preparação dos modelos solvatados consistiu na minimização extensiva da energia potencial do sistema por 1000 passos do algoritmo *steepest descent* e por 4000 passos do algoritmo *conjugate gradient*, seguido de uma simulação de 10 ps de DM, na qual foi empregado o *ensemble* NVT ( $T = 298$  K). Todos os átomos da proteína e do(s) inibidor(es) e contra-íons foram mantidos fixos durante o processo de preparação com o objetivo de relaxar as moléculas de água ao potencial do soluto. Em seguida, todo o sistema foi submetido a processos de minimização da energia potencial empregando-se os algoritmos *steepest descent* e *conjugate gradient* por 500 e 1500 passos, respectivamente. Para permitir a difusão dos contra-íons em solução e ajustar a densidade do sistema, foi realizada uma etapa adicional de simulação de DM por 10 ps em *ensemble* NPT ( $T = 298$  K,  $P = 1$  bar) mantendo-se os átomos da proteína e do(s) inibidor(es) restritos às suas posições iniciais através de um potencial harmônico

(constante de forças de 200 kcal/mol.Å<sup>2</sup>). Para relaxar progressivamente os átomos da proteína e do(s) inibidor(es), seis simulações de DM de 10 ps em *ensemble* NPT (T = 298 K, P = 1 bar) foram realizadas com a redução gradativa do potencial harmônico; valores de constante de forças de 200, 100, 50, 10, 2 e 0 kcal/mol Å<sup>2</sup> foram empregados. Após isto, os sistemas solvatados foram extensivamente relaxados por simulações de DM de 3 ns em *ensemble* NPT (T = 298 K, P = 1 bar).

### 3. Condições de Simulação.

Todas as simulações de DM foram realizadas no módulo *Sander* do programa AMBER7 [Case, 2002]. O algoritmo SHAKE [Ryckaert, 1977] foi usado para fixar as ligações que envolvem átomos de hidrogênio. Desta forma, as equações de movimento foram integradas a cada 2,0 fs usando o algoritmo *Verlet Leapfrog* [Hockney, 1970]. Para análises posteriores, configurações selecionadas a cada 1,0 ps foram reservadas. Nas simulações de DM, um banho externo foi aplicado para controle de temperatura e pressão. As constantes de acoplamento usadas foram de 0,2 ps para o banho de temperatura e 1,0 ps para o banho de pressão [Berendsen, 1984]. O movimento do centro de massa foi removido em intervalos regulares de 500 fs. O método *Particle Mesh Ewald* (PME) [Essmann, 1995; Ding, 1992] foi empregado no cálculo das interações eletrostáticas de longo alcance nas etapas de minimização e simulação dos sistemas solvatados. Um raio de corte de 8 Å foi empregado no cálculo da parte real do somatório de *Ewald*. A lista de átomos vizinhos foi atualizada em intervalos regulares de 25 fs.

#### 4. Cálculos QM/MM.

Devido ao grande número de átomos em proteínas e ao fato de reações envolverem a quebra e formação de ligações químicas, a catálise enzimática ainda é um grande desafio para a química computacional [Borman, 2004]. Métodos quantomecânicos de alto nível teórico são limitados à aplicação em sistemas com número relativamente pequeno de átomos. A combinação dos métodos quantomecânicos e de mecânica molecular (QM/MM) estende o domínio dos cálculos QM a macromoléculas. Neste caso, uma pequena região (geralmente o sítio ativo) que participa diretamente da quebra e formação de ligações é tratada pelos métodos QM enquanto o resto do sistema, com um número muito maior de átomos (da ordem de  $10^3$ ), é descrito por métodos de mecânica molecular [Field, 1990; Singh, 1986].

##### 4.1. Preparação do Sistema.

Como um dos principais objetivos desta tese é verificar os fatores estruturais e energéticos relevantes que são responsáveis pela atividade do dímero da protease, a última configuração das trajetórias de 3 ns dos modelos solvatados **DI** e **MI** foram utilizadas como ponto de partida nos cálculos QM/MM.

Os sistemas QM/MM foram construídos mantendo-se a enzima, os contra-íons e as moléculas de água situadas em uma esfera 22 Å de raio, centrada no oxigênio nucleofílico da Ser132 (Figura 13). O modelo esférico de solvatação foi empregado já que seria inviável a realização de cálculos QM/MM em condições periódicas de contorno devido ao altíssimo custo computacional.

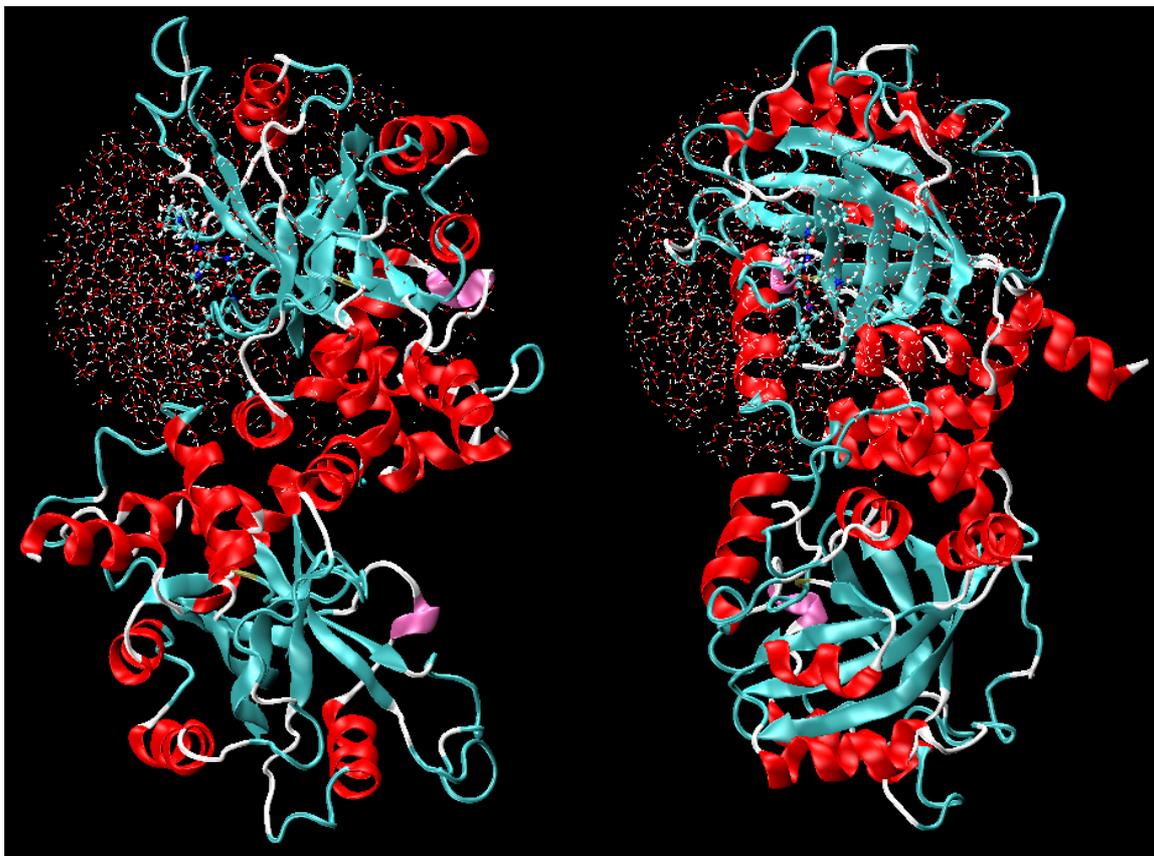


Figura 13: Visão superior (esquerda) e lateral (direita) do modelo do complexo não covalente inibidor-dímero da protease utilizado nos cálculos QM/MM. Somente as moléculas de água situadas a uma distancia inferior a 22 Å do oxigênio do resíduo de serina 132 foram mantidas no modelo.

Como próximo passo, foram realizados procedimentos de minimização e relaxação do solvente no intuito de adequar as moléculas de água às novas condições de contorno impostas. Inicialmente, a energia potencial do sistema foi minimizada por 500 passos do algoritmo *steepest descent* seguido por 5000 passos do algoritmo *conjugate gradient*. A estrutura otimizada foi então submetida a simulações de DM por um tempo total de 20 ps. Nestas etapas, somente as coordenadas referentes aos átomos das moléculas de água

foram variadas. Para manter as moléculas de água no interior da esfera de solvatação, foi aplicado um potencial semi-harmônico a cada molécula de solvente.

$$V = \frac{1}{2}k[\text{Max}(0, R - R_{esf})]^2 \quad \text{Equação 1}$$

Na equação 1,  $k$  corresponde a constante de força do potencial,  $R$  é a distância entre o centro de massa da molécula de solvente e o centro da esfera de solvatação, que tem  $R_{esf}$  como seu raio. A função  $\text{Max}(a,b)$  retorna o maior valor entre dois números reais  $a$  e  $b$ . Quando  $R$  é menor que  $R_{esf}$ , a diferença  $(R - R_{esf})$  resultará em um valor negativo e a função  $\text{Max}$  retornará um valor nulo ao potencial  $V$ . Por outro lado, para moléculas de solvente cujas distâncias em relação ao centro da esfera são superiores a  $R_{esf}$ , a função  $\text{Max}$  retornará o valor da diferença  $(R - R_{esf})$ . Neste caso, a parte harmônica do potencial  $V$  passará a ser aplicada a estas moléculas, o que as encoraja permanecer no interior ou na superfície da esfera de solvatação.

#### 4.2. Partição do Sistema nas Regiões QM e MM.

A próxima etapa consistiu na partição do sistema nas regiões QM e MM. Como um dos nossos objetivos é investigar o papel do segundo resíduo de histidina (His157) da tríade catalítica da protease, dois esquemas de partição foram considerados. No primeiro, denominado ESQ1 e mostrado em azul na Figura 14, a região QM é composta pelas cadeias laterais dos resíduos Ser132 e His63 e pelos átomos do inibidor que incluem o resíduo de alanina presente na posição  $P_1$  e a amida e metileno do resíduo  $P_1'$ . A região QM em ESQ1 possui um total de 33 átomos. No segundo, denominado ESQ2,

a cadeia lateral do terceiro membro da tríade catalítica (His157) foi adicionada à região QM, totalizando 44 átomos. A fronteira entre as regiões QM e MM foi tratada utilizando-se o método dos átomos *Link* (ver tópico III.6.2).

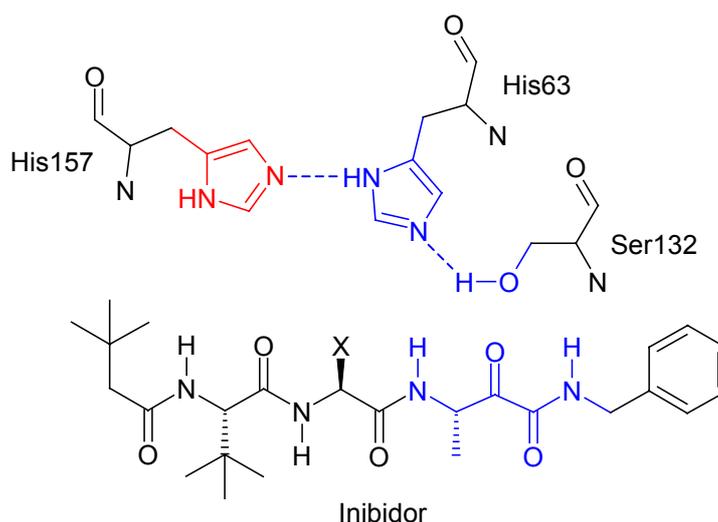


Figura 14: Região QM utilizada nos esquemas de partição ESQ1 e ESQ2. Em ESQ1, a região QM é composta pelos átomos indicados em azul. Em ESQ2, a região QM é composta pelos átomos indicados em azul e a cadeia lateral do resíduo His157 (em vermelho).

O esquema de partição ESQ1 foi aplicado aos modelos **MI** e **DI**, enquanto ESQ2 somente a **DI**, gerando os sistemas QM/MM **MI<sub>ESQ1</sub>**, **DI<sub>ESQ1</sub>** e **DI<sub>ESQ2</sub>**. Os sistemas QM/MM foram então submetidos a procedimento de otimização de energia potencial na superfície AM1/AMBER.

#### 4.3. Definição da Coordenada de Reação.

Para a reação de formação do intermediário tetraédrico entre o inibidor peptídico e a protease, a coordenada de reação (RC) escolhida inclui a distância entre o oxigênio da cadeia lateral da Ser132 e o carbono da carbonila ativada do inibidor e as distâncias envolvidas na transferência de próton da Ser132 para a His63, como mostrado na Figura 15.

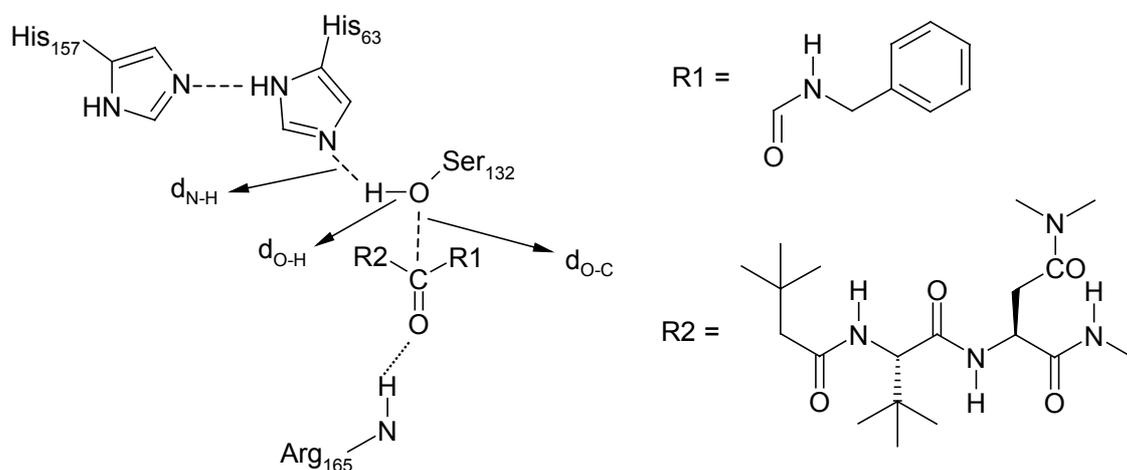


Figura 15: Ilustração da coordenada de reação (RC) escolhida para a reação de formação do intermediário tetraédrico,  $RC = d_{O-H} - d_{C-O} - d_{N-H}$ .

Para o cálculo do caminho de reação de mínimo de energia, o método RESD (*Restrained Distances*, ver tópico III.6.3) [Eurenius, 1996] foi aplicado nas otimizações de geometria em diferentes pontos ao longo de RC. Isto resulta em um caminho ótimo para reação no ambiente enzimático e na correspondente superfície de energia potencial dos modelos **DI<sub>ESQ1</sub>**, **DI<sub>ESQ2</sub>** e **MI<sub>ESQ1</sub>**.

#### 4.4. Condições Empregadas nos Procedimentos de Otimização QM/MM.

Os cálculos do caminho mínimo de reação foram realizados no módulo ROAR2.1 [Cheng, 2002] do programa AMBER7 [Case, 2002]. O módulo ROAR atua como uma interface entre as versões modificadas do programa MOPAC7 e do módulo *Sander* contido no pacote AMBER7. Para a parte QM, foi utilizado um critério de convergência de  $10^{-6}$  kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-1</sup> para o cálculo SCF (*self consistent field*). Para a parte MM, foi utilizado um critério de convergência de 0,1 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-1</sup> para o raiz quadrática média (RMS, *root-mean-square*) do gradiente de energia. Nas etapas de otimização, somente os átomos situados no interior de uma esfera de 22 Å de raio, centrada no oxigênio hidroxílico da Ser132, sofreram alterações em suas coordenadas. Nos cálculos QM/MM, não foi empregado raio de corte para as interações não-ligadas.

O Hamiltoniano semiempírico AM1 [Dewar, 1985] foi empregado nos cálculos QM. Para o cômputo das contribuições MM para a energia potencial, foram utilizados o campo de forças de Cornell *et al.* [Cornell, 1995] para os átomos da proteína e o modelo TIP3P [Jorgensen, 1983] para as moléculas de água.

#### 5. Dinâmica Molecular (DM).

No método de DM, configurações sucessivas do sistema são geradas pela integração das leis de movimento de Newton. O resultado é uma trajetória que revela a dependência temporal das posições e velocidades das partículas do sistema [Haile, 1997, Leach, 1996; Allen, 1987]. A trajetória é obtida resolvendo-se as equações diferenciais incorporadas na segunda lei de Newton:

$$F_i = m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} = - \frac{\partial U(r^N)}{\partial r_i} \quad \text{Equação 2}$$

em que  $F_i$  corresponde à força aplicada na partícula  $i$  causada pelas  $N-1$  demais partículas do sistema,  $m_i$  corresponde à sua massa e a segunda derivada parcial de sua posição  $r_i$  em relação ao tempo corresponde à aceleração.  $U(r^N)$  é a função de energia potencial do sistema cuja derivada parcial em relação à posição  $r_i$  é a força aplicada resultante na partícula  $i$ .

$U(r^N)$  normalmente é descrita como um somatório de termos ligados e não-ligados:

$$U(r^N) = U_{\text{ligação}} + U_{\text{ângulo}} + U_{\text{diedro}} + U_{\text{vdw}} + U_{\text{elet}} \quad \text{Equação 3}$$

em que  $U_{\text{ligação}}$ ,  $U_{\text{ângulo}}$  e  $U_{\text{diedro}}$ , correspondem às funções de energia potencial de deformação axial de ligação, deformação angular e de rotação torcional (interações ligadas), enquanto que  $U_{\text{vdw}}$ , e  $U_{\text{elet}}$  correspondem às funções de energia potencial de van der Waals e eletrostática (interações não-ligadas). Uma função de energia potencial, normalmente usada para os termos ligados, consiste em termos harmônicos para a deformação axial de ligação e de deformação angular, e dois termos para a rotação torcional (equações 4, 5 e 6). O primeiro termo da equação 6 é um termo harmônico para os ângulos diedros  $\xi$  com transições proibidas, como por exemplo ângulos diedros em anéis aromáticos ou ângulos diedros utilizados para manter a quiralidade. O segundo termo da equação 6 corresponde a uma função que se aplica aos ângulos diedros  $\varphi$ , que podem fazer rotações de até  $360^\circ$ .

$$U_{\text{ligação}} = \sum_i \frac{K_{r_i}}{2} (r_i - r_{oi})^2 \quad \text{Equação 4}$$

$$U_{\text{ângulo}} = \sum_i \frac{K_{\theta_i}}{2} (\theta_i - \theta_{oi})^2 \quad \text{Equação 5}$$

$$U_{\text{diedro}} = \sum_i \frac{K_{\xi_i}}{2} (\xi_i - \xi_{oi})^2 + \sum_i K_{\varphi_i} [1 + \cos(\varphi_i - \delta)]^2 \quad \text{Equação 6}$$

Nas equações 4 e 5,  $K_{r_i}$  e  $r_{oi}$  correspondem à constante de força e comprimento de equilíbrio para a ligação  $r_i$ ,  $K_{\theta_i}$  e  $\theta_{oi}$  correspondem à constante de força e ângulo de equilíbrio para o ângulo  $\theta_i$ . Na equação 6,  $K_{\xi_i}$  e  $\xi_{oi}$  correspondem à constante de força e ângulo diedro de equilíbrio, respectivamente, para o ângulo diedro  $\xi_i$  e  $K_{\varphi_i}$  corresponde à barreira de energia para torção do ângulo diedro  $\varphi_i$ .

Os termos não-ligados  $U_{\text{elet}}$  e  $U_{\text{vdw}}$  são representados tipicamente por interações de Coulomb e de Lennard-Jones, respectivamente, como na equação 7.

$$U_{\text{elet}} + U_{\text{vdw}} = \sum_i \sum_j \left\{ \frac{q_i q_j}{r_{ij}} + 4\varepsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \right\} \quad \text{Equação 7}$$

Nesta equação,  $q_i$  corresponde a carga parcial atômica do átomo  $i$ ,  $\sigma_{ij}$  e  $\varepsilon_{ij}$  correspondem aos diâmetros de colisão e a profundidade do poço de energia para a interação entre os átomos  $i$  e  $j$  segundo um potencial de Lennard-Jones.

Com a obtenção da trajetória da simulação de DM, o valor médio de uma determinada propriedade termodinâmica mecânica ( $M$ ) pode ser obtido (Equação 8).

$$\langle M \rangle = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{1}{t} \int_0^{t_0+1} M(t') dt' \quad \text{Equação 8}$$

Nestas simulações, é necessário um período de equilíbrio para relaxar o sistema e um de coleta de dados para o cálculo de valor médio. O tempo do período de equilíbrio em simulações de DM deve ser tão longo quanto o mais longo tempo de relaxação intrínseco do sistema ( $\tau_{\text{equil.}} \sim \tau_{\text{sistema}}$ ) [Beutler, 1994; van Gunsteren, 1992]. O tamanho dos sistemas biomoleculares torna este procedimento inviável e, nestes casos, é desejável que pelo menos o sistema tenha atingido um equilíbrio metaestável [van Gunsteren, 1992]. Para que o cálculo do valor médio seja acurado, o período de coleta de dados deve ser suficiente grande para que todas as configurações relevantes, representativas do espaço de fase do sistema, sejam amostradas [Severance, 1995; Beutler, 1994; van Gunsteren, 1992]. Ou seja, o tempo de coleta de dados em DM deve ser superior ao tempo de relaxação da propriedade de interesse ( $\tau_{\text{coleta}} \gg \tau_{\text{propriedade}}$ ).

## 6. O Método Híbrido QM/MM.

### 6.1. Formulação.

A estratégia básica dessa metodologia foi primeiramente introduzida por Levitt e Warshel [Warshel, 1976], visando o desenvolvimento de uma estratégia que possibilitasse o estudo de processos reativos em enzimas e em solução. Formalmente, o método híbrido QM/MM pode ser descrito da seguinte forma [Field, 2002; Gogonea, 2001, Buice, 2000; Field, 1990; Singh, 1986]: assume-se que o sistema molecular pode

ser dividido em dois subsistemas, regiões QM e MM (Figura 16). As regiões QM e MM contêm todos os átomos que são tratados explicitamente no cálculo. Na região QM, os átomos são representados por núcleos e elétrons e a superfície potencial é construída dentro da aproximação Born-Oppenheimer [Szabo, 1996]. A região MM compreende o restante dos átomos do sistema. Ao contrário de região QM, os átomos pertencentes a esta região são como esferas que interagem segundo uma função de energia potencial empírico.

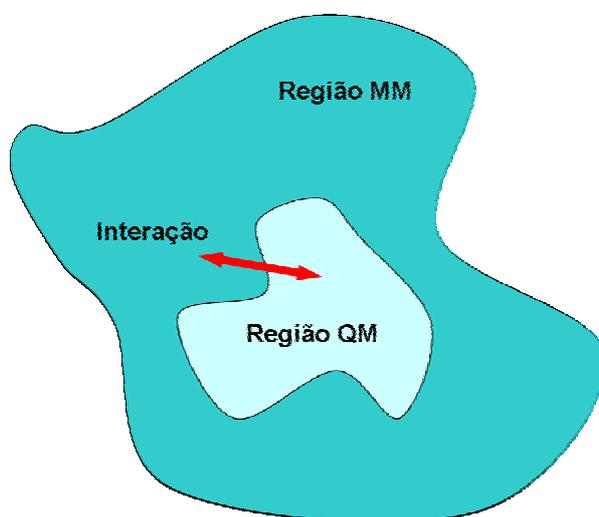


Figura 16: Partição do sistema nas regiões quantomecânica (QM) e de mecânica molecular (MM).

O Hamiltoniano usado na formulação QM/MM passa a ser considerado um Hamiltoniano efetivo ( $H_{eff}$ ) o qual opera na função de onda ( $\psi$ ) do sistema. A função de onda é dependente das posições dos núcleos das partículas quantomecânicas,  $R_{QM}$ , das posições dos núcleos das partículas pertencentes à região MM,  $R_M$ , e das posições dos elétrons,  $r$ .

$$H_{eff}\psi(r, R_{QM}, R_M) = E(r, R_{QM}, R_M)\psi(r, R_{QM}, R_M) \quad \text{Equação 9}$$

O Hamiltoniano efetivo pode ser dividido em três termos (Equação 10). Os termos considerados incluem uma contribuição puramente quantomecânica para a região QM,  $H_{QM}$ , uma contribuição devido às interações entre as partículas na região MM,  $H_{MM}$ , e uma contribuição referente às interações entre estas regiões,  $H_{QM/MM}$ .

$$H_{eff} = H_{QM} + H_{MM} + H_{QM/MM} \quad \text{Equação 10}$$

Assim, a energia total do sistema é dada através do valor esperado da função de onda operada pelo Hamiltoniano  $H_{eff}$  e pode ser dividida em três componentes.

$$E_{eff} = \left( \langle \psi | H_{QM} + H_{QM/MM} | \psi \rangle + E_{MM} \right) / \langle \psi | \psi \rangle = E_{QM} + E_{MM} + E_{QM/MM} \quad \text{Equação 11}$$

O termo MM pode ser removido da integral visto que a função de onda depende somente parametricamente de  $R_M$ .  $E_{MM}$  corresponde à energia obtida por campo de forças clássicos [Cornell, 1995; Jorgensen, 1988; Brooks, 1983]. Na Equação 11,  $H_{QM}$  corresponde ao Hamiltoniano eletrônico não relativístico dado por métodos semiempíricos [Dewar, 1985; People, 1970], *ab initio* [Hehre, 1986] ou teoria de funcional de densidade (DFT) [Parr, 1983]. O termo  $H_{QM}$  pode ser escrito em unidades atômicas como,

$$H_{QM} = -\frac{1}{2} \sum_i \nabla_i^2 + \sum_{ij} \frac{1}{r_{ij}} - \sum_{iA} \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{AB} \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad \text{Equação 12}$$

onde  $i, j$  e  $A, B$  indicam as coordenadas eletrônicas e nucleares respectivamente,  $r_{ij}$  corresponde à distância entre os elétrons  $i$  e  $j$ ,  $r_{iA}$  corresponde à distância entre o elétron  $i$  e o núcleo  $A$ ,  $R$  corresponde à distância nuclear e  $Z_A$  à carga nuclear. No caso dos métodos semiempíricos, algumas simplificações são introduzidas no Hamiltoniano  $H_{QM}$ . A contribuição  $H_{QM/MM}$  representa a interação entre as regiões QM e MM e pode ser expressa como a contribuição de três termos: interação entre as cargas parciais dos átomos MM com a nuvem eletrônica dos átomos QM, interação eletrostática entre os núcleos dos átomos QM e as cargas parciais dos átomos MM e um termo referente a interações do tipo van der Waals.

$$H_{QM/MM} = -\sum_{iM} \frac{q_M}{|r_{iM}|} + \sum_A \frac{q_M Z_A}{|R_{AM}|} + \sum_{AM} \left( \frac{A_{AM}}{R_{AM}^{12}} - \frac{B_{AM}}{R_{AM}^6} \right) \quad \text{Equação 13}$$

Na equação 13,  $q_M$  é a carga parcial atômica de um átomo MM,  $r_{iM}$  é a distância entre o elétron e o átomo MM,  $R_{AM}$  é distancia entre o núcleo  $A$  da região QM e o átomo  $M$  da região MM, e  $A_{AM}$  e  $B_{AM}$  são parâmetros de Lennard-Jones. O primeiro termo da equação 13 é um termo importante que permite a região QM “sentir” a vizinhança MM. Em outras palavras, é o termo que permite a polarização da região QM devido às interações com a região MM. Os últimos dois termos da equação 13 são adicionados à energia total após o cômputo da energia QM e, desta forma, afetam a distribuição eletrônica do sistema QM apenas indiretamente.

## 6.2. O Uso de Átomos *Link*.

Para o caso de reações realizadas em solução, a interface entre soluto e solvente é bem definida. Portanto, é possível definir as regiões QM e MM sem a introdução de uma fronteira QM/MM entre átomos que estão ligados covalentemente. Entretanto, quando a reação a ser estudada é catalisada por uma enzima, a definição das regiões QM e MM, na grande maioria dos casos, envolve a presença de uma ligação covalente conectando as duas regiões. Neste caso, como os elétrons dos átomos MM não são tratados explicitamente, ocorre uma interrupção brusca na densidade eletrônica ao longo da ligação entre os átomos da fronteira. Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de um esquema onde os efeitos dos átomos MM sobre a densidade eletrônica da região QM sejam o mais próximo possível dos resultados obtidos de um cálculo QM sobre todo o sistema. Como não há uma forma única de se resolver este problema, várias soluções têm sido propostas ultimamente [Liu, 2000; Reuter, 2000; Zang, 2000; Zang, 1999; Gao, 1998; Harrison, 1997; Assfeld, 1996; Eurenus, 1996; Monard, 1996; Théry, 1994; Vasilyev, 1994].

Um método que tem sido bastante utilizado é o esquema do átomo *link* (LA). A idéia foi introduzida originalmente em cálculos puramente quântomecânicos onde parte da molécula era descartada e as valências corrigidas com átomos de hidrogênio [Allen, 1981; Davis, 1974; Christoffersen, 1969]. A primeira formulação QM/MM deste esquema foi introduzida por Singh e Kollman [Singh, 1986]. No esquema LA, um átomo de hidrogênio (HLA) é introduzido no átomo QM presente na fronteira QM/MM. O átomo HLA adicionado é tratado exatamente como um átomo QM e invisível aos átomos MM. HLA é introduzido no sistema ao longo da ligação na fronteira QM/MM a 1 Å do átomo QM (Figura 17). Para manter a orientação de HLA ao longo da ligação,

um termo angular HLA-átomo QM-átomo MM é adicionado ao campo de forças com valor de equilíbrio de  $0^\circ$ . Interações intramoleculares definidas classicamente entre a parte QM e MM são consideradas e adicionadas à energia total do sistema quando pelo menos um átomo MM é envolvido.

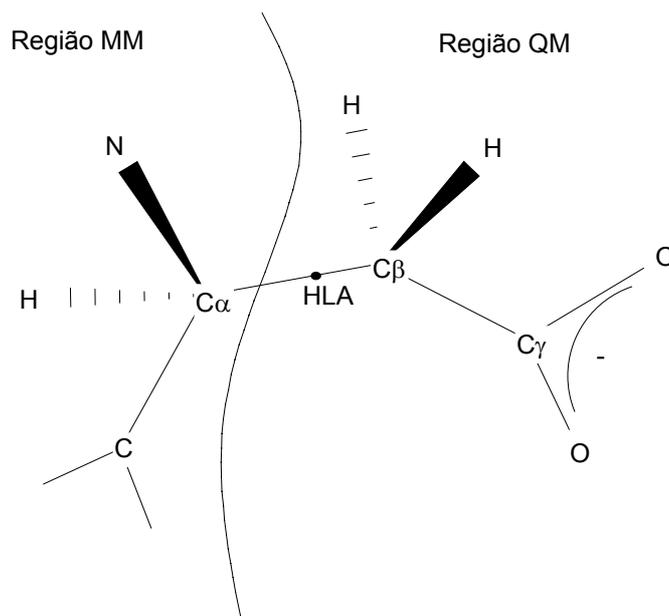


Figura 17: Regiões QM e MM definidas na mesma molécula. A figura mostra a cadeia lateral do íon glutamato em uma proteína. HLA corresponde ao átomo de hidrogênio adicionado para completar a valência do átomo C $\beta$  nos cálculos quantomecânicos.

O esquema descrito acima permite a partição de uma molécula em duas regiões distintas, QM e MM. O cálculo quantomecânico permite determinar a energia e a distribuição dos elétrons nos átomos da região QM, sujeita às perturbações causadas pelas interações com a região MM. Esta, por sua vez, preserva a integridade do resto do sistema e garante que os átomos QM mantenham a orientação correta em relação aos átomos MM.

### 6.3. Determinação do Caminho de Reação.

Um número razoável de métodos para a obtenção do caminho de reação baseado na Hessiana da energia potencial foi desenvolvido para moléculas pequenas. Entretanto, estes métodos tornam-se inviáveis para sistemas com mais de algumas dezenas de átomos devido ao alto custo computacional [Schlegel, 2003]. Um método útil para o mapeamento da superfície de energia potencial envolve o uso de restrições gerais, o qual segue uma coordenada de reação pela aplicação de restrições fortes sobre os principais graus de liberdade envolvidos no mecanismo proposto. Por exemplo, para uma reação de transferência de proton do átomo A para o átomo B, um potencial harmônico na forma abaixo é aplicado sobre a coordenada de reação  $R_{H-B} - R_{H-A}$ .

$$\frac{1}{2}K(R_{H-B} - R_{H-A} - d)^2 \quad \text{Equação 14}$$

Na Equação 14,  $K$  é a constante de força do potencial harmônico,  $R_{H-B}$  é a distância entre o próton e o átomo B,  $R_{H-A}$  é a distancia entre o próton e o átomo A, e  $d$  é um parâmetro geométrico que é alterado sistematicamente ao longo da coordenada de reação. Mais especificamente, o caminho é mapeado alterando-se  $d$  em pequenos incrementos a partir de seu valor inicial e realizando-se minimizações de energia potencial em cada passo.

Vários mecanismos propostos para a reação podem ser tratados simultaneamente pela generalização deste método, denominado RESD (*REStrained Distances*) [Eurenius, 1996] e incorporado por nosso grupo no módulo ROAR do programa AMBER7. O método consiste em aplicar um potencial harmônico sobre a coordenada de reação de

cada mecanismo proposto e adicionar à energia potencial total o termo referente a energia de restrição total. Este termo possui a seguinte forma,

$$E_{RES D} = \sum_i^N \frac{1}{2} K_i [w_i (R_{ci} - d_i)]^2 \quad \text{Equação 15}$$

onde  $R_{ci}$  é a coordenada de reação do mecanismo  $i$  proposto,  $w_i$  é o peso dado a este mecanismo,  $N$  é o número de mecanismos considerados,  $K_i$  é a constante de força do potencial harmônico aplicado ao mecanismo  $i$ , e  $d_i$  é o parâmetro geométrico aplicado a coordenada de reação  $R_{ci}$ . Para cada mecanismo será obtido um perfil de energia potencial ao longo da coordenada de reação, onde o ponto de máximo localiza o estado de transição da reação. Vale ressaltar que esta metodologia não leva em consideração nenhuma contribuição entrópica e que apenas determina um caminho mínimo de reação baseando-se unicamente na energia potencial do sistema.

#### IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 1. Análise da Estabilidade e do Comportamento Dinâmico da Protease do HCMV

Para verificar a estabilidade das simulações o valor calculado para o RMSD (*root-mean-squared deviation*) ao longo da trajetória foi analisado. A Figura 18 mostra a dependência temporal do RMSD calculado para os átomos C $\alpha$  de todos os modelos em relação à estrutura inicial. Os resultados revelam que trajetórias estáveis foram obtidas em todos os casos. Os valores de RMSD para as simulações da forma monomérica da protease convergiram aproximadamente após 1 ns. Para o dímero da protease, os valores de RMSD convergiram em aproximadamente 700 ns. Para garantir que os sistemas estão equilibrados, as análises realizadas neste trabalho foram feitas para os 1,5 ns finais de simulação.

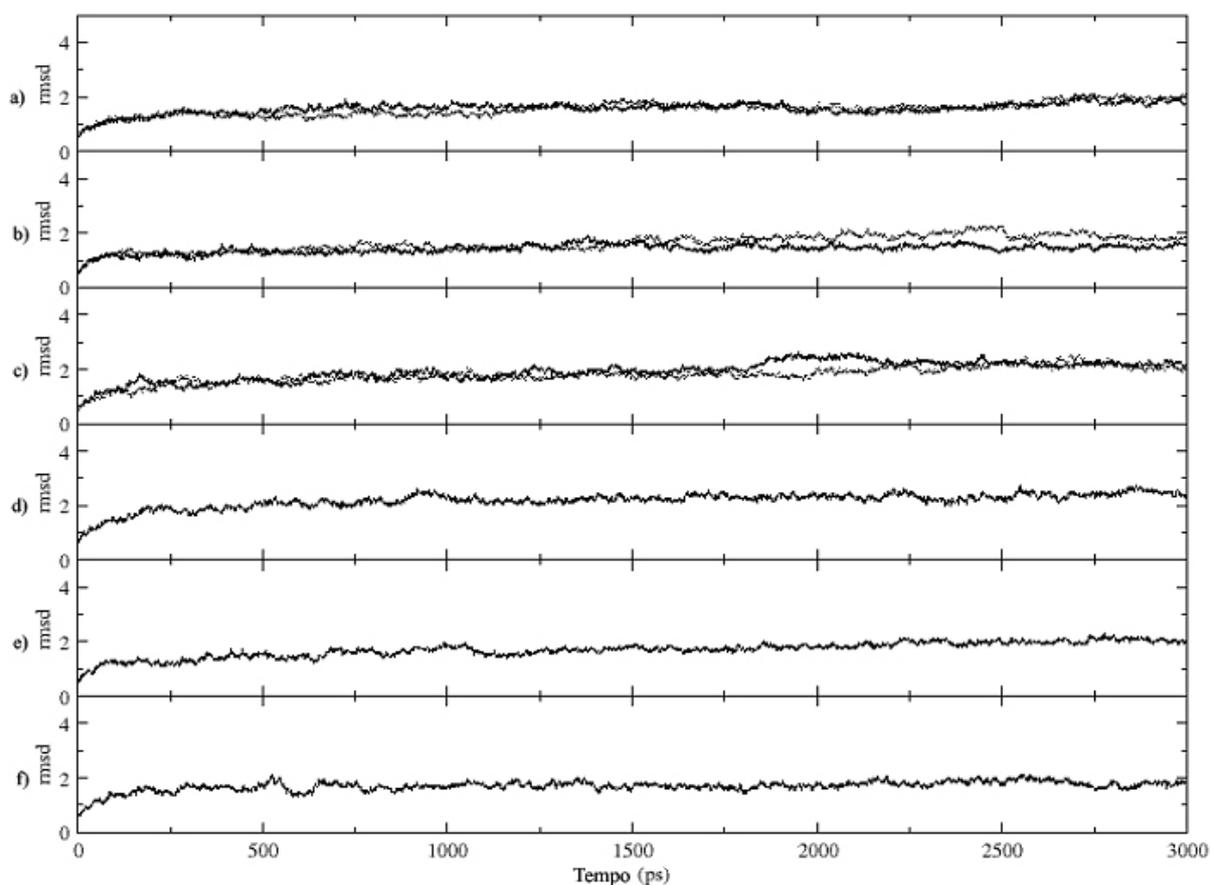


Figura 18: Valores de RMSD calculados em relação a estrutura inicial para os modelos a) **D**, b) **DI**, c) **D-I**, d) **M**, e) **MI** e f) **M-I**.

O fator Debye-Waller ou fator isotrópico de temperatura (fator-B), obtido a partir da raiz quadrática média das flutuações atômicas, foi calculado para os últimos 1,5 ns das trajetórias geradas pelas simulações de DM. O valor final do fator-B para cada resíduo, gerado pela equação 16 [McCammon, 1987], foi calculado pela média dos valores obtidos em três blocos consecutivos de 500 ps.

$$\langle \Delta r_i^2 \rangle = \frac{3B_i}{8\pi^2}$$

Equação 16

Na equação 16,  $\langle \Delta r_i^2 \rangle$  é a flutuação quadrática média para os átomos de carbono  $C\alpha$  do resíduo  $i$ . A Figura 19a compara os fatores-B calculados para o modelo **D** com os fatores-B experimentais da forma dimérica não complexada da protease, obtido a partir dos estudos de cristalografia de raio X realizados por Tong e colaboradores (código PDB: 1WPO) [Tong, 1996]. Devido à ausência de valores experimentais para os fatores-B do complexo não covalente formado entre a enzima e o inibidor, a Figura 19b compara os fatores-B calculados para **DI** com os fatores-B experimentais da forma dimérica da protease complexada covalentemente ao inibidor BILC 821, utilizados também como referência para comparação com os os fatores-B calculados para **D-I** (Figura 19c).

Os resultados exibidos nas Figuras 19a, 19b e 19c mostram boa concordância entre os valores experimentais e calculados, apresentando picos e vales coincidentes. Regiões que apresentam flexibilidade no cristal da protease foram bem reproduzidas nas trajetórias de MD. Por exemplo, as regiões não definidas no cristal, as quais correspondem as alças ausentes na estrutura, possuem os maiores valores para os fatores-B. Como discutido por Halle [Halle, 2002], isto ocorre provavelmente devido ao fato de que estas regiões além de serem expostas ao solvente, corresponderem a estruturas secundárias não regulares. Vale ressaltar, entretando, que as flutuações atômicas calculadas das simulações de DM são maiores que os valores experimentais. Este resultado pode ser atribuído ao fato de que os átomos da proteína em solução possuem uma maior mobilidade quando comparados aos átomos da estrutura mais rígida do cristal, como discutido por Stocker e colaboradores [Stocker, 2000]. Forças de empacotamento no cristal restringem os movimentos na proteína, especialmente no caso de regiões de superfície como alças, e regiões N e C terminal. Outra explicação é que o fator-B da cristalografia não corresponde a uma completa medida dos movimentos

moleculares. Enquanto que os fatores-B simulados correspondem às verdadeiras flutuações das posições atômicas e podem em princípio aumentar infinitamente com a mobilidade dos átomos, os fatores-B experimentais estão restritos a regiões de máximo no mapa de densidade eletrônica durante o refinamento da estrutura [Hunenberger, 1995]. Contudo, este comportamento não é normalmente observado na literatura, onde os valores calculados de fator-B são geralmente menores do que os valores experimentais [Madrid, 2001; Norberto, 1999; Philippopoulos, 1995; Saito, 1995]. Neste caso, propõe-se que o espaço configuracional explorado no experimento seja amostrado de forma incompleta nas simulações de DM [Levitt, 1998; Komeiji, 1994]. Em outras palavras, o curto intervalo de tempo normalmente utilizado na literatura para o cálculo dos fatores-B provavelmente subestima a grande mobilidade apresentada pelos átomos das proteínas em solução. Finalmente, é possível que a desordem estática incluída nos fatores-B cristalográficos derivados do raio X [Frauenfelder, 1979] e as oscilações restritas de toda a molécula ao redor de suas posições na rede do cristal não sejam levados em consideração nos estudos de DM devido aos procedimentos de ajustes usados no cálculo das flutuações atômicas [Edwards, 1990].

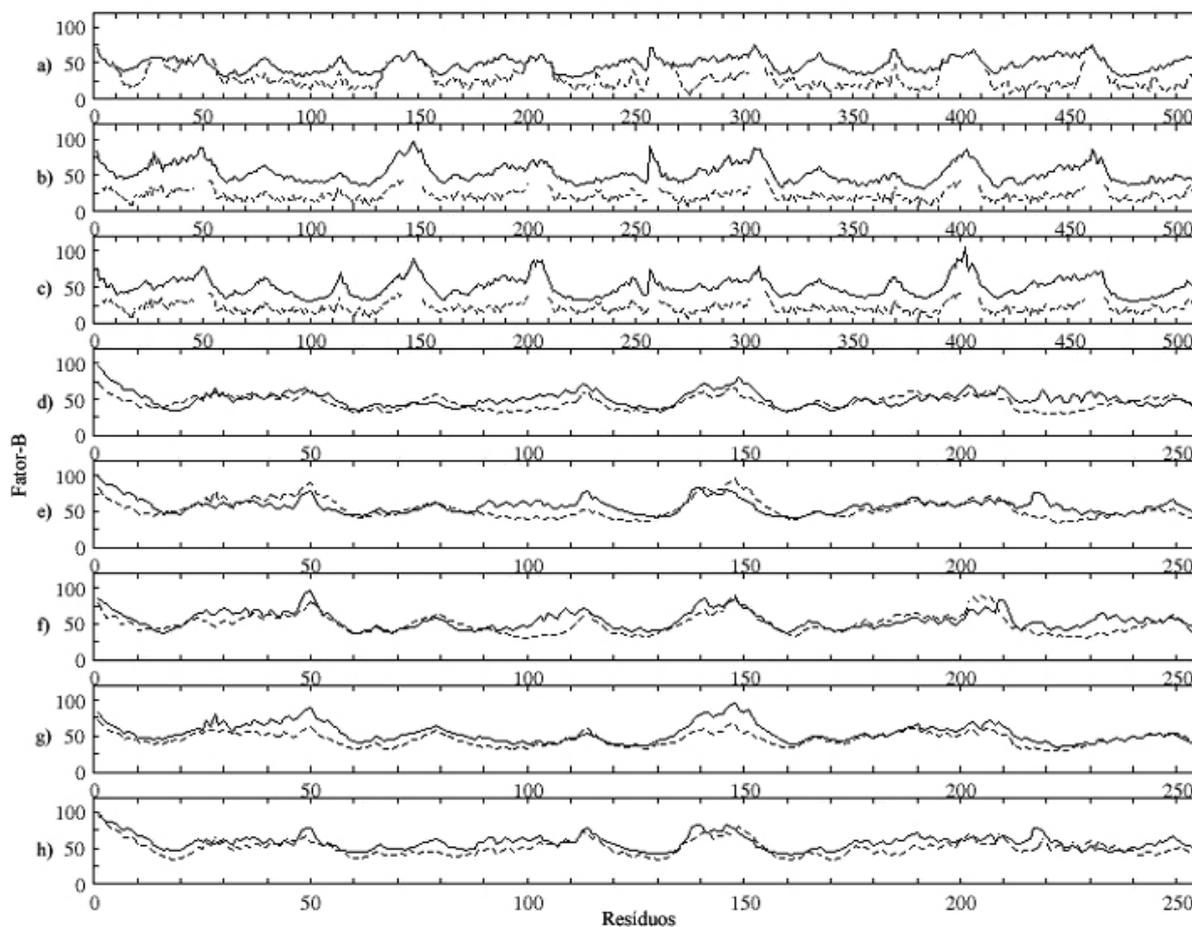


Figura 19: a) — Fator-B calculado para **D**, - - - - - Fator-B experimental para **D**; b) — Fator-B calculado para **DI**, - - - - - Fator B experimental para D-BILC 821; c) — Fator-B calculado para **D-I**, - - - - - Fator B experimental para D-BILC 821; d) — Fator-B calculado para **M**, - - - - - Fator-B calculado para o monômero A de **D**; e) — Fator-B calculado para **MI**, - - - - - Fator-B calculado para o monômero A de **DI**; f) — Fator-B calculado para **M-I**, - - - - - Fator-B calculado para o monômero A de **D-I**; g) — Fator-B calculado para **DI**, - - - - - Fator-B calculado para **D**; h) — Fator-B calculado para **MI**, - - - - - Fator-B calculado para **M**.

Para analisar as alterações nas flutuações atômicas entre as formas monomérica e dimerica da protease, os valores calculados para os fatores-B de **M** e o monômero A de

**D**, **MI** e o monômero A de **DI**, e **M-I** e o monômero A de **D-I** foram comparados nas Figuras 19d, 19e e 19f, respectivamente. Enquanto algumas regiões se tornam mais ordenadas devido à dimerização, outras se tornam menos ordenadas. É importante notar que as regiões mais ordenadas no estado dimérico da protease caracterizadas pelas simulações de DM correspondem às regiões envolvidas nas interações proteína-proteína, mediadas pelas hélices  $\alpha$ B (91-109),  $\alpha$ C (119-127)<sub>2</sub> e  $\alpha$ F (217-230).

Para análise das alterações das flutuações dos átomos entre as formas livres em solução e complexadas não-covalentemente ao inibidor, os fatores-B calculados para **D** e **DI**, e **M** e **MI** foram plotados nas Figuras 19g e 19h, respectivamente. Em nossos modelos, a formação do complexo não covalente entre o dímero e o inibidor aumenta a mobilidade dos átomos em diferentes regiões da proteína. Resíduos 35-90 nas regiões  $\alpha$ A, L3,  $\beta$ 2, L4,  $\beta$ 3, L5 e  $\beta$ 4, e os resíduos 130-160 nas regiões  $\beta$ 5, L9,  $\beta$ 6, o qual estão localizados próximos ao sítio ativo, estão mais ordenados na enzima livre em solução do que no complexo não-covalente. Interessantemente, estes resultados concordam com as diferenças entre o complexo covalente dímero-BILC 821 e dímero livre observadas nos estudos de cristalografia de raio-X, o que sugere que as mudanças na estrutura ocorrem antes da formação do aduto covalente e que a protease do HCMV opera segundo um mecanismo de encaixe induzido [Guimarães, 2004; Oliveira, 2003; LaPlante, 1999].

As alterações estruturais ocorridas na formação do complexo inibidor-dímero podem aumentar a flutuação nas regiões mencionadas acima devido à perda de ligações de hidrogênio nestes segmentos. Para verificar esta hipótese, a ocorrência de todas as ligações de hidrogênio ao longo dos 1,5 ns finais da trajetória de **D** e **DI** foi analisada. A Figura 20 mostra em representação *cartoon* os resíduos 35-90 e 130-160 e as ligações de hidrogênio (linhas tracejadas) com ocupância maior que 50%, presentes no modelo **D** e ausentes no modelo **DI**.

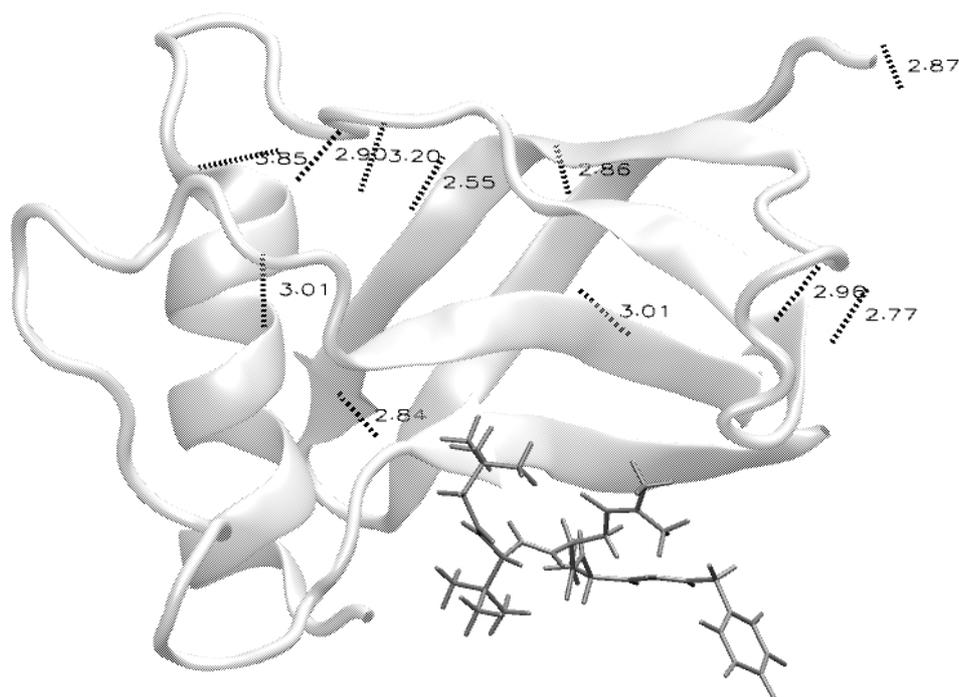


Figura 20: Representação em *cartoon* dos segmentos 35-90 e 130-160 do modelo **D**. As linhas tracejadas correspondem às ligações de hidrogênio com ocupância maior que 50% ao longo da trajetória presentes no modelo **D**, mas ausentes em **DI**. O inibidor, representado em *stick*, superposto ao modelo **D** serve apenas como referência para localização do sítio ativo da protease.

Como mostrado na Figura 20, diversas ligações de hidrogênio não estão presentes ou possuem ocupância menor do que 50 % ao longo da trajetória no modelo **DI**. Entretanto, o aumento na mobilidade dos resíduos nestas regiões não é observado no estado monomérico da protease. Finalmente, a Figura 19h compara os fatores-B calculados para os modelos **MI** e **M**. Como pode ser visto, não existe alteração

significativa no comportamento dinâmico do monômero da protease durante o processo de complexação.

A Figura 21 mostra a sobreposição dos traços de quinze estruturas selecionadas a cada 100 ps dos 1,5 ns finais da trajetória de cada um dos modelos. As estruturas presentes nas Figuras 21a-f correspondem aos modelos **D**, **DI**, **D-I**, **M**, **MI**, e **M-I** respectivamente. Os primeiros 256 resíduos (referentes ao monômero A) foram utilizados como referência no ajuste dos traços das estruturas em todos os modelos. Em concordância com os resultados experimentais, os segmentos que não foram observados na estrutura cristalográfica, a região N-terminal  $\alpha$ N e as alças L3, L9 e L13 [Tong, 1998], mostraram grande flexibilidade ao longo da trajetória para todos os modelos. Além disto, como esperado, a ausência das interações proteína-proteína nas formas monoméricas da protease resulta em uma maior mobilidade da hélice  $\alpha$ F quando comparada ao estado dimérico da enzima.

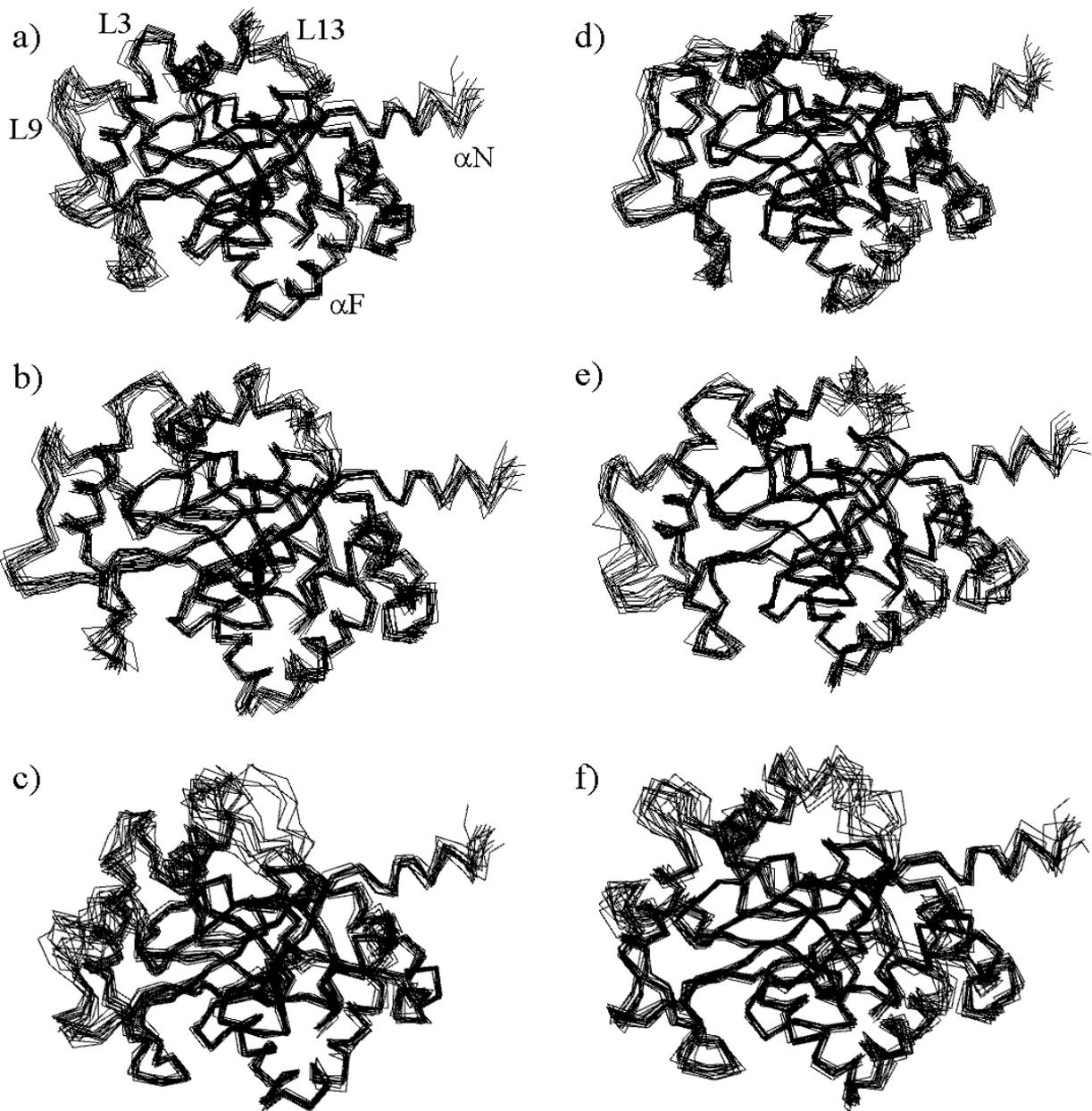


Figura 21: Amplitude dos movimentos realizados pelas formas dimérica e monomérica da protease do HCMV. Sobreposição das 15 estruturas selecionadas em intervalos regulares de 100 ps dos 1,5 ns finais da trajetória dos modelos a) **D** (monômero A), b) **DI** (monômero A), c) **D-I** (monômero A), d) **M**, e) **MI**, f) **M-I**.

## 2. Mudanças Conformacionais Ocorridas na Formação do Complexo Protease-Inibidor.

Para estudar as mudanças conformacionais no dímero da protease quando da complexação do inibidor de carbonila ativada, mas antes da formação do aduto covalente [Tong, 1998; Bonneau, 1997], as estruturas médias obtidas dos 500 ps finais das simulações de DM do monômero A dos modelos **DI** e **D** foram sobrepostas (Figura 22a). Interessantemente, as diferenças conformacionais mais significativas entre a enzima livre e o complexo covalente com o inibidor BILC 821, observadas por Tong e colaboradores nos estudos de cristalografia de raio-X [Tong, 1998], foram reproduzidas nas simulações de DM de **DI** e **D**. Este resultado indica que as mudanças conformacionais observadas estão associadas ao processo de complexação e não à formação do aduto covalente. Mais especificamente, foram observadas mudanças conformacionais nos resíduos 1-9 da hélice  $\alpha$ N, 23-33 da alça L2, 35-45 da hélice  $\alpha$ A, 136-154 da alça L9, 217-230 da hélice  $\alpha$ F, e 231-232 da alça L15. Grandes mudanças conformacionais também foram observadas para os resíduos 201-209 da alça L13, mas esta região não está definida na estrutura cristalográfica. A alça L13 corresponde à região de maior flexibilidade nos modelos dos complexos covalentes, como pode ser visto nas Figuras 21c e 21f para as formas dimérica e monomérica da protease. Contudo, as alterações estruturais observadas experimentalmente para os resíduos 165-169 na alça L10 não foram reproduzidas nas simulações de DM.

A Figura 22b sobrepõe as estruturas médias dos modelos **MI** e **M** obtidas nos 500 ps finais da trajetória. As mudanças conformacionais observadas entre os modelos **DI** e **D** foram também observadas entre **MI** e **M**. Além disto, as alterações estruturais para os resíduos 165-169 na alça L10, não observadas entre os modelos **DI** e **D**, foram bem

reproduzidas nos modelos **M** e **MI**. Desta forma, nossos resultados sugerem que a presença da interface monômero-monômero no dímero da protease não é condição essencial para a ocorrência das mudanças conformacionais observadas experimentalmente na formação do complexo covalente protease-inibidor.

As estruturas médias dos modelos **DI** e **MI** foram sobrepostas para análise das principais diferenças estruturais entre o complexo protease-inibidor nos estados dimérico e monomérico da protease (Figura 22c). Além das diferenças estruturais nas alças L2, L9 e L13, a principal mudança conformacional foi observada na hélice  $\alpha F$ . Resultados similares foram obtidos para os modelos **D** e **M** (22d). Como esperado, a ausência das interações proteína-proteína na interface do dímero da protease é responsável pela mudança da posição e orientação de equilíbrio da hélice  $\alpha F$  no estado monomérico.

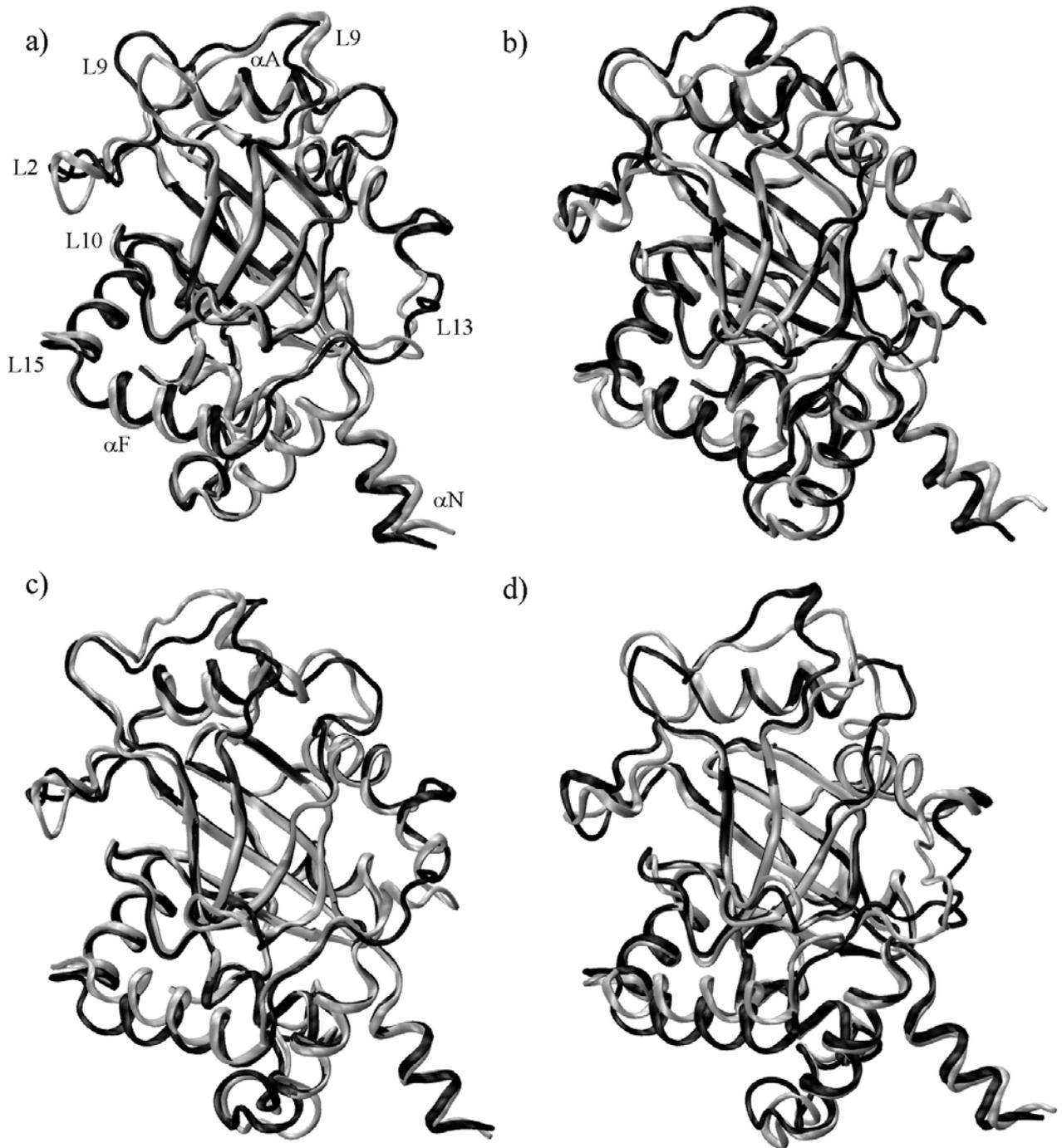


Figura 22: Principais alterações estruturais ocorridas na formação do complexo não covalente protease-inibidor. Sobreposição das estruturas médias obtidas dos últimos 500 ps da trajetória de DM. a) Monômero A de **DI** (preto) e Monômero A de **D** (cinza), b) **MI** (preto) e **M** (cinza), c) Monômero A de **DI** (preto) e **MI** (cinza), d) Monômero A de **D** (preto) e **M** (cinza).

Tong e colaboradores [Tong, 1998] verificaram que quando os monômeros A das estruturas cristalográficas do dímero livre e do complexo covalente dímero-BILC 821 da protease são sobrepostos, uma rotação de aproximadamente  $6,5^\circ$  em torno do eixo definido pelas hélices  $\alpha F$  da interface é necessária para sobrepor o monômero B de ambas as estruturas. A causa responsável por esta alteração estrutural é atualmente desconhecida. A Figura 23 mostra que esta observação experimental também foi reproduzida nas simulações de DM para os modelos **DI** e **D**. Visando o entendimento da origem desta alteração estrutural, os seguintes parâmetros geométricos foram monitorados ao longo da trajetória dos modelos **DI** e **D**: i) distância entre o centro de massa dos monômeros A e B; ii) ângulo entre os vetores  $V'_1$  e  $V_2$  ( $V_1'V_2$ ) (Figura 24e) definidos pela distância entre os centros de massa dos monômeros A e B nos dois modelos. Em ambos os modelos, a origem dos vetores  $V_1$  e  $V_2$  foi definida no centro de massa do monômero A. O vetor  $V'_1$  corresponde ao vetor  $V_1$  na mesma origem e orientação do vetor  $V_2$ . Para garantir que ambos os sistemas possuem a mesma orientação, as duas trajetórias dos modelos **DI** e **D** foram sobrepostas usando o monômero A de **DI** como referência; iii) Ângulo definido entre o centro de massa do monômero A, das hélices  $\alpha F$  e do monômero B ( $A\alpha FB$ ) (Figura 24f, à esquerda); e iv) ângulo diedro definido pelo centro de massa do monômero A,  $C\alpha$  do resíduo Ser 225 da hélice  $\alpha F$  do monômero A,  $C\alpha$  do resíduo equivalente a Ser 225 da hélice  $\alpha F$  do monômero B e o centro de massa do monômero B (Figura 24f, à direita).

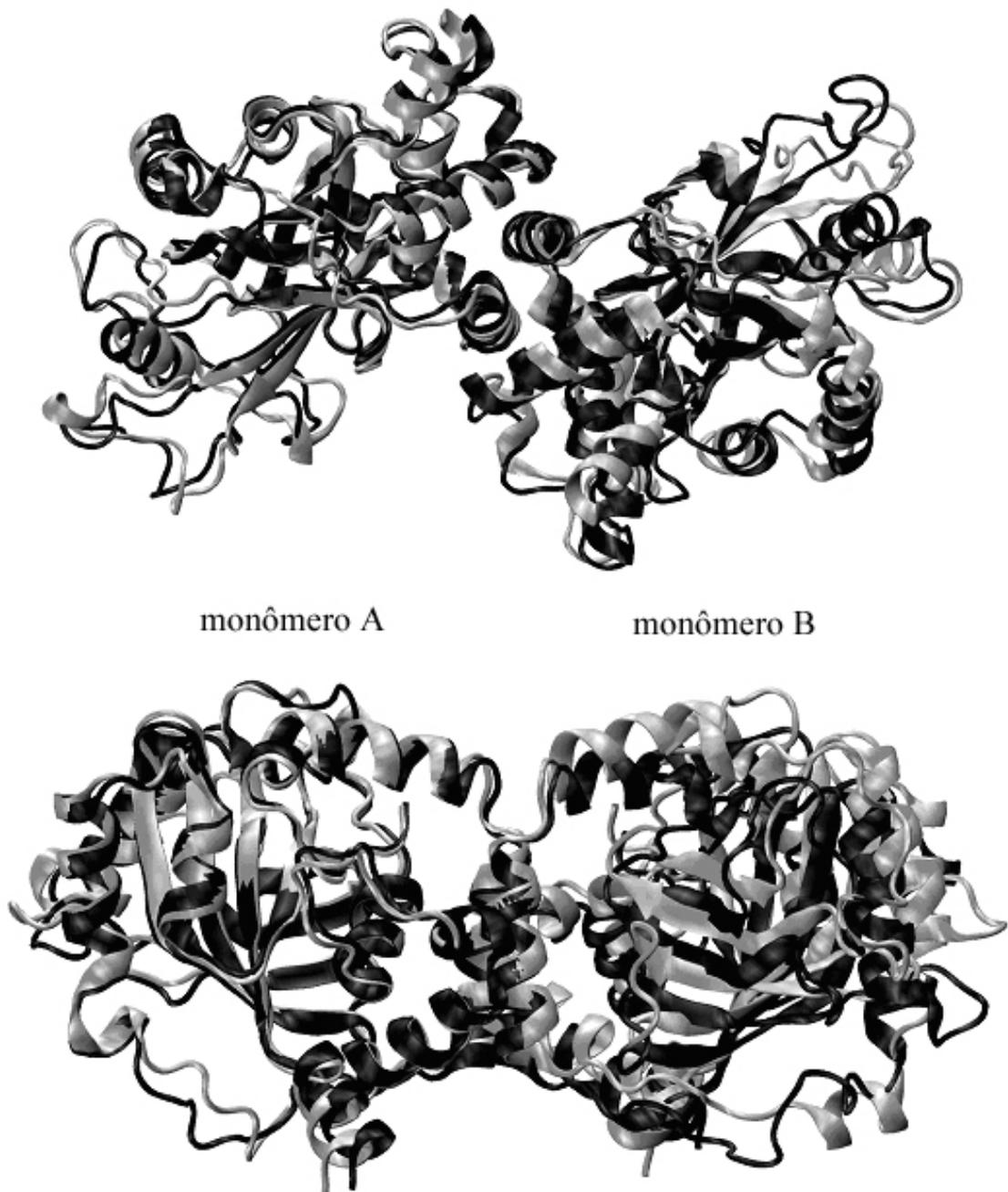


Figura 23: Sobreposição das estruturas médias obtidas nos últimos 500 ps das simulações em DM para os modelos **DI** e **D**. Sobreposição do monômero A do dímero da protease.

A Figura 24a mostra que ambos os sistemas, **DI** e **D**, apresentam praticamente a mesma distância entre os centros de massa dos monômeros ao longo da trajetória, sugerindo que a formação do complexo não expande nem comprime a estrutura do dímero da protease. A Figura 24b mostra que o ângulo  $V_1'V_2$  oscila em torno de  $6^\circ$ , em excelente acordo com o valor observado por Tong e colaboradores [Tong, 1998]. Esta mudança na orientação do dímero da protease pode ser entendida como o resultado da contribuição de três diferentes movimentos entre monômeros: rotação em torno do eixo paralelo às hélices de interface  $\alpha F$  (Figura 24f, à esquerda), rotação ao redor de um eixo perpendicular às hélices  $\alpha F$  (Figura 24f, à direita) e translação do monômero B em relação ao monômero A. Com o objetivo de quantificar estes movimentos, os ângulos  $A\alpha FB$  e o ângulo diedro definidos acima foram monitorados ao longo da trajetória. As Figuras 24c e 24d mostram que diferentes parâmetros geométricos são de fato visitados nas simulações de **DI** e **D**, e isso é evidente após 1 ns de trajetória.

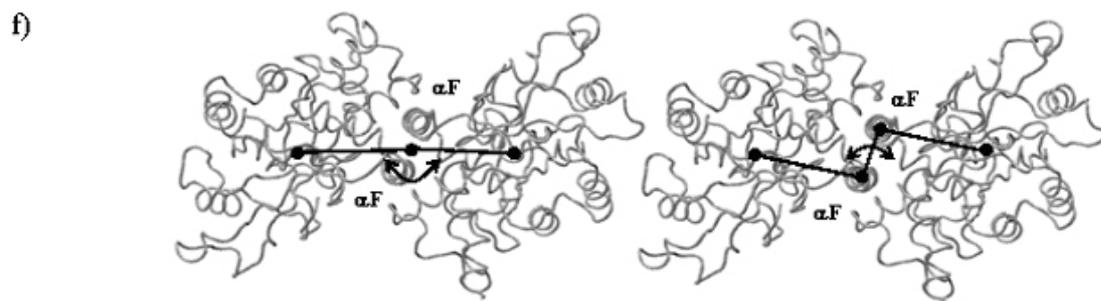
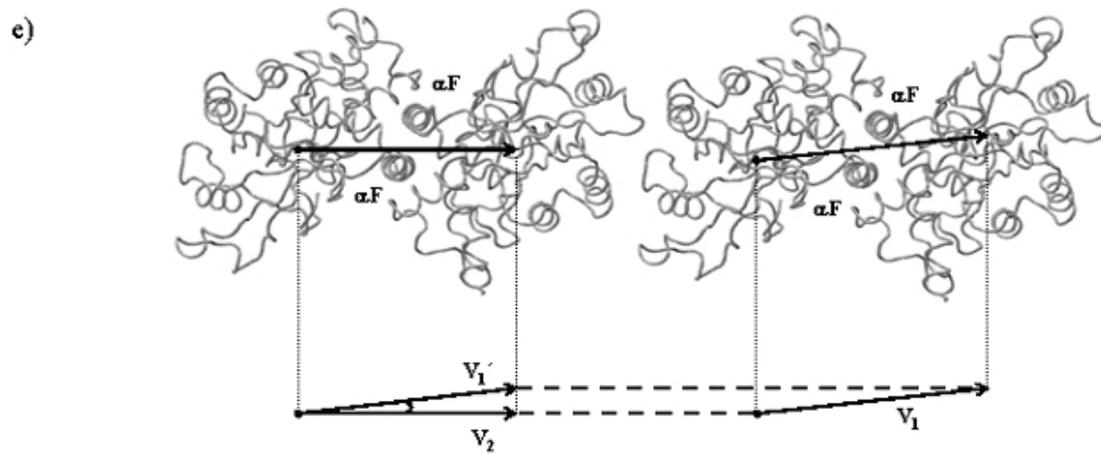
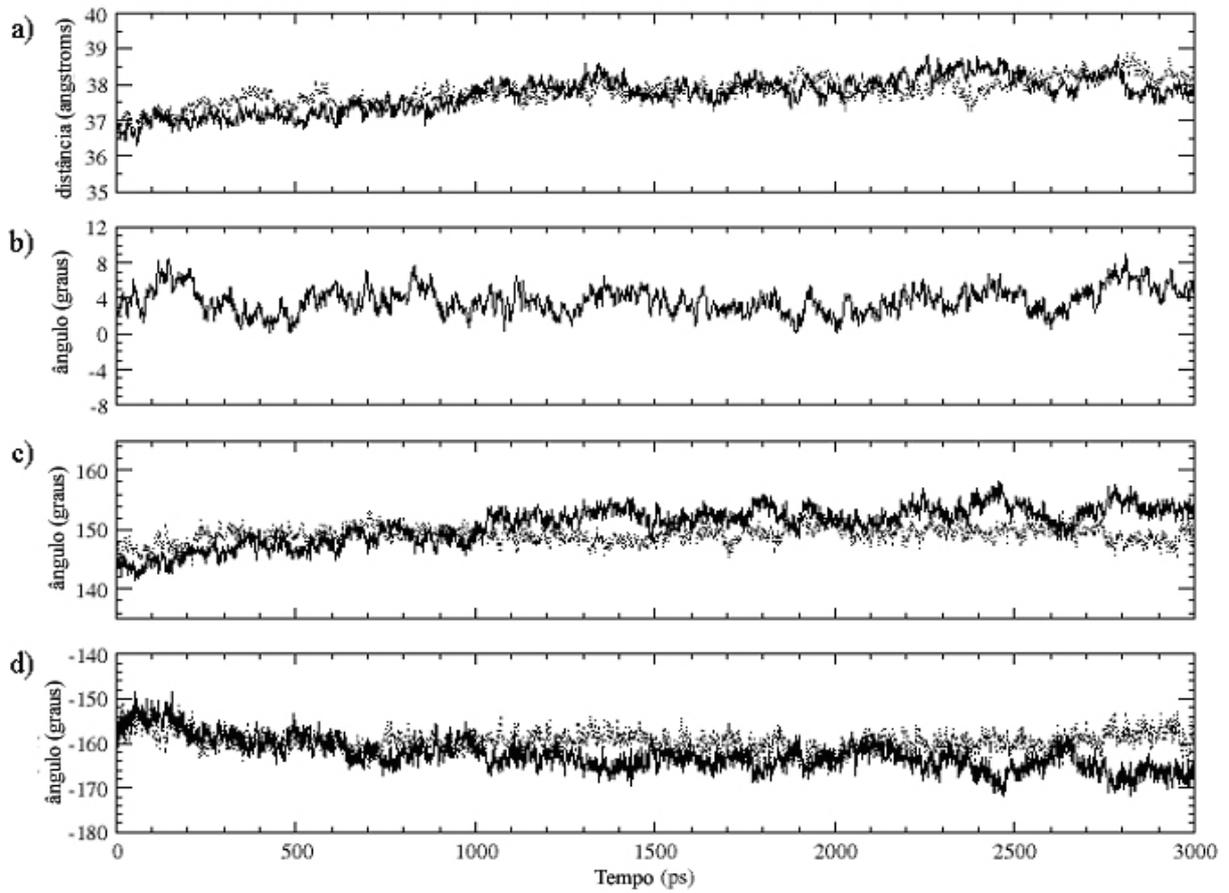


Figura 24: Os gráficos a), b), c) e d) correspondem a variação temporal dos seguintes parâmetros geométricos :a) distancia entre o centro de massa dos monômeros A e B. b) ângulo definido pelos vetores  $V_1$  e  $V_2$ . c) ângulo definido entre o centro de massa do monômero A, das hélices  $\alpha F$  e do monômero B. d) ângulo diedro definido pelo centro de massa do monômero A, pelo carbono  $\alpha$  do resíduo Ser 225 na hélice  $\alpha F$  do monômero A, pelo carbono  $\alpha$  do resíduo equivalente à Ser 225 na hélice  $\alpha F$  do monômero B e pelo centro de massa do monômero B. e) representação esquemática dos vetores  $V_1$ ,  $V_1'$  e  $V_2$ . f) esquerda: representação esquemática do ângulo definido em c). f) direita: representação esquemática do ângulo definido em d). Nos gráficos a, b, c e d, a linha contínua preta se refere ao modelo **DI**, e a linha tracejada ao modelo **D**.

### 2.1. O Mecanismo de Encaixe Induzido.

O modelo **D**, dímero da protease livre em solução, foi construído a partir do modelo **DI** e não a partir da estrutura cristalográfica do dímero livre. Assim, a concordância entre os resultados teóricos e experimentais descritos acima suporta a qualidade dos nossos modelos, e indica que nossas simulações de DM foram longas o suficiente para descrever adequadamente as diferenças estruturais observadas entre a enzima livre e o complexo covalente. Além disso, visto que as alterações observadas experimentalmente na conformação e orientação do complexo covalente dímero-BILC 821 foram reproduzidas em nossas simulações de DM do complexo formado entre o inibidor usado no presente trabalho e o dímero da protease antes da formação do aduto covalente, nossos resultados mostram que as alterações estruturais não estão associadas à formação do intermediário tetraédrico. Alternativamente, a formação do complexo não

covalente induz mudanças conformacionais nos resíduos próximos ao sítio ativo mediadas pelos contatos entre a porção peptídica do inibidor e os sítios de interação da protease. Portanto, nossos resultados teóricos concordam com as evidências experimentais de que a protease do HCMV é um novo exemplo de serina protease que opera via mecanismo de encaixe induzido [LaPlante, 1999]. Em outras palavras, uma porção considerável da energia livre de complexação é usada para realizar a reorganização estrutural necessária para trazer a enzima à forma cataliticamente ativa.

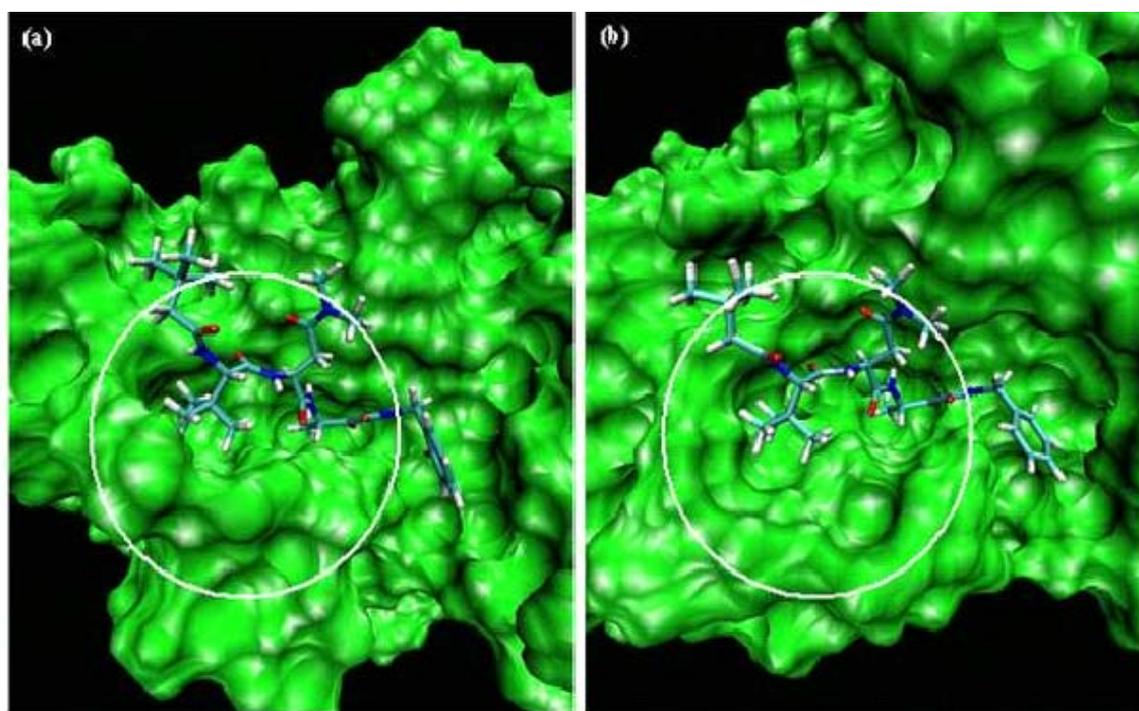


Figura 25: Superfície molecular próxima ao sítio ativo para a) **DI** e b) **MI**. Os sítios de interação  $S_1$  e  $S_3$  estão indicados pelos círculos brancos.

As Figuras 25a e b mostram a superfície molecular próxima ao sítio ativo nos modelos **DI** e **MI**, respectivamente. As cadeias laterais do inibidor nas posições  $P_2$  e  $P_4$  estão situadas sobre a superfície da protease e expostas ao solvente em ambos os modelos. As cadeias laterais dos resíduos  $P_1$  e  $P_3$  são menos acessíveis ao solvente e

interagem com os sítios  $S_1$  e  $S_3$  que formam uma larga depressão na superfície da protease em ambas as formas. Entretanto, alterações significantes nos sítios  $S_1$  e  $S_3$  podem ser vistas se compararmos as superfícies de **DI** e **MI**. As alterações nos sítios de interação  $S_1$  e  $S_3$  são atribuídas principalmente ao reposicionamento dos resíduos Glu31 e Leu32 presentes na alça L2, Arg137 na alça L9, e Arg165 e Arg166 na alça L10 no modelo **MI**. Sendo a protease do HCMV uma enzima que opera via mecanismo de encaixe induzido, podemos especular que a ausência das interações monômero-monômero impossibilita a reorganização conformacional adequada no estado monomérico, necessária para trazer a enzima à forma cataliticamente ativa após a formação do complexo não covalente com o substrato ou inibidores peptídil com carbonila ativada.

### 3. Movimentos Coletivos Entre Monômeros.

A matriz de correlação dinâmica cruzada ( $C_{ij}$ ) [Estabrook, 2005; Mazumder-Shivakumar, 2005; Zoete, 2004; Hunenberger, 1995; Harte, 1992; Ichiye, 1991] foi utilizada para o estudo do comportamento dinâmico do dímero da protease, mais especificamente os movimentos coletivos relacionados às interações monômero-monômero. Os elementos de  $C_{ij}$  foram obtidos a partir dos respectivos elementos da matriz de covariância  $c_{ij}$  dados por:

$$c_{ij} = \langle (r_i - \langle r_i \rangle)(r_j - \langle r_j \rangle) \rangle = \langle r_i \cdot r_j \rangle - \langle r_i \rangle \langle r_j \rangle \quad \text{Equação 17}$$

onde  $r_i$  corresponde ao vetor de coordenadas cartesianas do átomo  $i$ , e  $\langle \rangle$  denota a média temporal. Expandindo os termos da equação 17, temos que:

$$c_{ij} = \frac{\Delta t}{t_{m\acute{e}dia}} \left[ \sum_{t=0}^{t_{m\acute{e}dia}-\Delta t} r_i(t)r_j(t) - \frac{\Delta t}{t_{m\acute{e}dia}} \left( \sum_{t=0}^{t_{m\acute{e}dia}-\Delta t} r_i(t)r \right) \times \left( \sum_{t=0}^{t_{m\acute{e}dia}-\Delta t} r_j(t)r \right) \right] \quad \text{Equação 18}$$

onde  $t_{m\acute{e}dia}$  corresponde ao intervalo de tempo em que a média é calculada e  $\Delta t$  ao intervalo de tempo entre duas configurações. O elemento da diagonal principal da matriz de covariância ( $i=j$ ) corresponde à flutuação quadrática média do átomo  $i$ . Assim, os elementos da matriz de correlação cruzada (ou covariância normalizada) são definidos por:

$$C_{ij} = \frac{c_{ij}}{c_{ii}^{1/2}c_{jj}^{1/2}} = \frac{\langle r_i \cdot r_j \rangle - \langle r_i \rangle \langle r_j \rangle}{\left[ \left( \langle r_i^2 \rangle - \langle r_i \rangle^2 \right) \left( \langle r_j^2 \rangle - \langle r_j \rangle^2 \right) \right]^{1/2}} \quad \text{Equação 19}$$

Os valores de  $C_{ij}$  variam de -1 (movimentos completamente anticorrelacionados) a 1 (movimentos completamente correlacionados).  $C_{ij}$  iguais a 1 ou -1 refletem movimentos que possuem a mesma fase e o mesmo período. Valores positivos correlacionam movimentos com mesma direção e sentido, enquanto que valores negativos correlacionam movimentos com mesma direção, mas sentido contrário. A matriz de correlação dinâmica cruzada foi calculada efetuando-se a média dos valores calculados em 6 blocos de 200 ps em intervalos de 50 ps ao longo dos 1,5 ns finais das trajetórias de DM. A remoção dos movimentos translacional e rotacional do centro de massa da proteína foi realizada pela sobreposição das estruturas selecionadas usando como referência os  $C\alpha$  dos seguintes resíduos: 13-23, 57-61, 67-78, 81-89, 130-134, 156-161,

169-174 presentes nas fitas  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 6$  e  $\beta 7$  de ambos os monômeros. Estes resíduos fazem parte das regiões menos flexíveis da protease. A utilização de resíduos de regiões de grande mobilidade no procedimento de ajuste das estruturas é responsável pelo surgimento de movimentos correlacionados artificiais entre resíduos da superfície da proteína [Hunenberger, 1995].

As Figuras 26 e 27 mostram os gráficos bidimensionais da matriz de correlação dinâmica cruzada calculada para os modelos **D** e **DI** e as regiões mais relevantes de cada monômero com movimentos correlacionados. No modelo **D**, os resíduos presentes nas regiões próximas à interface possuem movimentos altamente correlacionados (Figura 26, resíduos marcados em amarelo). Além disto, foi possível identificar regiões com movimentos correlacionados separadas por mais de 30 Å (Figura 26, resíduos marcados em vermelho). Estas regiões compreendem aos resíduos 72-78 na fita  $\beta 3$ , 82-87 na fita  $\beta 4$ , 92-110 na hélice  $\alpha B$ , 115-117 na alça L7, 118-127 na hélice  $\alpha C$ , 174-175 na alça L11, 176-179 na hélice  $\alpha D$ , 217-230 na hélice  $\alpha F$ , 231-232 na alça L15, 233-235 na hélice  $\alpha G$  e 248-256 na alça L16 em ambos os monômeros.

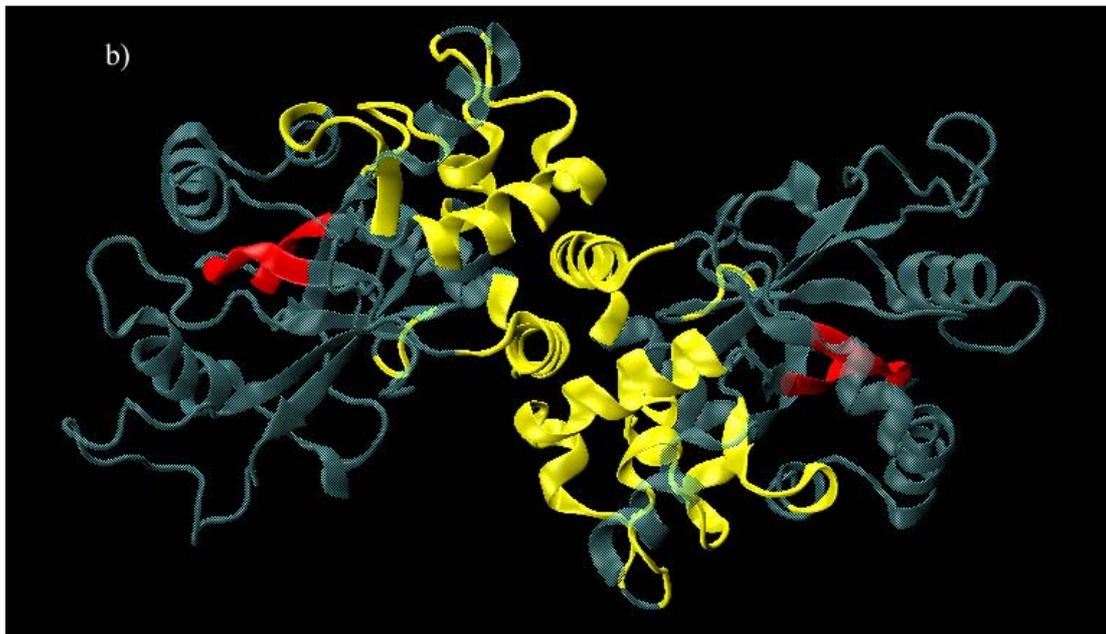
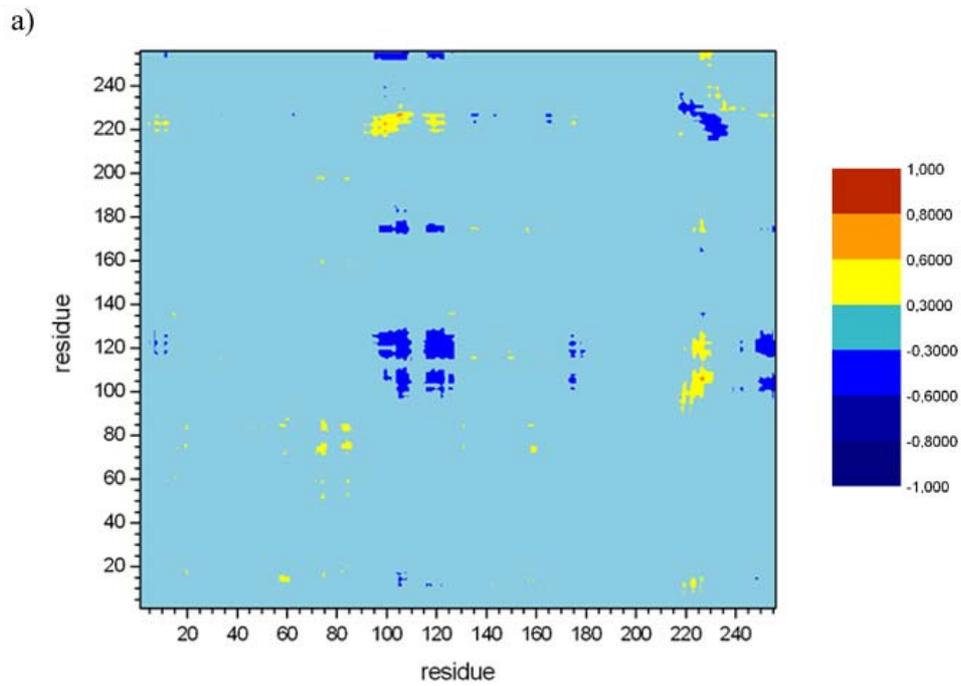


Figura 26: a) Representação bidimensional dos elementos da matriz de correlação dinâmica cruzada calculados para o modelo **D**. Os eixos horizontal e vertical correspondem aos resíduos dos monômeros A e B, respectivamente. b) Os resíduos marcados em amarelo e vermelho possuem movimentos entre monômeros altamente correlacionados.

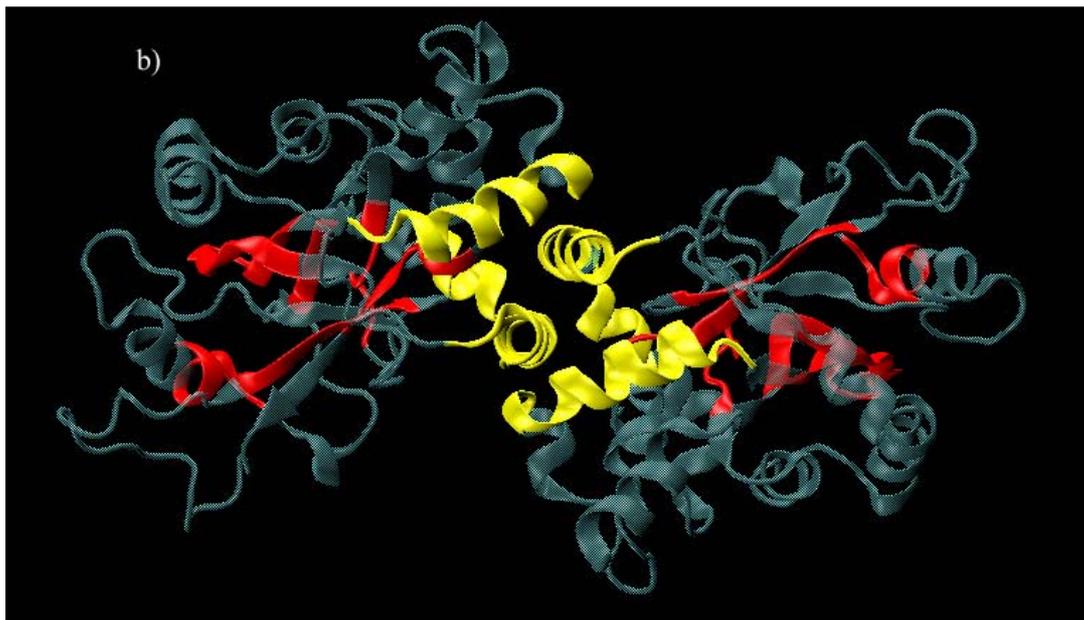
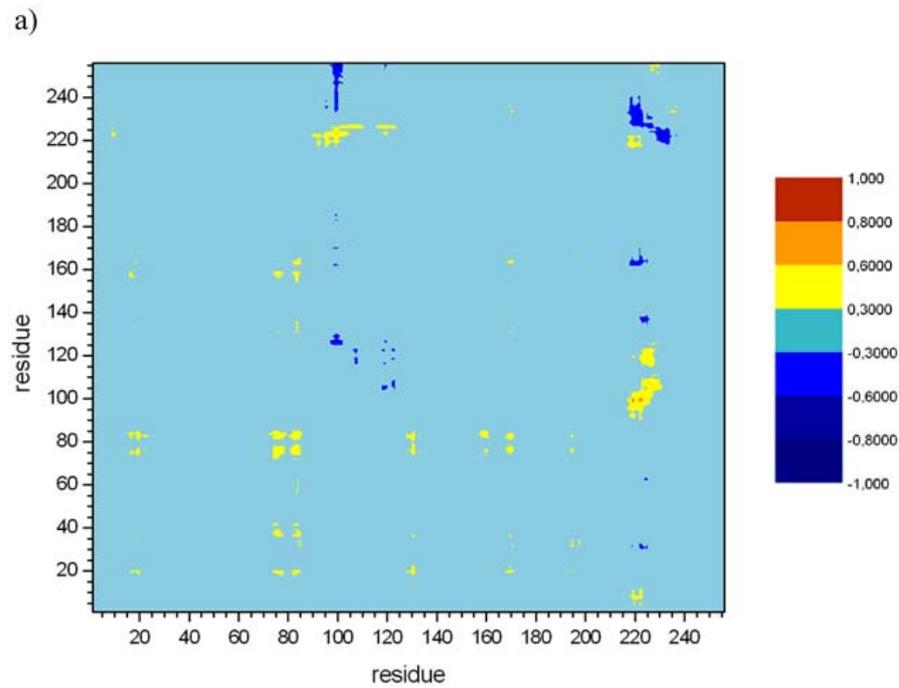


Figura 27: a) Representação bidimensional dos elementos da matriz de correlação dinâmica cruzada calculados para o modelo **DI**. Os eixos horizontal e vertical correspondem aos resíduos dos monômeros A e B, respectivamente. b) Os resíduos marcados em amarelo e vermelho possuem movimentos entre monômeros altamente correlacionados.

Comparando os resultados obtidos para os modelos **D** e **DI**, observa-se que diversas regiões correlacionadas próximas à interface mômero-monômico presentes em **D** não foram encontradas em **DI** (Figura 27). Por outro lado, a formação do complexo não covalente é responsável pelo surgimento de novos movimentos correlacionados entre segmentos presentes na região do sítio ativo (Figura 27, região em vermelho). Estudos prévios [Estabook, 2005; Luo, 2002] mostraram que a presença de movimentos correlacionados e anticorrelacionados na região do sítio ativo da enzima eleva a taxa de reação enzimática devido ao aumento do número de conformações reativas visitadas pela proteína.

#### 4. Interações Protease-Inibidor

A Figura 28a mostra uma representação esquemática para a primeira etapa do mecanismo de reação aceito para as serinas proteases clássicas. Somente os principais elementos do sistema catalítico são mostrados: a tríade catalítica Ser132-His63-His157; o nitrogênio e o hidrogênio da amida da cadeia principal da Arg165 e Arg166; e a carbonila do substrato ou do inibidor.

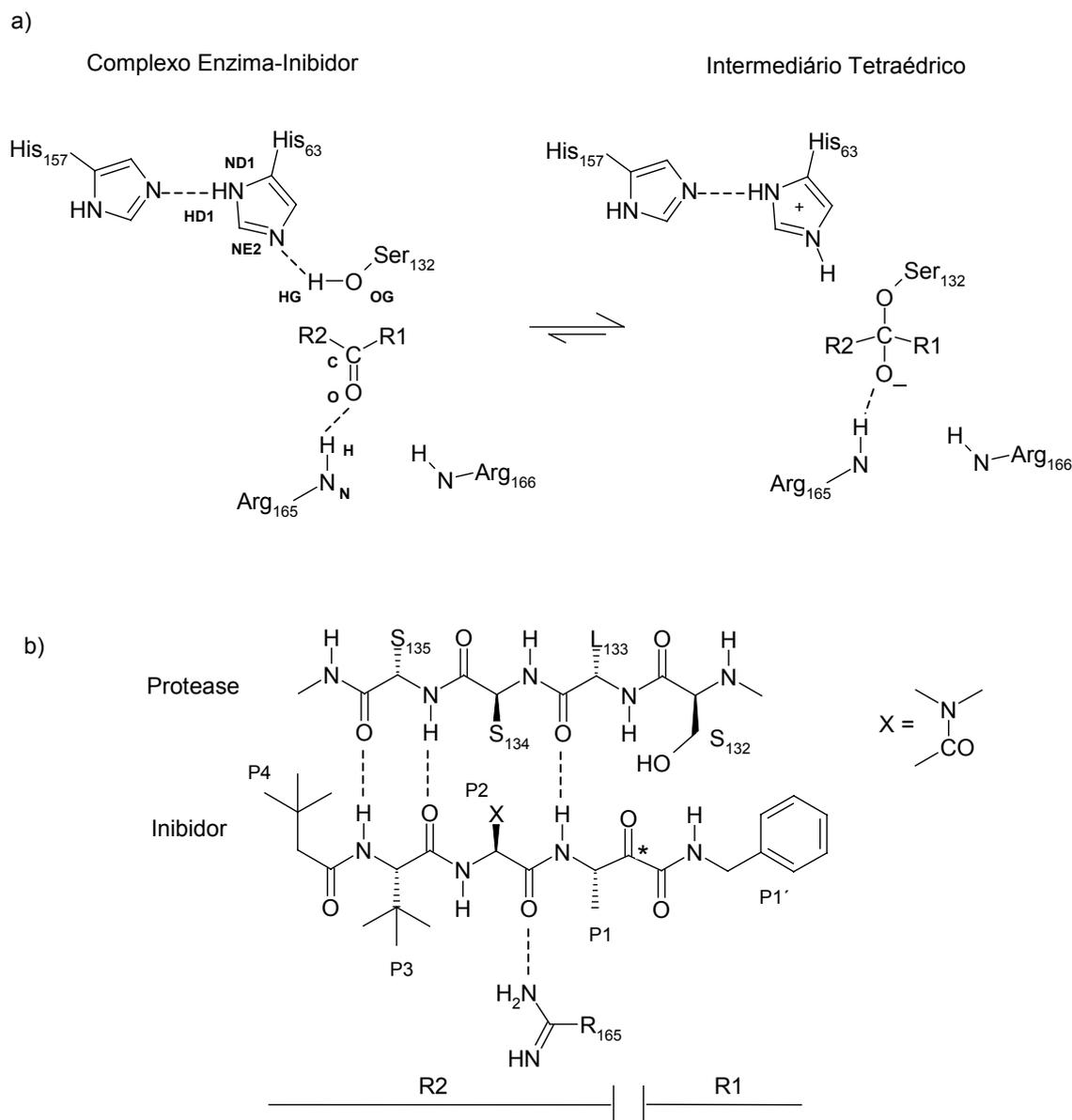


Figura 28: a) Representação esquemática para a primeira etapa do mecanismo de reação aceito para as serinas proteases clássicas. b) Interações relevantes entre o inibidor peptídil de carbonila ativada e a protease.

Nos modelos dos complexos não covalente e covalente, **DI**, **MI**, **D-I** e **M-I**, o subsistema composto pelo inibidor e a tríade catalítica permaneceu estável ao longo das trajetórias. Nos modelos **DI** e **MI**, a Ser132 interage via ligação de hidrogênio com a His63. A distância calculada entre o hidrogênio de hidroxila da serina (HG) e o

nitrogênio do anel imidazol da histidina (NE2) flutua em torno de 2,8 Å, enquanto que o valor médio para o ângulo Ser<sub>132</sub>HG-Ser<sub>132</sub>OG- His<sub>63</sub>NE2 é de 16,6° em **DI** e 11,8° em **MI**. Para ambos os modelos, a His<sub>63</sub> interage através de uma ligação de hidrogênio com a His<sub>157</sub>, e a ocupância para esta interação calculada ao longo da trajetória foi de 62% e 66% nas formas dimérica e monomérica dos complexos não covalentes. A distância (His<sub>63</sub>ND1-His<sub>157</sub>NE2) e ângulo (His<sub>63</sub>ND1-His<sub>63</sub>HD1-His<sub>157</sub>NE2) calculados para esta interação flutuam em torno de 2,9 Å e 154° para as trajetórias de **DI** e **MI**. Resultados similares foram obtidos para esta distância e ângulo nos modelos **D-I** e **M-I**.

Para verificar se o resíduo de serina Ser<sub>132</sub> se mantém em sua orientação reativa ao longo da trajetória dos modelos **DI** e **MI**, a distância entre o oxigênio OG da Ser<sub>132</sub> e o carbono da carbonila ativada do inibidor foi monitorada nas simulações de DM. Em ambos os casos, a distância calculada oscila em torno 2,9 Å. Assim, a ausência da interface no monômero não impede que a tríade catalítica e a carbonila ativada do inibidor adotem configurações apropriadas para o ataque.

Em nossos modelos, o inibidor forma uma fita β antiparalela com a protease e se complexa em uma conformação estendida muito semelhante à conformação adotada pelo inibidor peptidomimético BILC 821 na estrutura cristalográfica do complexo covalente. Na estrutura do cristal, existem três ligações de hidrogênio entre os átomos da cadeia principal do inibidor e a fita β<sub>5</sub> da protease (Figura 28b). Duas destas ligações de hidrogênio são feitas pela cadeia principal do resíduo P<sub>3</sub> do inibidor e a Ser<sub>135</sub> da protease. A terceira ligação de hidrogênio é entre o nitrogênio da cadeia principal do resíduo P<sub>1</sub> e o grupamento carbonila do resíduo L133. Experimentos de *N*-metilação de inibidores peptídiomiméticos da protease do HCMV mostraram que de fato os átomos de nitrogênio da cadeia principal dos resíduos P<sub>1</sub> e P<sub>3</sub> são requeridos para complexação e, conseqüentemente, para catálise [Ogilvie, 1997]. Todas as interações foram bem

reproduzidas nas simulações de DM, exceto no modelo **DI** onde o átomo de nitrogênio da cadeia principal do resíduo P<sub>1</sub> e o átomo de oxigênio da carbonila da cadeia principal do resíduo L133 estão separados por 4,8 Å no final da trajetória.

Na estrutura do complexo covalente presente no cristal, o oxianion resultante do ataque da Ser132 à carbonila ativada do inibidor BILC 821 interage por meio de uma ligação de hidrogênio com a amida da cadeia principal da Arg165 (cavidade do oxianion). Além disto, o resíduo Arg165 participa da formação do sítio S<sub>3</sub> pela ligação de hidrogênio do grupo guanidino de sua cadeia lateral com o oxigênio da carbonila da cadeia principal do resíduo P<sub>2</sub> (Figura 28b). Estas interações foram reproduzidas nas simulações de DM. Entretanto, nos modelos **DI** e **M-I** a ligação de hidrogênio entre a cadeia lateral da Arg165 e o oxigênio da cadeia principal de P<sub>2</sub> é mediada por uma molécula de água.

Para verificar a estabilidade da ligação hidrogênio entre o oxianion e o nitrogênio da cadeia principal da Arg165 nas formas dimérica e monomérica da protease, antes e após a formação do aduto covalente, a distância e ângulos para esta interação foram monitorados ao longo da trajetória dos modelos **DI**, **D-I**, **MI** e **M-I**. O ângulo é definido pelo oxianion, hidrogênio e nitrogênio da amida da cadeia principal da Arg165. A distância média calculada foi de 3,0 Å em **DI**, 2,8 Å em **D-I**, 2,9 Å em **MI** e 2,8 Å em **M-I**. A Figura 29 mostra a distribuição dos valores obtidos para o ângulo analisado para os estados dimérico (**DI** e **D-I**) e monomérico (**MI** e **M-I**) dos complexos. Apesar dos complexos nos estados dimérico e monomérico, antes e após a formação do aduto covalente, apresentarem praticamente a mesma distância média, o ângulo que define esta ligação de hidrogênio apresentou uma distribuição com ângulos mais lineares para **D-I** quando comparada a **DI**, **MI** e **M-I**. Nossos resultados sugerem que a forma dimérica da protease é capaz de reorientar os átomos da cadeia principal da Arg165 ao

longo da reação e, assim, atuar de forma mais eficiente na estabilização do estado de transição e intermediário tetraédrico.

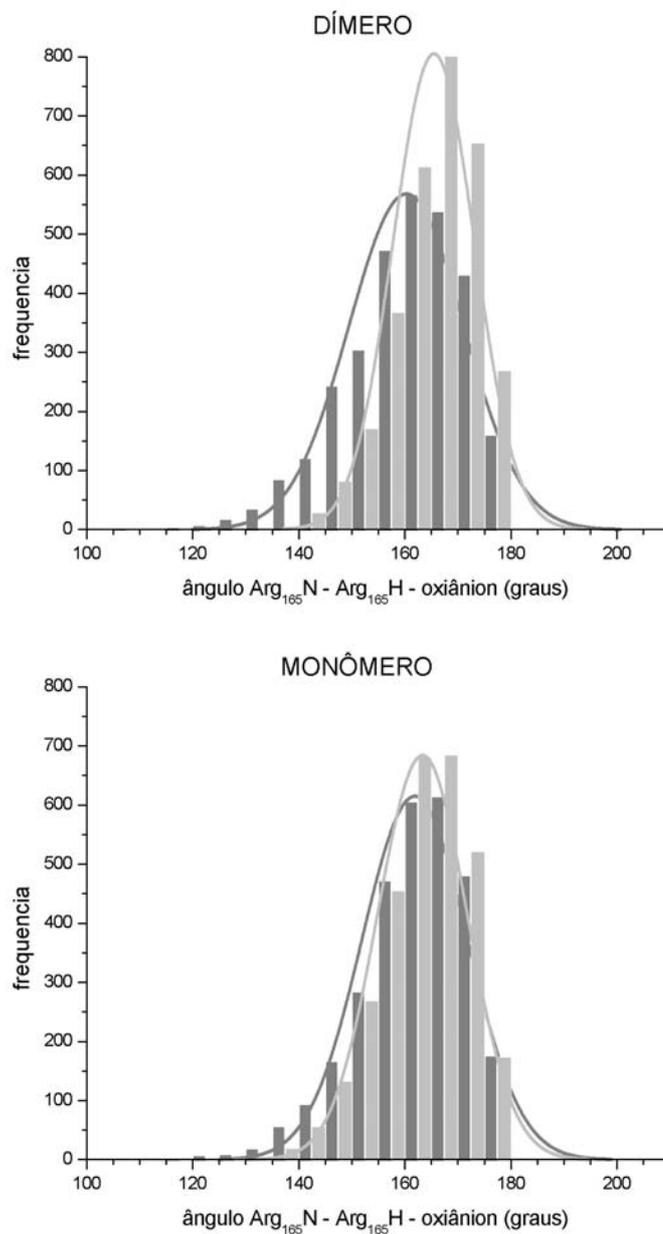


Figura 29: Distribuição do ângulo Arg<sub>165</sub>N-Arg<sub>165</sub>H-oxiânion ao longo das simulações de DM para os estados dimérico e monomérico dos complexos protease-inibidor não covalente (cinza) e covalente (cinza claro).

Visando identificar os resíduos que mais contribuem para as interações inibidor-protease e formação dos sítios de interação, as componentes eletrostática e de van der Waals por resíduo foram calculadas. As interações eletrostáticas e de van der Waals, obtidas pela média de trinta estruturas selecionadas a cada 50 ps nos 1,5 ns finais das trajetórias de **DI**, **D-I**, **MI**, e **M-I**, foram realizadas entre cada resíduo da proteína e o grupo de átomos composto pela díade catalítica, Ser132 e His63, e o inibidor (Figuras 30 e 31).

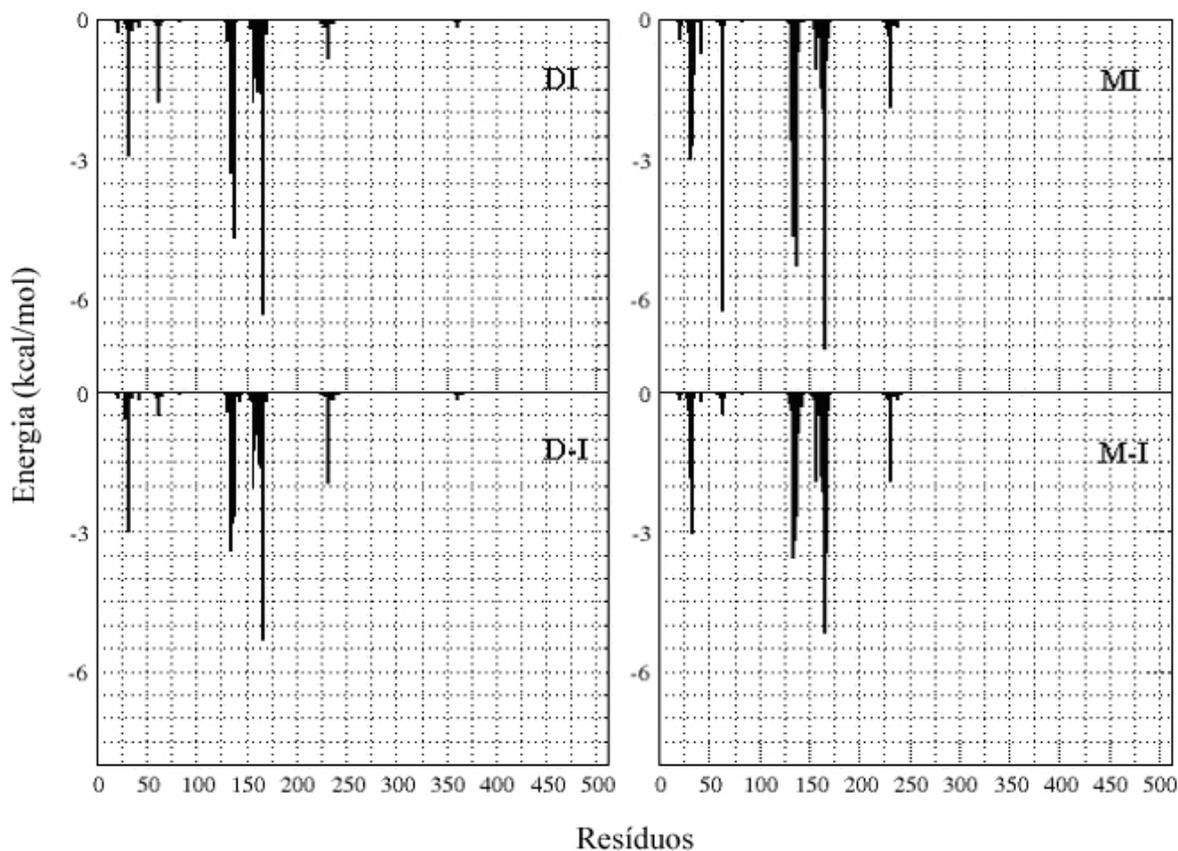


Figura 30: Energia de interação de van der Waals de cada resíduo com o subsistema composto pelos resíduos Ser132 e His63 e os átomos do inibidor.

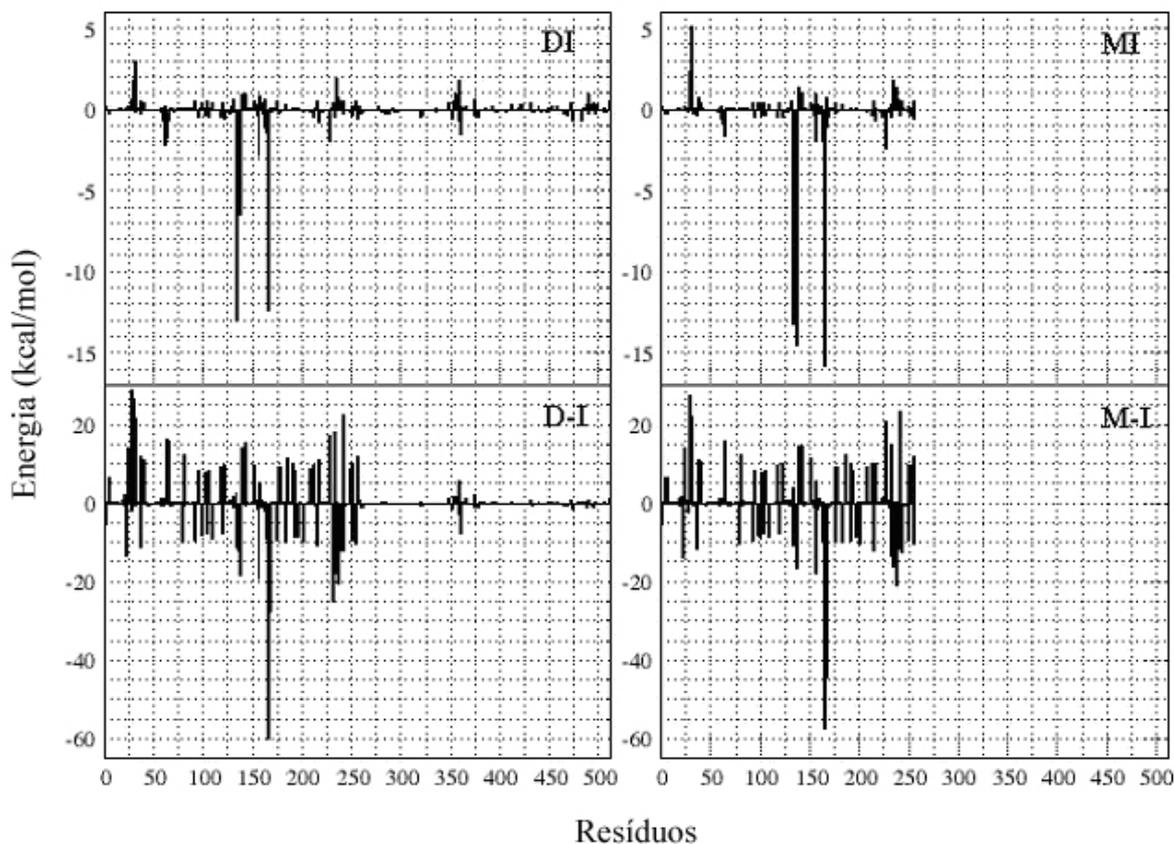


Figura 31: Energia de interação eletrostática de cada resíduo com o subsistema definido pelos resíduos Ser132 e His63 e os átomos do inibidor.

Nos modelos **DI** e **MI**, a decomposição energética identificou os resíduos Glu31 e Leu32 da alça L2, Asn62 da alça L4, Leu133 e Ser134 da fita  $\beta$ 5, Ser135, Arg136 e Arg137 da alça L9, e Arg165 e Arg166 da alça L10 como os que mais contribuem através de interações de van de Waals. Os resíduos Leu32, Leu133, Arg165 e Arg166 constituem o sítio  $S_1$ , enquanto que Glu31, Arg137, Arg165, Ser135 e Arg166 formam

o sítio S3. Estes sítios são conectados formando uma larga depressão na superfície da protease e foram somente observados no estado complexado da enzima.

As contribuições de van der Waals por resíduo calculadas foram muito semelhantes para os modelos **DI** e **MI**, exceto para os resíduos Asn62 e Leu231, cujas contribuições foram maiores em **MI**. Como mostrado na Figura 32, devido à ausência das interações proteína-proteína, a forma monomérica da protease não possui a hélice  $\alpha F$  na mesma orientação encontrada no estado dimérico. A distância calculada entre o átomo  $C\alpha$  do resíduo Met229 da hélice  $\alpha F$  e o átomo  $C\alpha$  da Ser132 é de 18,3 Å em **DI** e 14,6 Å em **MI**; no estado monomérico, a hélice  $\alpha F$  é cerca de 4,0 Å mais próxima da fita  $\beta 5$ , que contém a serina catalítica Ser132. Como consequência, o resíduo Leu231 da alça L15, diretamente conectada à hélice  $\alpha F$ , interage de forma mais favorável com o resíduo hidrofóbico  $P_1'$  em **MI** (Figura 32). É importante notar que devido à esta interação, o resíduo  $P_1'$  adota uma conformação diferente em **MI**. O resíduo Asn62, que faz parte do sítio de interação  $S_1'$ , é conservado em todas as proteases dos  $\beta$ -herpesvírus [Holwerda, 1997; Gibson, 1995]. Especula-se que sua cadeia lateral pode interagir via ligação de hidrogênio com a cadeia lateral do resíduo de serina da posição  $P_1'$  do substrato natural. Nossa decomposição energética mostrou que o resíduo Asn62 interage mais fortemente com o inibidor em **MI** do que em **DI**. O reposicionamento da hélice  $\alpha F$ , que propicia a formação de uma ligação de hidrogênio entre os resíduos Asp227 e Asn62, e a conformação alternativa do resíduo  $P_1'$  em **MI** fortalecem a interação do inibidor com Asn62. Nenhuma diferença relevante entre **D-I** e **M-I** foi observada para as contribuições de van der Waals por resíduo.

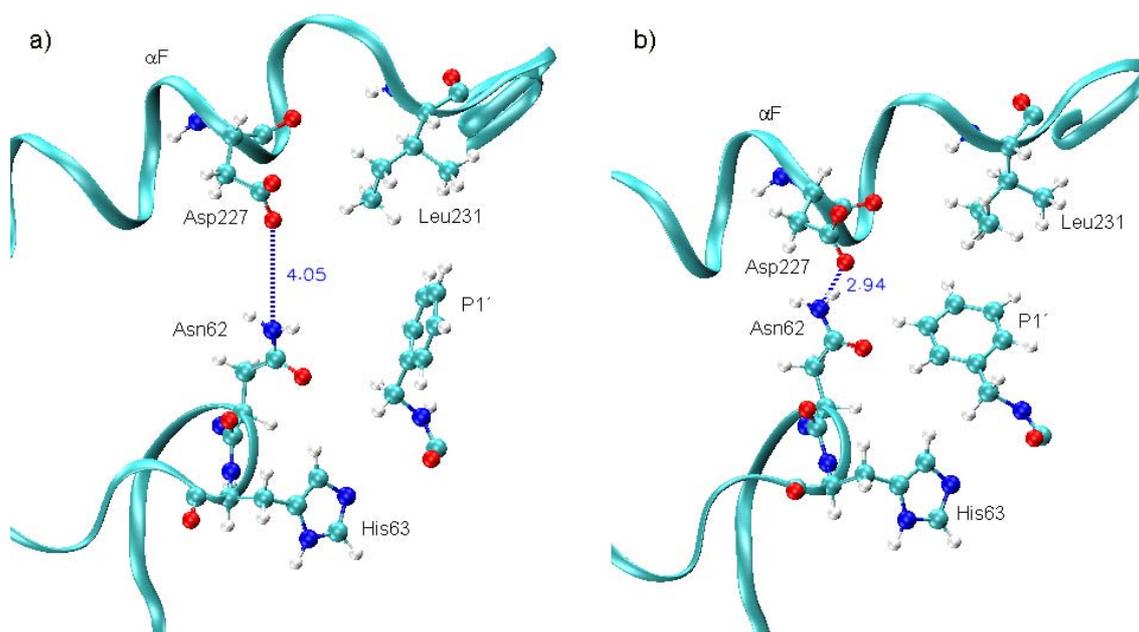


Figura 32: Representação dos resíduos Asn62, His63, Asp227, Leu231 e P1' do inibidor. A linha tracejada azul indica a distância entre as cadeias laterais dos resíduos Asn62 e Asp227. a) **DI** e b) **MI**.

A decomposição por resíduo da energia de interação eletrostática para **DI** e **MI** é muito semelhante. Ambas identificaram os resíduos Leu133 e Ser134 na fita  $\beta_5$ , Ser135 e Arg137 na alça L9 e Arg165 na alça L10 como aqueles que mais contribuem. Por outro lado, os modelos **D-I** e **M-I** apresentaram resultados bem distintos para alguns resíduos. Os resíduos Arg137, Arg165 (que estabiliza o oxiânion), Arg232 e Arg234 contribuem menos para a estabilização do complexo covalente em **M-I**. Na estrutura cristalográfica do dímero da protease complexada covalentemente ao inibidor BILC 821, pode-se observar no sítio  $S_3$  pontes salinas entre os resíduos Glu31, Arg137 e Arg165. Estas interações foram bem caracterizadas nas simulações de DM do modelo **D-I** (Figura 33a), mas não em **M-I**, onde tais resíduos adotam conformações alternativas (Figura 33b).

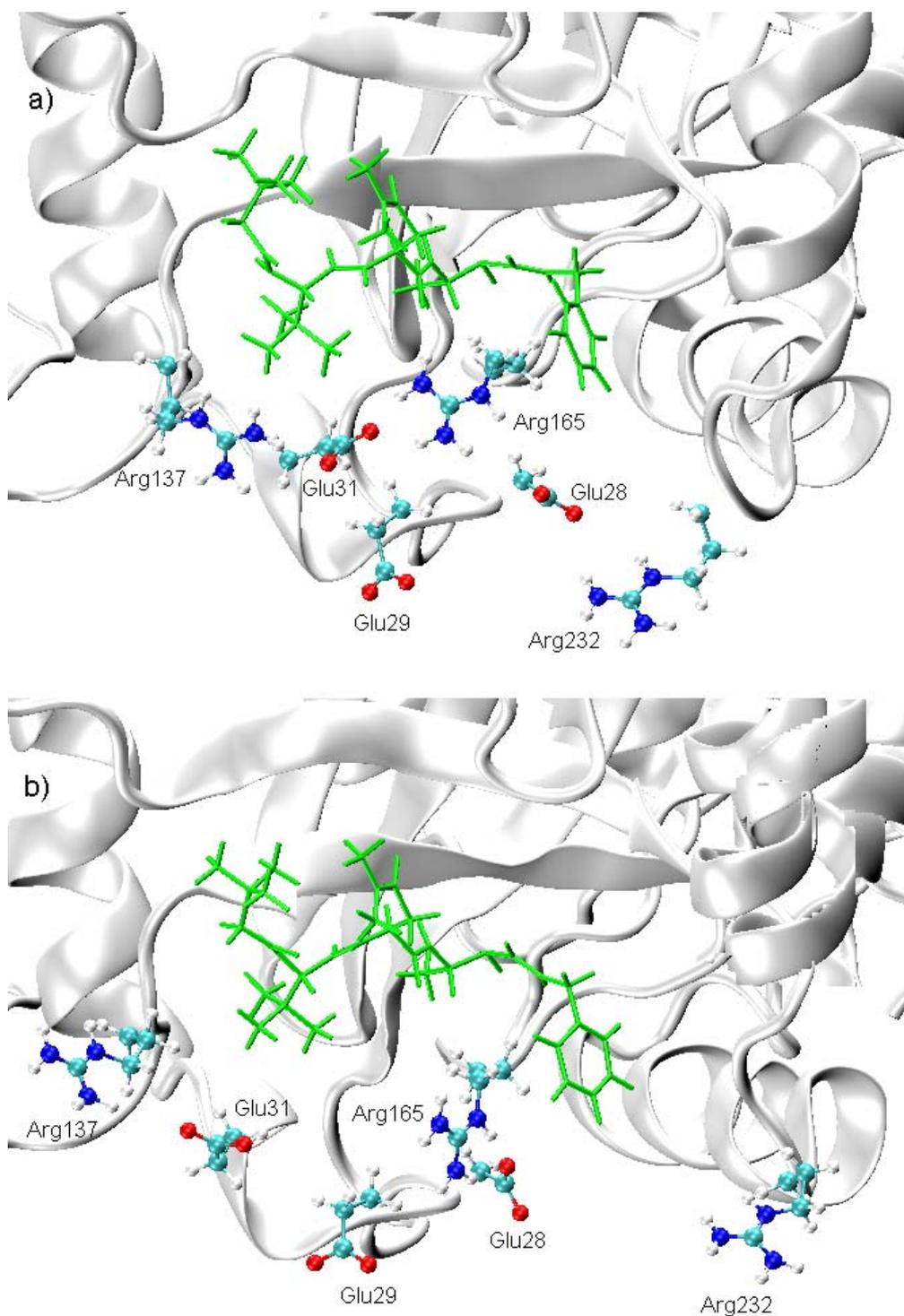


Figura 33: Representação em *Ball Stick* das cadeias laterais dos resíduos Glu28, Glu29, Glu31, Arg137, Arg165 e Arg232. Os resíduos Glu31, Arg137 e Arg165 pertencem ao sítio  $S_3$ . A molécula em verde corresponde ao inibidor peptídil de carbonila ativada complexado à protease. a) modelos **D-I**, e b) modelo **M-I**.

No dímero da protease, além das interações entre Glu31 e Arg137 e Arg165 (os resíduos Glu31 e Arg137 são altamente conservadas nas subfamílias  $\alpha$  e  $\beta$  dos herpesvírus), o resíduo Arg232, presente na alça L15 que conecta as hélices  $\alpha F$  e  $\alpha G$ , interage com os ácidos glutâmicos Glu28 e Glu29. Entretanto, no monômero da protease, a nova orientação adotada pelas hélices de interface impossibilita a interação de Arg232 com Glu28 e Glu29. Como consequência, os resíduos Glu28 e Glu29 passam a perturbar as pontes salinas entre os resíduos Glu31, Arg137 e Arg165. Desta forma, apesar das formas dimérica e monomérica contribuírem de maneira similar para a estabilização do complexo não covalente, nossos resultados indicam que a inatividade catalítica do monômero da protease está associada a desestabilização eletrostática de seu intermediário tetraédrico.

##### 5. Cálculo do Caminho de Reação de Mínimo de Energia.

As estruturas otimizadas dos sistemas QM/MM  $DI_{ESQ1}$ ,  $DI_{ESQ2}$  e  $MI_{ESQ1}$  foram utilizadas como ponto de partida para o cálculo do caminho de reação para a formação do intermediário tetraédrico nas formas dimérica e monomérica da protease do HCMV. As coordenadas de reação iniciais correspondentes a estas estruturas foram 3,99 Å para os modelos  $DI_{ESQ1}$  e  $DI_{ESQ2}$ , e 3,98 Å para o modelo  $MI_{ESQ1}$ . O caminho de energia mínima foi mapeado variando o valor inicial da coordenada de reação (RC) em incrementos de -0.02 Å e realizando sucessivas minimizações da energia potencial nos pontos gerados. Para manutenção do valor desejado da coordenada de reação nos procedimentos de minimização de energia, uma constante de força de 5000 kcal.mol<sup>-1</sup>.Å<sup>-2</sup> foi utilizada no método ERESO. Um total de 202 e 241 pontos foram

utilizados para a construção do perfil da energia potencial ao longo da coordenada de reação no dímero e no monômero, respectivamente.

Os perfis de energia potencial (Figura 34) foram calculados utilizando o esquema de partição ESQ1 nas formas dimérica e monomérica da protease. A reação ocorre a partir dos reagentes em direção ao intermediário tetraédrico passando por um máximo na curva de energia potencial, correspondente ao estado de transição da reação.

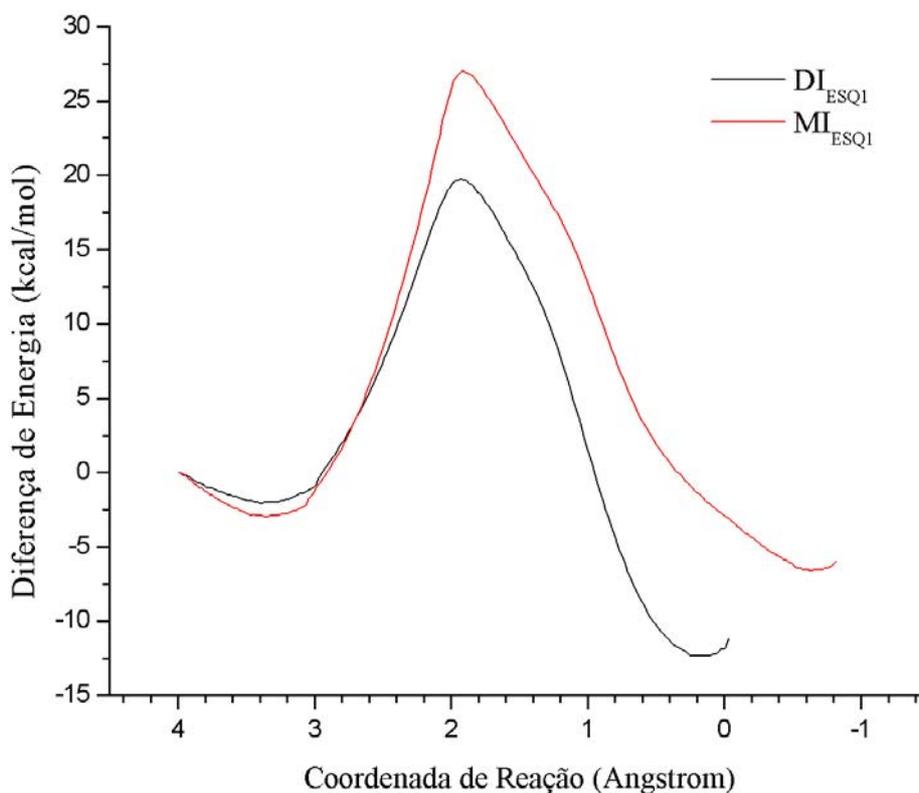


Figura 34: Caminho de reação para a formação do intermediário tetraédrico entre o inibidor peptídil de carbonila ativada e a protease nas formas dimérica (preto) e monomérica (vermelha).

Nos cálculos AM1/AMBER, os reagentes, estado de transição e produto possuem os seguintes valores para a coordenada de reação: 3,39, 1,93 e 0,19 Å para o dímero e 3,36, 1,92 e -0,66 Å para o monômero. Os valores das coordenadas de reação para o reagente e o estado de transição são quase os mesmos para as formas dimérica e monomérica da enzima, mas consideravelmente diferentes para o produto. A principal diferença pode ser observada na orientação final adotada pelos resíduo de histidina e serina da região QM. A distância entre os átomos OG da Ser132 (átomo de oxigênio da cadeia lateral) e o HG da His63 (o hidrogênio HG, originalmente na Se132, foi transferido para o nitrogênio NE2 da His63) é 2,33 Å no dímero e 3,12 Å no monômero da protease, respectivamente.

A Figura 34 revela que a reação é 5,7 kcal/mol mais exotérmica para o dímero que o monômero. Como discutido na seção anterior, as interações eletrostáticas entre a proteína e o inibidor são mais favoráveis em **D-I** do que em **M-I**. A barreira de energia calculada é de 21,9 e 30,0 kcal/mol para as formas dimérica e monomérica, respectivamente. Através da teoria do estado de transição (equação 20), onde R é a constante dos gases ideais, T é a temperatura, e  $\Delta G^\ddagger$  é a diferença de energia livre<sup>2</sup> entre o estado de transição e o reagente, temos que a reação de conversão de **DI** em **D-I** é da ordem de  $10^6$  mais rápida que a conversão de **MI** em **M-I**.

$$\frac{k_{\text{monômero}}}{k_{\text{dímero}}} = e^{-\frac{(\Delta G_{\text{monômero}}^\ddagger - \Delta G_{\text{dímero}}^\ddagger)}{RT}} \quad \text{Equação 20}$$

<sup>2</sup>Assume-se que, para uma dada temperatura e pressão, a variação de entropia na reação de formação do complexo covalente inibidor-protease é muito semelhante no dímero e no monômero. Assim,

$$\Delta\Delta G^\ddagger = \Delta G_{\text{monômero}}^\ddagger - \Delta G_{\text{dímero}}^\ddagger = \Delta H_{\text{monômero}}^\ddagger - T\Delta S_{\text{monômero}}^\ddagger - \Delta H_{\text{dímero}}^\ddagger + T\Delta S_{\text{dímero}}^\ddagger \cong \Delta H_{\text{monômero}}^\ddagger - \Delta H_{\text{dímero}}^\ddagger$$

## 6. Correção da Contribuição QM.

Para verificar os efeitos da correlação eletrônica na região QM ao longo do caminho de energia mínima obtido no esquema AM1/AMBER, a contribuição quantomecânica foi recalculada em diferentes níveis teóricos e seu valor corrigido aplicado ao valor total da energia potencial QM/MM [Ranaghan, 2004; Ranaghan, 2003; Ridder, 2003; Mulholland, 2000]. Vale ressaltar que este procedimento apenas corrige a parcela QM e não inclui a interação com os átomos da região MM no nível mais elevado de teoria. Devido ao custo computacional, este procedimento foi aplicado em pontos selecionados a cada 0,2 Å no caminho de reação, resultando em um total de 21 pontos para o dímero (modelos  $\mathbf{DI}_{\text{ESQ1}}$  e  $\mathbf{DI}_{\text{ESQ2}}$ ) e 25 pontos para o monômero (modelo  $\mathbf{MI}_{\text{ESQ1}}$ ) da protease. Em cada ponto selecionado, a região QM é retirada do ambiente da enzima e submetida a cálculos de energia. Átomos de hidrogênio foram adicionados aos átomos QM da fronteira QM/MM na mesma posição dos átomos *Link* considerados nos cálculos QM/MM, ou seja, sobre a ligação covalente existente entre os átomos de fronteira QM e MM e a uma distância de 1 Å do átomo QM. A Figura 35 abaixo exemplifica o procedimento descrito acima.

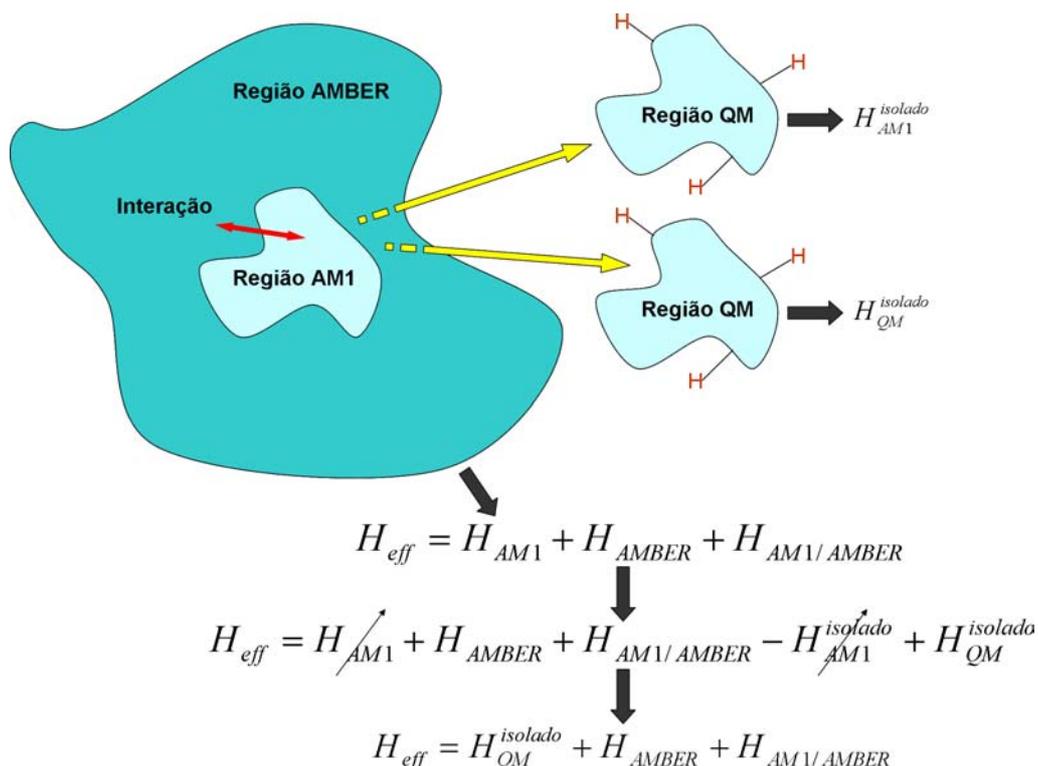


Figura 35: Ilustração do procedimento de correção da parcela quântomecânica do Hamiltoniano efetivo  $H_{eff}$ . Em vermelho, estão representados os átomos *Links* adicionados aos átomos QM da fronteira QM/MM região.

Por exemplo, no esquema de partição ESQ1 o cálculo da contribuição QM envolve os 33 átomos da região QM e todos os átomos *link*, no caso 4 átomos de hidrogênio (Figura 36).

As contribuições quântomecânicas do sistema definido na Figura 36 nas diferentes geometrias selecionadas ao longo da coordenada de reação foram calculadas utilizando métodos baseados na teoria Hartree-Fock, na teoria do funcional de densidade e na teoria de perturbação Moller-Plesset. Em cada ponto selecionado, a contribuição QM foi corrigida subtraindo-se a parcela AM1 da energia potencial total QM/MM e adicionando-se o valor calculado nos diferentes níveis teóricos. Entretanto, este procedimento só é aplicável se as estruturas do sistema QM, ao longo do caminho

mínimo de reação obtido pelo método AM1/AMBER, forem semelhantes às estruturas obtidas em um diferente nível de teoria. Nossos resultados mostraram que isto é verdade somente para os métodos baseados na teoria Hartree-Fock.

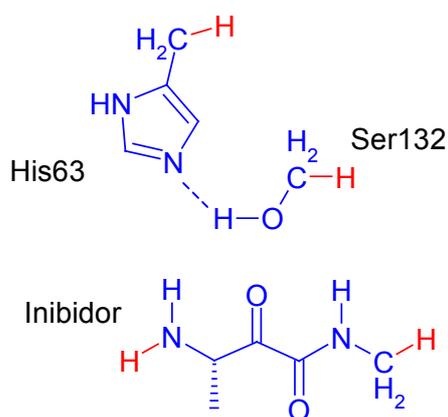


Figura 36: O sistema utilizado no cômputo da contribuição puramente quantomecânica no esquema ESQ1 compreende os 33 átomos da região QM (em azul) e os átomos *Link* (em vermelho), no caso 4 átomos de hidrogênio.

A Figura 37 mostra o perfil obtido para a contribuição puramente quantomecânica ao longo da coordenada de reação calculada pelo método Hartree-Fock usando diferentes bases. Apenas os valores referentes ao caminho de reação obtido para o dímero da protease estão representados na Figura 37. Resultados semelhantes foram encontrados para a forma monomérica da enzima. Estes valores foram então utilizados na correção do perfil da energia potencial total QM/MM.

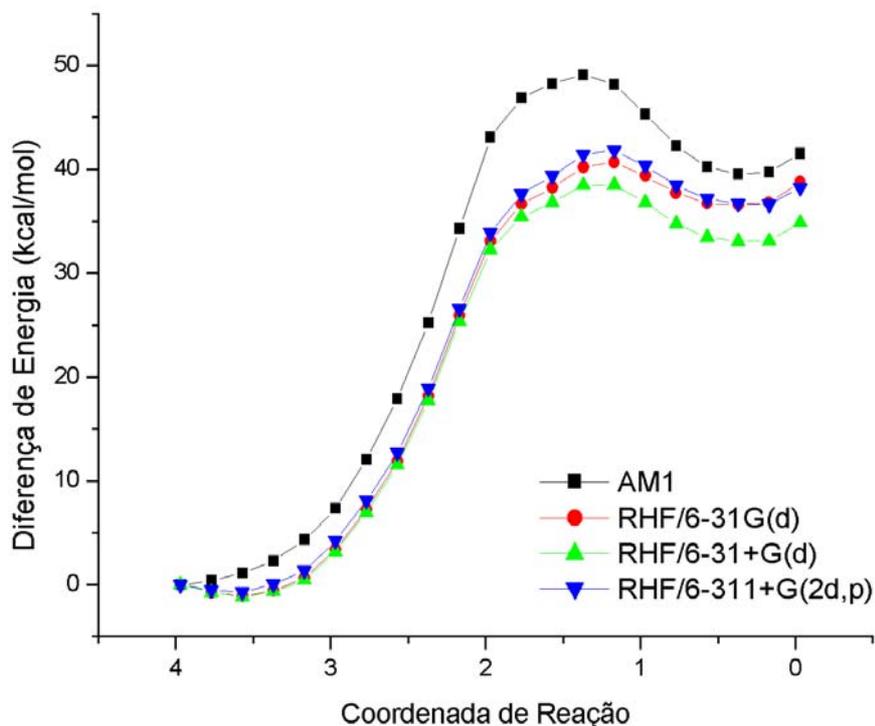


Figura 37: Variação da contribuição quantomecânica ao longo da coordenada de reação calculada pelo método Hartree-Fock usando diferentes bases. O perfil mostrado foi obtido a partir dos pontos extraídos do caminho de reação calculado no dímero da protease.

Note que sem o ambiente da enzima o estado de transição caracterizado no esquema AM1/AMBER em 1,93 Å é deslocado para a direita na coordenada de reação em todos os níveis teóricos considerados, e possui um valor de 1,37 Å com AM1 e 1,17 Å com o método Hartree-Fock. Para o produto, o valor de 0,19 Å obtido com AM1/AMBER muda para 0,37 Å em todos os níveis e a reação passa a ser endotérmica. Finalmente, a Figura 37 mostra que a forma cataliticamente ativa da enzima contribui com cerca de

45-50 kcal/mol na estabilização do complexo tetraédrico, e com cerca de 20-30 kcal/mol na estabilização do estado de transição.

A próxima etapa consistiu na correção da contribuição QM do perfil AM1/AMBER nos pontos selecionados ao longo do caminho mínimo de reação. Deste ponto em diante, a análise dos resultados será realizada utilizando o perfil QM/MM corrigido a nível RHF/6-311+G(2d,p), denominado RHF/6-311+G(2d,p)//AM1/AMBER. A Figura 38 mostra o perfil da energia potencial total QM/MM corrigido para as formas dimérica e monomérica da protease, e uma comparação entre as energias obtidas antes e após correção é listada na Tabela 1.

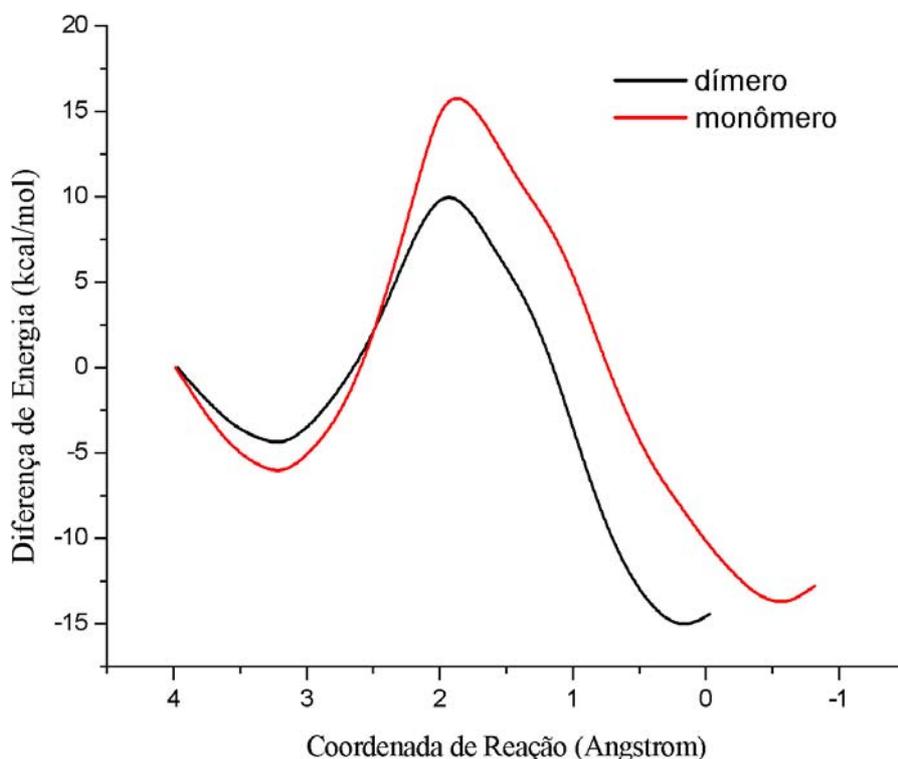


Figura 38: Caminho de reação para a formação do intermediário tetraédrico entre o inibidor peptídil de carbonila ativada e a protease nas formas dimérica (preto) e monomérica (vermelha) calculado a nível RHF/6-311+G(2d,p)//AM1/AMBER.

Tabela 1: Energias em kcal/mol do reagente, estado de transição e produtos obtidas nos cálculos AM1/AMBER e RHF/6311+G(2d,p)//AM1/AMBER para o dímero e o monômero da protease.<sup>a</sup>

	AM1/AMBER	RHF/6311+G(2d,p)//AM1/AMBER
Dímero		
Reagente	-2,1 (3,39)	-4,5 (3,17)
Estado de transição	19,8 (1,93)	10,5 (1,97)
Produto	-12,3(0,19)	-15,3 (0,17)
$\Delta E^\ddagger$	21,9	15,0
Monômero		
Reagente	-3,0 (3,36)	-6,3 (3,18)
Estado de transição	27,0 (1,93)	16,0 (1,98)
Produto	-6,6 (-0,64)	-13,9 (-0,62)
$\Delta E^\ddagger$	30,0	22,3

<sup>a</sup>As coordenadas de reação referente a cada estado correspondem aos valores entre parênteses.

No perfil corrigido RHF/6-311+G(2d,p)//AM1/AMBER, os reagentes, estado de transição e produto tiveram suas coordenadas de reação alteradas para 3,17, 1,97 e 0,17 Å no dímero e 3,18, 1,98 e -0,62 Å no monômero; estes valores são muito próximos aos observados no esquema AM1/AMBER. Após a correção QM, a reação no dímero passa a ser apenas 1,4 kcal/mol mais exotérmica que no monômero e a barreira de energia passa de 21,9 para 15 kcal/mol no dímero e de 30,0 para 22,3 no monômero. Com os

novos valores de  $\Delta E^\ddagger$  calculados, a conversão de **DI** em **D-I** passa a ser da ordem de  $10^5$  mais rápida que a conversão de **MI** em **M-I**.

Como discutido anteriormente, nossos estudos de DM indicaram que apesar das duas formas da protease, dimérica e monomérica, contribuírem de maneira similar para a estabilização do complexo não covalente, as conformações preferencias adotadas pelo monômero da protease são responsáveis pela desestabilização eletrostática do estado de transição e intermediário tetraédrico. Assim, nossos resultados indicam que, frente ao substrato natural, as formas dimérica e monomérica apresentam valores próximos de  $K_M$  e que a inatividade catalítica do monômero da protease estaria diretamente relacionada com a etapa de reação.

#### 7. Reação de Formação do Complexo Tetraédrico Inibidor-Enzima.

O caminho de reação calculado para as formas dímérica e monomérica da protease utilizando o esquema de partição ESQ1 foi projetado em um diagrama bidimensional em termos das coordenadas mostradas na Figura 39 . No diagrama representado, o eixo horizontal corresponde à distância entre o carbono da carbonila ativada do inibidor e o átomo de oxigênio do resíduo Ser132 (inibidorC-Ser<sub>132</sub>OG), enquanto que o eixo vertical corresponde à distância entre o hidrogênio HG e oxigênio OG da Ser132 (Ser<sub>132</sub>HG-Ser<sub>132</sub>OG). A Figura 40 mostra as estruturas finais otimizadas para os reagentes, estado de transição e produto obtidas a partir do perfil RHF/6-311+G(2d,p)//AM1/AMBER para o dímero e monômero da protease.

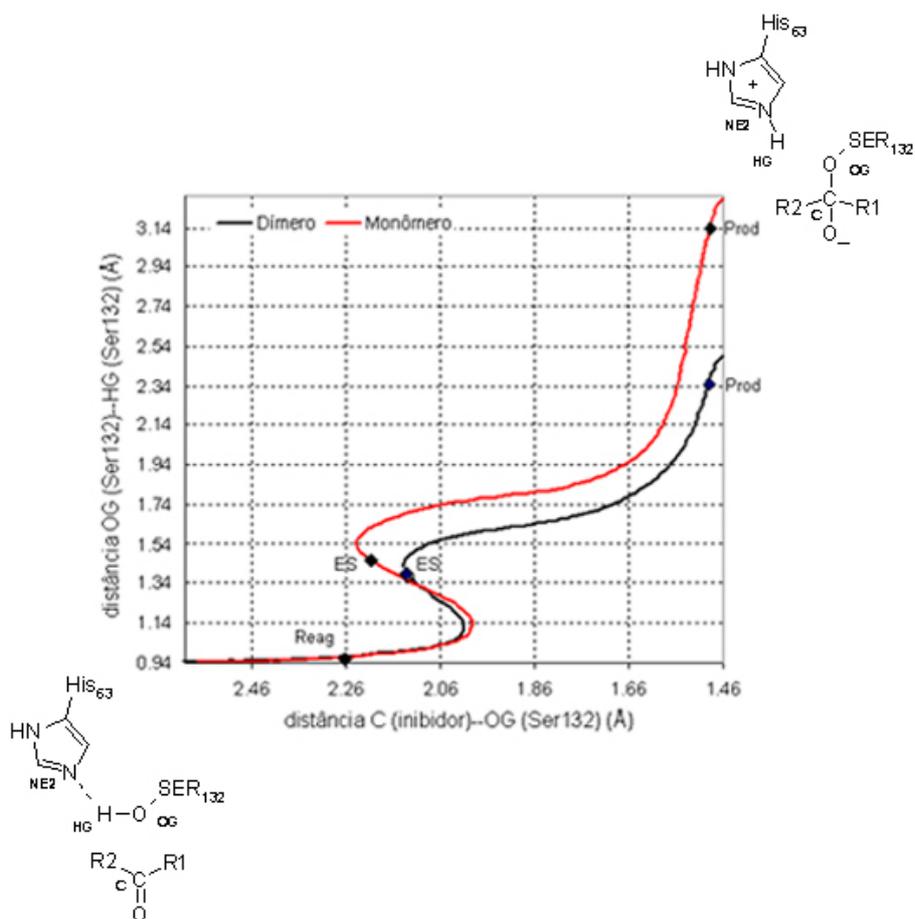


Figura 39: Representação bidimensional da variação das distâncias Ser<sub>132</sub>HG-Ser<sub>132</sub>OG e inibidorC-Ser<sub>132</sub>OG na reação na formação do complexo covalente inibidor-protease.

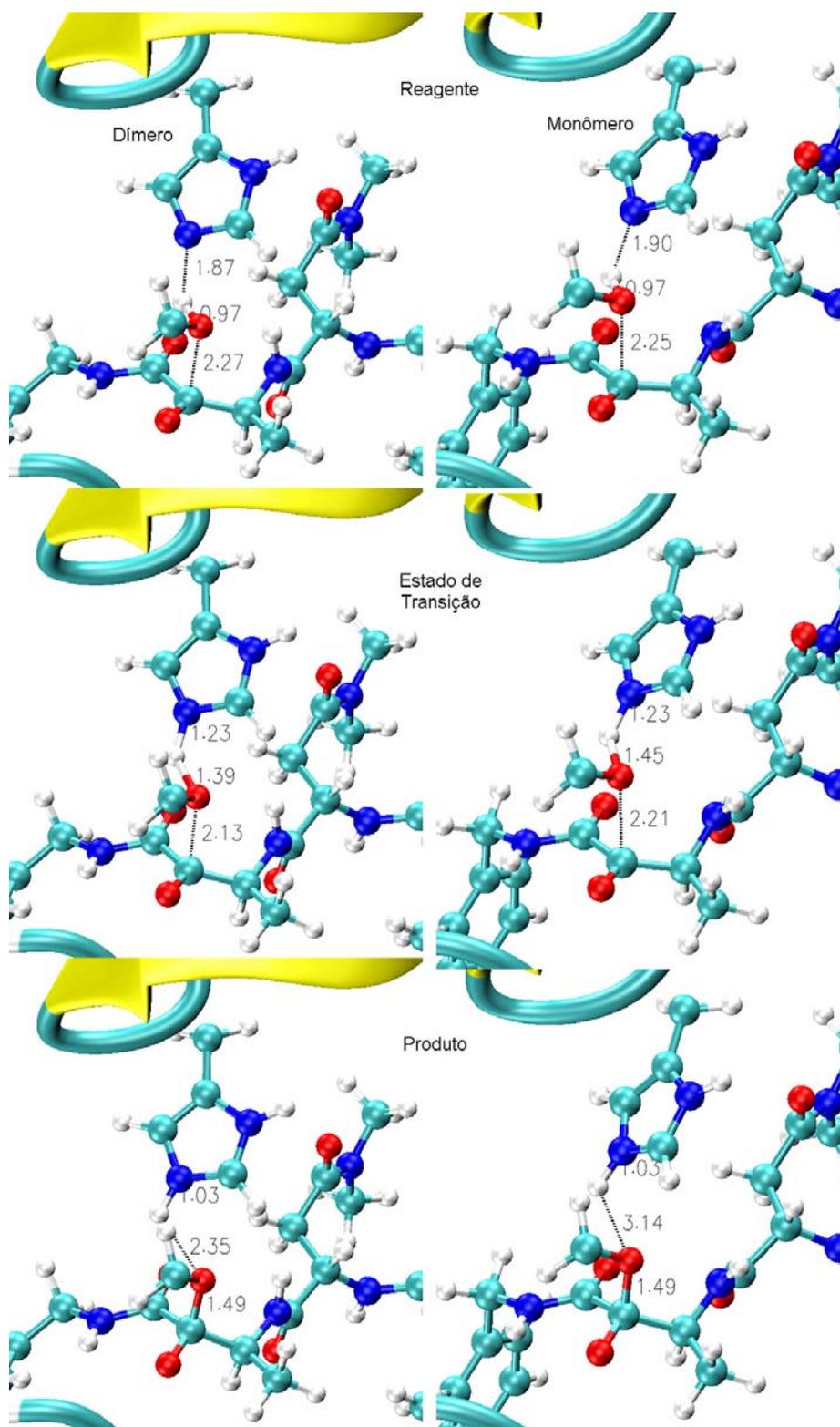


Figura 40: Estruturas finais otimizadas para o reagente, estado de transição e produto obtidas do perfil RHF/6-311+G(2d,p)//AM1/AMBER para o dímero e o monômero da protease.

Como pode ser visto na Figura 40, os parâmetros geométricos utilizados na coordenada de reação assumem praticamente os mesmos valores para os reagentes nas duas formas da enzima. O oxigênio nucleofílico OG da Ser132 encontra-se a 2,27 e 2,25 Å do carbono da carbonila ativada do inibidor no dímero e no monômero da protease, respectivamente. O comprimento da ligação Ser<sub>132</sub>HG-Ser<sub>132</sub>OG possui o mesmo valor em ambos os modelos. Porém, o átomo de nitrogênio NE2 do anel imidazol da His63 encontra-se 0,03 Å mais próximo do próton HG no dímero.

Na Figura 39, é interessante notar que para os valores de distância inibidorC-Ser<sub>132</sub>OG entre 2,27-2,00 Å (dímero) e 2,25-1,99 Å (monômero), o ataque nucleofílico do oxigênio OG à carbonila ativada do inibidor ocorre de forma simultânea à transferência do próton HG para o nitrogênio NE2. Entretanto, para valores inferiores a ca. 2,00 Å na coordenada inibidorC-Ser<sub>132</sub>OG, a migração do hidrogênio HG passa a ocorrer concomitantemente a um pequeno aumento para a distância inibidorC-Ser<sub>132</sub>OG. No intervalo de 1,10-1,45 Å para a coordenada Ser<sub>132</sub>HG-Ser<sub>132</sub>OG, a distância inibidorC-Ser<sub>132</sub>OG aumenta cerca 0,13 e 0,24 Å para o dímero e monômero da protease, respectivamente. Na forma dimérica, a partir dos valores 2,13 e 1,39 Å para as distâncias inibidorC-Ser<sub>132</sub>OG e Ser<sub>132</sub>HG-Ser<sub>132</sub>OG, que caracterizam o estado de transição da reação, a transferência do próton volta a ocorrer com o ataque nucleofílico. Entretanto, observou-se no monômero que a distância inibidorC-Ser<sub>132</sub>OG aumenta cerca de 0,03 Å após o estado de transição ter sido atingido, e que o ataque nucleofílico concomitante a transferência do próton só volta a ocorrer para distâncias inibidorC-Ser<sub>132</sub>OG inferiores a 2,24 Å e Ser<sub>132</sub>HG-Ser<sub>132</sub>OG superiores a 1,53 Å. Nos pontos onde as distâncias inibidorC-Ser<sub>132</sub>OG correspondem a 1,64 Å no dímero e no monômero, o próton HG se encontra praticamente transferido para His63, apresentando

uma distância de ca. 1,1 Å entre o hidrogênio HG e o nitrogênio NE2 do anel imidazol. A grande variação em Ser<sub>132</sub>HG-Ser<sub>132</sub>OG para valores de distância inibidorC-Ser<sub>132</sub>OG menores que 1,64 Å ocorre principalmente devido ao reposicionamento do resíduo His63 no final da reação. No produto otimizado, o complexo covalente apresentou a mesma distância de equilíbrio para as ligações formadas entre o oxigênio OG da Ser132 e o carbono da carbonila ativada do inibidor e entre o átomo de hidrogênio HG e o nitrogênio NE2 da His63. Porém, a distância Ser<sub>132</sub>HG-Ser<sub>132</sub>OG é consideravelmente mais longa para o monômero que para o dímero (Figura 40).

#### 8. Estabilização Eletrostática QM/MM.

A Figura 41 mostra a componente eletrostática do termo referente a interação entre as regiões QM e MM ( $QM/MM_{ELE}$ ) ao longo da coordenada de reação. A componente eletrostática QM/MM foi obtida subtraindo-se da energia potencial total QM/MM os termos de energia QM e MM, e o termo responsável pela interação de van der Waals entre os átomos da região QM e MM.

A comparação direta entre os perfis obtidos para contribuição  $QM/MM_{ELE}$  no caminho de reação revela que o dímero da protease é mais eficiente na estabilização eletrostática do estado de transição por aproximadamente 6,3 kcal/mol. Esta parcela contribui com cerca de 86% do valor total da redução da barreira de energia produzida pela forma dimérica da protease. Desta forma, nossos resultados sugerem que as alterações estruturais, oriundas da ausência das interações proteína-proteína no monômero da protease, induzem mudanças conformacionais nos resíduos presentes nas regiões próximas ao sítio ativo responsáveis pela desestabilização eletrostática do estado de transição formado na reação de acilação do substrato natural.

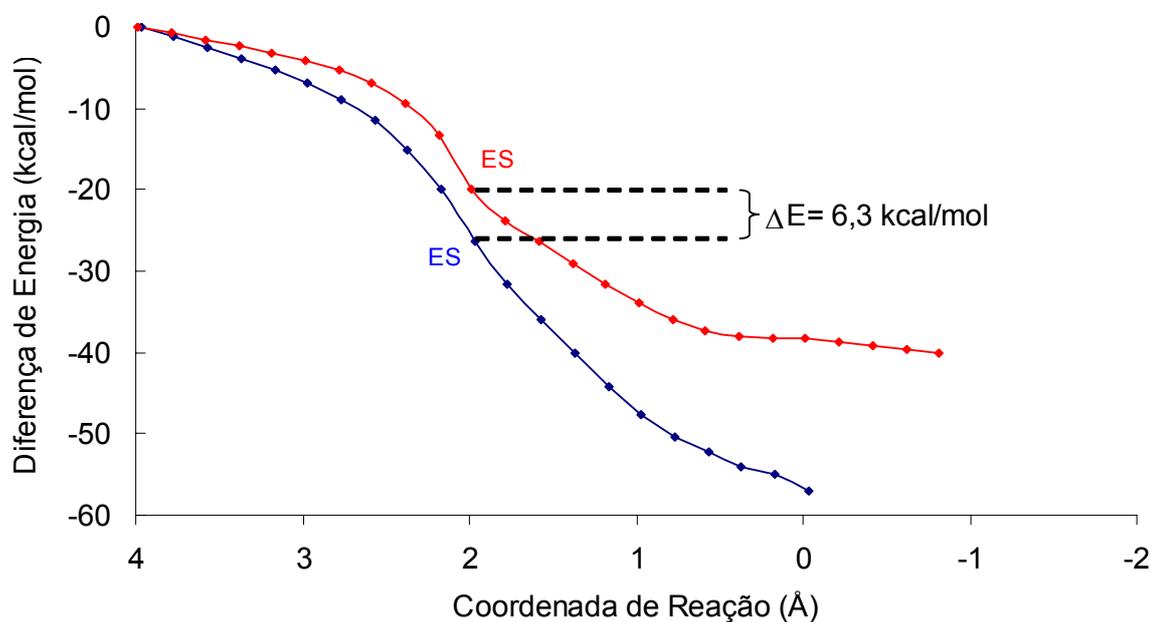


Figura 41: Perfis obtidos para contribuição QM/MM<sub>ELE</sub> no caminho mínimo de reação das formas dimérica (azul) e monomérica da protease.

No intuito de verificar o papel de cada resíduo na catálise, a componente eletrostática QM/MM<sub>ELE</sub> foi decomposta. A diferença entre as energias de interação obtidas no estado de transição e no reagente forneceram a contribuição eletrostática de cada resíduo da região MM para a barreira de reação. Valores negativos indicam que o resíduo contribui para a diminuição da barreira de reação, enquanto valores positivos indicam o contrário.

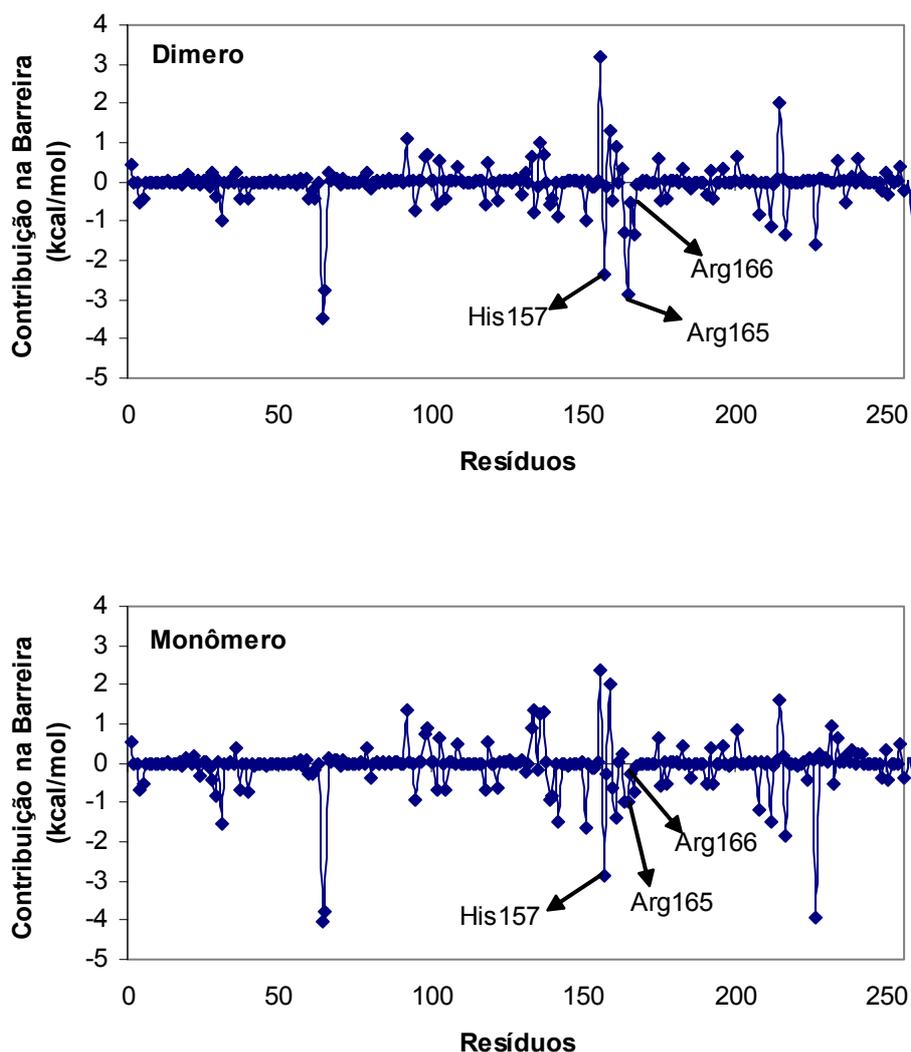


Figura 42: Contribuição eletrostática de cada resíduo na estabilização da barreira de energia da reação de formação do complexo tetraédrico inibidor-dímero da protease.

A Figura 42 mostra as contribuições eletrostáticas QM/MM por resíduo calculadas para o dímero e o monômero da protease. Os perfis obtidos para os dois estados da protease foram muito semelhantes, exceto para os resíduos Ser134, Lis156, His157, Ala159, Arg165, Arg167 e Asp227. Destes, os resíduos Lis156 e Asp227 diferem nas formas monomérica e dimérica apenas com relação à disposição das cadeias laterais, e não fornecem nenhuma informação relevante para a catálise. O resíduo His157, terceiro

membro da tríade catalítica, contribui de forma importante em ambas as formas da enzima na estabilização da barreira. Isto era esperado devido à ligação de hidrogênio com o resíduo His63, que torna-se mais forte com a transferência de próton da Ser132 para His63. Os resíduos Ser134, Ala159, Arg165 e Arg167 são os que mais contribuem para o aumento da barreira na forma monomérica. Os grupos CO e NH do resíduo Ala159 interagem por intermédio de ligações de hidrogênio com a cadeia principal do resíduo Ser132, sendo portanto de suma importância para orientação da serina nucleofílica Ser132 (Figura 43a). De forma similar, o resíduo Ser134 auxilia na manutenção da conformação cataliticamente ativa da protease interagindo com a cadeia principal da His157 (Figura 43a). Uma das diferenças mais significativas entre os perfis apresentados deve-se ao resíduo Arg165, que possui a maior contribuição para a redução da barreira no dímero. A Arg165 é estritamente conservada entre as proteases dos herpesvírus e atua na estabilização do intermediário tetraédrico formado através de ligações de hidrogênio com o grupo NH de sua cadeia principal. Os resultados também revelam que o resíduo Arg167 contribui de forma importante para a redução da barreira no dímero, auxiliando na estabilização eletrostática de longo alcance do oxianion formado (Figura 43b).

Enquanto estudos experimentais mostram que a mutação da Arg166 por uma alanina acarreta na completa perda da atividade catalítica da protease do HCMV, nossos resultados apontam apenas uma pequena contribuição deste resíduo para a redução da barreira no dímero. Experimentos de mutagenese devem ser interpretados com cuidado porque as conformações e interações observadas para o mutante podem ser diferentes daquelas para a forma nativa. Desta forma, a mutação Arg166Ala pode abolir a catálise não por causa da ausência de importantes interações entre o estado de transição e a Arg166 e sim pela perturbação que esta mutação causa nos resíduos vizinhos a ela.

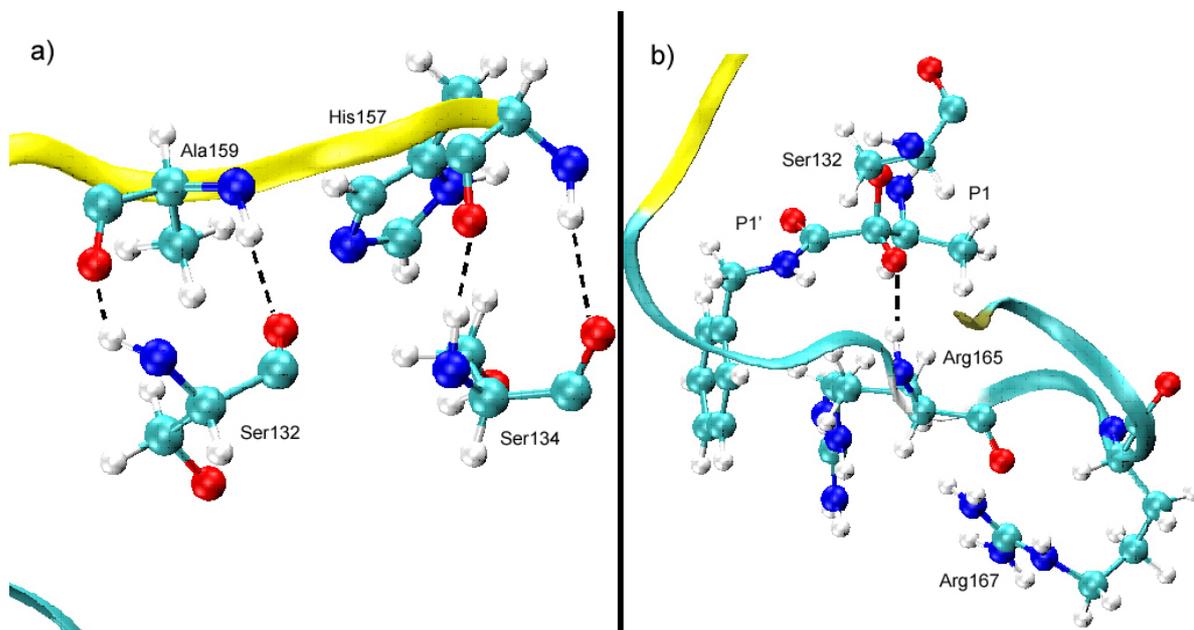


Figura 43: a) Interação entre os Ala159, Ser134 e os resíduos Ser132 e His157 da tríade catalítica. b) Interação entre os resíduos Arg165 e Arg167 e o complexo covalente tetraédrico inibidor-protease.

## 9. O Papel do Segundo Resíduo de Histidina na Tríade Catalítica.

Estudos de mutagênese e análise da estrutura cristalográfica identificaram nas proteases dos hespesvírus uma nova tríade catalítica onde o terceiro membro consiste em um resíduo de histidina, ao contrário das serinas proteases clássicas que possuem um resíduo de ácido aspártico ou ácido glutâmico nesta posição [Reling, 2000; Hoog, 1997; Qiu, 1997; Chen, 1996; Qiu, 1996; Shieh, 1996; Tong, 1996]. Apesar da tríade funcional (presente em todas as serinas proteases), composta pelos resíduos de serina e histidina, participar diretamente no mecanismo proposto de hidrólise de ligações peptídicas (Figura 9), o papel do terceiro resíduo da tríade catalítica continua uma

questão a ser respondida [Hedstrom, 2002; Fersht, 1999]. Três mecanismos de reação para a clivagem de ligações peptídicas, que diferem segundo o papel do terceiro resíduo da tríade na catálise, foram propostos na literatura. No primeiro, conhecido como transferência de próton única, um simples aumento da interação eletrostática entre o terceiro resíduo da tríade e o cátion imidazólio atuaria na estabilização do estado de transição e do intermediário tetraédrico formado [Bachovchin, 1985; Kossiakoff, 1981; Kossiakoff, 1980; Bachovchin, 1978; Robillard, 1974a; Robillard, 1974b]. No mecanismo de transferência de carga ou de transferência de próton dupla, o ataque nucleofílico do resíduo de serina à carbonila da ligação peptídica e duas transferências de próton ocorreriam de forma concertada. A primeira consistiria na transferência de próton usual entre a díade funcional serina e histidina, enquanto que a segunda corresponderia a transferência de próton do resíduo de histidina para o terceiro membro da tríade catalítica. No terceiro mecanismo, conhecido como mecanismo de ligação de hidrogênio de baixa barreira, uma ligação de hidrogênio mais forte que possui baixa barreira de energia para transferência de próton é formada entre o cátion imidazólio e o terceiro resíduo da tríade catalítica. Isto normalmente acontece quando os resíduos participantes desta ligação hidrogênio passam a possuir valores de  $pK_a$  próximos no estado de transição. Neste caso, o próton teria probabilidades semelhantes de estar associado ao segundo ou ao terceiro resíduo da tríade catalítica. Propõe-se que esta forte ligação hidrogênio aumenta a basicidade do resíduo de histidina, tornando assim mais efetiva a abstração do hidrogênio da serina reativa [Cleland, 1994; Frey, 1994].

O terceiro membro da tríade catalítica nas serinas proteases clássicas é de suma importância para a atividade enzimática. Entretanto, estudos bioquímicos sugerem que o resíduo His157 exerce um diferente papel na protease do HCMV [Khayat, 2001]. No caso da protease dos herpesvírus, a mutação da His157 por um resíduo de alanina não

gera uma redução da eficiência catalítica da protease tão pronunciada quanto à das serinas proteases clássicas. Por exemplo, na tripsina, a mutação do terceiro membro da tríade catalítica, um resíduo de ácido aspártico, por um resíduo de Asn leva a uma redução de 38000 no valor de  $k_{cat}$  [Corey, 1992], enquanto que na subtilisina, a mutação do equivalente ácido aspártico por um resíduo de alanina diminui o  $k_{cat}$  por cerca de 20000 [Carter, 1988]. Curiosamente, todas as serinas proteases que possuem uma mutação (para Ala ou Asn) no terceiro membro da tríade catalítica possuem valores muito próximos de  $k_{cat}$ , sugerindo que a eficiência da tríade catalítica Ser132-His63 nas proteases dos herpesvírus é semelhante a encontrada nas serinas proteases clássicas [Khayat, 2001; Corey, 1992; Carter, 1988]. Desta forma, estes dados indicam que a baixa eficiência catalítica das proteases dos herpesvírus frente às serinas proteases clássicas é resultado da menor contribuição do resíduo His157 para a catálise enzimática quando comparada à contribuição dos ácidos aspártico e glutâmico.

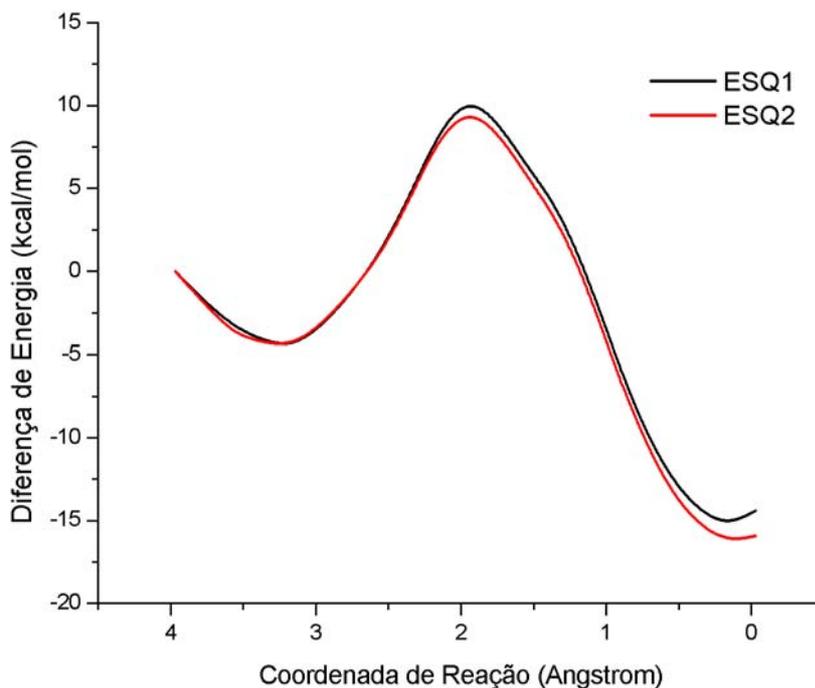


Figura 44: Caminho reação para a formação do intermediário tetraédrico entre o inibidor peptídil de carbonila ativada e a protease na forma dimérica da protease calculado a nível RHF/6-311+G(2d,p)//AM1/AMBER com ESQ1 (preto) e ESQ2 (vermelho).

A Figura 44 mostra o perfil da energia potencial RHF/6-311+G(2d,p)//AM1/AMBER ao longo da coordenada de reação obtido para o caminho de reação calculado nos esquemas de partição ESQ1 e ESQ2. Para os cálculos realizados utilizando o esquema ESQ1, a interação entre o resíduo His157 e o subsistema QM é descrita através de interações eletrostática clássicas. A análise da contribuição eletrostática de cada resíduo na barreira de ativação (Figura 42) revelou que o terceiro membro a tríade catalítica contribui para a estabilização do estado de transição em ambas as formas da protease, dimérica e monomérica. A Figura 44 acima mostra que o tratamento quantomecânico do resíduo His157 acarreta em um decréscimo

de somente 0,8 kcal/mol na barreira energética e de ca. 2 kcal/mol no complexo tetraédrico, o que pode ser atribuído predominantemente a efeitos de polarização.

Para investigar o papel da His157 na reação de formação do complexo tetraédrico inibidor-enzima, o próton HD1 do resíduo His63 foi gradualmente transferido para o nitrogênio NE2 da His157 em cada um dos estados caracterizados no caminho de reação obtido pelo esquema ESQ2. Um procedimento similar ao utilizado no cálculo do caminho mínimo de reação mostrado anteriormente foi aplicado nesta reação de transferência de próton. Neste procedimento, duas coordenadas de reação foram utilizadas ao longo do processo de otimização, sendo a primeira definida como anteriormente por  $RC = d_{O-H} - d_{C-O} - d_{N-H}$ , e a segunda pela diferença das distâncias entre os átomos ND1 e HD1 da His63 e o nitrogênio NE2 da His157 ( $RC_H = d_{ND1-HD1} - d_{NE2-HD1}$ ). Assim o caminho de reação para a transferência de próton foi obtido fixando-se  $RC$  e variando-se o valor  $RC_H$  até o que próton HD1 fosse totalmente transferido para o resíduo H157. Os perfis AM1/AMBER calculados para a reação de transferência do hidrogênio HD1 entre os resíduos His63 e His157 para os reagentes, estado de transição e produto foram então corrigidos como descrito anteriormente.

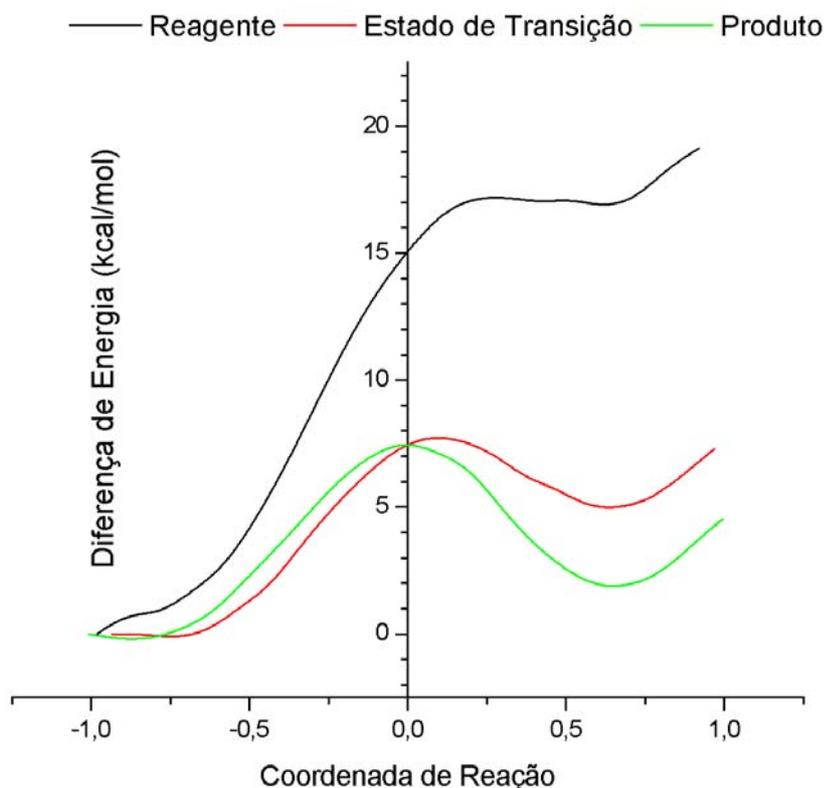


Figura 45: Caminho de reação para a transferência de próton entre os resíduos His63 e His157 calculado a nível RHF/6-311+G(2d,p)//AM1/AMBER para o reagente (preto), estado de transição (vermelho) e produto (verde) na reação de formação do complexo tetraédrico inibidor-protease.

Como podemos ver na Figura 45 a protonação do resíduo His157 desestabiliza o reagente, o estado de transição e o produto da reação de formação do complexo tetraédrico. Assim, é improvável que o resíduo His157 atue na catálise segundo o mecanismo de transferência de carga ou transferência de próton dupla. As curvas referentes ao estado de transição e ao produto tetraédrico mostram a existência de uma ligação de hidrogênio assimétrica de duplo poço entre os resíduos His63 e His157. Analisando o perfil referente ao estado de transição e ao produto, vemos que a diferença

de energia entre os estados inicial e final da reação de transferência de próton entre os resíduos His63 e His157 é de aproximadamente 5 e 2 kcal/mol, respectivamente, e que as barreiras de energia calculadas são de aproximadamente 7-8 kcal/mol, o que elimina o mecanismo de ligação de hidrogênio de baixa barreira. Os resultados sugerem que a protease do HCMV opera via mecanismo de transferência de próton única e que o terceiro membro da tríade catalítica contribui para a catálise enzimática através do aumento da interação eletrostática com o cátion imidazólio incipiente do resíduo His63 no estado de transição, como mostrado na Figura 42. Os resultados concordam com a observação experimental de que o terceiro membro da tríade catalítica da serina protease do HCMV contribui de forma muito menos significativa para a catálise enzimática do que nas serina proteases clássicas. Neste último caso, a interação eletrostática no estado de transição é muito mais forte visto que o terceiro membro da tríade catalítica (Glu e Asp) possui carga negativa. Isto explica o porquê da cinética lenta das proteases dos herpesvírus frente as serinas proteases clássicas, e ao fato de que a mutação do resíduo His157, por um resíduo de alanina, não gerar perda significativa da atividade enzimática.

## V. CONCLUSÕES

Trajórias estáveis para todos os modelos da protease do HCMV foram obtidas através de simulações de Dinâmica Molecular (DM) e o comportamento dinâmico de suas formas dimérica e monomérica, livres em solução e complexadas antes e após a formação do aduto covalente com o inibidor peptídil de carbonila ativada, foram analisadas. Os fatores-B calculados identificaram as regiões que tornam-se mais flexíveis pela formação do complexo não covalente inibidor-dímero. A maior flexibilidade do complexo deriva da perda de ligações de hidrogênio entre segmentos da proteína que mantém sua rigidez. A comparação entre as formas dimérica e monomérica revelou, como esperado, que as regiões mais ordenadas no estado dimérico da protease correspondem às regiões envolvidas na interação entre os dois monômeros.

As simulações de DM de **DI** e **D** reproduziram as diferenças conformacionais mais significativas entre a enzima livre e o complexo covalente com o inibidor BILC 821, observadas por Tong e colaboradores nos estudos de cristalografia de raio-X [Tong, 1998]. Este resultado indica que as mudanças conformacionais estão associadas ao processo de complexação e não à formação do aduto covalente, sugerindo que a enzima opera pelo mecanismo de encaixe induzido. Em outras palavras, uma porção considerável da energia livre de complexação é usada para realizar a reorganização estrutural necessária para trazer a enzima à forma cataliticamente ativa. Além disto, a comparação entre as formas dimérica e monomérica da protease indicou que a presença da interface monômero-monômero não é necessária para a ocorrência de tais mudanças conformacionais.

As simulações de DM mostram que as interações formadas em **MI** e **DI** são muito semelhantes. Isto sugere que a complexação do dímero e monômero com o substrato

natural possui valores próximos de  $K_M$ . Desta forma, a inatividade catalítica do monômero está diretamente relacionada à etapa de reação. O perfil energético RHF/6-311+G(2d,p)//AM1/AMBER obtido para a reação de formação do complexo tetraédrico inibidor-enzima no dímero revelou que a barreira de energia é 7,3 kcal/mol menor e que reação é cerca de 1,4 kcal/mol mais exotérmica que no monômero. Assim, a conversão de **DI** em **D-I** é aproximadamente  $10^5$  mais rápida que a conversão de **MI** em **M-I**.

A análise da contribuição eletrostática do termo referente à interação entre as regiões QM e MM ( $QM/MM_{ELE}$ ) ao longo da coordenada de reação revelou que o dímero da protease é mais eficiente na estabilização eletrostática do estado de transição por aproximadamente 6,3 kcal/mol; isto corresponde a 86% do valor total da redução da barreira de energia produzida pela forma dimérica da protease. Vários resíduos próximos ao sítio ativo contribuem para esta estabilização, sendo a Arg165 o mais importante deles.

Finalmente, os cálculos QM/MM mostraram que a protease do HCMV opera via mecanismo de transferência de próton única e que o terceiro membro da tríade catalítica (His157) contribui para a catálise enzimática através do aumento da interação eletrostática com o cátion imidazólio incipiente do resíduo His63 no estado de transição. Isto explica o porquê da cinética lenta das proteases dos herpesvírus frente as serinas proteases clássicas. Neste último caso, a interação eletrostática no estado de transição é muito mais forte visto que o terceiro membro da tríade catalítica (Glu e Asp) tem carga negativa.

---

## VI. ARTIGOS PRODUZIDOS DURANTE A VIDA ACADÊMICA

Oliveira, C. A. F.; Guimarães, C. R. W.; Barreiro, G.; Alencastro, R. B. *Role of His157 in the Catalytic Triad of the Cytomegalovirus Serine Protease: A theoretical Study* (**em preparação**).

Oliveira, C. A. F.; Guimarães, C. R. W.; Barreiro, G.; Alencastro, R. B. *Human Cytomegalovirus Protease: Why is the Dimer Required for Catalytic Activity?* (**em preparação**).

Oliveira, E. R. A.; Oliveira, C. A. F.; Furtado, V.; Alencastro, R. B. *Application of GB/SA Solvation Model on the Molecular Simulation of Dendrimers Pamam*. (**em preparação**).

Neto, P. A. P.; Oliveira, C. A. F.; Guimarães, C. R. W.; Alencastro, R. B. *Understanding the Selectivity Difference between the HCMV and HSV2 Serine Proteases: A molecular Dynamic Study*. (**em preparação**).

Oliveira, C. A. F.; Guimarães, C. R. W.; Mello, H.; Echevarria, A.; Alencastro, R. B. (2004) Evaluating Relative Octanol/Water Partition Coefficients of Thrombin Inhibitors via Free-Energy Perturbations. *Int. J. Quantum Chem.* **102**, 542.

Guimarães, C. R. W.; Barreiro, G.; Oliveira, C. A. F.; Alencastro, R. B. (2004) On the Application of Simple Explicit Water Models to the Simulations of Biomolecules. *Braz. J. Phys.* **34(1)**, 126.

---

Garden, S. J.; Guimarães, C. R. W.; Oliveira, C. A. F.; Correa, M. B.; Pinto, A. C.; Alencastro, R. B. (2003) Synthetic and Theoretical Studies on the Reduction of Electron Withdrawing Group Conjugated Olefins Using the Hantzsch 1,4-dihydropyridine Ester. *J. Org. Chem.* **68(23)**, 8815.

Oliveira, C. A. F.; Guimarães, C. R. W.; Barreiro, G.; Alencastro, R. B. (2003) Investigation of the Induced-Fit Mechanism and Catalytic Activity of the Human Cytomegalovirus Protease Homodimer via Molecular Dynamics Simulations. *Proteins* **52(4)**, 483.

Alencastro, R. B.; Albuquerque, M. G.; Santos Filho, O. A.; Guimarães, C. R. W.; Barreiro, G.; Romeiro, N. C.; Martins, R. C. A.; Oliveira, C. A. F. (2002) *Metodologias em Modelagem Molecular de Biomoléculas*. Em "A Arte de Vencer Desafios: Um Tributo a Claudio Costa Neto", Editor M. A. Chaer do Nascimento, Rio de Janeiro, pp. 29-41.

Oliveira, C. A. F.; Guimarães, C. R. W.; Alencastro, R. B. (2002) A Molecular Dynamics Study on Liquid 1-Octanol. Part 2. The Water-Saturated 1-Octanol Solution. *Int. J. Quantum Chem.* **90(2)**, 786.

Oliveira, C. A. F.; de Araújo, O. Q. F.; Medeiros, J. L. (2002) Detecção em Tempo Real de Vazamentos em Redes de Escoamento para Fluidos Incompressíveis: Uma Abordagem em Séries Temporais. *Boletim Técnico da Petrobrás*, Brasil, v.45, n. 2.

---

Oliveira, C. A. F.; de Araújo, O. Q. F.; Medeiros, J. L. (2002) Instantaneous Leak Detection in Pipe Networks for Incompressible Fluids: A Time Series Approach. *Proceedings Of Third Enpromer*, v. 1, p. 433-438.

Alencastro, R. B.; Albuquerque, M. G.; Santos Filho, O. A.; Guimarães, C. R. W.; Barreiro, G.; Romeiro, N. C.; Martins, R. C. A.; Oliveira, C. A. F. (2002) *Metodologias em Modelagem Molecular de Biomoléculas*. Em: SANTOS, Hélio F.; COURA, Pablo Z.; DANTAS, Sócrates O.; BARONE, Paulo M. V. B. (Org.). Escola Brasileira de Estrutura Eletrônica. São Paulo, p. 191-201.

Oliveira, C. A. F.; Guimarães, C. R. W.; Alencastro, R. B. (2000) A Molecular Dynamics Study on Liquid 1-Octanol. *Int. J. Quantum Chem.* **80(4-5)**, 999.

---

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allen, L. C. (1981) The catalytic function of active site amino acid side chains in well-characterized enzymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **367**, 383

Allen, M. P.; Tildesley, D. J. (1987) *Computer Simulation of Liquids*, Clarendon Press, Oxford.

Arvin, A. M. (1996) Varicella-zoster virus. *Clin. Microbiol. Rev.* **9(3)**, 361.

Assfeld, X.; Rivail, J.-L. (1996) Quantum chemical computations on parts of large molecules: the ab initio local self consistent field method. *Chem. Phys. Lett.* **263**, 100.

Bachovchin, W. W.; Roberts, J. D. (1978) Nitrogen-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy. The state of histidine in the catalytic triad of  $\alpha$ -lytic protease. Implications for the charge-relay mechanism of peptide-bond cleavage by serine proteases. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 8041.

Bachovchin, W. W. (1985) Confirmation of the assignment of the low-field proton resonance of serine proteases by using specifically nitrogen-15 labeled enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 7948.

Baum, E. Z.; Beberitz, G. A.; Hulmes, J. D.; Muzithras, V. P.; Jones, T. R.; Gluzman, Y. (1993) Expression and analysis of the human cytomegalovirus UL80-encoded protease: identification of autoproteolytic sites. *J. Virol.* **67(1)**, 497.

---

Batra, R.; Khayat, R.; Tong, L. (2001a) Structural studies of herpesvirus proteases. *Protein and Peptide Lett.* **8**, 333.

Batra, R.; Khayat, R.; Tong, L. (2001b) Molecular mechanism for dimerization to regulate the catalytic activity of human cytomegalovirus protease. *Nat Struct Biol* **8**, 810.

Ben, M. D. (1999) *Proteases of Infectious Agents*, Academic Press, New York.

Berendsen, H. C. J.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **81**, 3684.

Beutler, T. C.; Mark, A. E.; van Schaik, R. C.; Gerber, P. R.; van Gunsteren, W. F. (1994) Avoiding singularities and numerical instabilities in free energy calculations based on molecular simulations. *Chem. Phys. Lett.* **222**, 529.

Boivin, G.; Gilbert, C. (2005) Human cytomegalovirus Resistance to antiviral drugs. *J. Antimicrob. Agents and Chemoter.* **49**, 873.

Bonneau, P. R.; Grand-Maître, C.; Greenwood, D. J.; Lagacé, L.; LaPlante, S. R.; Massariol, M-J.; Ogilvie, W. W.; O'Meara, J. A.; Kawai, S. H. (1997) Evidence of a conformational change in the human cytomegalovirus protease upon binding of peptidyl-activated carbonyl inhibitors. *Biochemistry* **36(41)**, 12644.

---

Borman, S. A. (2004) Much ado about enzyme mechanisms. *Chem. Eng. News.* **82(8)**, 35.

Borthwick, A. D.; Angier, S. J.; Crame, A. J.; Exall, A. M.; Haley, T. M.; Hart, G. J.; Mason, A. M.; Pennel, A. M. K; Weingarten, G. G. (2000) Design and synthesis of pyrrolidine-5,5-trans-lactams (5-oxo-hexahydro-pyrrolo[3,2-b]pyrroles) as novel mechanism-based inhibitors of human cytomegalovirus protease. 1. The alpha-methyl-trans-lactam template. *J. Med. Chem.* **43**, 4452.

Borthwick, A. D.; Exall, A. M.; Haley, T. M.; Jackson, D. L.; Mason, A. M.; Weingarten, G. G. (2002) Pyrrolidine-5,5-trans-lactams as novel mechanism-based inhibitors of human cytomegalovirus protease. Part 3: potency and plasma stability *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 1719.

Brooks, B. R.; Bruccoleri, R. E.; Olafson, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M. (1983) Charm - A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* **4**, 187.

Bruggeman, C. A.; Marjorie, H. J.; Nelissen-Vrancken, G. (1999) Cytomegalovirus and atherogenesis. *Antiv. Res.* **43**, 191.

Bruice, T. C.; Kahn, K. (2000) Computational enzymology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 540.

---

Carter, P.; Wells, J. A. (1988) Dissecting the catalytic triad of a serine protease. *Nature* **332**, 564.

Case, D. A.; Perlman, D. A.; Caldwell, J. W.; Chetham III, T. E.; Ross, W. S.; Simmerling, C. L.; Darden, T. A.; Merz, K. M.; Stanton, R. V.; Cheng, A. L.; Vincent, J. J.; Crowley, M.; Tsui, V.; Gohlke, H.; Radmer, R. J.; Duan, Y.; Pitera, J.; Massova, I.; Seibel, G. L.; Singh, U. C.; Weiner, P. K., Kollman, P. A., 2002, AMBER7, University of California, San Francisco.

Candau, R.; Berger, S. L. (1996) Structural and functional analysis of yeast putative adaptors. *J. Biol. Chem.* **271**, 5237.

Chan L, Jin H, Stefanac T, Wang W, Lavallée J-F, Bédard J, May S. (1999) Isoquinoline-6-carboxamides as potent and selective anti-human cytomegalovirus (HCMV) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 2583.

Chen, P.; Tsuge, H.; Almassy, R. J.; Gribskov, C. L.; Katoh, S.; Vanderpool, D. L.; Margosiak, S. A.; Pinko, C.; Matthews, D. A.; Kan, C. (1996) Structure of the human cytomegalovirus protease catalytic domain reveals a novel serine protease fold and catalytic triad. *Cell* **86**, 835.

Cheng, A.; Stanton, R. S.; Vincent, J. J.; van der Vaart, A.; Damodaran, K. V.; Dixon, S. L.; Hartsough, D. S.; Mori, M.; Best, S. A.; Monard, G.; Garcia, M.; Van Zant L.; Merz Jr., K. M. (2002) ROAR 2.1, The Pennsylvania State University, Pennsylvania.

---

Christoffersen, R. E.; Maggiora, G. M. (1969) Ab initio calculations on large molecules using molecular fragments. Preliminary investigations. *Chem. Phys. Lett.* **3**, 419.

Cleland, W. W.; Kreevoy, M. M. (1994) Low-barrier hydrogen bonds and enzymic catalysis. *Science* **264**, 1887.

Collier, L.; Oxford J. (1993) *Human Virology*. Oxford, New York.

Corey L.; Spear, P. G. (1986) Infections with herpes simplex viruses *N. Engl. J. Med.* **314**, 686.

Corey, D. R., Craik, C. S. (1992) An investigation into the minimum requirements for peptide hydrolysis by mutation of the catalytic triad of trypsin. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 1784.

Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M., Jr.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A. (1995) A 2nd generation force-field for the simulation of proteins, nucleic-acids, and organic-molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5179.

Darke, P.L.; Cole, J. L.; Waxman, L.; Hall, D. L.; Sardana, M. K.; Kuo, L. C. (1996) Active human cytomegalovirus protease is a dimer. *J. Biol. Chem.* **271**, 7445.

David, B. D.; Duebecco, R.; Eisen, H. N.; Ginseberg, H. S. (1990) *Microbiology*. 4<sup>a</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins, Hagerstown.

---

Davis, T. D.; Maggiora, G. M.; Christoffersen, R. E. (1974) Ab initio calculations on large molecules using molecular fragments. Unrestricted Hartree-Fock calculations of the low-lying states of formaldehyde and its radical ions. *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 7878

De Clercq, E. (2001) Antiviral drugs: current state of the art. *J. Clin. Virol.* **22**, 73.

De Clercq, E. (2002) Strategies in the design of antiviral drugs. *Nat. Rev. Drug. Discovery* **1**, 13.

De Clercq, E. (2003) New inhibitors of human cytomegalovirus (HCMV) on the horizon. *J. Antimicrob. Chemoter.* **51**, 1079.

De Clercq, E. (2004) Antiviral drugs in current clinical use. *J. Clin. Virol.* **30**, 115.

Dereweda, Z. S.; Dereweda, U.; Kobos, P. M. (1994) (His)C<sup>α</sup>-H...O=C< hydrogen bond in the active sites of serine hydrolases. *J. Mol. Biol.* **241**, 83.

Déziel, R.; Malefant, E. Inhibition of human cytomegalovirus protease N(o) with monocyclic beta-lactams. (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8(11)**, 1437.

Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P (1985) The development and use of quantum-mechanical molecular-models. 76. AM1 – A new general-purpose quantum-mechanical molecular-model. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 3902.

---

Dhanak, D.; Keenan, R. M.; Burton, G.; Kaura, A.; Darcy, M. G.; Shah, D. H.; Ridgers, L. H.; Breen, A.; Lavery, P.; Tew, D. G.; West, A. (1998) Benzothiopyran-4-one based reversible inhibitors of the human cytomegalovirus (HCMV) protease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8(24)**, 3677.

Dhanak, D.; Burton, G.; Christmann, L. T.; Darcy, M. G.; Elrod, K. C.; Kaura, A.; Keenan, R. M.; Link, J. O.; Peishoff, C. E.; Shah, D. H. (2000) Metal mediated protease inhibition: design and synthesis of inhibitors of the human cytomegalovirus (hCMV) protease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10(20)**, 2279.

Dimnock N.J.; Primrose S.B. (1994) *Introduction to Modern Virology*. 4<sup>a</sup> ed., Blackwell Science. Oxford.

Ding, H. Q.; Karasawa, N.; Goddard, W. A. (1992) Atomic level simulations on a million particles: the cell multipole method for Coulomb and London nonbond interactions. *J. Chem. Phys.* **97**, 4309.

Dockrell, D. H. (2003) Human herpesvirus 6: molecular biology and clinical features. *J Med Microbiol*, **52**, 5.

Edwards, C., Palmer, S. B., Emsley, P., Helliwell, J. R., Glover, I. D., Harris, G. W., Moss, D. S. (1990) Thermal motion in proteins estimated using laser-generated ultrasound and Young's modulus measurements. *Acta Cryst. Sect. A*, **46**, 315-320.

---

Eizuru, Y. (2003) Development of new antivirals for herpesvirus. *J. Antimicrob. Chemoter.* **14**, 299.

Emery, V. C. (2001) Progress in understanding cytomegalovirus drug resistance. *J. Clin. Virol.* **21**, 223.

Essmann U, Perera L, Berkowitz ML, Darden T, Lee H, Pedersen LG. (1995) A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* **103**, 8577.

Estabrook, R. A.; Luo, J.; Purdy, M. M.; Sharma, V.; Weakliem, P.; Bruice, T. C.; Reich, N. O. (2005) Statistical coevolution analysis and molecular dynamics: identification of amino acid pairs essential for catalysis. *Proc. Acad. Sci. USA* **102**, 994.

Eurenius, K. P.; Chatfield, D. C.; Brooks, B. R.; Hodoscek, M. (1996) Enzyme mechanisms with hybrid quantum and molecular mechanical potentials. I. Theoretical considerations. *Int. J. Quantum Chem.* **60**, 1189.

Fersht, A. (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science. A Guide to enzyme Catalysis and Protein Folding*. 2<sup>a</sup> ed, W. H. Freeman and Company, New York.

Field, M. J.; Bash, P. A.; Karplus, M. (1990) A combined quantum mechanical and molecular mechanical potential for molecular dynamics simulations. *J. Comp. Chem.* **11(6)**, 700.

---

Field, M. J. (2002) Simulating enzyme reactions: challenges and perspectives. *J. Comput. Chem.* **23**, 48.

Fields, B. N.; Knipe, D. M.; Howley, P. M. (1990) *Fields Virology*, Lippincott-Raven Press, New York.

Flint, S. J.; Enquist, L. W.; Krug, R. M.; Racaniello, V. R.; Skalka, A. M. (1999) *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control*, American Society of Microbiology, Washington.

Flynn, D. L.; Abood, N.A.; Holwerda, B.C. (1997) Recent advances in antiviral research: identification of inhibitors of the herpesvirus proteases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**, 190.

Frauenfelder, H., Petsko, G. A., Tsernoglou, D. (1979) Temperature-dependent X-ray diffraction as a probe of protein structural dynamics. *Nature* **280**, 558.

Frey, P. A.; Whitt, S. A.; Tobin, J. B. (1994) A low-barrier hydrogen bond in the catalytic triad of serine proteases. *Science* **264**, 1927.

Gao, M.; Matusick-Kumar, L.; Hurlburt, W.; DiTusa, S. F.; Newcomb, W. W.; Brown, J. C.; McCann, P. J.; Deckman, I.; Colonno, R. J. (1994) The protease of herpes simplex virus type 1 is essential for functional capsid formation and viral growth *J. Virol.* **68**, 3702.

---

Gao, J.; Amara, P.; Alhambra, C.; Field, M. J. (1998) A generalized hybrid orbital (GHO) method for the treatment of boundary atoms in combined QM/MM calculations. *J. Phys. Chem. A* **102**, 4714.

Gibson, W.; Welch, A. R.; Hall, M. R. T. (1995) Assemblin, a herpesvirus serine maturational proteinase and new molecular target for antiviral. *Perspect. Drug Discovery* **2**, 413

Gibson, W. (2001) Action at the assemblin dimer interface. *Nat. Struct. Biol.* **8(9)**, 739.

Gogonea, V.; Suarez, D.; van der Vaart, A.; Merz, K. W. (2001) New developments in applying quantum mechanics to proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 217.

Goldblum, A. (1997) *On the mechanism of proteinases. In computational approaches to biochemical reactivity* (Nára-Szabó, G.; Warshel, A., ed.), Kluwer, Academic Publishers, Dordrecht, págs. 295-340.

Gopalsamy, A.; Lim, K.; Ellingboe, J. W.; Mitsner, B.; Nikitenko, A.; Upešlacis, J.; Mansour, T. S.; Olson, M. W.; Bebernitz, G. A.; Grinberg, D.; Feld, B.; Moy, F. J.; O'Connell, J. (2004) Design and syntheses of 1,6-naphthalene derivatives as selective HCMV protease inhibitors. *J. Med. Chem.* **47**, 1893.

Griffiths, P. D. (2002) The treatment of cytomegalovirus infection. *J. Antimicrob. Chemoter.* **49**, 243.

---

Guex, N.; Peitsch, M. C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714.

Guimarães, C. R. W.; Barreiro, G.; Oliveira, C. A. F.; Alencastro, R. B. (2004) On the Application of Simple Explicit Water Models to the Simulations of Biomolecules. *Braz. J. Phys.* **34(1)**, 126.

Guo, B.; Daí, J-R.; Ng, S.; Huang, Y.; Leong, C.; Ong, W.; Carté, B. K. (2000) Cytonic acids A and B: novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus cytonaema species. *J. Nat. Prod.* **63**, 602.

Haile, J. M. (1997) *Molecular Dynamics Simulation: Elementary Methods*. John Wiley & Sons, INC. New York.

Halle B. (2002) Flexibility and packing in proteins. *Prod. Natl. Acad. Sci. USA* **99(3)**, 1274.

Harper, D. R.; Kinchington, P. R. (1999) *Molecular Virology*, BIOS Scientific Publishers, Oxfordshire.

Harrison, M. J.; Burton, N. A.; Hillier, I. H. (1997) Catalytic mechanism of the enzyme papain: predictions with a hybrid quantum mechanical/molecular mechanical potential. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 12285.

---

Harte, W. E. Jr.; Swaminathan, S.; Beveridge, D. (1992) Molecular dynamics of HIV-1 protease. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **13**, 175.

Hedstrom, L. (2002) Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev.* **102**, 4501.

Hehre, W. J.; Radom, L.; Schleyer, P. v. R.; Pople, J. A. (1986) *Ab Initio Molecular Orbital Theory*, John Wiley & Sons, New York.

Hockney, R.W. (1970) The potential calculation and some applications. *Meth. Comp. Phys.* **9**, 135.

Holwerda, B. C.; Wittwer, A. J.; Duffin, K. L.; Smith, C.; Toth, M. V.; Carr, L. S.; Wiegand, R. C.; Bryant, M. L. (1994) Activity of two-chain recombinant human cytomegalovirus protease. *J. Biol. Chem.* **269**, 25911.

Holwerda, B. C. (1997) Herpesvirus proteases: targets for novel antiviral drugs. *Antiviral Res.* **35(1)**, 1.

Homa, F. L.; Brown J. C. (1997) Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Rev. Med. Virol.* **7**, 107.

Hoog, S. S.; Smith, W. W.; Qiu, X. Y.; Janson, C. A.; Hellmig, B.; McQueney, M. S.; O'Donnell, K.; O'Shannessy, D.; DiLella, A. G.; Debouck, C.; AbdelMeguid, S. S. (1997) Active site cavity of herpesvirus proteases revealed by the crystal structure of herpes simplex virus protease/inhibitor complex. *Biochemistry* **36**, 14023.

---

Howley, P. M.; Griffin, D. E.; Lamb, R. A.; Martin, M. A.; Knipe, D. M. (2001) *Fundamental Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, Hagerstown.

Hunenberger, P. H., Mark, A. E., Gunsteren, W. F. (1995) Fluctuation and cross-correlation analysis of protein motions observed in nanosecond molecular dynamics simulations. *J. Mol. Biol.* **252**, 492.

Ichiye, T.; Karplus, M. (1991) Collective motions in proteins: a covariance analysis of atomic fluctuations in molecular dynamics and normal mode simulations. *Proteins: Struct. Func. Genet.* **11**, 205.

Jawetz, E.; Melnick, J. L.; Adelberg, E. A. (1998) *Microbiologia Médica*, 20<sup>a</sup> ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Jones, C. (1998) Alphaherpesvirus latency: its role in disease and survival of the virus in nature. *Adv. Virus Res.* **51**, 81.

Jong M. D.; Galasso G. J.; Gazzard, B.; Griffiths P. D.; Jabs D. A.; Kern, E. R., Spector, S. A. (1998a) Summary of the II international symposium on cytomegalovirus. *Antiviral Res.* **39**, 141.

Jong M. D.; Boucher, C. A. B.; Danner, S. A.; Gazzard, B.; Griffiths, P. D., Katlama, C.; Lange, J. M. A.; Richman, D. D.; Vella, S. (1998b) Summary of the international consensus symposium on cytomegalovirus. *Antiviral Res.* **37**, 1.

---

Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926.

Jorgensen, W. L.; Tirado-Rives, J. (1988) The opls potential functions for proteins - energy minimizations for crystals of cyclic-peptides and crambin. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1657.

Khayat, R.; Batra, R.; Massariol, M-J.; Lagacé, L.; Tong, L. (2001) Investigating the role of histidine 157 in the catalytic activity of human cytomegalovirus protease. *Biochemistry* **40**, 6344.

Knipe, D. M.; Howley, P. M. (2001) *Fields Virology*, Vol. 2, Lippincott Williams & Wilkins, Hagerstown.

Komeiji, Y.; Uebayasi, M.; Yamato, I. (1994) Molecular dynamics simulations of trp apo-and holorepressors: domain structure and ligand-protein interaction. *Proteins: Struc. Func. Genet.* **20**, 248.

Kossiakoff, A. A.; Spencer, S. A. (1980) Neutron diffraction identifies His 57 as the catalytic base in trypsin, *Nature* **288**, 414.

---

Kossiakoff, A. A.; Spencer, S. A. (1981) Direct determination of the protonation states of aspartic acid-102 and histidine-57 in the tetrahedral intermediate of the serine proteases: neutron structure of trypsin. *Biochemistry* **20**, 6462.

Kraut, J. (1977) Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 331.

LaFemina, R. L.; Bakshi, K.; Long, W. J.; Pramanik, B.; Veloski, C. A.; Wolanski, B. S.; Marcy, A. I.; Hazuda, D. J. (1996) Characterization of a soluble stable human cytomegalovirus protease and inhibition by M-site peptide mimics. *J. Virol.* **70**, 4819.

LaPlante, S. R.; Bonneau, P. R.; Aubry, N.; Cameron, D. R.; Deziel, R.; Grand-Maitre, E.; Plouffe, C.; Tong, L.; Kawai, S. H. (1999) Characterization of the human cytomegalovirus protease as an induced-fit serine protease and the implications to the Design of mechanism-based inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 2974.

Leach, A. R. (1996) *Molecular Modelling. Principles and Applications*. Longman, Harlow.

Levitt, M.; Sharon, C. Accurate simulation of protein dynamics in solution. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7557.

Liang, Po-H.; Brun, K. A.; Feild, J. A.; O'Donnell, K.; Doyle, M. L.; Green, S. M.; Baker, A. E.; Blackburn, M. N.; Abdel-Meguid, S. S. (1998) Site-directed mutagenesis

---

probing the catalytic role of arginines 165 and 166 of human cytomegalovirus protease.

*Biochemistry* **37**, 5923

Liu, H.; Zhang, Y.; Yang, W. (2000) How is the active site of enolase organized to catalyze two different reaction steps? *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 6560.

Luo, J.; Bruice, T. C. (2002) Ten-nanosecond molecular dynamics simulation of the motions of the horse liver alcohol dehydrogenase-PhCH<sub>2</sub>O<sup>-</sup> complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 16597.

Madrid, M.; Lukin, J. A.; Madura, J. D.; Ding, J.; Arnold, E. (2001) Molecular dynamics of HIV-1 reverse transcriptase indicates increased flexibility upon DNA binding. *Proteins: Struct. Func. Genet.* **45**, 176.

Margosiak, S. A.; Vanderpool, D. L.; Sisson, W.; Pinko, C.; Kan, C-C. (1996) Dimerization of the human cytomegalovirus protease: Kinetic and biochemical characterization of the catalytic homodimer. *Biochemistry* **35**, 5300.

Matusick-Kumar, L.; McCann, P. J.; Robertson, B. J.; Newcomb, W. W.; Brown, J. C.; Gao, M. (1995) Release of the catalytic domain N(o) from the herpes simplex virus type 1 protease is required for viral growth. *J. Virol.*, **69(11)**, 7113.

Mazumder-Shivakumar, D.; Bruice, T. C. (2005) Computational study of IAG-nucleoside hydrolase: determination of the preferred ground state conformation and the role of active site residues. *Biochemistry* **44**,7805.

---

McCammon, J. A.; Harvey, S. C. (1987) *Dynamics of Proteins and Nucleic Acids*. Cambridge University Press, Cambridge.

Monard, G.; Loos, M.; Théry, V.; Baka, K.; Rivail, J.-L. (1996) Hybrid classical quantum force field for modeling very large molecules. *Int. J. Quantum Chem.* **58**, 153.

Mulholland, A. J.; Lyne, P. D.; Karplus, M. (2000) Ab Initio QM/MM study of the citrate synthase mechanism. A low-barrier hydrogen bond is not involved. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 534.

Neurath, H. (1983) Evolution of proteolytic enzymes. *Science.* **224**, 350.

Nichols, W. G; Boeckh, M. (2000) Recent advances in the therapy and prevention of CMV infections. *J. Clin. Virol.* **16**, 25.

Norberto de Souza O.; Ornstein, R. L. (1999) Molecular dynamics simulations of a protein-protein dimer: particle-mesh Ewald electrostatic model yields far superior results to standard cutoff model. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **6**, 1205.

O'Boyle, D. R.; Wager-Smith, K.; Stevens, J. T.; Weinheimer, S. P. (1995) The effect of internal autocleavage on kinetic properties of the human cytomegalovirus protease catalytic domain. *J. Biol. Chem.* **270**, 4753.

---

Ogilvie, W.; Bailey, M.; Poupart, M-A.; Abraham, A.; Bhavsar, A.; Bonneau, P.; Bordeleau, J.; Bousquet, Y.; Chabot, C.; Duceppe, J-S.; Fazal, G.; Goulet, S.; Grand-Maître, C.; Guse, I.; Halmos, T.; Lavallée, P.; Leach, M.; Malenfant, E.; O'Meara, J.; Plante, R.; Plouffe, C.; Poirier, M.; Soucy, F.; Yoakim, C.; Déziel, R. (1997) Peptidomimetic inhibitors of the human cytomegalovirus protease. *J. Med. Chem.* **40**, 4113.

Oliveira, L. H. S., (1994) *Virologia Humana*, Editora Cultura Médica, Rio de Janeiro.

Oliveira, C. A. F.; Guimarães, C. R. W.; Barreiro, G.; Alencastro, R. B. (2003) Investigation of the Induced-Fit Mechanism and Catalytic Activity of the Human Cytomegalovirus Protease Homodimer via Molecular Dynamics Simulations. *Proteins* **52(4)**, 483.

Parr, R. G. (1983) Density functional theory. *Ann. Rev. Phys. Chem.* **34**, 631.

Patrick, A. K.; Potts, K. E. (1998) Protease inhibitors as antiviral agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 614.

Pople, J. A.; Beveridge, D. L. (1970) *Approximate Molecular Orbital Theory*, McGraw-Hill, New York.

Perona, J. J.; Craik, C. S. (1995) Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci.* **4**, 337.

---

Philippopoulos, M.; Carmay, L. (1995) Molecular Dynamics Simulation of E. coli Ribonuclease H1 in Solution: correlation with NMR and X-ray Data and Insights into Biological Function. *J. Mol. Biol.* **254**, 771.

Pinto, I. L.; West, A.; Debouck, C. M.; DiLella, A. G.; Gorniak, J. G.; O'Donnell, K. C.; O'Shannessy, D. J.; Patel, A.; Jarvest, R. L. (1996) Novel, selective mechanism-based inhibitors of the herpes proteases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **6(20)**, 2467.

Qiu, X.; Culp, J. S.; DiLella, A. G.; Hellmig, B.; Hoog, S. S.; Janson, C. A.; Smith, W. W.; Abdel-Meguid, S. S. (1996) Unique fold and active site in cytomegalovirus protease. *Nature* **383**, 275.

Qiu, X.; Janson, C. A.; Culp, J. S.; Richardson, S. B.; Debouck, C.; Smith, W. W.; Abdel-Meguid, S. S. (1997) Crystal structure of varicella-zoster virus protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2874.

Ranaghan, K. E.; Ridder, L.; Szeftczyk, B.; Sokalski, W. A.; Hermann, J. C.; Mulholland, A. J. (2003) Insights into enzyme catalysis from QM/MM modeling: transition state stabilization in chorismate mutase. *Mol. Phys.* **101**, 2695.

Ranaghan, K. E.; Ridder, L.; Szeftczyk, B.; Sokalski, W. A.; Hermann, J. C.; Mulholland, A. J. (2004) Transition state stabilization and substrate strain in enzyme catalysis: ab initio QM/MM modeling of the chorismate mutase reaction. *Org. Biomol. Chem.* **2**, 968.

---

Reefschlaegera, J.; Benderb, W.; Hallenbergera, S.; Weberc, O.; Eckenbergb, P.; Goldmannb, S.; Haerterb, M.; Buergera, I.; Trapped, J.; Herrington, J. A.; Haebichb D.; Ruebsamen-Waigmanna, H. (2001) Novel non-nucleoside inhibitors of cytomegaloviruses (BAY 38-4766): in vitro and in vivo antiviral activity and mechanism of action. *J. Antimicrob. Chem.* **48** (6), 757.

Reiling, K. K.; Pray, T. R.; Craik, C. S.; Stroud, R. M. (2000) Functional consequences of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus protease structure: regulation of activity and dimerization by conserved structural elements. *Biochemistry* **39**, 12796.

Reuter, N.; Dejaegere, A.; Maignet, B.; Karplus, M. (2000) Frontier bonds in QM/MM methods: a comparison of different approaches. *J. Phys. Chem. A.* **104**, 1720.

Ridder, L.; Harvey, J. N.; Rietjens, I. M. C. M., Vervoort, J.; Mulholland, A. J. (2003) Ab initio QM/MM modeling of the hydroxylation step in p-hydroxybenzoate hydroxylase. *J. Phys. Chem. B*, **107**, 2118.

Robillard, G.; Shulman, R. G. (1974a) High resolution nuclear magnetic resonance studies of the active site of chymotrypsin. I. The hydrogen bonded protons of the "charge relay" system. *J. Mol. Biol.* **86**, 519.

Robillard, G.; Shulman, R. G. (1974b) High resolution nuclear magnetic resonance studies of the active site of chymotrypsin. II. Polarization of histidine 57 by substrate analogues and competitive inhibitors. *J. Mol. Biol.* **86**, 541.

---

Roizman B., Desrosiers R. C., Fleckenstein B., Lopez C., Minson A. C., Studdert M. J. (1992). The family herpesviridae: an update. *Arch. Virol.* **123**, 425.

Roizman, B. (1990) *Virology*, Raven Press, New York.

Ryckaert, J. P.; Ciccohi, G.; Berendsen, H. J. C. (1997) Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* **23**, 327.

Saito, M. (1995) Molecular dynamics/free energy study of a protein in solution with all degrees of freedom and long-range Coulomb interactions. *J. Phys. Chem.* **99**, 17043.

Sanders C. J. G.; Canninga-van Dijk, M. R.; Borleffs, J. C. (2004) Kaposi's sarcoma. *Lancet* **364(9444)**, 1549.

Santos, N. S. O., Romanos, M. T. V.; Wigg, M. D. (2002) *Introdução à Virologia Humana*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Schechter, I.; Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 157.

Schirmer, E. C.; Wyatt, L. S.; Yamanishi, K.; Rodriguez, W. J.; Frenkel, N. (1991) Differentiation between two distinct classes of viruses now classified as human herpesvirus 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5922.

---

Schlegel, H. B. (2003) Exploring potential energy surfaces for chemical reactions: an overview of some practical methods. *J. Comp. Chem.* **24(12)**, 1514.

Severance, D. L.; Essex, J. W.; Jorgensen, W. L. (1995) Generalized alteration of structure and parameters: A new method for free-energy perturbations in systems containing flexible degrees of freedom. *J. Comp. Chem.* **16(3)**, 311.

Shieh, H. S.; Kurumbail, R. G.; Stevens, A. M.; Stegeman, R. A.; Sturman, E. J.; Pak, J. Y.; Wittwer, A. J.; Palmier, M. O.; Wiegand, R. C.; Holwerda, B. C.; Stallings, W. C. (1996) Three-dimensional structure of human cytomegalovirus protease. *Nature* **383**, 279.

Singh, U. C.; Kollman, P. A. (1986) A combined *ab initio* quantum mechanical and molecular mechanical method for carrying out simulations on complex molecular systems: applications to the CH<sub>3</sub>Cl + Cl<sup>-</sup> exchange reaction and gas phase protonation polyethers. *J. Comp. Chem.* **7(6)**, 718.

Smith, D. G.; Gribble, A. D.; Haigh, D.; Ife, R. J.; Lavery, P.; Skett, P.; Slingsby, B. P.; Stacey, R.; Ward, R. W.; West, A. (1999) The inhibition of human cytomegalovirus (hCMV) protease by hydroxylamine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 3137.

Sobel, R. E.; Cook, R. G.; Perry, C. A. Annunziato, A. T.; Allis, C. D. (1995) Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. *Proc. Acad. Natl. Sci. USA* **92**, 1237.

---

Snoeck, R. (2000) Antiviral therapy of herpes simplex. *Int. J. Antimicrob. Agents* **16**, 157.

Stocker, U.; Spiegel, K.; van Gunsteren, W. F. (2000) On the similarity of properties in solution or crystalline state: a molecular dynamics study of hen lysozyme. *J. Biomol. NMR*. **18**, 1.

Szabo, A.; Ostlund, N. S. (1996) *Modern quantum chemistry. Introduction to advanced electronic structure theory*. Dover Publications, New York.

Théry, V.; Rinaldi, D.; Rivail, J.-L.; Maigret, B.; Ferenczy, J. J. (1994) Quantum mechanical computations on very large molecular systems: the local self-consistent field method. *J. Comput. Chem.* **15**, 269.

Tong, L.; Qian, C.; Massariol, M-J.; Bonneau, P.; Cordingley, M.; Lagacé, L. (1996) A new serine-protease fold revealed by the crystal structure of human cytomegalovirus protease. *Nature* **383**, 272.

Tong, L.; Qian, C.; Massariol, M-J.; Déziel, R.; Yoakim, C.; Lagacé, L. (1998) Conserved mode of peptidomimetic inhibition and substrate recognition of human cytomegalovirus protease. *Nat. Struct. Biol.* **5(9)**, 819.

Tong, L. (2002) Viral proteases. *Chem Rev.* **102**, 4609.

---

van Gunsteren, W. F.; Mark, A. E. (1992) On the interpretation of biochemical data by molecular dynamics computer simulation. *Eur. J. Biochem.* **204**, 947.

Vasilyev, V. V. (1994) Tetrahedral intermediate formation in the acylation step of acetylcholinesterases. A combined quantum chemical and molecular mechanical model. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **304**, 129.

Veronesi R. (1991) *Doenças Infeciosas e Parasitárias*. 8ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Voet, D.; Voet, J. (1995) *Biochemistry*, John Wiley & Sons, New York.

Warshel, A.; Levitt, M. (1976) Theoretical studies of enzymic reactions - dielectric, electrostatic and steric stabilization of carbonium-ion in reaction of lysozyme. *J. Mol. Biol.* **103**, 227.

Waxman, L.; Darke, P. L. (2000) The herpesvirus proteases as targets for antiviral chemotherapy. *Antiviral Chem. Chemother.* **11**, 1.

Weber, B.; Cinatl, J. (1996) Antiviral therapy of herpes simplex virus infection: recent developments. *J. Eur. Acad. Dermat. Vener.* **6**, 112.

Welch, A. R.; McNally, L. M.; Hall, M. R. T.; Gibson, W. (1993) Herpesvirus proteinase: site-directed mutagenesis used to study maturational, release, and

---

inactivation cleavage sites of precursor and to identify a possible catalytic site serine and histidine. *J. Virol.* **67**, 7360.

White, D.O; Fenner F.J. (1994) *Medical Virology*. 4<sup>a</sup> ed., Academic Press, New York.

Whitley R. J., Kimberlin D. W., Roizman B. (1998) Herpes simplex viruses. *Clin. Infect. Dis.* **26**, 541.

Yamamoto, A.; Tomoo, K.; Doi, M.; Ohishi, H.; Inoue, M.; Ishida, T.; Yamamoto, D.; Tsuboi, S.; Okamoto, H.; Okada, Y. (1992) Crystal structure of papain-succinyl-Gln-Val-Val-Ala-Ala-p-nitroanilide complex at 1.7 Å resolution: noncovalent binding mode of a common sequence of endogenous thiol protease inhibitors. *Biochemistry* **31**, 11305.

Yoakim, C.; Ogilvie, W. W.; Cameron, D. R.; Chabot, C.; Guse, I.; Haché, B.; Naud, J.; O'Meara, J. A.; Plante, R.; Déziel, R. (1998) Beta-Lactam derivatives as inhibitors of human cytomegalovirus protease *J. Med. Chem.* **41**, 2882.

Young, L. S.; Rickinson, A. B. (2004) Epstein-barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer.* **4(10)**, 757.

Zhang, Y.; Lee, T.; Yang, W. (1999) A pseudobond approach to combining quantum mechanical and molecular mechanical methods. *J. Chem. Phys.* **110**, 46.

---

Zhang, Y.; Liu, H.; Yang, W. (2000) Free energy calculation on enzyme reactions with an efficient iterative procedure to determine minimum energy paths on a combined ab initio QM/MM potential energy surface. *J. Chem. Phys.* **112**, 3483.

Zoete, V.; Meuwly, M.; Karplus, M. (2004) A Comparison of the dynamic behavior of monomeric and dimeric insulin shows structural rearrangements in the active monomer. *J. Mol. Biol.* **342**, 913.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)