Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Efeito da temperatura na enzima 2-*trans*-enoil-ACP (CoA) redutase (EC 1.3.1.9) de *Mycobacterium tuberculosis* em complexo com o NADH: um estudo por simulação pela dinâmica molecular

Autor

Furia Gargano

Orientador

Prof. Dr. Osmar Norberto de Souza

Porto Alegre, RS
Julho, 2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Efeito da temperatura na enzima 2-*trans*-enoil-ACP (CoA) redutase (EC 1.3.1.9) de *Mycobacterium tuberculosis* em complexo com o NADH: um estudo por simulação pela dinâmica molecular

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Autor

Furia Gargano

Orientador

Prof. Dr. Osmar Norberto de Souza

Porto Alegre, RS
Julho, 2009

Aos vinte e um dias do mês de julho de dois mil e nove (21/07/2009), às 8:30, no Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese, da estudante **Furia Gargano.**

A tese intitulada

"Efeito da temperatura na enzima 2-*trans*-enoil-ACP (CoA) redutase (EC 1.3.1.9) de *Mycobacterium tuberculosis* em complexo com o NADH: um estudo por simulação pela dinâmica molecular"

Foi apresentada e aprovada pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

Dr. Osmar Norberto de Souza
PPG em Biologia Celular e Molecular - PUCRS

Dr. Luiz Augusto Basso
PPG em Biologia Celular e Molecular - PUCRS

Dra. Virgínia Minghelli Schmitt
PPG em Biologia Celular e Molecular - PUCRS

Dra. Evelyn Koeche Schroeder
PPG em Biologia Celular e Molecular - UFRGS

Dr. Hermes Luís Neubauer de Amorim – ULBRA
PPG em Genética e Toxicologia Aplicada

Porto Alegre, 21 de julho de 2009

À minha mãe Suneida,

Ao meu pai Aldo (*in memorian*),

Ao meu filho René

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Osmar Norberto de Souza, por ter acreditado em mim ao aceitar-me como orientanda, pela sua permanente disposição no esclarecimento de dúvidas, pelos interessantes debates sobre temas abordados na pesquisa e pelas palavras de incentivo nos momentos difíceis.

À Dra. Evelyn Schroeder pelo auxílio na elaboração do projeto de pesquisa, pela disponibilidade no esclarecimento de quaisquer dúvidas e pelas oportunas discussões sobre alguns tópicos do trabalho.

Ao Prof. Dr. Jomar Pereira Laurino por ter acreditado no meu potencial, aceitando a minha orientação no início do curso.

Ao Prof. de Estatística da PUCRS Dr. João Feliz Duarte, que muito eficientemente realizou a análise estatística dos dados da tese.

À Prof. Bárbara Charlotte Bach Rizzatti, chefe do departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSM, cujas palavras de incentivo e carinho foram muito importantes para o seguimento de meu doutorado.

Aos colegas professores e funcionários do departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSM, que me apoiaram e foram solidários nesta caminhada.

Aos professores do curso do PPGBCM da PUCRS, os quais me estimularam com suas aulas e me incentivaram com suas sábias palavras em diversos momentos.

À bióloga Claudinara Sarturi, do laboratório GENOMA, que com eficiência me mostrou procedimentos e técnicas laboratoriais de biologia molecular.

Ao funcionário Fernando Coruja, do setor de informática da PUCRS, por me auxiliar de forma rápida e competente sobre a questão computacional.

À Cátia Ticiana Oliveira, Josilene Martins Rocha, Maria Luíza Moreira, secretárias do PPGBCM e Sandra Morais da Rosa, Thiago Lingener e Régis Escobal da Silva, secretários do PPGCC da FACIN, pelo gentil e atencioso atendimento demonstrado durante todo o tempo do curso.

À Cláudia Lemelle Fernandes, por transmitir-me com eficiência e dedicação alguns de seus conhecimentos sobre modelagem molecular, no início do meu curso.

À Karina dos Santos Machado por ter me auxiliado na parte de informática e pela amizade e companheirismo.

Ao casal de pesquisadores Prof. Dr. Marcelo Cohen e sua esposa Elisängela, pelo incentivo, amizade e esclarecimento de dúvidas na área da informática.

Aos colegas de curso Anderson, André, Ardala, Carla, Danieli, Diego, Giselle, Jefferson, Márcio pela convivência e aprendizagem.

Ao LABIO (Laboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biossistemas) da Faculdade de Informática que disponibilizou suas instalações para que eu pudesse realizar todos os procedimentos de minha pesquisa em ambiente confortável e com computadores rápidos e precisos.

À Prof. Elita El Missiri, pela amizade, palavras de incentivo, carinho e apoio.

Ao Dr. Cyrillo Zadra, pela pronta disponibilidade sempre que solicitado, contribuindo para o meu equilíbrio emocional, fundamental para o desempenho desta tarefa.

À Prof. Dra. Maria Isabel Aude pela amizade, carinho e palavras de incentivo nos momentos mais difíceis.

Aos meus tios Sulema e Paulo Camilo, por ter estado ao meu lado nos momentos mais difíceis, por ter ficado com o meu filho diversas vezes para que a mãe pudesse ir a Porto Alegre, por ter nos dado muito apoio e carinho.

À minha querida e preciosa mãe Suneida, que cuidou integralmente do meu filho nestes quatro anos, pela dedicação, amor, carinho, força e muita sabedoria.

Ao meu amado filho René, meu pequeno grande homem, cuja coragem, amor e bondade me auxiliaram no percurso desta trajetória.

A TODOS aqueles que, em algum momento desta caminhada, mesmo com um

pequeno gesto ou uma única palavra, me incentivaram para que as minhas

realizações tivessem pleno êxito,

meu sincero,

MUITO OBRIGADA!

Uma gota de chuva
A mais, e o ventre grávido
Estremeceu, da terra.
Através de antigos
Sedimentos, rochas
Ignoradas, ouro
Carvão, ferro e mármore
Um fio cristalino
Distante milênios
Partiu fragilmente
Sequioso de espaço
Em busca de luz.

Um rio nasceu.

Vinícius de Moraes

RESUMO

Esta pesquisa refere-se a um estudo computacional via simulação por dinâmica molecular (DM) que investiga os efeitos da temperatura na InhA, enzima 2-*trans*-enoil-ACP (CoA) redutase do *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). A temperatura pode interferir na estrutura e função protéicas, na habilidade de ligação de uma proteína, na distribuição dos microestados, na conformação molecular média e nas reações enzimáticas. A partir do início do século XX, os experimentos *in silico* tem sido cada vez mais utilizados para auxiliar na compreensão e comprovação das hipóteses teóricas elaboradas em diversas áreas da ciência. Neste contexto, a simulação por dinâmica molecular (DM) tem sido uma das técnicas da biofísica molecular computacional utilizadas no estudo da variação das propriedades estruturais do estado nativo das proteínas e no planejamento e *design* de fármacos. Esta pesquisa investigou o efeito da temperatura sobre a enzima 2-*trans*-enoil-ACP (CoA) redutase (InhA) através de um estudo por simulação pela DM (SDM). A enzima InhA é um importante alvo para a isoniazida (INH), um dos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose (TBC). O complexo enzimático InhA-NADH foi submetido a uma SMD a 25 ^{o}C (298 K) e outra a 37 ^{o}C (310 K) durante um período de 20 ns. A temperatura de 37 ^{o}C foi escolhida por corresponder à temperatura corporal humana. Por outro lado, 25 ^{o}C representa a temperatura ambiente utilizada nos experimentos realizados em condições normais de temperatura e pressão (NTP). Alguns parâmetros iniciais (desvio médio quadrático, raio de giro, superfície acessível ao solvente) foram obtidos a partir da análise dos dados das duas trajetórias. Existem diferenças conformacionais estatisticamente significativas entre as estruturas 3D resultantes das SDM a 25 ^{o}C e 37 ^{o}C. Também pesquisou-se o efeito da temperatura sobre a flexibilidade molecular. Enquanto observamos um importante aumento da flexibilidade na região de ligação do

substrato (alça A, alça B e alça de ligação do substrato) aos 37 ^{o}C, as hélices α6, α7 e α2 apresentaram Fatores-B menores na temperatura corporal humana. Na região do sítio de ligação da coenzima, apenas três resíduos (Ser20, Ile21 e Phe41) apresentaram uma menor flexibilidade com o aumento da temperatura. Pequenos aumentos de temperatura afetam significativamente a conformação de uma proteína em regiões importantes para o desempenho de suas funções. A elevação da temperatura aumenta a flexibilidade da estrutura protéica, porém de forma heterogênea, preservando regiões que necessitam de maior estabilidade no aspecto funcional. As nítidas modificações da enzima InhA e sua coenzima NADH durante um processo de alteração de temperatura de 25 ^{o}C para 37 ^{o}C devem ser consideradas no decorrer do planejamento e *design* de qualquer fármaco. O conhecimento detalhado das estruturas alvo, portanto, deve levar em conta as condições ambientais (pressão, temperatura, pH) às quais serão submetidas em in *vivo*. Sugerem-se, para o futuro, pesquisas com temperaturas maiores e trabalhos com *docking.*

Palavras-chave: biofísica molecular computacional, simulação por dinâmica molecular, temperatura, InhA, *Mycobacterium tuberculosis*, Fator-B, flexibilidade, fármaco

ABSTRACT

Temperature can interfere with protein structure and function, affecting its ability to bind to other molecules, its conformational microstates distribution, as well as the rate of its enzymatic reactions. Since the mid-20th the *in silico* or computer experiments have increasingly been used in different areas of science to help better understand and prove theoretical hypotheses. In this context, molecular dynamic (MD) simulations, a computational molecular biophysics technique was used in the study of structural variations in the native state of proteins as well as in the design and development of new drugs. The focus of the present study is on the effect of temperature in the enzyme 2-*trans*-enoil-ACP (CoA) reductase (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis* by means of MD simulations. The InhA enzyme is the bonafide target of isoniazid (INH), the most important medicine used in the treatment of tuberculosis. The InhA-NADH enzymatic complex was submitted to MD simulations at 25 ^{o}C (298 K) and at 37 ^{o}C (310 K) for a total simulation time of 20 ns each. The temperature of 37 ^{o}C was chosen because it is the human body temperature, whilst 25 ^{o}C is used in *in vitro* experiments under normal conditions of temperature and pressure (NTP). Structural parameters such as root-mean square deviation or RMSD, radius of gyration, B-factors, and solvent accessible surface area were calculated from the MD trajectories. There are statistically significant conformational differences between the 3D structures resulting from 25 ºC and 37 ºC MSD. We also investigated the effect of temperature in the molecular flexibility. While observing a significant increase in flexibility in the substrate binding region (A- and B-loops and in the substrate biding loop), at 37 ºC the helices α6, α7 and α2 presented low B-factors at human body temperature. In the NADH coenzyme binding site, only three residues (Ser20, Ile21 e Phe41) presented lower flexibility with temperature increase. Small increases in temperature significantly affect the protein conformation

in important regions that are relevant to its function. The increase in temperature changes the protein flexibility but in a heterogeneous way, preserving regions that need more stability in the functional aspect. The clear changes in the InhA enzyme and its coenzyme NADH during the temperature increase process from 25 ºC to 37 ºC must be considered in planning new drugs against this target. Therefore, we should take into account the environmental conditions (air pressure, temperature and pH) which they will be submitted on *in vivo*. We suggest, for the future, that research of targets to be done in temperature equal or very close to body temperature and to the one used at the dynamic spectrum of these target structures in molecular docking experiments, an important step in rational drug design.

Key-words: computational molecular biophysics, molecular dynamics (MD) simulations, temperature, InhA or 2-*trans*-enoyl-ACP (CoA) reductase, *Mycobacterium tuberculosis*, B-factor, flexibility, ration drug design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Níveis de energia existentes em um proteína nativa..... 4

Figura 1.2 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática..... 9

Figura 1.3 Representação do tipo *ribbons* da cadeia principal da estrutura terciária da enzima InhA de *Mycobacterium tuberculosis*..... 26

Figura 1.4 Representação do tipo *ribbons* da cadeia principal da estrutura terciária da unidade biológica funcional da enzima InhA de *Mycobacterium tuberculosis*..... 27

Figura 1.5 Representação do tipo *ribbons* das alças A B e de ligação do substrato da InhA..... 28

Figura 2.1 Representação esquemática dos potenciais de energia existentes nas ligações, ângulos, diedros impróprios, torsões, forças eletrostáticas e de van der Waals..... 36

Figura 2.2 Caixa d´ água contendo o complexo *wt* InhA-NADH..... 42

Figura 3.1 Gráfico da energia total do sistema aquoso InhA-NADH em função do tempo de simulação..... 47

Figura 3.2 RMSD da cadeia principal da enzima InhA a 25 ^{o}C e 37 ^{o}C em função do tempo para as simulações por DM durante 20 ns..... 49

Figura 3.3 Raio de giro da enzima InhA a 25 ^{o}C e 37 ^{o}C nos 20 ns da trajetória, sem o NADH..... 51

Figura 3.4 Gráfico das médias e desvios padrões do RMSD das simulações por DM em ambas as temperaturas..... 53

Figura 3.5 Modelos de superfície molecular..... 55

Figura 3.6 Representação gráfica da área total da superífcie acessível ao solvente da InhA livre a 25 ^{o}C e 37 ^{o}C..... 56

Figura 3.7 Gráfico da área total da superfície acessível ao solvente (ASAS) da InhA a 25 ^{o}C e 37 ^{o}C, com as suas subdivisões..... 58

Figura 3.8 Gráfico do RMSF da cadeia principal da InhA a 25 ^{o}C e 37 ^{o}C em comparação com o RMSF da estrutura inicial..... 61

Figura 3.9 Representação das regiões de maior mobilidade da estrutura cristalina da InhA (cód. pdb: 1ENY)..... 62

Figura 3.10 Fator-B da cadeia principal (átomos N, Cα, C, O) da enzima InhA nas simulações a 25 ^{o}C (preto), 37 ^{o}C (vermelho) calculados sobre os últimos 5 ns de simulação..... 63

Figura 3.11 Fator-B dos resíduos da InhA que estão a 4 Å do NADH a 25 ^{o}C e 37 ^{o}C..... 64

Figura 3.12 Gráfico das diferenças do Fator-B da cadeia principal (átomos N, Cα, C, O) da enzima InhA calculadas sobre os últimos 5 ns de simulação..... 65

Figura 3.13 Representação do tipo *ribbons* da cadeia principal da estrutura terciária da enzima InhA colorida de acordo com a diferenças dos valores do Fator-B..... 66

Figura 3.14 Distribuição do Fator-B da InhA de acordo com os seus valores.... 68

Figura 3.15 Extensão da coenzima NADH. Este parâmetro é medido pela distância entre os átomos C2 do anel nicotinamida e C6 do anel adenina a 25 ^{o}C e 37 ^{o}C..... 70

Figura 3.16 Representação do NADH a 25 ^{o}C e 37 ^{o}C..... 71

Figura 3.17 Estrutura cristalina da InhA (cód. pdb: 1ENY) mostrando a interação entre o NADH e os resíduos da proteína..... 72

Figura 3.18 Posição da alça rica em glicina em relação ao NADH a 25 ^{o}C e 37 ^{o}C..... 74

Figura 3.19 Visualização da coenzima NADH, resíduo Lys165 e parte da hélice α5 na estrutura cristalina 1ENY..... 77

Figura 3.20 Interação entre os resíduos Lys165 e Tyr158 e o NADH a 25 ^{o}C e 37 ^{o}C..... 78

Figura 3.21 Interação entre o resíduo de Thr196 e o NADH a 25 ^{o}C e a 37 ^{o}C 79

Figura 3.22 Interação entre o resíduo de Ser94 e o NADH a 25 ^{o}C e a 37 ^{o}C... 80

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1 Temperatura média corporal humana..... 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Composição do sistema de simulação do complexo da enzima InhA espécie selvagem com o NADH (*wt* InhA-NADH)..... 42

Tabela 3.1 RMSDs do complexo InhA-NADH em diferentes temperaturas..... 50

Tabela 3.2 Rg dos sistemas da InhA a 25 ^{o}C e 37 ^{o}C, nos 20 ns de trajetória, sem a presença do NADH..... 52

Tabela 3.3 Valores da área acessível ao solvente a 25 ^{o}C e 37 ^{o}C durante toda a extensão da trajetória (0 a 20 ns)..... 57

Tabela 3.4 Distribuição da média da ASAS por região e polaridade nas duas temperaturas no intervalo de 15 a 20 ns..... 58

Tabela 3.5 Parâmetros estruturais da InhA observados nos últimos 5 ns das simulações por DM..... 59

Tabela 3.6 Interações de hidrogênio formadas entre o NADH e a proteína InhA nas temperaturas de 25 ^{o}C e 37 ^{o}C nos últimos 5 ns..... 73

Tabela 3.7 Comprimento das ligações de hidrogênio formadas entre o NADH e a proteína InhA nas temperaturas de 25 ^{o}C e 37 ^{o}C..... 76

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP	análise de componentes principais
ANS	naftaleno ácido sulfônico
ASAS	área acessível ao solvente
^oC	temperatura grau Celsius
Cα	carbono α
CoA	coenzima A
CP	cadeia principal
ΔC_p	variação do calor específico
3D	tridimensional
DC	dicroísmo circular
DM	dinâmica molecular
dp	desvio padrão
DNA	ácido desoxirribonucléico
ΔE	variação total da energia interna da reação
Ea	energia de ativação
ENR	*enoil* redutase
fs	fentosegundo
ΔG	variação da energia livre
$\Delta G^{\ddagger}$	variação da energia livre de ativação
ΔG_b	variação da energia livre de ligação
$\Delta G_{N \rightarrow D}$	variação da energia livre do estado nativo para o desnaturado
ΔG^{mic}	variação da energia livre do microdesenovelamento
H	hidrogênio
H^-	hidreto
ΔH	variação da entalpia

ΔH_b	variação da entalpia de ligação
IFN	Interferon
INH	Isoniazida
InhA	enzima *2-trans*-enoil-ACP (CoA) redutase (InhA) *do Mycobacterium tuberculosis*
inhA	gene que codifica a InhA
K	temperatura Kelvin
K_a	constante de associação
K_b	constante de ligação
K_{cat}	constante catalítica de uma enzima
K_d	constante de dissociação
K_i	coeficiente de inibição
K_M	constante de Michaelis - a concentração para a qual a velocidade da reação enzimática é metade da velocidade máxima
K_{non}	atividade não catalítica
LABIO	laboratório de bioinformática, modelagem e simulação de biossistemas
LPS	lipopolissacarídeo
MTB	*Mycobacterium tuberculosis*
NAD^+	nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NO	óxido nítrico
ONS	óxido nítrico sintase
O	oxigênio
ORF	*open reading frame* ou fase aberta de leitura
PAH	fenilalanina hidroxilase
PDB	*protein data bank* ou banco de dados de estrutura 3D de proteínas

ps	picossegundo
Q	coeficiente de temperatura
R	constante dos gases
Rg	raio de giro
RMN	ressonância magnética nuclear
RMSD	*root mean square deviation* ou desvio médio quadrático
RMSF	*root mean square fluctuation* ou flutuação da raiz média quadrática
ΔS	variação da entropia
ΔS_b	variação da entropia de ligação
SDR	*short chain dehyrogenase/reductase*, família de enzimas desidrogenase/redutase
SM	superfície molecular
T	temperatura
TA	todos os átomos

SUMÁRIO

Dedicatória..... i

Agradecimentos..... ii

Epígrafe..... iv

Resumo..... v

Abstract..... vii

Lista de Figuras..... ix

Lista de Quadros xi

Lista de Tabelas..... xii

Lista de Abreviaturas..... xiii

Sumário..... xvi

1 CAPÍTULO 1..... 1

1.1 Introdução..... 2

1.1.1 As proteínas e os fatores ambientais..... 2

1.1.2 Efeito da temperatura sobre as proteínas..... 9

1.1.3 Biofísica molecular e computacional..... 17

1.1.4 A enzima InhA..... 24

1.2 Objetivos..... 31

1.3 Justificativa..... 32

2 CAPÍTULO 2..... 33

2.1 Materiais e Métodos..... 34

2.1.1 O método de simulação por dinâmica molecular..... 34

2.1.1.1 O campo de força..... 35

2.1.1.2 Organização de uma simulação por Dinâmica Molecular... 39

2.1.1.3 Simulação por dinâmica molecular da enzima InhA de MTB a 25 ^{o}C e 37 ^{o}C..... 41

2.1.1.4 Análise dos resultados obtidos pelas simulações por dinâmica molecular da enzima InhA de MTB a 25 ^{o}C e 37 ^{o}C..... 44

3 CAPÍTULO 3..... 46

3.1 Resultados e Discussões..... 47

3.1.1 Convergência e estabilidade das simulações por dinâmica molecular (DM) da enzima InhA em duas temperaturas (25 °C e 37 °C)..... 47

3.1.2 ASAS – Área Acessível ao Solvente..... 54

3.1.3 Fator-B ou Fator de Temperatura..... 60

3.1.3.1 Flutuações posicionais atômicas (RMSF)..... 61

3.1.3.2 Fator-B da estrutura cristalina da InhA..... 62

3.1.3.3 Fator-B das simulações por dinâmica molecular aos 25 °C e 37 °C..... 63

3.1.3.4 Amplitude do RMSF e do Fator-B..... 68

3.1.4 Região de ligação do NADH..... 69

4 CAPÍTULO 4..... 82

4.1 Artigo Científico..... 83

4.1.1 *Abstract*..... 84

4.1.2 Artigo tipo *Letter.*..... 85

4.1.3 *References and footnotes*..... 90

4.1.4 Carta de submissão do artigo..... 92

5 CAPÍTULO 5..... 93

5.1 Considerações Finais e Perspectivas..... 94

Referências..... 98

Glossário..... 112

Apêndices..... 119

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

1.2 Objetivos

1.3 Justificativa

1.1 INTRODUÇÃO

O presente estudo envolve a investigação de possíveis alterações conformacionais que a proteína InhA (2-*trans*-enoil-ACP (CoA) redutase) possa sofrer com o aumento da temperatura. Realizaram-se, para isso, duas simulações por dinâmica molecular (DM) de 20 ns cada, aplicando-se valores diferentes de temperatura para cada uma delas: 25 ^{o}C (temperatura ambiente) e 37 ^{o}C (temperatura fisiológica humana). Ao final da fase experimental, os dados foram organizados em Gráficos, Figuras e Tabelas e, posteriormente, analisados. Para facilitar a leitura e o entendimento da questão de pesquisa e seus resultados, a tese foi dividida em CAPÍTULOS. No CAPÍTULO 1 apresentam-se o referencial teórico, os objetivos e os argumentos que motivaram a realização deste trabalho. No CAPÍTULO 2 descrevem-se os materiais e métodos empregados na pesquisa. No CAPÍTULO 3 são discutidos os resultados obtidos nos experimentos computacionais. No CAPÍTULO 4 apresenta-se o artigo científico submetido a um periódico e, no CAPÍTULO 5, desenvolvem-se as considerações finais, acompanhadas das perspectivas futuras. As palavras ou expressões em negrito estarão melhor definidas no glossário (CAPÍTULO 7).

1.1.1 As proteínas e os fatores ambientais

As proteínas são polímeros de aminoácidos, com cada resíduo de aminoácido unido ao seu vizinho por um tipo específico de ligação covalente denominada ligação peptídica (Lehninger et al., 2006). As proteínas desempenham diversas funções biológicas nos processos vitais, podendo ser classificadas de acordo com suas propriedades. Existem proteínas estruturais (as proteínas do capsídeo viral, as da camada mais externa da pele), proteínas que catalisam reações químicas

(enzimas), proteínas de transporte e armazenagem (hemoglobina e ferritina), proteínas reguladoras (hormônios), proteínas que controlam a transcrição gênica e proteínas envolvidas em reconhecimento (Lesk, 2008). Tanto a estrutura como a função protéicas podem sofrer alterações pelos fatores ambientais como, por exemplo, pressão, pH, temperatura e concentração de sais. Medidas termodinâmicas indicam que, em condições fisiológicas, as proteínas são apenas **marginalmente estáveis** no estado nativo (Voet et al., 2000; Berg et al., 2008). Cada uma das várias influências não-covalentes nas proteínas - como efeitos hidrofóbicos, interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio (H) e forças de Van der Waals – envolve uma quantidade de energia que pode chegar a milhares de quilocalorias por mol (kcal/mol) em uma molécula inteira de proteína (Voet et al., 2000). Portanto, o conjunto das interações não covalentes são muito importantes para a estabilização da **conformação** das proteínas. Para uma dada proteína, somente um pequeno número de conformações possíveis tem significado biológico (Murray & Harper, 1998). A compreensão do papel das alterações conformacionais de uma proteína durante o processo de catálise enzimática tem sido objeto de estudo entre os enzimologistas (Benkovic et al., 2008).

A distribuição dos estados conformacionais que uma proteína pode ocupar é potencialmente astronômica. As características deste conjunto de estados pode influenciar profundamente a estabilidade, a dinâmica e a função da proteína (Song et al., 2007). Uma proteína pode ser encontrada, portanto, em uma variedade de **microestados** que diferem em suas conformações (Wintrode et al., 2003). A distribuição dos microestados é temperatura-dependente, de forma que a elevação da temperatura aumenta a fração da população de conformações relativamente desordenadas, as quais deixam de possuir a geometria necessária para permitir a ligação da proteína com um substrato (Somero, 2004). A habilidade de ligação de

uma proteína, portanto, é fortemente influenciada pela temperatura. As estruturas relativamente flexíveis que favorecem valores altos de atividade catalítica (k_{cat}) (como as estruturas que realizam um rápido movimento de fechamento durante a ligação) apresentarão, com o aumento da temperatura, um enfraquecimento da ligação com o substrato, pois uma fração maior das conformações da enzima encontrar-se-ão no estado de "ligação-incompetente") (Somero, 2004).

Um diagrama de energia livre para o enovelamento protéico mostra **macroestados** estáveis (**nativo**, desnaturado e intermediário), considerando as fontes aproximadas de energias harmônicas como um conjunto de uma reação global coordenada. Um quadro mais completo considera macroestados compostos de conjuntos de microestados (Figura 1.1) com similar, mas não idênticas, energias e conformações (Merkley et al., 2008).

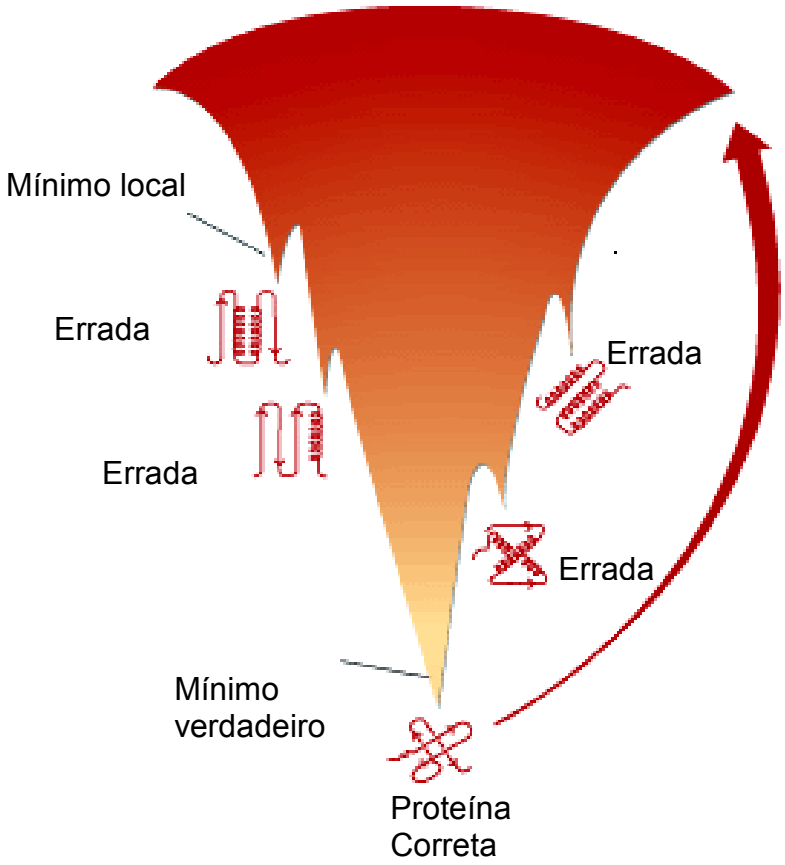

Figura 1.1 A estrutura 3D de uma proteína nativa sob condições fisiológicas é aquela na qual a energia livre do sistema é a mais baixa (Anfinsen, 1973). Assim, enquanto proteínas podem mostrar outros mínimos locais durante o enovelamento, existe apenas um único arranjo com energia mínima verdadeira. Figura extraída e adaptada de Holliman (2000).

Este conjunto de conformações pode ser descrito através de uma superfície padrão multi-dimensional de energia-livre (*landscape*) que é bastante rugosa, contendo estados transicionais e de múltiplos mínimos (Benkovic et al., 2008).

Os microestados são populados de acordo com a **distribuição de Boltzmann**. Variações da temperatura alteram a população relativa dos microestados conformacionais com o macroestado. Se a conformação molecular média varia com a temperatura, as propriedades do estado nativo também irão se alterar com a temperatura. A variação das propriedades estruturais no estado nativo podem ser observadas e analisadas através do método da Dinâmica Molecular (DM) (Merkley et al., 2008).

Os fatores termodinâmicos de associação envolvidos na interação das macromoléculas biológicas (enzima-substrato, anticorpo-antígeno, hormônio-receptor, etc.) são caracterizados pela **estequiometria** da interação (n), a constante de associação (K_a), a energia livre de ligação (ΔG_b), a entalpia de ligação (ΔH_b), a entropia de ligação (ΔS_b) e a capacidade calorífica ou térmica (ΔC_p). Juntamente com a informação estrutural, as energias envolvidas nas ligações podem fornecer uma dissecação completa da interação e auxiliar na identificação das principais regiões de interface e contribuições energéticas (Pierce et al., 1999).

A segunda lei da termodinâmica estabelece que: “a entropia total de um sistema deve aumentar quando um processo ocorre espontaneamente”. A entropia representa o grau de desordem ou distribuição ao acaso do sistema e torna-se máxima à medida que este se aproxima do equilíbrio verdadeiro (Murray et al., 1998). Sob condições de temperatura e pressão constantes, a relação entre a variação de energia livre (ΔG) de um sistema reagente e a variação da entropia (ΔS) é dada pela seguinte equação (Murray et al., 1998):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{ou} \quad \Delta G = \Delta E - T\Delta S$$

onde

T = temperatura

$\Delta H = Ea - RT$ é a variação da entalpia (calor)

R = a constante dos gases

Nas reações bioquímicas, podemos substituir ΔH por ΔE (variação total da energia interna da reação) pois os valores de ambas as variáveis são aproximadamente iguais. A energia de ativação (*Ea*) é calculada pela equação de Arrhenius, pelo método dos mínimos quadrados.

Závodszky et al. (1998) realizaram um estudo comparativo entre a enzima 3-isopropilmalato desidrogenase (IPMDH, E.C. 1.1.1.85) da bactéria termofílica *Thermus thermophilus* HB8 e seu homólogo IPMDH encontrado na bactéria mesofílica *Escherichia coli.* As enzimas termofílicas são estáveis e plenamente ativas em temperaturas elevadas, apresentando características físico-químicas semelhantes aos seus homólogos.

A estabilidade protéica pode ser expressa em termos de diferença de energia livre associada ao desenovelamento da conformação da IPMDH. A macroestabilidade é caracterizada pela variação da energia livre do estado nativo para o desnaturado ($\Delta G_{N \rightarrow D}$ calculado por mol da unidade cooperativa), i.e., pelo trabalho necessário para transferir a proteína do estado macroscópico nativo (N) para o (D) desnaturado. Por outro lado, a microestabilidade é característica da rigidez de uma estrutura, com ΔG^{mic} (variação da energia livre do micro-desenovelamento) como a energia livre de Gibbs associada com as reações locais, reversíveis, não-cooperativas de "desenovelamento" dentro do estado enovelado. A macroestabilidade mantém a integridade da conformação nativa enovelada, enquanto que a microestabilidade determina a flexibilidade da proteína, que é, presumivelmente, responsável pela função ótima (Závodszky et al., 1998).

Experimentos da termoestabilidade procuram elucidar como uma proteína desenovela-se globalmente em resposta à energia térmica. Assim, priorizando a medida dos movimentos globais em detrimento dos movimentos locais, consegue-se explicar, com maior detalhe, como as dinâmicas protéicas podem determinar sua termoestabilidade (Zhang et al., 2004).

As forças de interação entre uma molécula (fármaco, substrato, ligante, inibidor) e uma proteína/enzima podem incluir interações hidrofóbicas, eletrostáticas, de van der Waals e ligações de hidrogênio. Um estudo da interação entre a albumina sérica humana e a vitamina B12 constatou uma relação inversamente proporcional da constante de ligação (K_b) (7,40; 6,93; 6,22; 5,27) com o aumento da temperatura (292, 298, 304 e 310 K), mostrando, que a K_b diminui com a elevação da temperatura (Hou et al., 2008).

A água, assim como as pontes salinas, afetam a termoestabilidade por influenciar, de uma certa forma, as conformações suscetíves às mudanças (Zhang et al. 2004, Bakker et al. 1999). As macromoléculas biológicas, como as proteínas, conseguem adquirir e manter suas estruturas nativas 3D em diversos ambientes, como, por exemplo, em solução aquosa (Burova et al., 2000).

Após a ligação inicial de um substrato a uma enzima, a sua afinidade mútua no meio aquoso aumenta proporcionalmente à sua taxa de produção. Durante a transformação do substrato, sua constante de dissociação (K_d), algumas vezes alcança valores muito baixos no **estado de transição** (Wolfenden et al., 1999). O aumento da eficiência enzimática deve-se muito mais ao componente entálpico da reação do que ao entrópico (Wolfenden et al., 1999).

Harcourt (1867) revela que as taxas das reações químicas aumentam com a elevação da temperatura, tendendo a dobrar o coeficiente de temperatura (Q), quando a temperatura é ajustada de 20 a 30 ^{o}C ("Q_{10}=2").

Wolfenden et al. (1999) mostraram que reações muito lentas tendem a ser muito mais sensíveis à temperatura do que a generalização possa sugerir, pois a eficiência enzimática de muitas enzimas aumenta acentuadamente com a diminuição da temperatura. Portanto, um aumento da afinidade enzimática por inibidores de enzimas **análogos do estado de transição,** em relação aos substratos convencionais ou análogos de substratos, é esperado com o decréscimo da temperatura.

A nítida dependência que há da temperatura do K_i (coeficiente de inibição) fornece um novo critério para testar possíveis inibidores análogos do estado de transição e pode representar uma importante orientação no uso prático dos análogos dos estados de transição como antagonistas de enzimas na medicina e na agricultura (Wolfenden et al., 1999).

Por outro lado, estudos por calorimetria de titulação isotérmica revelaram que a ligação ótima do fator de virulência estreptocócico G148-GA3 à albumina sérica humana ocorre à temperatura de 37 ^{o}C. Nesta temperatura fisiológica, obteve-se o menor perfil de energia livre para a reação em estudo (Rozak et al., 2005). A elevação da temperatura (20 a 37 ^{o}C) também está relacionada a um maior crescimento celular bacteriano e a um aumento da síntese protéica (Farewell & Neidhardt, 1998).

A elevação da temperatura aumenta a velocidade da reação, pois ocorre uma maior agitação e colisão entre átomos e moléculas. Todavia, nas reações catalisadas por enzimas que são encontradas em temperatura ambiente, a velocidade tende a diminuir quando a temperatura passa de 35 ^{o}C e 40 ^{o}C (Campbell, 2006). Temperaturas muito elevadas alteram as estruturas secundárias e terciárias das enzimas, podendo leva-las até a um processo de desnaturação (Campbell, 2006).

1.1.2 Efeito da temperatura sobre as proteínas

Os níveis de temperatura e de hidratação controlam as propriedades estruturais e dinâmicas comuns das macromoléculas. Em temperaturas elevadas, os átomos das proteínas podem apresentar **movimentos anarmônicos** devido às transições entre subestados conformacionais múltiplos que caracterizam o variado perfil de energia das biomoléculas. Em baixas temperaturas, as transições entre os subestados conformacionais são menos freqüentes e as macromoléculas são congeladas em diversos mínimos de energia (Melchionna et al., 1998). A temperatura exerce importantes efeitos na estrutura e atividade das proteínas, sendo um dos importantes fatores ambientais que influenciam as atividades biológicas das células vivas (Villeneuve et al., 2005). A temperatura pode afetar enormemente as reações enzimáticas (Figura 1.2).

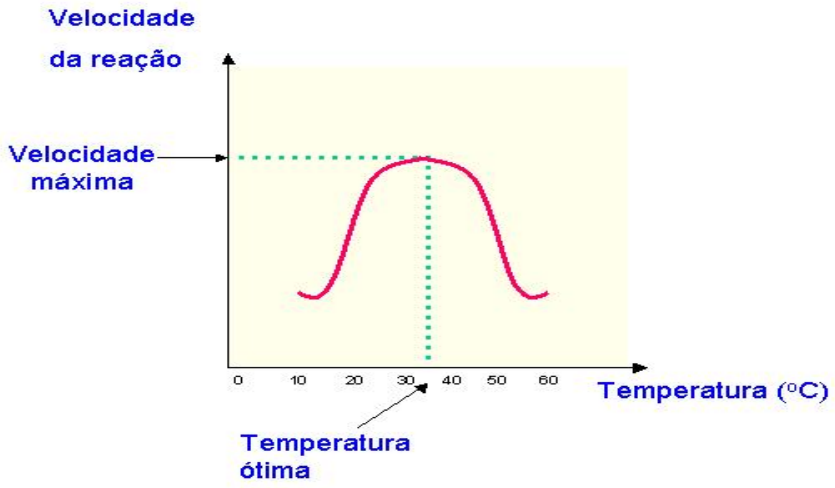

Figura 1.2 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática Exemplificação da relação entre a velocidade de uma reação química e a temperatura. À medida que a temperatura do ambiente aumenta, a velocidade da reação enzimática eleva-se. A temperatura na qual a atividade enzimática é máxima é chamada de temperatura ótima. Em organismos mesofílicos, a temperatura em que as enzimas atingem a sua melhor velocidade de reação é de cerca 35 °C a 40 °C. A partir destes níveis, a elevação gradativa da temperatura vai ocasionando uma diminuição na velocidade da reação enzimática (Campbell, 2006).

As proteínas participam de uma ampla gama de reações, todas envolvendo movimentos internos de seus átomos. Algumas, como na ligação e liberação de oxigênio na mioglobina e hemoglobina e as catálises das reações pela enzimas, envolvem a formação e quebra de ligações químicas. Outras reações são regidas por interações relativamente fracas (van der Waals) e forças eletrostáticas podendo envolver alterações conformacionais, tais como movimentos do "***hinge-bending***", reorientações de subunidades e de **enovelamento** e desenovelamento da cadeia polipeptídica (Karplus, 2000). Qualquer uma das **interações** acima dependem da temperatura devido à imensa gama de movimentos protéicos subjacentes nas escalas de tempo e de comprimento (Karplus, 2000).

As reações catalíticas e a ativação do complexo enzima-substrato, em especial, são sensíveis à temperatura (Low et al., 1973). Existe uma temperatura na qual a atividade da enzima é máxima, chamada de temperatura enzimática ótima. De acordo com os ambientes analisados, serão encontradas enzimas com diversos ótimos de temperatura. Acima da temperatura considerada ótima, a velocidade da reação é reduzida devido à perda de atividade catalítica devido à desnaturação térmica. O efeito da temperatura sobre as enzimas também depende do pH, da força iônica no meio e da presença ou ausência de ligantes (Campbell, 2006).

As enzimas, habitualmente, demonstram uma ótima adaptação de sua função na faixa de temperatura ambiente do organismo que as produz (D'Amico et al., 2003). Como conseqüência, a estabilidade das proteínas de um organismo específico depende da temperatura do seu ambiente. Por exemplo, proteínas de organismos psicrofílicos se desnaturam a temperaturas acima de 30 ^{o}C (Georlette et al., 2003).

Nos animais homeotérmicos, capazes de manter constante a temperatura corporal, a temperatura ótima, geralmente, está entre 35 ^{o}C e 40 ^{o}C (nos humanos, 36 ^{o}C a 37 ^{o}C). A taxa de metabolismo basal aumenta cerca de 13% para cada grau Celsius (^{o}C) da elevação de temperatura corporal. Pequenas elevações da temperatura potencializam a defesa do organismo contra agentes infecciosos e células neoplásicas (Sund-Levander & Grodzinsky, 2009; Voltarelli, 1994).

A natureza utiliza várias estratégias para adaptar as enzimas às alterações ambientais de temperatura. Foi experimentalmente comprovado que as adaptações mutacionais das enzimas para alterações ambientais de temperatura tendem a manter uma flexibilidade conformacional ótima nas temperaturas fisiológicas características a cada microrganismo (Svingor et al., 2001). Proteínas extraídas de organismos mesofílicos e termofílicos são interessantes objetos para o estudo das relações entre a estabilidade estrutural, dinâmica e sua função. Uma comparação estrutural entre homólogos de proteínas mesofílicas e termofílicas revelam que famílias diferentes de proteínas utilizam mecanismos estruturais diferentes para se adaptar a temperaturas mais elevadas (Meinhold et al., 2008).

Comparações recentes entre as estruturas de proteínas mesofílicas e hipertermofílicas tem identificado um número de características estruturais que, acredita-se, serem responsáveis pelo aumento da estabilidade térmica. Uma característica importante é o elevado número de pontes salinas na superfície de dímero protéicos termofílicas (Bakker et al., 1999).

As flutuações dinâmicas de uma estrutura protéica ocorrem durante um ampla faixa de tempo, que varia de fentosegundos a segundos (Benkovic et al., 2008). Uma questão fundamental a ser enfatizada é a existência da relação entre as flutuações conformacionais da estrutura enzimática e sua função catalítica (Hammes-Schiffer & Benkovick, 2006; Jaenicke & Závodszky, 1990).

A conservação das propriedades estruturais e funcionais necessárias das proteínas, nas espécies adaptadas a diferentes temperaturas e pressões, é obtida através da variação na seqüência dos aminoácidos e acúmulo dos pequenos solutos orgânicos (por exemplo açúcares, álcoois) que estabilizam as características protéicas. Embora ortólogos de diferentes espécies termicamente adaptadas variem na estabilidade, acredita-se que, em temperaturas fisiológicas, um conjunto similar de microestados conformacionais existam para todos eles. Estudos comparativos de diversos conjuntos de ortólogos demonstram que a estabilidade protéica geralmente está positivamente correlacionada com a adaptação à temperatura (Somero, 2003).

Diversos estudos experimentais realizados com microrganismos mesofílicos e termofílicos comprovaram que a atividade enzimática e a flexibilidade conformacional estão estreitamente correlacionadas e a adaptação evolucionária das proteínas a diferentes temperaturas fisiológicas tende a manter a flexibilidade conformacional adequada àquela temperatura (Závodszky et al., 1998).

Um estudo dinâmico computacional realizado por Hajdú et al. (2008) obteve o parâmetro da flexibilidade conformacional da proteína Gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase (GAPDH) em dois organismos: *Thermotoga maritima* (TmGAPDH, cuja **temperatura fisiológica** é de 68 ^{o}C) e músculo de rato (RmGAPDH – temperatura fisiológica é de 25 ^{o}C). Em **temperatura ambiente** (21 a 23 ^{o}C), a flexibilidade conformacional da TmGAPDH é muito menor do que a observada na RmGAPDH, mas aumenta com a elevação da temperatura e torna-se comparável a da RmGAPDH a temperaturas próximas às fisiológicas da *Thermotoga marítima.* As principais alterações foram observadas nas regiões de ligação do NADH e do substrato, mostrando como as adaptações se deram nos locais de maior importância funcional. Estes achados sustentam a idéia de que a dinâmica na GAPDH é essencial tanto para a função catalítica como para a regulação alostérica

e que a flexibilidade conformacional da proteína, principalmente nas regiões importantes para a função, é ajustada para a temperatura fisiológica, maximizando a eficiência da enzima na temperatura ótima de crescimento do organismo (Hajdú et al., 2008).

A bactéria *Thermotoga maritima* (Tm) foi objeto de estudo também de outro pesquisador (Motono et al., 2007), o qual comparou os fatores termodinâmicos da proteína de choque frio (CSP – *cold shock protein*) com os de proteínas homólogas encontradas em duas bactérias mesofílicas. Apesar da *TmCSP* mostrar-se mais estável do que as outras CSPs a temperatura ambiente (21 – 23 ^{o}C), em condições fisiológicas (68 ^{o}C) ela apresenta uma estabilidade termodinâmica mais baixa.

Em simulações por DM a 300 K, a *TmCSP* mostra uma flexibilidade semelhante às outras CSPs com exceção das regiões N e C-terminais, que se apresentam mais rígidas. Estas regiões são aproximadas por uma suposta rede eletrostática formada por quatro resíduos e um par de íons. Estas interações são observadas tanto a 300 K como a 600 K, não sendo observadas nas outras CSPs. Elas constituem uma verdadeira barreira cinética ao desenovelamento da *TmCSP*. Isso sugere que os instrumentos da **cinética** nos permite uma melhor compreensão, auxiliada pelos recursos da **termodinâmica**, de como a a enzima CSP da Tm possa evitar o seu desenovelamento a altas temperaturas.

Sabendo-se que a magnitude da energia livre de ativação ($\Delta G^{\ddagger}$) representa a "barreira de energia" à reação, as enzimas termoestáveis conseguem realizar reações químicas em temperaturas ótimas graças à redução significativa dos valores de $\Delta G^{\ddagger}$ (Low,1973).

O *Chromobacterium violaceum*, uma bactéria de solo disseminada em climas tropicais, pode agir como um patógeno oportunista. Para uma melhor compreensão dos efeitos da temperatura nesta bactéria, foi pesquisada a dependência da

temperatura nas propriedades catalíticas e estabilidade de sua enzima fenilalanina hidroxilase (PAH) (Zoidakis et al., 2005). Observou-se um aumento exponencial de sua atividade catalítica máxima (k_{cat}) com a temperatura (de 7 ^{o}C a 40 ^{o}C). O K_M permaneceu constante entre 20 ^{o}C e 40 ^{o}C, mas rapidamente aumentou em temperaturas inferiores a 20 ^{o}C. Este perfil cinético em relação à afinidade justifica a preferência desta bactéria por climas tropicais (Zoidakis et al., 2005).

Um dos maiores temas de interesse na pesquisa dos procariotos refere-se ao controle da expressão gênica e produção dos fatores de virulência pelos complexos circuitos reguladores, em resposta a alterações no meio hospedeiro (disponibilidade de nutrientes, pH, osmolaridade, fase de crescimento, tensão de oxigênio, concentração de ferro e temperatura). As bactérias patogênicas (que causam doenças) são expostas a diferentes temperaturas durante um ciclo infeccioso, necessitando regular sua expressão gênica de acordo com estas alterações (Smoot et al., 2001).

O S*treptococcus pneumoniae* é um exemplo de adaptação a diversos sítios da microbiota humana, já que pode causar quadros patológicos em tecidos distantes (pneumonia, meningite, faringite, otite, etc.) a partir da colonização da nasofaringe (Pandya et al., 2005). Devido à história natural da doença pneumocócica, a regulação mediada pela temperatura poderia ter uma importante função na virulência. Sabe-se que os fatores de patogenicidade estão relacionados com as características epidemiológicas das doenças infecciosas, mas a predileção de certos fatores ambientais (como temperatura, concentração de sais e outros) também são preponderantes para definir a preferência de algumas bactérias ou vírus em processos infecciosos específicos. Os genes e proteínas responsáveis por este comportamento ainda permanecem desconhecidos. Por outro lado, a regulação da

expressão gênica em função da variação de temperatura tem sido amplamente estudada nas bactérias patogênicas (Konkel & Tilly, 2000).

Uma alteração na temperatura de crescimento de 37 para 42 ^{o}C, no meio de cultivo da bactéria *Campylobacter jejuni* (causadora de diarréia), resultou em um aumento de 20% na expressão gênica. (Stintzi, 2003).

O estreptococo do grupo A (*S. pyogenes*) é uma bactéria da microbiota cutânea que pode invadir a camada protetora da pele e causar doenças graves como fasceíte necrotizante ou síndrome do choque tóxico. Percebeu-se que, globalmente, esta bactéria transcreve uma quantidade de genes 9% maior a 29 ^{o}C (temperatura da pele) do que a 37 ^{o}C (temperatura fisiológica humana interna). É importante salientar que a maioria destes genes (57%) tem função inibitória e podem estar relacionados com fatores de virulência (Smoot et al., 2001).

Com a finalidade de melhorar o entendimento da capacidade de adaptação do estreptococo do grupo B (EGB) ao sangue humano, foi desenvolvido um estudo que analisou o comportamento de todo o transcriptoma do genoma desta bactéria durante a incubação em sangue de voluntários sadios. Estas amostras foram incubadas a 37 ^{o}C e 40 ^{o}C (simulando um estado febril). Observou-se uma diminuição no número de transcritos na temperatura de 40 ^{o}C em relação a 37 ^{o}C (Mereghetti et al., 2008).

O efeito da variação da temperatura externa nas proteínas quinases do parasita *Leishmania donovanii* (formas promastigotos) foi objeto de estudo de Vieira et al. (2002). A temperatura e o pH são considerados os dois maiores fatores geradores de estresse encontrados pelo parasita ao infectar o hospedeiro mamífero, pois a atividade máxima das proteínas quinases para os promastigotos foram obtidas a um pH de 7.4 e temperatura de 30 ^{o}C. A liberação da **proteína quínase**

constitutiva pela *L. donovani* parece ser um processo altamente regulado e é controlado pelos fatores ambientais.

Bactérias patogênicas respondem a mudanças da temperatura apresentando alterações nas necessidades nutritivas, nas taxas de crescimento e na expressão dos fatores de virulência (Pandya et al., 2005).

O efeito da temperatura no metabolismo protéico dos miotubos C2C12 foi investigado com a finalidade de estimar o potencial efeito da febre no catabolismo dos músculos. No estado febril (40 ^{o}C), houve uma diminuição de 13 % da meia-vida das proteínas de vida longa em relação a 37 ^{o}C (Morita et al., 1996).

Sarkar et al. (2006) pesquisaram o efeito do pH e da temperatura no mecanismo de associação e dissociação do complexo perfurante celular do bacteriófago T4. Através de experimentos sobre o equilíbrio de sedimentação, mostrou-se que os valores dos pesos moleculares mantinham-se estáveis nas temperaturas mais baixas (4 ^{o}C, 20 ^{o}C) decrescendo, nitidamente, a 37 ^{o}C. Tais resultados indicam que o processo de dissociação tem elevada dependência da temperatura, pois os menores valores de massa molecular a 37 ^{o}C mostraram que as subunidades protéicas encontravam-se separadas.

A prefenato desidrogenase é uma enzima chave na regulação da biossíntese da tirosina no *Mycobacterium tuberculosis*. Um estudo experimental, cujo objetivo foi obter sua purificação e caracterização (Xu et al., 2006), comprovou que a sua atividade máxima é observada a uma temperatura de 310 K (37 ^{o}C). Esta informação é bastante relevante para o presente estudo que avalia o comportamento dinâmico e estrutural de uma outra enzima do MTB, a InhA, em função do aumento da temperatura. Apesar de tratar-se de uma enzima diferente, o estudo da prefenato desidrogenase ressalta a importância de se investigar as propriedades conformacionais das proteínas em diferentes temperaturas.

A liberação de óxido nítrico (NO) e óxido nítrico sintase (ONS), por parte dos macrófagos, são elementos importantes na resposta imune celular. Em condições ambientais fisiológicas (37 ^{o}C), a presença de outros mediadores, como interferon (IFN)- γ e lipopolissacarídeos (LPS) são necessários para a produção do ON. Já em temperaturas próprias do estado febril (39,5 ^{o}C), a presença única de LPS é suficiente para estimular a síntese de NO (Pritchard et al., 2005). Estes achados sugerem que a variação térmica microambiental é um elemento importante que influencia a atividade inflamatória dos macrófagos.

1.1.3 Biofísica molecular e computacional

Até meio século atrás, as estruturas 3D das proteínas eram estudadas indiretamente. Em 1970, a classificação das proteínas de acordo com sua estrutura secundária resultou em um natural aprimoramento das pesquisas na aplicação dos conhecimentos computacionais na pesquisa das macromoléculas biológicas (Fersht, 2008).

A consideração incial das proteínas como estruturas relativamente rígidas tem sido substituída pelo modelo dinâmico no qual os movimentos internos e as alterações conformacionais resultantes têm um papel essencial na sua função (Karplus & McCammon, 2002).

O papel destas alterações no vasto poder catalítico das enzimas representa, atualmente, um dos maiores desafios na área da biologia molecular. Embora se saiba que as enzimas modulem as taxas de reação através de uma série de movimentos protéicos mais ou menos extensos, é quase sempre impossível distinguir as alterações conformacionais envolvidas nas atividades catalíticas (Sytina et al., 2008).

As simulações por Dinâmica Molecular (DM) são importantes instrumentos para o entendimento das bases físicas da estrutura e função das macromoléculas biológicas. As simulações podem prover detalhes minuciosos relacionados com os movimentos das partículas (por exemplo, átomos em uma proteína) em função do tempo. Desta forma, as simulações por DM podem ser utilizadas para investigar questões específicas sobre as propriedades de um sistema modelo, de forma muito mais ágil do que em experimentos laboratoriais (Karplus & McCammon, 2002).

Além das proteínas, a DM pode estudar outros sistemas moleculares como líquidos, soluções, eletrólitos, DNA, polissacarídeos, membranas, cristais líquidos, cristais e **zeólitos**. Processos como fusão, adsorção, segregação, formação de complexos moleculares e desnaturação protéica podem ser analisados e fenômenos como estabilidade protéica, reatividade enzimática e permeabilidade da membrana podem ser investigados (van Gunsteren & Mark, 1998).

A dinâmica das proteínas têm sido investigada no contexto do comportamento de uma única molécula através da simulação pela dinâmica molecular (DM), embasada pela mecânica estatística (Lu *et al.*, 1998). Por outro lado, a caracterização da imensa gama de movimentos protéicos encontra-se, ainda, nos seus estágios primordiais. O entendimento sobre a relação entre os movimentos protéicos e a atividade biológica encontra-se em fase bem avançada.

Reforçando a importância da técnica de DM, esta consiste em um instrumento cada vez mais popular utilizado para a investigação energética e mecânica das biomoléculas. As moléculas protéicas flutuam devido ao movimento térmico e alguns rearranjos estruturais são necessários para o desempenho de sua função normal. Graças às técnicas experimentais como a microscopia de força atômica e às informações teóricas resultantes das simulações por DM, o conhecimento da

natureza dinâmica das proteínas vem apresentando um crescimento considerável (Burden & Oakley, 2007).

Embora proteínas com estruturas semelhantes possam apresentar funções similares, pequenas diferenças entre estas estruturas podem resultar em variações na expressão de sua especificidade e regulação (Gunasekaran & Nussinov, 2007).

A função protéica é mediada por dinâmicas internas anarmônicas em uma superfície de energia potencial bastante rugosa. Este comportamento pode ser simulado pelo método da DM. As trajetórias atômicas obtidas envolvem movimentos complexos multidimensionais em uma ampla extensão espacial e de escalas de tempo (Moritsugu & Smith, 2006). As mudanças conformacionais das proteínas observadas durante as simulações de DM podem ser descritas através dos desvios quadráticos médios (RMSD) e as flutuações da estrutura média da proteína podem ser expressas em termos de flutuações dos desvios quadráticos médios atômicos (RMSF) (Namba et al., 2008). Um método utilizado para simplificar as análises das trajetórias complexas das simulações por DM consiste na aproximação quase-harmônica das flutuações posicionais atômicas usando a **análise de componentes principais** (ACP) (Moritsugu & Smith, 2006; Benkovic et al., 2008; Hammes-Schiffer & Benkovic, 2006).

As dinâmicas internas das proteínas globulares ocorrem em uma ampla variação de escalas de tempo, desde vibrações de alta freqüência de ligações químicas, com períodos na ordem de 10 fs, a deformações globais que requerem milisegundos ou até mais (Becker & Karplus, 1993). Estes movimentos são de considerável interesse, em parte devido à sua importância para as funções biológicas (Benkovic et al., 2008). Movimentos em escala de tempo de picossegundos possuem um caráter localizado, que quase sempre envolve deslocamentos harmônicos de muitos átomos em diferentes partes da proteína.

Experimentalmente, estes movimentos em picossegundos são detectáveis por diversas técnicas, incluindo o **espalhamento incoerente de nêutrons** (Smith et al*.,* 1990). Movimentos nesta mesma variação de escala de tempo podem ser examinados por simulações por DM, bem como por análises de modos normais de vibração (Becker & Karplus, 1993).

A ACP das trajetórias da DM tem demonstrado que as flutuações dos desvios quadráticos médios atômicos (RMSF) são dominadas por um pequeno número de modos ACP de grande amplitude com distribuição não quadrática do equilíbrio. O movimento protéico anarmônico pode ser assim amplamente descrito em termos de dinâmicas ao longo destes modos ACP de larga amplitude (Moritsugu & Smith, 2006).

Um desafio permanente no entendimento de movimentos protéicos internos é a efetiva separação e caracterização de componentes dinâmicos vibracionais.

À temperatura ambiente, as proteínas sofrem excursões dinâmicas distantes de sua estrutura 3D nativa, o que representa um importante papel para sua função. As simulações por DM podem revelar detalhes da natureza destes movimentos ao representar o estado de uma proteína como um conjunto conformacional que segue as leis da termodinâmica estatística (Showalter et al., 2007).

O estudo das dinâmicas macromoleculares como uma função da temperatura nos permite investigar o cenário energético das estruturas protéicas e melhor compreender as forças envolvidas nos movimentos da estrutura protéica (Wood et al., 2008).

Existe uma boa relação entre a variação total da temperatura e as características do espectro de difração de nêutrons de uma proteína em relação aos seus movimentos internos. Os componentes de difração podem ser elásticos, quase-elásticos e inelásticos e contribuem para a precisão dos movimentos internos

das simulações, oferecendo importantes informações sobre os deslocamentos atômicos em uma escala de tempo de 0.3-100 ps (Smith et al., 1990).

As simulações por DM oferece um amplo número de dados que podem ser comparados com os obtidos a partir de experimentos laboratoriais realizados para detectar movimentos protéicos (ressonância magnética nuclear – RMN – despolarização de fluorescência, raio-X de difusão e espectroscopia vibracional) (Levy et al., 1985).

As proteínas estão no centro da ação dos processos biológicos, pois a quase totalidade das transformações moleculares que definem o metabolismo celular são mediadas pela catálise protéica. As proteínas exercem também funções regulatórias, controlando as condições intracelulares e extracelulares e enviando informações para outros componentes da célula. Além disso, as proteínas são componentes estruturais essenciais das células (Voet et al., 2000). O entendimento da estrutura protéica não é fundamental para a compreensão de sua função, já que temos muitas proteínas com funções conhecidas mas cuja estrutura ainda é ignorada. As variações no comprimento e na seqüência de aminoácidos dos polipeptídeos contribuem para a diversidade na forma e nas funções biológicas das proteínas. Informações estruturais, energéticas e dinâmicas, em nível atômico, de biomoléculas de grande mobilidade geralmente não são acessíveis através de técnicas experimentais. Nesses sistemas, pode-se utilizar métodos teóricos para a investigação de seus aspectos moleculares. Se estes forem suficientemente adequados para predizer as propriedades de sistemas biológicos, eles podem ser utilizados no estudo de propriedades moleculares com uma resolução espacial, energética e temporal que não poderia ser alcançada experimentalmente (van Gunsteren & Mark, 1992).

Variações de ordem espectral na absorção de um fóton resultante de **espectroscopia de infra-vermelho** (espectroscopia IV) revelam significativas alterações conformacionais na enzima, ilustrando a importância da flexibilidade e dinâmica na estrutura das enzimas para a sua função (Sytina et al., 2008).

Experimentos realizados por Závodsky et al. (1998) confirmam a idéia de que a atividade enzimática e a flexibilidade conformacional estão estritamente correlacionadas.

Considera-se a atividade enzimática como sendo dependente da estrutura tri-dimensional e das dinâmicas do esqueleto polipeptídico. A flexibilidade protéica tem origem do equilíbrio entre forças intra e intermoleculares e o constante deslocamento das moléculas solventes cuja viscosidade tem propriedade temperatura-dependente (Dvorsky et al., 2000).

A compreensão sobre como as dinâmicas moleculares e o ambiente no qual ocorrem contribuem para o entendimento sobre os mecanismos catalíticos vem refinando os conhecimentos sobre as estruturas 3D e os mecanismos químicos. Isso não se deve apenas à complexidade da interação enzima/substrato, mas também à ampla variação de movimentos internos exibidos pelas proteínas globulares (Benkovic et al., 2008; Hammes-Shiffer & Benkovic, 2006). O grande desafio consiste no entendimento da natureza destes movimentos e de como eles contribuem para a função enzimática (Daniel et al., 2003). As reações protéicas, incluindo a formação do complexo-substrato, podem ser dependentes da temperatura (Karplus, 2000).

Um estudo experimental e da dinâmica avaliou os efeitos da temperatura na atividade antimicrobiana e estrutura de algumas bacteriocinas do tipo IIa (pediocina PA-1, carnobacteriocina B2 e leucocina A) (Kaur et al., 2004). Foram utilizados, para isso, o dicroísmo circular (DC), simulações por DM e testes de atividade

antimicrobiana. Em temperaturas elevadas, a pediocina PA-1 (única a ter uma segunda ligação dissulfeto C-terminal) mantém sua estrutura global, enquanto que os outros peptídeos apresentaram parcial ruptura da hélice. A pediocina PA-1 e seu mutante (ped[M31Nle]) mostraram igual atividade nas diferentes temperaturas, enquanto que os outros peptídeos possuíam 30 a 50 vezes menos potência antimicrobiana aos 37 ^{o}C (310 K) em relação aos 25 ^{o}C (298 K). Estes resultados indicam que as alterações estruturais na região helicoidal, observadas em temperaturas fisiológicas, contribuem para a perda da atividade destes peptídeos (Kaur et al., 2004).

Um desafio permanente no entendimento dos movimentos protéicos internos consiste na separação e caracterização efetiva entre os componentes dinâmicos vibracionais e os difusivos (Moritsugu & Smith, 2006). Simulações por DM foram realizadas com a carboximioglobina da baleia azul (pdb 1A6G) em solução aquosa, adotando-se temperaturas em faixas entre 120 e 300 K. A partir de alguns parâmetros obtidos na análise das trajetórias, foi avaliada a dependência da temperatura desta proteína. Os movimentos protéicos internos (atômicos) foram separados e caracterizados em difusos e vibracionais. O componente de difusão das flutuações dos desvios quadráticos médios atômicos (RMSF) aumentou acentuadamente durante a transição dinâmica, enquanto que o componente vibracional manteve-se linear com o aumento da temperatura (Moritsugu & Smith, 2006).

Um estudo da dinâmica, realizado com técnicas espectroscópicas, investigou os efeitos do pH e da temperatura nos estados conformacionais de duas proteínas de choque térmico, Hsc70 e gp96 (Fan et al., 2006). Estas proteínas tem atividades relacionadas com a imunidade e funcionam, também, como **chaperoninas**. Com o aumento da temperatura, o **dicroísmo circular** (**DC**) mostrou, para a proteína

Hsc70, uma diminuição do conteúdo de hélice alfa (α). Observaram-se duas fases de transição a um pH de 6 a 8: a primeira inicia na faixa de 30 a 40 ^{o}C e a segunda ocorre a temperaturas acima de 60 ^{o}C. Medidas de fluorescência da sonda ANS (Naftaleno Ácido Sulfônico) mostraram que, com a elevação da temperatura, um aumento da acessibilidade das regiões apolares ao solvente em ambas as proteínas. Mais do que à seqüência nucleotídica ou à estrutura 3D, a semelhança da resposta conformacional às variações da temperatura e pH do ambiente foram atribuídas à flexibilidade estrutural das chaperoninas (Fan et al., 2006).

1.1.4 A enzima InhA

A enzima 2-*trans*-enoil-ACP (CoA) redutase (InhA) do *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) é uma enoil redutase (ENR) e participa do processo de síntese dos ácidos micólicos, importantes constituintes da parede do MTB (Baldock et al., 1996). Esta enzima catalisa a transferência de um hidreto para o substrato alocado em seu sítio catalítico usando a coenzima NADH, que é um agente redutor encontrado em diversos processos bioquímicos nos seres vivos, como fonte de hidreto (H^{-}).

Foi identificada uma ORF (fase aberta de leitura), como sendo responsável pela codificação da proteína alvo (InhA) da isoniazida (INH) (Banerjee et al., 1994). Um único evento mutagênico neste gene, resultando na substituição na posição 94 do aminoácido serina por uma alanina, confere ao MTB o fenótipo de resistência ao tuberculostático INH, tornando-o incapaz de sintetizar ácidos micólicos (Banerjee et al., 1994; Dessen et al.,1995; Quémard et al., 1995).

A InhA é um membro das enzimas da família das desidrogenase/redutase de cadeia curta (SDR – *short chain dehydrogenase/reductase*), que utilizam como

coenzima uma molécula de NAD(H) ou NADP(H) (Dessen et al., 1995). A principal característica desta família é a topologia do esqueleto polipeptídico, onde cada subunidade é formada por um único domínio com um núcleo central do tipo *Rossmann-fold* (Schroeder, 2004). *Rossmann-fold* caracteriza-se por um leque de 7 fitas beta (β) paralelas formando uma folha β, a qual é flanqueada por hélices alfa (α) formando o domínio de ligação ao NADH (Figura 1.3) (Rozwarski et al.,1999; Schroeder et al., 2005).

Além do MTB, esta enzima pode ser encontrada em outras espécies bacterianas, como, por exemplo, na *Escherichia coli* e *H. pylori* (Rozwarski et al.,1999).

Para que a inibição da InhA por INH seja efetiva, a molécula de INHA deve sofrer uma transformação para a forma biologicamente ativa (Dessen et al., 1995). A INH liga-se ao anel nicotinamida do NAD(H), dando origem ao complexo inibidor covalente INH-NAD, também chamado de aduto (Rozwarski et al., 1998; Oliveira et al., 2006).

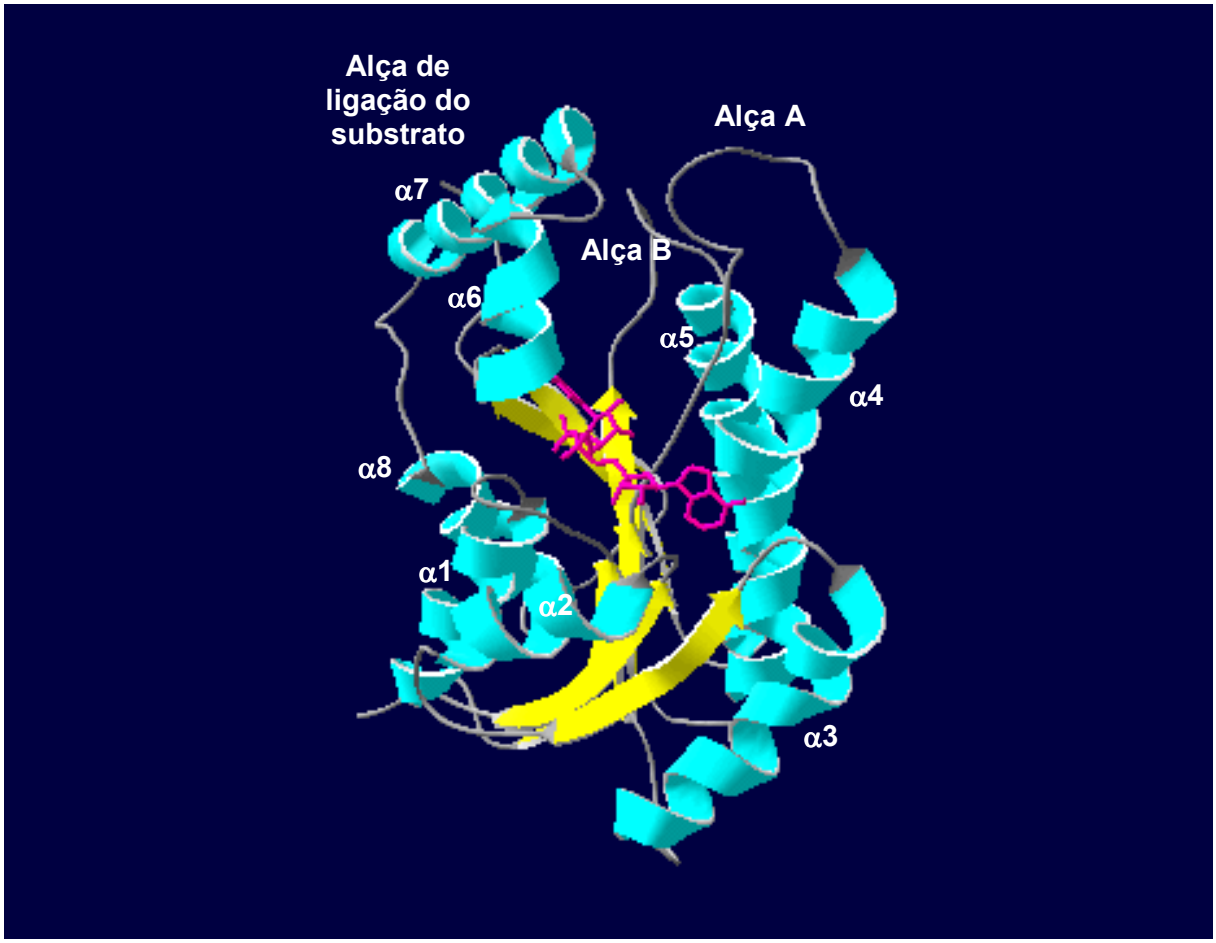

Figura 1.3 Representação do tipo *ribbons* da cadeia principal da estrutura terciária da enzima InhA de *Mycobacterium tuberculosis*. As oito hélices α (em ciano), flanqueiam a folha β (em amarelo) constituída de sete fitas. A coenzima NADH (magenta), encontra-se em uma conformação estendida acima do núcleo formado pela folha β. Encontram-se destacadas as alças A (resíduos 100 a 114), B (resíduos 150 a 161) e de ligação ao substrato (resíduos 197 a 204 da hélice α 6; resíduos 209 a 220 da hélice α 7) (código PDB: 1ENY – Dessen et al., 1995).

A estrutura geral da InhA lembra uma “cadeira” onde o sítio de ligação do NADH é uma cavidade entre o “encosto” e o “assento” da estrutura. O sítio de ligação do substrato localiza-se no “encosto” (Dessen et al., 1995). Estudos do mecanismo enzimático em estado estacionário da InhA do MTB indicaram que, apesar do mecanismo cinético não ser estritamente ordenado, o NADH liga-se preferencialmente à enzima e é seguido pelo substrato (Quémard et al., 1995).

A unidade biológica funcional da InhA é um homotetrâmero (Figura 1.4) (Rozwarski et al., 1999).

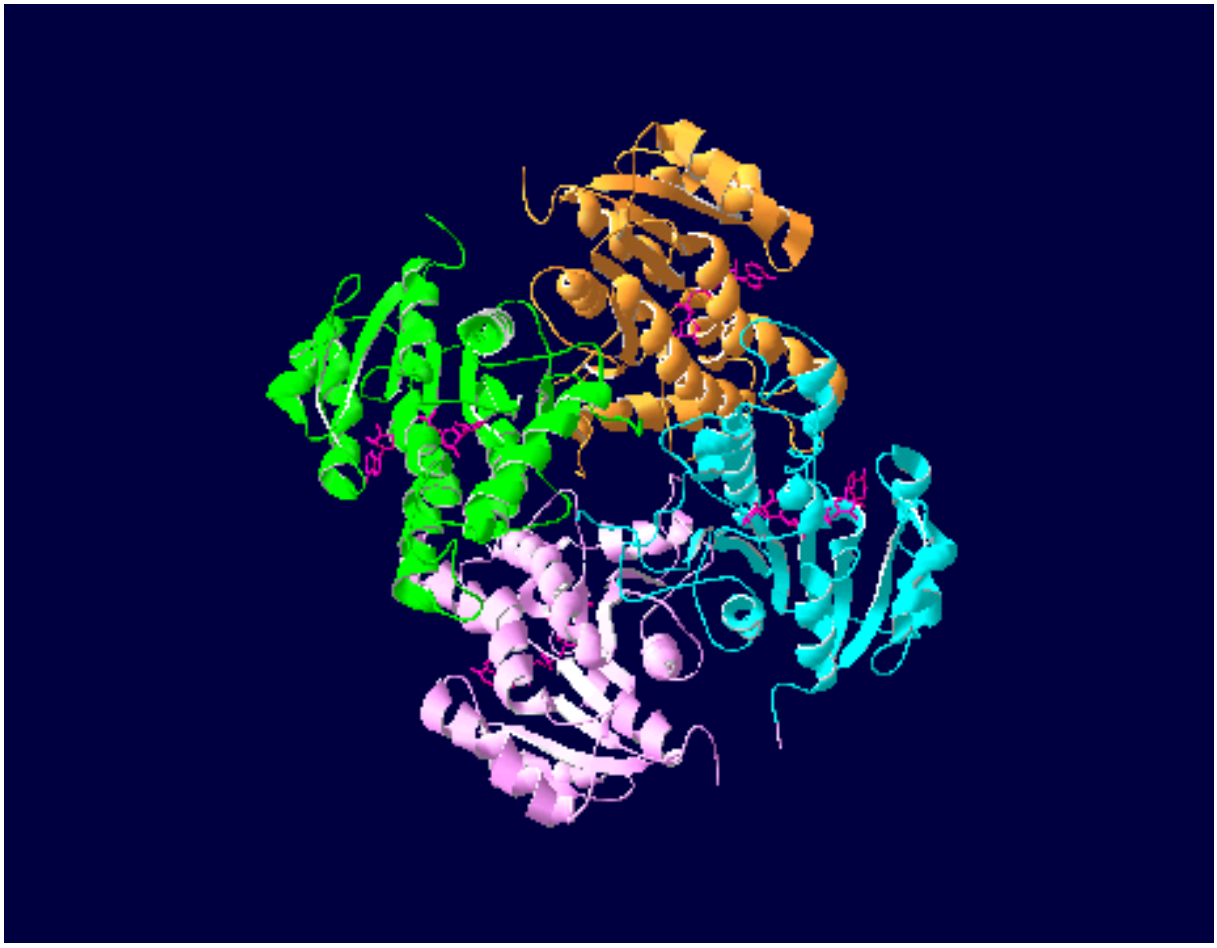

Figura 1.4 Representação do tipo *ribbons* da cadeia principal da estrutura terciária da unidade biológica funcional da enzima InhA de *Mycobacterium tuberculosis* (código PDB: 1BVR). As quatro cores diferentes destacam cada uma das subunidades do homotetrâmero. A coenzima NADH está representada em modelo de palitos (magenta).

A análise independente de cada subunidade revela que a região da cadeia no lado oposto ao sítio ativo tem um fator de temperatura (Fator-B) muito baixo (região de baixa mobilidade) e deve estar envolvido no contato com as outras subunidades, na parte interna do homotetrâmetro. Uma porção considerável de cada subunidade esta envolvida em contatos intermoleculares (Rozwarski et al., 1999).

Os aminoácidos que delimitam o lado mais externo da cavidade de ligação, à esquerda do substrato, formam duas hélices α perpendiculares (α6 e α7) sustentadas por alças e formam a “alça de ligação ao substrato” (resíduos 196-219).

Esta alça de ligação na InhA é maior do que as das demais ENRs, o que justifica a capacidade da enzima do MTB em reduzir substratos maiores (Schroeder, 2004).

Em cada uma das subunidades, o NADH assume uma conformação estendida dentro de sua cavidade de ligação ao longo das porções carbóxi-terminal da folha β. O anel nicotinamida do NADH se liga ao fundo, enquanto que a porção adenina se direciona para fora da cavidade de ligação. Acima do NADH, o análogo do substrato C_{16} assume uma conformação em forma de "U" (Figura 1.5) e é fixado pela alça de ligação do substrato (Rozwarski et al., 1999).

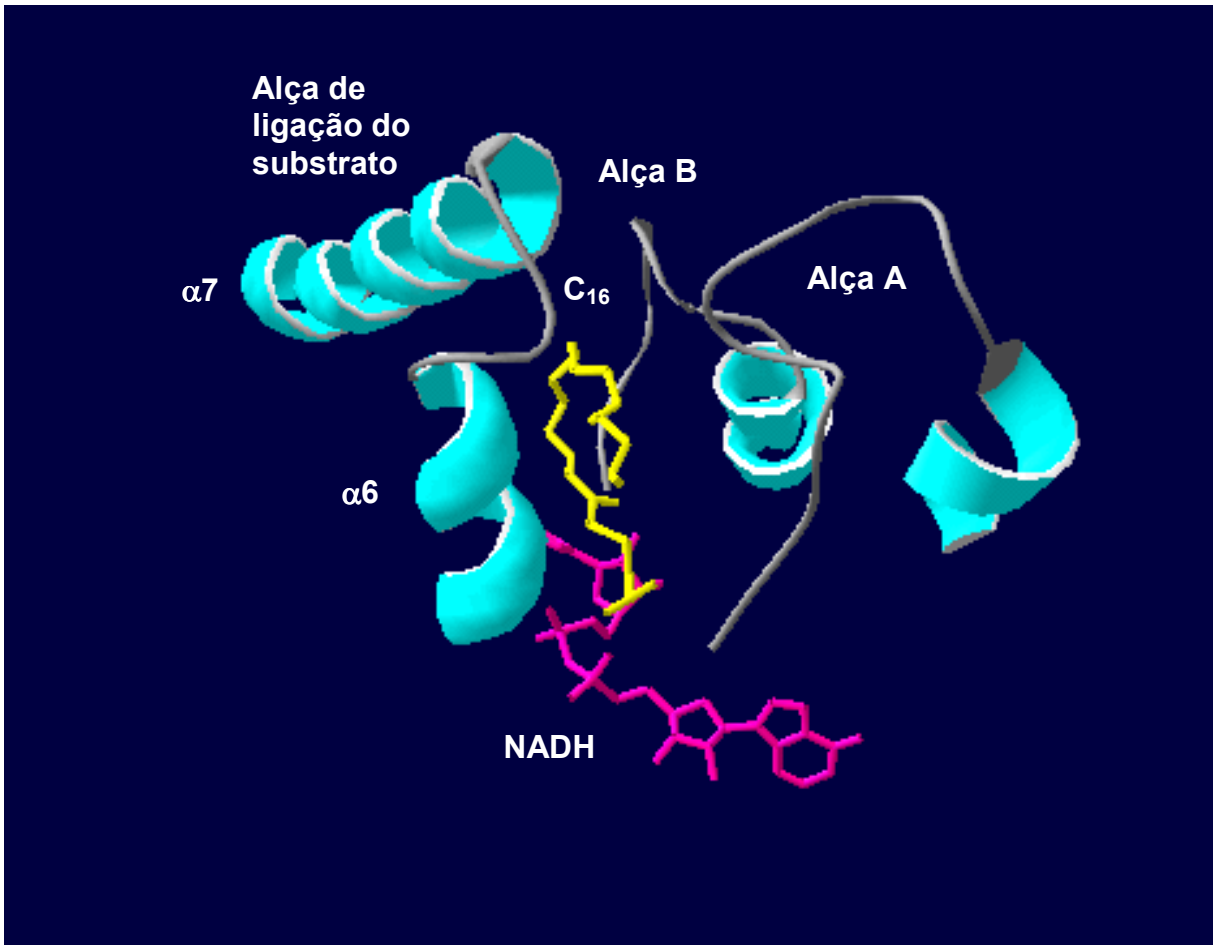

Figura 1.5 Representação do tipo *ribbons* das alças A e B e de alça de ligação do substrato da InhA (hélices α6 e α7). Entre as alças visualizam-se o análogo do substrato C_{16} e, na região inferior, a coenzima NADH (código PDB: 1BVR - subunidade C).

As duas hélices α da esquerda (α6 e α7), que são conectadas por uma pequena alça (volta), deslocam-se abrindo espaço para a entrada do substrato. Na

região de contato entre as duas hélices à esquerda e as alças à direita do substrato há o predomínio de aminoácidos não carregados e as interações entre estes dois segmentos da molécula são do tipo hidrofóbicas (Schroeder, 2004). Por se tratar de uma enzima específica do MTB e por ser o alvo primário do principal fármaco utilizada no combate à tuberculose, a isoniazida (INH), a InhA representa um alvo interessante para o desenvolvimento de novos fármacos anti-tuberculose (Schroeder, 2004). Muitos dos estudos experimentais *in vitro* (Quemard et al., 1995; Rozwarski et al., 1999; Oliveira et al., 2006) e *in silico* (Schroeder et al., 2002; Schroeder et al., 2005; Oliveira et al., 2006) envolvendo a InhA foram realizados à temperatura de 25 ^{o}C. Na simulação por DM realizada por Schroeder (2004), observou-se que a interação do NADH com a enzima InhA segue um padrão de ligação comum entre as enzimas da família das SDRs com topologia do tipo *Rossmann fold* (Schroeder et al., 2005).

Estudos experimentais da enzima InhA com a coenzima NADH, a temperaturas intracelulares do organismo animal, ainda não foram realizados. Existem variações de temperatura nos diferentes sítios anatômicos: superfície da nasofaringe a 33 ^{o}C, tecidos mais profundos, como pulmões, sangue e baço a 37 ^{o}C. Além disso, outros fatores influem na alteração da temperatura corporal, entre eles as infecções e as reações auto-imunes (Pandya et al., 2005)..

Desconhece-se, portanto, detalhes sobre o comportamento da interação entre o InhA do *Mycobacterium tuberculosis* e o NADH em temperaturas fisiológicas (33 ^{o}C a 42 ^{o}C). Não existe consenso sobre os limites da temperatura corporal normal e, portanto, sobre qual nível deve ser tomado como referência para se definir a presença de febre em um indivíduo em particular. Isto se deve às variações individuais e a variações fisiológicas da temperatura corporal, que ocorrem com os períodos do dia (ritmo circadiano), a temperatura ambiental, o ciclo menstrual, a

digestão dos alimentos, a gravidez, os exercícios físicos, o estresse emocional e a desidratação (Voltarelli, 1994). No quadro 1.1 foram reunidas algumas citações encontradas em livros texto, que fazem menção à temperatura corporal média humana. Portanto, apesar de uma variação individual da temperatura corporal, acredita-se que o valor médio da mesma seja de 37 ^{o}C ou 310 K (Wong, 1997).

Quadro 1.1 Temperatura média corporal humana

Temperatura corporal média humana	**Texto circunjacente**
37 ^{o}C	"... *a human can maintain its ´internal pond` at a constant temperature of 37 ^{o}C*" (Campbell, 1993)
37 ^{o}C	"... *a healthy, resting adult human being is 98.6 ^{o}F (37 ^{o}C)*" (*World Book Encyclopedia*, 1996)
36.1 – 37.8 ^{o}C	"... *the normal range for body temperature is 97 to 100 degrees fahrenheit or 36.1 to 37.9 degrees celsius*" (Simmers, 1988)
37 ^{o}C	"... *fairly constant temperature of 98.6 degrees*" (Eisman, 1972)
37 ^{o}C	",,, *core body temperature ... the normal 37 ^{o}C* (Mackoviak et al., 1992)
37 ^{o}C	" ... *37 ^{o}C, the physiological temperature of the human body* (Mereghetti et al., 2008)
37 ^{o}C	"... limiar térmico (que normalmente é controlado rigidamente em torno de 37 ^{o}C (Voltarelli, 1994)
37 ^{o}C	O valor médio da temperatura corporal humana é de 37 ^{o}C (Wong, 1997)

Portanto, seria importante estudar o comportamento da enzima InhA do *Mycobacterium tuberculosis* em temperaturas de 37 ^{o}C (fisiológica) ou mais altas (febre), pois é nesta temperatura que ocorrem os fármacos agem.

1.2 – OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo o estudo computacional, pelo método da DM, do complexo formado entre a enzima 2-*trans*-enoil-ACP (CoA) redutase de *Mycobacterium tuberculosis* e a sua coenzima NADH, também chamado de InhA-NADH (EC 1.3.1.9) em duas diferentes temperaturas.

Para alcançar tais objetivos foram realizadas as seguintes atividades:

- simulação por DM a 25 ^{o}C (temperatura ambiente);
- simulação por DM a 37 ^{o}C (temperatura fisiológica humana).

Para avaliar a convergência entre as duas simulações, foram usados os seguintes parâmetros:

- RMSD;
- energia total, energia cinética.

Com o intuito de observar e analisar as possíveis alterações conformacionais que a enzima InhA possa sofrer com a mudança de temperatura, as simulações por DM se estenderam por um período de 20 nanossegundos. As seguintes análises foram realizadas:

- RMSD;
- Rg;
- ASAS;
- Fator-B;
- Medida do comprimento do NADH (distância C2N-C6A);
- Número de interações de hidrogênio diretas entre a enzima InhA e o NADH.

1.3 – JUSTIFICATIVA

A enzima InhA é uma enzima micobacteriana envolvida na síntese de ácidos micólicos (Dessen et al., 1995; Quemard et al., 1995) e que tem características específicas que a tornam um bom alvo para o planejamento de fármacos potencialmente tuberculostáticos. As justificativas para tal afirmativa são as seguintes:

- muitas das mutações encontradas em microrganismos resistentes à INH estão associadas à enzima ativadora deste fármaco, a KatG;

- somente uma enoil-ACP redutase é encontrada no MTB;

- a InhA é uma enzima específica da micobactéria, não interferindo no sistema FAS I humano (Rozwarski et al., 1999).

A InhA tem sido estudada através de simulações por DM (Schroeder et al., 2002; Schroeder et al., 2005; Oliveira et al., 2006) em temperatura ambiente (25 ^{o}C). Porém, os processos celulares no organismo humano, infecção e multiplicação dos microrganismos nos seres humanos ocorrem a 37 ^{o}C (Campbell, 1987; Simmers, 1988; Mackoviak et al., 1992; Mereghetti, 2008; Voltarelli, 1994).

Estudos cinéticos e de simulação por DM (Hajdú et al., 2008; Benkovik et al., 2008) mostraram que a temperatura exerce importante influência na conformação e flexibilidade das proteínas.

Considerando a constante busca por novos inibidores da InhA, com este estudo poderemos observar alterações conformacionais que esta enzima poderá apresentar com a elevação da temperatura de 25 ^{o}C a 37 ^{o}C.

CAPÍTULO 2

2.1 Materiais e Métodos

2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.1 O método de simulação por dinâmica molecular

A dinâmica molecular (DM) é um método de simulação computacional da evolução temporal do arranjo estrutural dos sistemas moleculares, isto é, de sistemas físicos compostos por átomos e moléculas (Teodoro et al., 2003). Através deste método, podem ser obtidas, em nível atômico, informações estruturais, energéticas e dinâmicas de biomoléculas de grande mobilidade (van Gunsteren & Mark, 1992).

Na DM, as interações entre os átomos do sistema molecular são descritas através das teorias da mecânica clássica associada a funções semi-empíricas (Karplus & McCammon, 2002). Desta forma, a DM permite o estudo do comportamento dinâmico microscópico dos átomos que compõem um sistema, além de representar e determinar as propriedades de equilíbrio do mesmo, como: grandezas termodinâmicas (pressão, temperatura, volume, etc.), estrutura e energia livre (Tuckerman & Martyna, 2000).

O desenvolvimento de diversos campos de força tem permitido realizar cálculos para sistemas biológicos de grandes proporções a custos computacionais mais reduzidos (Tuckerman & Martyna, 2000).

2.1.1.1 O campo de força

A função que descreve a energia potencial – e, portanto, a interação entre os diversos átomos de um sistema molecular – juntamente com seus parâmetros, é chamada de campo de força (Schroeder, 2004).

Um campo de força é composto de expressões que representam as forças intra e intermoleculares do sistema em questão. A associação de funções simples da mecânica molecular que descrevem as interações entre partículas de um sistema, de dados empíricos e de cálculos de mecânica quântica de pequenos sistemas modelo permite o cálculo da energia potencial de grandes sistemas moleculares em função de suas coordenadas atômicas (Leach, 1996; Weiner et al., 1984).

As funções que descrevem os campos de força são compostas por termos independentes, que representam: i) a vibração linear através de um estiramento; ii) a deformação angular; iii) as torções de ângulos diedros; iv) as interações entre pares de átomos não ligados covalentemente como as interações de van der Waals e as interações eletrostáticas (Figura 2.1).

As simulações por DM realizadas neste estudo utilizam a função de energia potencial do pacote AMBER (Pearlman et al., 1995).

Na simulação por DM, as forças que atuam sobre cada átomo são obtidas calculando-se a primeira derivada do potencial em relação às posições desses átomos. A partir destas forças, resolvem-se as equações do movimento para descrever como as posições atômicas variam com o tempo. A cada passo da dinâmica as forças são reavaliadas (Teodoro et al., 2003).

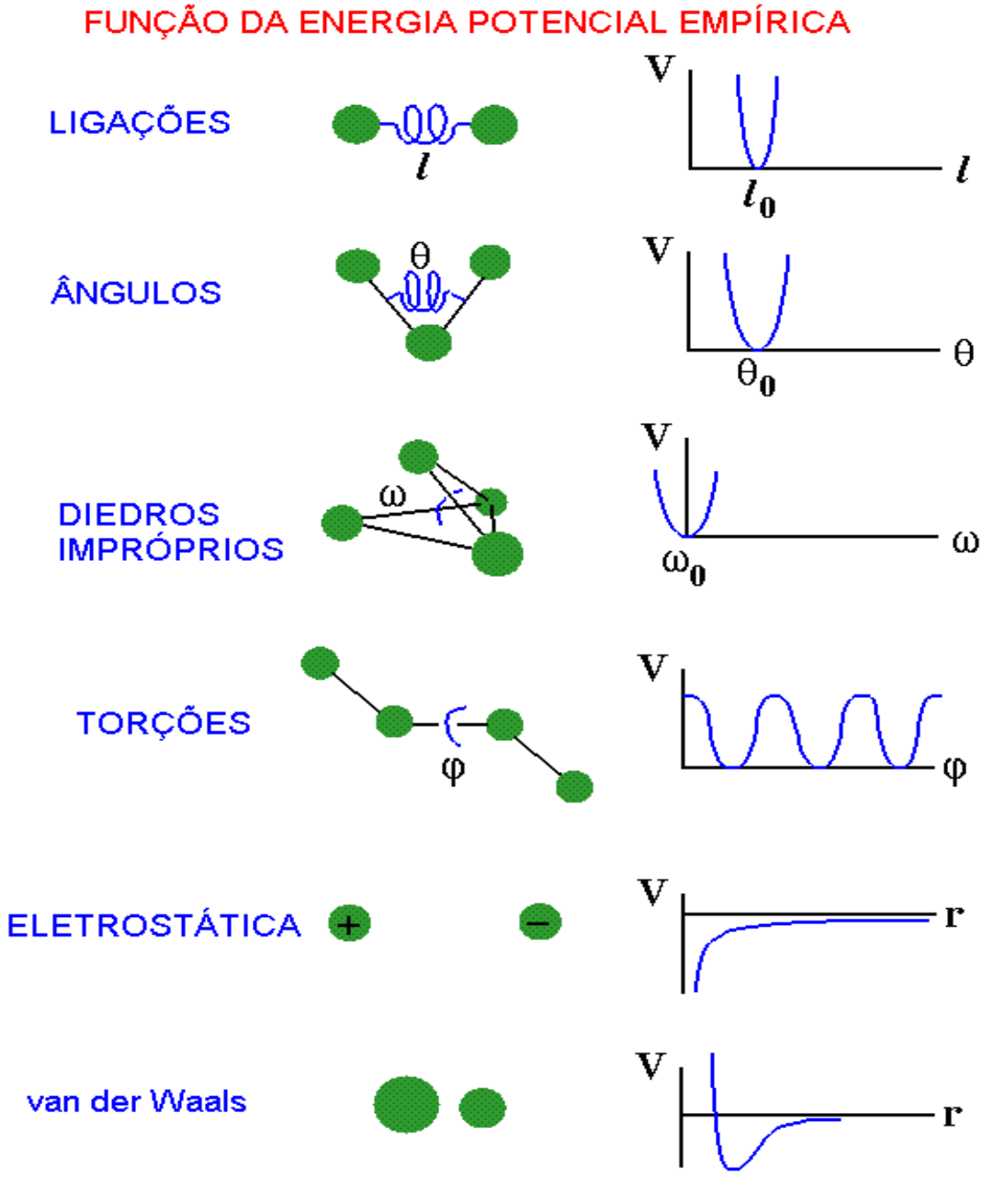

Figura 2.1 Representação esquemática dos potenciais de energia existentes nas ligações, ângulos, diedros impróprios, torções, forças eletrostáticas e de van der Waals. Figura extraída e adaptada de Steinbach.

As contribuições relativas destas forças são diferentes para os diversos tipos de átomos na molécula simulada. Elas são determinadas pelo ajuste de uma série de parâmetros, de forma que a molécula possa apresentar características que

tenham sido observadas experimentalmente ou que tenham sido calculadas pelos princípios básicos (Teodoro et al., 2003).

O número de campos de força desenvolvidos para a aplicação de moléculas de interesse biológico é consideravelmente grande, devido a grande complexidade das interações que envolvem grupos iônicos e polares em solução aquosa (Cornell et al., 1995). Atualmente, existe um conjunto de bons testes para avaliar tais campos de força. O campo de força *ff94*, que está comumente associado ao pacote de simulação do Amber, é um dos mais amplamente usados na simulação biomolecular. Após uma década de extenso uso e de testes, foram registradas algumas limitações como, por exemplo, a super-estabilização das hélices (Hornak et al, 2006).

Atualmente, avançados campos de força (Hornak et al., 2006) tem permitido uma interpretação quantitativa das dinâmicas do esqueleto peptídico próxima às conferidas pela relaxação spin de RMN e acoplamentos dipolares residuais. Estas melhoras foram somente atribuídas às modificações dos ângulos potenciais diedros φ e ψ do esqueleto polipeptídico em alguns campos de força, entre os quais o ff*99SB*. Os movimentos dos aminoácidos das cadeias laterais, também tem um importante papel funcional, mas ajustes oportunos foram realizados no passado (Showalter et al., 2007).

As trajetórias resultantes de simulações por DM com campo de força AMBER99SB tem coeficientes de correlação mais altos, um RMSD mais baixo e um desvio padrão inferior na relação S_{DM}^2 quando comparadas com as obtidas com um campo de força AMBER99. Isso demonstra que o campo de força 99SB consegue reproduzir, mais fielmente, os parâmetros de ordem experimental (Showalter & Brüschweiler, 2007).

Pelos argumentos expostos acima, optou-se por utilizar, no presente estudo, um campo de força mais atualizado (*ff99SB*), cujo novo conjunto de parâmetros surgiu para obter um equilíbrio maior entre os elementos da estrutura secundária, observando-se uma melhor distribuição dos diedros do esqueleto peptídico para a glicina e alanina com relação aos dados encontrados no PDB. Isso também leva a um ajuste mais adequado, conferindo-se dados experimentais publicados para preferências conformacionais de pequenos peptídeos de alanina assim como uma melhor harmonia dos dados de relaxação experimental de RNM de sistemas protéicos testados (Hornak et al., 2006).

Um progresso considerável no tratamento das forças eletrostáticas em sistema biológicos foi feito com a utilização do somatório de Ewald e do método PME (*particle-mesh Ewald*) (Darden et al., 1993; Essmann et al., 1995). Este método impõe uma periodicidade infinita ao sistema e permite o cálculo de todas as interações eletrostáticas sem truncamento, levando, em princípio, a uma avaliação mais exata destas interações. Transformadas de Fourier são utilizadas para acelerar o cálculo das interações no espaço recíproco. Este método resulta em trajetórias estáveis e foi logo adotado na simulação de proteínas (Fox & Kollman, 1996) e ácidos nucléicos (Cheatham & Kollman, 1996; Cheatham et al., 1997) em solução.

Sob algumas condições, a periodicidade do sistema pode levar a distorções na simulação de líquidos e soluções (Hünenberger & McCammon, 1999a e 1999b; Weber et al., 2000). Portanto, alguns cuidados devem ser tomados para a construção destes sistemas, entre eles a adição de contra-íons em regiões próximas a grupos carregados da macromolécula (Ibragimova & Wade, 1998) e utilização de uma camada de solvatação suficientemente grande para não causar distorções nas interações (consideração de um sistema diluído) (Norberto de Souza & Ornestein, 1997).

Na verdade, a escolha do método de tratamento das interações eletrostáticas depende das características dos sistemas e do balanço entre o grau de exatidão necessário e o custo computacional da simulação (van Gunsteren & Berendsen, 1990).

2.1.1.2 Organização de uma simulação por Dinâmica Molecular

Para que a qualidade dos resultados de uma DM seja satisfatória, é necessário que haja, na entrada dos parâmetros fornecidos, uma adequada descrição das interações interatômicas (Tuckerman & Martyna, 2000).

Uma simulação por DM exige o cumprimento de algumas etapas, que serão descritas a seguir (Karplus & Petsko, 1990; Norberto de Souza, 1994):

INICIAÇÃO

Inicialmente, é preciso conhecer as coordenadas e velocidades dos átomos (temperatura) que compõem o sistema, para que possam ser calculadas as novas posições e velocidades e, assim, gerar a trajetória (Schroeder, 2004). A estrutura inicial da biomolécula a ser simulada por DM pode ser obtida a partir da estrutura 3D obtida pela cristalografia por difração de raios-X, por ressonância magnética nuclear (RMN) ou por um modelo gerado por estudos de modelagem molecular. Esta molécula é colocada em um meio de simulação (pode ser vácuo, um meio contínuo ou de solvente explícito) e, se necessário, são adicionados contra-íons para que o sistema se torne neutro. As possíveis tensões e interações indesejáveis que possam existir na conformação inicial são corrigidas através da relaxação do sistema, atribuindo-se uma minimização de energia (Schroeder, 2004).

AQUECIMENTO E EQUILIBRAÇÃO

Uma vez estabelecidas as coordenadas iniciais da simulação, são atribuídas as velocidades para uma temperatura desejada. Para que não sejam introduzidas perturbações no sistema, o mesmo é aquecido lentamente. Inicialmente, as velocidades são atribuídas para uma baixa temperatura (de um modo geral, 10 K) e, através de sucessivas termalizações (como 10$\rightarrow$50 K, 50$\rightarrow$100 K, 100$\rightarrow$150 K, etc) esta temperatura sofre um aumento até atingir os níveis desejados (Norberto de Souza & Ornstein, 1999). Para isso, as velocidades são reatribuídas a cada nova temperatura.

Após ter sido atingida a temperatura almejada, é preciso equilibrar o sistema até que suas propriedades (energias cinética e potenciais, temperatura, pressão e outros parâmetros) se tornem estáveis (Schroeder, 2004).

PRODUÇÃO

Após o sistema entrar em equilíbrio, ele passa para a fase de produção. Nesta fase, as propriedades médias dos sistemas já estão estabilizadas e podem, desta forma, ser medidas. Dentro desta fase, por outro lado, pode-se perceber regiões da trajetória mais estáveis do que outras. No presente trabalho, a região compreendida entre os 15 e 20 ns foi considerada a de maior estabilidade, por apresentar os menores valores de desvio padrão nas medidas de RMSD (Figura 3.2). Os últimos 5 ns da trajetória da fase de produção, portanto, foram utilizados para o cálculo dos parâmetros necessários.

2.1.1.3 Simulação por dinâmica molecular da enzima InhA de MTB a 25 ^{o}C e 37 ^{o}C

As simulações por DM, neste trabalho, foram realizadas com o pacote do AMBER versão 9.0. Utilizou-se, como estrutura incial para o complexo InhA-NADH, a estrutura cristalina da InhA (cód. pdb: 1ENY) com uma resolução de 2,2 Å (Dessen et al., 1995), incluindo as moléculas das águas cristalográficas. A molécula de InhA foi preparada a partir das coordenadas da 1ENY.pdb, com 268 aminoácidos. Esta estrutura não apresenta coordenadas para o primeiro resíduo Met1. A Thr2 original foi substituída por um resíduo Ala (Schroeder, 2004). As coordenadas do NADH também foram obtidas da estrutura 1ENY.pdb e foram utilizadas em conjunto com os parâmetros do NADH e do campo de força do NADH gerados pelo Prof. Dr. Ulf Ryde (Apêndice 1).

Os dados resultantes das simulações poderão se referir ao complexo *wt* InhA-NADH ou apenas à enzima *wt* InhA (InhA livre), de acordo com o contexto.

Todos os átomos do sistema foram tratados explicitamente (modelo atomístico) e seus resíduos de aminoácidos foram considerados em pH fisiológico. Neste pH, a proteína apresenta uma carga líquida -4, e o NADH apresenta carga -2, por isso o sistema a ser simulado foi neutralizado pela adição de 6 íons de sódio (Na+), próximos a resídiuos Asp na superfície da proteína, a 5 Å de distância. Os resíduos de histidina HIS foram avaliados em relação à sua protonação e substituídos por HID (posição δ protonada) ou HIE (posição ε protonada). Após esta avaliação obtivemos os seguintes resíduos: 23 HIE, 69 HID, 92 HIE, 120 HID, 264 HID (Schroeder, 2004).

O sistema foi ajustado no interior de uma caixa retangular d'água (Figura 2.2), adicionando-se moléculas do tipo TIP3P. As dimensões iniciais da caixa foram de 77,7 Å x 73,3 Å x 77,3 Å.

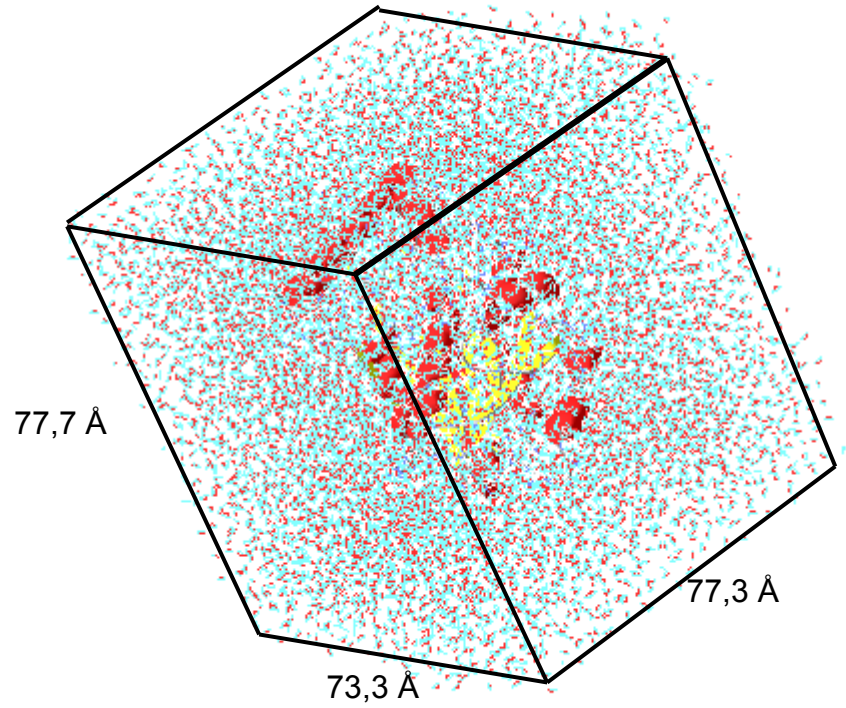

Figura 2.2 Caixa d´água ortorrômbica de dimensões 77,7 Å x 73,3 Å x 77,3 Å, contendo o complexo *wt* InhA-NADH (amarelo e vermelho) e 6 contra-íons Na^+. As moléculas d´água do tipo TIP3P estão em ciano e vermelho.

Na tabela 2.1 apresentamos a composição do sistema que foi utilizado em ambas as simulações por DM.

Tabela 2.1 Composição do sistema de simulação do complexo da enzima InhA espécie selvagem com o NADH (*wt* InhA-NADH).

wt*INHA-NADH*	*Moléculas*	*Átomos*
wt InhA	1 – 268	1 – 4.008
NADH	269	4.009 – 4.079
6 Na+	270 – 275	4.080 – 4.085
Águas cristalográficas	276 – 316	4.086 – 4.208
TIP3P (10.491 moléculas)	317 – 10.807	4.209 – 35.681
Total	10.807 moléculas	35.681 átomos

As simulações por DM foram realizadas com o módulo SANDER do programa AMBER 9.0 (Pearlman, 1995), num *ensemble* isobárico-isotérmico (NPT), com temperaturas de 298 K (25 ^oC) e 310 K (37 ^oC), respectivamente, e pressão de 1 atm. O tempo das simulações foi de 20 ns para cada uma, o que equivale a cerca de 3 meses e meio de tempo real, tendo gerado, aproximadamente, 250 GB em volume

de dados. Para o processamento das duas simulações por DM e análise dos dados foi utilizado um CP com processador Core 2 Duo, memória RAM 2 GB, display com LCD de 19", Wide Screen Ultra Bright, DVD RW (grava e lê DVD/CD).

Os parâmetros da macromolécula, com todos os átomos explicitamente considerados (modelo atomístico), contra-íons e moléculas de água TIP3P, foram obtidos da biblioteca parm99.dat do AMBER 9.0 (Case et al., 2006). As cargas parciais e parâmetros do NADH (Apêndice 1) foram obtidos a partir da tese da Dra. Evelyn Schroeder (Schroeder, 2004), tendo sido gerados pelo Prof. Dr. Ulf Ryde (Ryde, 1995). Eles foram gerados a partir de cálculos *ab initio* com RHF/6-31G* e ajustados com o programa RESP (Bayly et al., 1993) e são totalmente compatíveis com o campo de força do AMBER (Cornell et al., 1995).

Todos os átomos de hidrogênio, íons e moléculas de água foram, inicialmente, submetidas a 100 passos de minimização de energia com *steepest descent* para remover os contatos muito próximos de *van der Waals*. O sistema foi, assim, relaxado com etapas sequënciais de energia de minimização onde os movimentos do soluto foram gradualmente liberados de forma que nenhuma restrição foi aplicada.

Recomenda-se que o aumento da temperatura seja gradual, a fim de não ocasionar uma perturbação ao sistema (fase de equilibração). Por isso, a temperatura foi sendo aumentada de 10 K para 298 K em 6 etapas (10 K para 50 K, 50 K para 100 K, ...) e as velocidades de cada etapa foram designadas de acordo com a **distribuição Maxwell-Boltzmann** para aquela temperatura e equilibrada por 200 ps (Norberto de Souza & Ornestein, 1999).

2.1.1.4 Análise dos resultados obtidos pelas simulações por dinâmica molecular da enzima InhA de MTB a 25 ^{o}C e 37 ^{o}C

Após a obtenção das duas trajetórias com a InhA de MTB a 25 ^{o}C e 37 ^{o}C por um período de 20 ns, foram calculados os parâmetros necessários para a análise do sistema. É importante ressaltar que as simulações foram feitas utilizando-se a proteína InhA em complexo com a coenzima NADH e as 41 águas cristalográficas. O cálculo dos parâmetros foi feito considerando-se o complexo InhA-NADH ou a InhA livre (sem o NADH). Ao se escrever "InhA", faz-se referência a dados relacionados apenas à enzima InhA.

Neste trabalho, a expressão "temperatura ambiente" refere-se à temperatura de 25 ^{o}C, enquanto que "temperatura fisiológica" corresponde a 37 ^{o}C.

Para se avaliar a estabilidade das trajetórias, foi medido o desvio médio quadrático (RMSD - *root mean-square deviation)*. A partir deste parâmetro (Figura 3.2), pôde-se observar uma área nitidamente mais estável entre os 15 e 20 ns de ambas as trajetórias. São nestes últimos 5 ns das trajetórias que foram realizados os cálculos dos demais parâmetros.

Para a medida da estimativa da variação do tamanho da proteína durante as simulações, utilizou-se o Raio de Giro (Rg).

Tanto o RMSD quanto o Rg foram calculados em relação à cadeia principal (CP), a todos os átomos (TA) e ao carbono α (Cα) da proteína InhA. A CP, neste contexto, é constituída pelos átomos de Nitrogênio (N), Carbono (C), Carbono α (Cα) e Oxigênio (O).

A extensão da exposição do complexo molecular InhA-NADH ao solvente água (ASAS) foi calculada com o programa NACCESS (Hubbard & Thornton, 1993). Os resultados obtidos são discriminados nos seus componentes polares, apolares (hidrofóbicos) da cadeia principal e cadeia lateral.

O Fator de temperatura ou Fator-B (em inglês *B-factor*) é um importante parâmetro que mede a flexibilidade da proteína. Optamos por denominá-lo, no texto, como Fator-B. Este parâmetro também foi calculado utilizando-se os dados dos últimos 5 ns, considerando-se a CP da InhA.

O valor do comprimento da conformação estendida do NAD é obtido pela mensuração da distância entre o carbono 6 (C6) da adenina (anel A) do NAD e o carbono 2 (C2) do anel nicotinamida (anel N) (Bell et al., 1997). Esta medida é de cerca 12,5 Å (Bell et al., 1997).

Foram consideradas ligações de hidrogênio (H) todas as que apresentavam distância igual ou inferior a 3,35 Å entre o H e o outro átomo.

Critérios observados no HBPLUS quanto à medida dos ângulos mínimos:

- DHA 90.00
- HAAA 90.00
- DAAA 90.00

CAPÍTULO 3

3.1 Resultados e discussões

3.1 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1.1 Convergência e estabilidade das simulações por dinâmica molecular (DM) da enzima InhA em duas temperaturas (25 °C e 37 °C)

A convergência das simulações por DM das moléculas biológicas é aferida, tradicionalmente, pela avaliação de parâmetros que constatam a estabilidade das mesmas (Norberto de Souza & Ornstein, 1999). Para isso, alguns parâmetros gerais como energia total (Figura 3.1) (energias potencial e cinética), temperatura, volume e densidade dos sistemas são monitorados durante as simulações por DM.

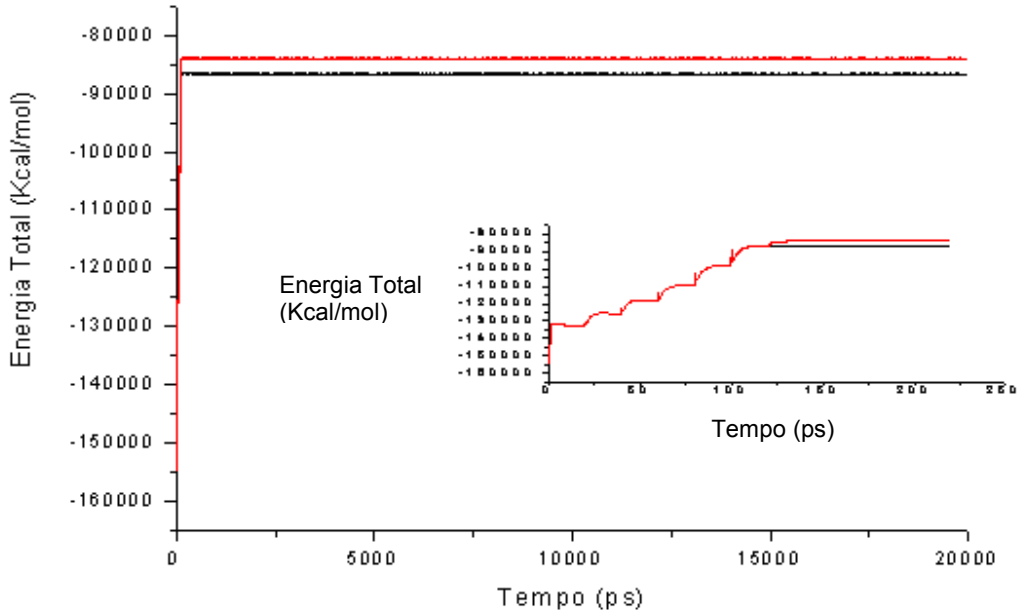

Figura 3.1 Gráfico da energia total do sistema aquoso InhA-NADH em função do tempo de simulação. A simulação a 25 °C (preto) e (vermelho) 37 °C. Observa-se uma nítida estabilidade energética após os primeiros 120 ps. Na figura inserto observamos o comportamento da energia total após a minimização e durante o período de aquecimento (0 a 200 ps).

O monitoramento dos parâmetros energéticos das simulações do complexo InhA-NADH em ambas as temperaturas mostrou que os valores observados alcançaram um patamar após os 120 ps das trajetórias, permanecendo estáveis durante este período de equilibração e fase de produção (Figura 3.1).

Por outro lado, visto que o nosso interesse refere-se essencialmente às alterações que a estrutura da macromolécula (InhA) sofre durante a trajetória dinâmica, em relação à estrutura inicial (cód pdb: 1ENY), a raiz do desvio médio quadrático (RMSD – *root mean-square deviation*) foi o principal parâmetro utilizado para se avaliar a estabilidade da simulação.

Este é um procedimento padrão em análises de simulações por DM em sistemas biológicos (Schroeder, 2004; Norberto de Souza O. & Ornstein R.L., 1999; Hornak et al., 2006).

O RMSD é uma medida global da macromolécula e que pode ser avaliado utilizando-se todos os átomos, inclusive os das cadeias laterais, ou apenas os átomos do esqueleto polipeptídico (N, Cα, C, O) ou, ainda, o Cα (carbono alfa).

O valor médio e desvio padrão do RMSD da cadeia principal a 25 °C é de 1,28 ± 0,13 Å e de 1,35 ± 0,17 Å a 37 °C, nos últimos 5 ns da trajetória (Figura 3.2 e Tabela 3.1). Os gráficos iniciais referentes aos RMSDs e aos demais parâmetros mostram cálculos que se referem à estrutura protéica isolada (InhA), ignorando o seu ligante NADH. Para isso, no momento da obtenção das coordenadas, pelo programa ptraj do AMBER, além das águas (cristalinas e da caixa) e dos íons sódio (Na^+), a coenzima NADH também foi removida. Na Figura 3.2, observam-se as curvas referentes ao RMSD da simulação por DM da InhA a 25 °C e 37 °C.

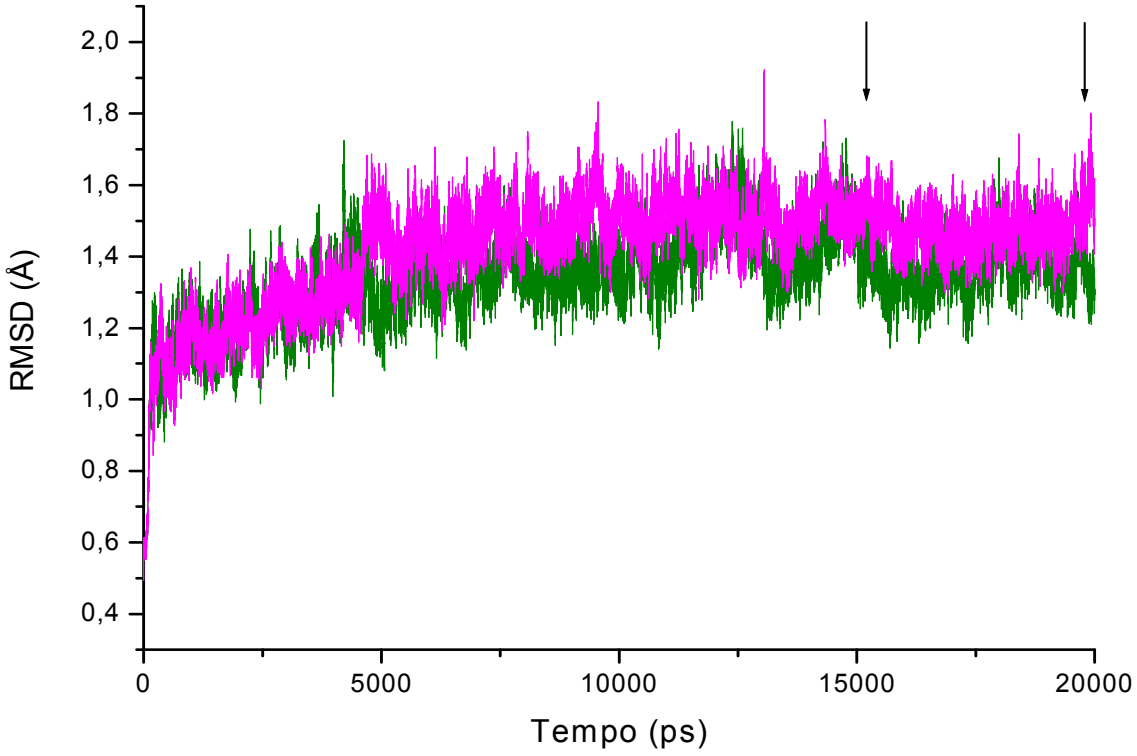

Figura 3.2 RMSD da cadeia principal da enzima InhA a 25 °C (verde) e a 37 °C (magenta) em função do tempo para as simulações por DM durante 20 ns. A média e desvio padrão do RMSD da InhA a 25 °C são de 1,28 ± 0,13 Å nos últimos 5 ns da trajetória. Os átomos que constituem a cadeia principal são os de nitrogênio (N), carbono α (Ca), carbono (C) e oxigênio (O). O RMSD foi calculado em relação à estrutura cristalina 1 ENY. Com a elevação da temperatura para 37 °C, ocorre um aumento da média do RMSD para 1,35 ± 0,17 Å. O cálculo dos parâmetros (Fator-B, distância entre átomos) foram calculados com os valores correspondentes à porção da trajetória mais estável, que vai de 15 a 20 ns.

Na Tabela 3.1 estão descritos os valores dos RMSDs em função do tempo das trajetórias do complexo InhA-NADH em ambas as temperaturas. Todos os RMSDs foram calculados com o programa ptraj do AMBER 9.0.

Tabela 3.1 Valores dos RMSDs do complexo InhA-NADH, em ambas as temperaturas, avaliadas durante toda a simulação (20 ns) e nos últimos 5 ns da trajetória.

	RMSD (Å)		
tempo: 0-20 ns	TA	CP (N, C, O, Cα)	Cα
25 °C	2,35 ± 0,20	1,34 ± 0,13	1,33 ± 0,13
37 °C	2,34 ± 0,18	1,42 ± 0,15	1,38 ± 0,15
tempo: 15-20 ns			
25 °C	2,44 ± 0,07	1,28 ± 0,13	1,35 ± 0,07
37 °C	2,44 ± 0,06	1,35 ± 0,17	1,44 ± 0,07

TA: todos os átomos **CP:** cadeia principal (N, C, O, Cα) **Cα:** carbono alfa

O raio de giro é definido como a média ponderada da distribuição das massas atômicas em relação ao centro de massa da macromolécula, medindo a compactação desta última e nos fornecendo uma estimativa da variação do tamanho da proteína durante as simulações.

A forma equacional do raio de giro instantâneo pode ser expressa como (Garofoli et. al., 2004):

$$\frac{1}{M}\sum_{i=1}^{N} m_i\left(\vec{r}_i - \vec{r}_{CM}\right)^2$$

aonde N = número total de átomos, m_i = massa do átomo i, r_i = posição do átomo i, r_{CM} = posição do centro de massa e M = massa total do sistema.

Na tabela 3.2 foram organizados os valores dos raios de giro por temperatura e tipos de resíduos considerados (todos os átomos, somente a cadeia principal, carbono α). Na Figura 3.3 temos os valores do raio de giro para a cadeia principal nas temperaturas de 25 °C e 37 °C.

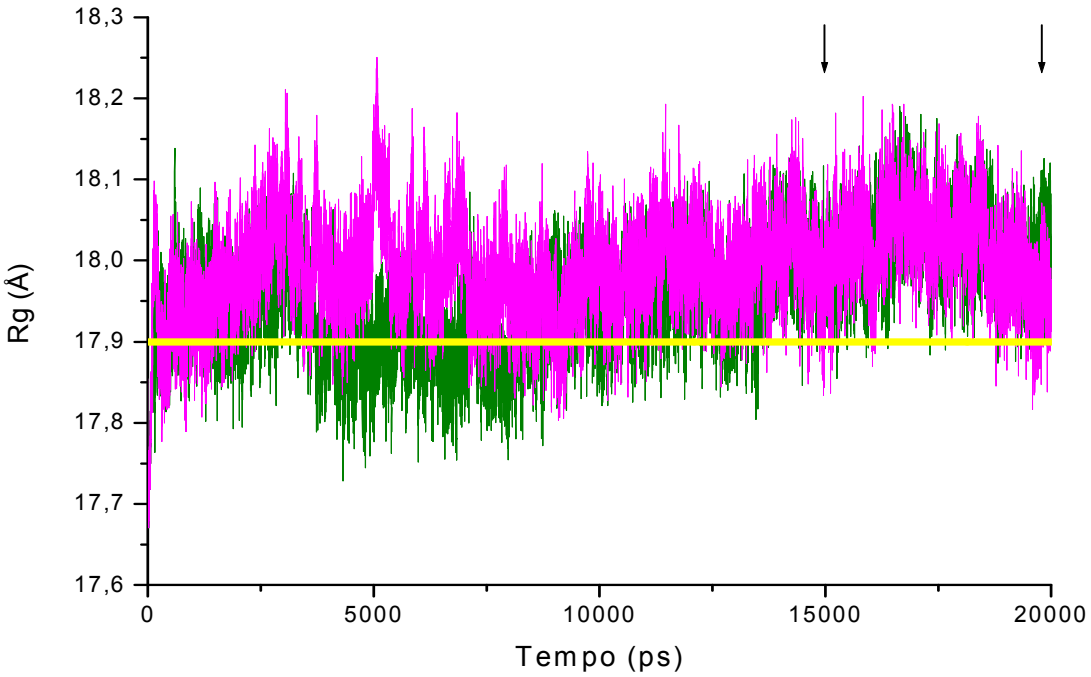

Figura 3.3 Raio de giro da enzima InhA em ambas as temperaturas nos 20 ns da trajetória, sem o NADH. Em magenta, está representado o Rg a 37 ^{o}C; em verde, tem-se o Rg a 25 ^{o}C e a linha em ciano corresponde ao Rg da estrutura cristalográfica 1ENY. Não existe diferença estatisticamente significativa entre os Rg das duas temperaturas.

O raio de giro foi escolhido para providenciar uma informação global da estabilidade mecânica da proteína durante a trajetória, para analisar mais especificamente a tendência da proteína ser submetida a transições conformacionais em uma direção específica do espaço.

Tabela 3.2 Valores dos Rg da InhA, em ambas as temperaturas, avaliadas durante toda a simulação (20 ns) e nos últimos 5 ns da trajetória.

Tempo/ Rg (Å)	TA	CP	Cα
tempo: 0-20 ns			
25 °C	18,13 ± 0,06	17,95 ± 0,06	17,95 ± 0,06
37 °C	18,17 ± 0,06	17,99 ± 0,06	17,99 ± 0,06
tempo: 15-20 ns			
25 °C	18,17 ± 0,05	18,01 ± 0,05	18,01 ± 0,05
37 °C	18,19 ± 0,05	18,02 ± 0,06	18,01 ± 0,05

TA: todos os átomos
CP: cadeia principal (N,C,O,Cα)
Cα: carbono alfa

Os raios de giro foram calculados com o programa ptraj do AMBER 9.0. O Rg do esqueleto polipeptídico da 1ENY é de 17,90 Å. Diferentemente do comportamento das curvas dos RMSDs, não houve alteração significativa dos valores médios e desvios padrões do Rg, como pode ser conferido na tabela 3.2. Na Figura 3.3 e Tabela 3.2 pode-se observar uma manutenção dos valores médios do raio de giro de todos os átomos em ambas as temperaturas.

Por outro lado, a enzima InhA na simulação por DM a 37 °C mostrou um raio de giro da cadeia principal (17,99 ± 0,06 Å) maior do que o apresentado pelo cristal 1ENY (17,90 Å) e pela InhA a 25 °C (18,01±0,05 Å nos últimos 5 ns). O Rg do carbono alfa tem valores semelhantes ao do esqueleto polipeptídico.

Na Figura 3.3, pode-se visualizar com maior nitidez a elevação da curva do raio de giro (Rg) da InhA a 37 °C com relação ao Rg da InhA a 25 °C e ao da 1ENY. Uma elevação do raio de giro nas simulações da InhA com o aumento da temperatura é um resultado intuitivamente previsível, pois espera-se que o sistema em estudo, com o calor, sofra relaxamento e gradual expansão.

A Figura 3.4 confirma a maior estabilidade encontrada no período de 15 a 20 ns em ambas as trajetórias, onde se encontra o menor desvio-padrão para ambas.

A avaliação dos parâmetros do RMSD e Rg mostram que as trajetórias da InhA estão estáveis para ambas as temperaturas. Os resultados parciais do estudo sobre o sistema da InhA através de simulações por DM mostraram que a elevação da temperatura de 25 °C para 37 °C (temperatura corporal) ocasionou uma gradual mudança conformacional da enzima em estudo, expressada pelo aumento do RMSD. Tal aumento é mais nítido nos últimos 5 ns. Quanto à estimativa da variação do tamanho da proteína durante as simulações, o Rg também elevou-se com o aumento da temperatura. Este parâmetro, contudo, mostrou uma elevação uniforme em toda a trajetória e não somente nos últimos 5 ns. A macromolécula encontra-se mais compactada a 25 °C e vai sofrendo um relaxamento de suas interações atômicas, resultando em uma maior variação do seu tamanho.

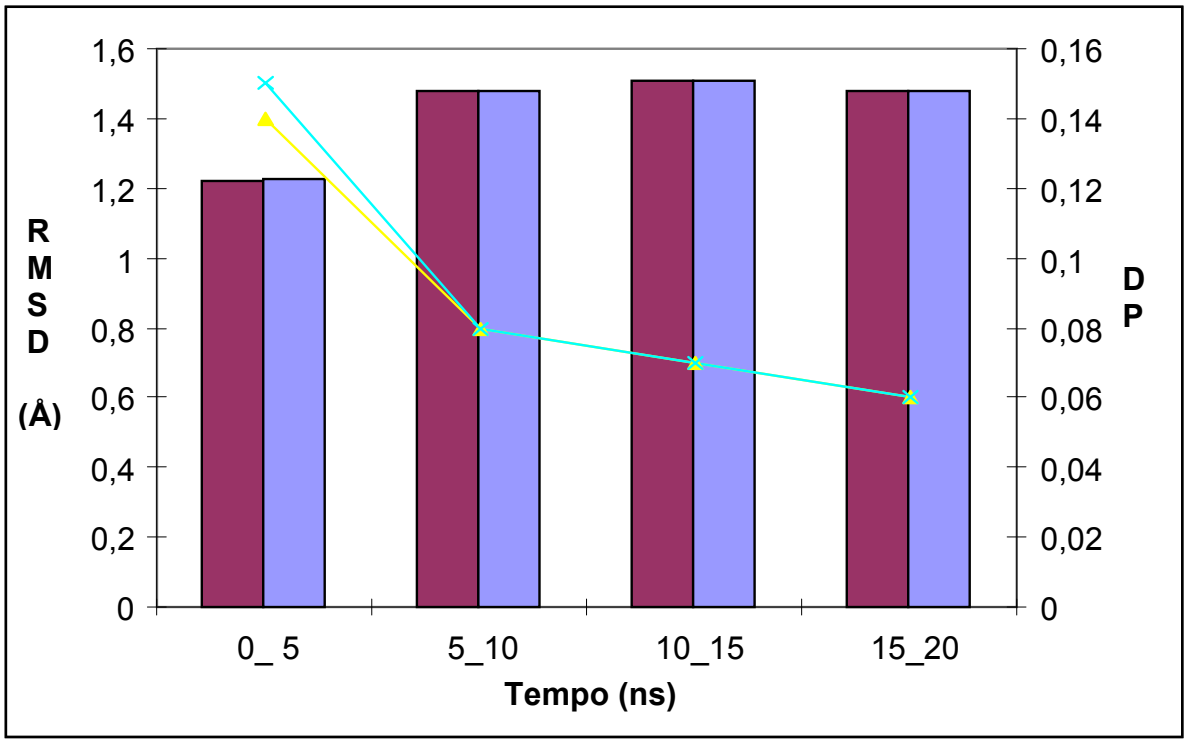

Figura 3.4 Gráfico das médias (colunas) e desvios padrões (DP - linhas) do RMSD das simulações por DM em ambas as temperaturas. O segmento de 15 a 20 ns mostra o menor DP do RMSD em relação aos outros intervalos de tempo.

Os parâmetros analisados foram acompanhados durante toda a trajetória das simulações por DM. Entretanto, para efeito de análise, somente os últimos 5 ns das trajetórias (fase de produção), quando os sistemas foram considerados estáveis de acordo com os critérios de convergência utilizados, são apresentados. A Figura 3.4 mostra uma diminuição gradual da variação dos valores dos desvios padrões do RMSDs, conforme a progressão temporal da simulação. O período da simulação por DM de 15 a 20 ns evidenciou os menores valores de desvio-padrão em ambas as trajetórias. Portanto, somente este segmento foi considerado para a análise dos demais parâmetros.

3.1.2 ASAS – Área Acessível ao Solvente

Outro parâmetro avaliado foi o da área de superfície acessível ao solvente (ASAS), que estima a extensão da exposição da molécula ao solvente água. A ASAS foi calculada com o programa NACCESS (Hubbard & Thornton, 1993).

O tamanho e a forma das macromoléculas representam um importante papel para o desempenho de suas funções. A área superficial das proteínas e de ácidos nucléicos são quantificações geométricas que determinam várias propriedades destas estruturas complexas. Recentemente, métodos de refinamento energético tem incluído a área superficial ou o volume excluído para o cálculo das energias de solvatação (Liang et al., 1998). Lee e Richards (1971) introduziram os modelos de ASAS e superfície molecular (SM) para proteínas. Este último é também conhecido como o volume excluído do solvente (Liang et al., 1998). Na Figura 3.5 podemos observar a representação esquemática dos modelos de superfície molecular.

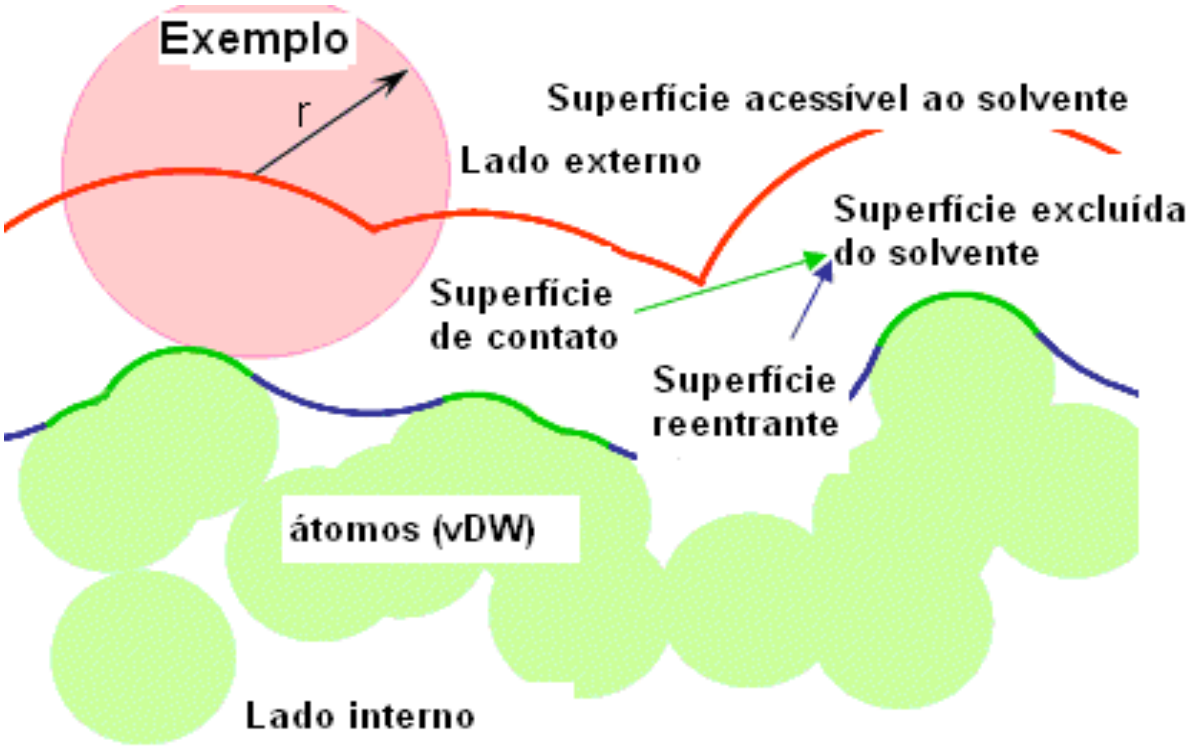

Figura 3.5 Modelos de superfície molecular. Em vermelho, temos uma linha que delimita a ASAS. A linha verde corresponde aos contatos de van der Waals: em conjunto com a linha azul, representa a superfície molecular (SM). Figura extraída e adaptada de Voss et al. (2006).

Estes modelos de superfície oferecem um instrumento para definir as propriedades geométricas das moléculas e servem de base para o desenvolvimento de algoritmos e programas para calcular tais propriedades.

Na Figura 3.6, observa-se o gráfico dos valores da ASAS da InhA a 25 °C e 37 °C, durante a trajetória completa (20 ns).

A média da ASAS da proteína InhA a 25 °C é de 12.867 ± 162 $Å^2$ e o padrão de sua curva confirma o caráter estável da trajetória, observado com os parâmetros anteriores.

A média da ASAS, em temperatura ambiente, para a InhA em complexo com o NADH (Tabela 3.3) foi de 12.489 ± 164 $Å^2$ diferindo de apenas 378 $Å^2$ dos valores obtidos pelo experimento de simulação por DM realizado com o programa AMBER 6.0 (13.110 ± 113 $Å^2$) (Schroeder, 2004). Estes resultados mostram que a utilização

de diferentes campos de força, assim como a obtenção de simulações mais longas (20 ns), não afetam, significativamente, a ASAS da proteína.

Estes valores descritos acima mostram que a presença do coenzima implica em uma pequena diminuição da ASAS. Isso se justifica pelo fato do NADH ocupar uma porção do espaço no qual a proteína faria contato com o solvente (Figura 3.5). O valor da ASAS da estrutura cristalina 1ENY (12.643 Å^2) está bastante próximo dos valores encontrados nas simulações a 25 °C.

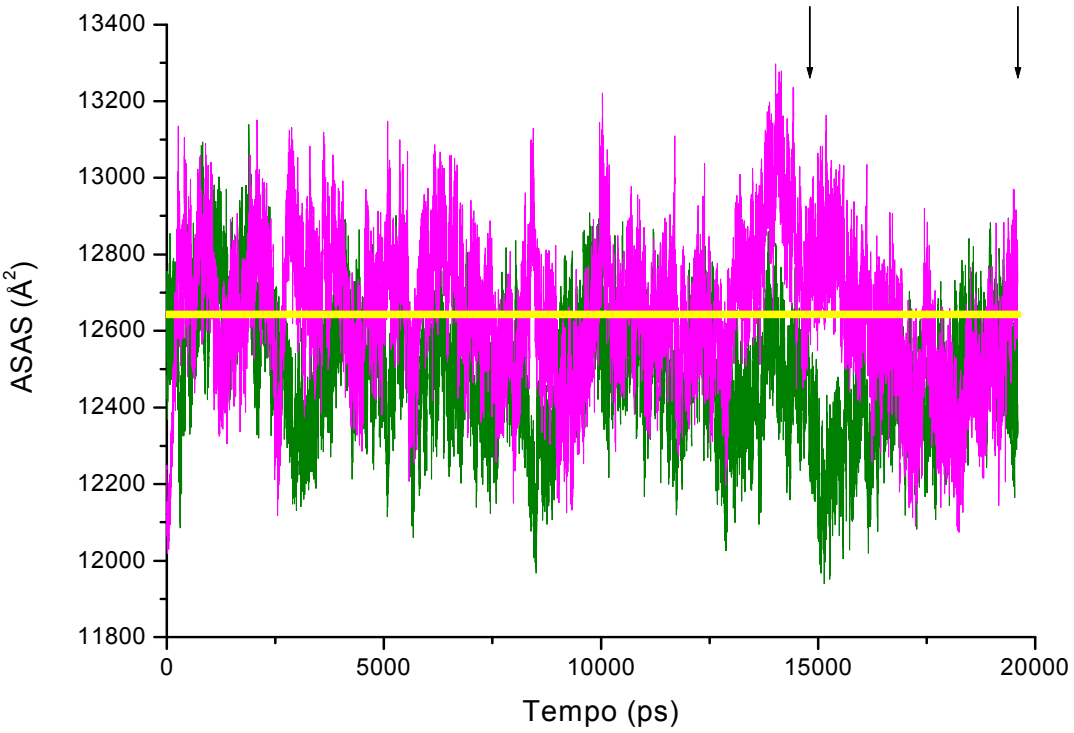

Figura 3.6 Representação gráfica da área total da superífcie acessível ao solvente da InhA livre, à temperatura ambiente (25 °C) (verde) e em temperatura fisiológica (37 °C) (linha magenta). Em linha horizontal está a ASAS da estrutura cristalina 1ENY (12.643 Å^2). Observa-se um aumento da ASAS com a elevação da temperatura.

Na Figura 3.6 foram comparadas as curvas das ASAS em ambas as temperaturas dos sistemas simulados. A média da ASAS a 25 °C é de 12.804 ± 147 Å^2, enquanto que a da ASAS a 37 °C é de 12.998 ± 172 Å^2, nos últimos 5 ns.

O aumento da ASAS com a elevação da temperatura, acompanhado do aumento global de seu volume, já era esperado, pois uma expansão geral da proteína ocorre nestas condições. Da mesma forma que em temperatura ambiente, a presença do NADH resulta em uma pequena diminuição dos valores da ASAS (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 Valores da área acessível ao solvente em temperatura ambiente (25 ^{o}C) e fisiológica (37 ^{o}C) durante toda a extensão da trajetória (0 a 20 ns)

Estrutura	**ASAS (Å^2)**
InhA a 25 ^{o}C	12.867 ± 162
*InhA a 25 ^{o}C	13.110 ± 113
InhA a 37 ^{o}C	13.047 ± 176
InhA-NADH a 25 ^{o}C	12.489 ± 164
*InhA-NADH a 25 ^{o}C	12.854 ± 136
InhA-NADH a 37 ^{o}C	12.651 ± 182
1ENY	12.643

*Simulação realizada por Schroeder em 2004

A diferença estatisticamente significativa (ANOVA, $p<0.01$) entre as ASASs confirma a hipótese de que existe, efetivamente, uma alteração conformacional global da proteína ao elevar-se a temperatura a níveis fisiológicos.

Ao medirmos a ASAS com o programa NACCESS, também obtemos os seus componentes polares, apolares (hidrofóbicos) da cadeia principal e cadeia lateral (Figura 3.7).

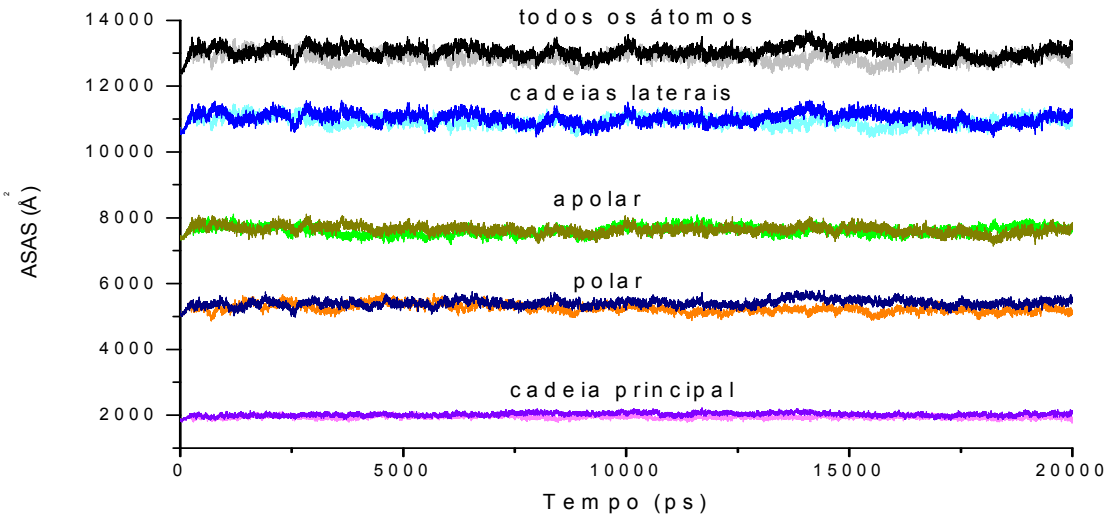

Figura 3.7 Gráfico da área total da superfície acessível ao solvente (ASAS) da InhA a 25 °C e 37 °C, com as suas subdivisões. As cores mais escuras (preto, azul, verde oliva, azul escuro e violeta) correspondem à temperatura fisiológica, enquanto que as cores mais claras (cinza, ciano, verde claro, laranja e rosa) correspondem à temperatura ambiente.

Como pode ser observado no gráfico da Figura 3.7, as cadeias laterais são as que estão mais expostas ao solvente, enquanto que a cadeia principal, evidentemente, permanece na região mais interna da proteína. As regiões apolares (hidrofóbicas – azul claro) também estão mais expostas, em relação às polares (hidrofílicas), ao solvente. O padrão das curvas obtidas na trajetória a 37 ^{o}C (Figura 3.8) é igual, diferindo, apenas nos valores (que são mais elevados) (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 Distribuição da média da ASAS por região e polaridade nas duas temperaturas no intervalo de 15 a 20 ns

	25 °C média e dp (Å^2)	37 °C média e dp (Å^2)
Todos os átomos	12.804 ± 147	12.999 ± 172
Cadeia lateral	10.880 ± 145	10.992 ± 161
Região apolar	7.629 ± 118	7.583 ± 123
Região polar	5.176 ± 86	5.416 ± 92
Cadeia principal	1.925 ± 41	2.007 ± 45

Os resultados obtidos na análise da ASAS mostram que, com exceção das regiões hidrofóbicas, o aumento da área exposta ao solvente ocorre de forma homogênea com a elevação da temperatura.

Por outro lado, um estudo de simulação por DM com a enzima RNase A (Merkley et al., 2008) em seis temperaturas (entre elas, 25 °C e 37 °C) mostrou que, abaixo da temperatura de fusão T_m (*melting temperature*), o aumento da ASAS se acompanha de um aumento proporcional da ASAS dos resíduos não polares.

Esta divergência de resultados ressalta a importância de não transpor as características de uma proteína para outra. Mesmo sob os mesmos fatores ambientais, diferentes comportamentos poderão ser observados para diferentes sistemas protéicos.

Um resumo dos parâmetros calculados e analisados até este momento, para se avaliar a estabilidade das simulações, é mostrado na Tabela 3.5 e foram comparados aos valores obtidos em Schroeder (2004), Schroeder et al. 2005 e à forma cristalina da InhA (1ENY).

Tabela 3.5 - Parâmetros estruturais da InhA observados nos últimos 5,0 ns das simulações por DM.

Sistemas/Parâmetros	**RMSD_cp (Å)**	**Rg_cp (Å)**	**ASAS ($Å^2$)**	**Tempo total (ns)**
***wt* InhA a 25 °C**	1,37 ± 0,07	18,01 ± 0,05	12.804 ± 147	20,0
***wt* InhA a 37 °C**	1,48 ± 0,06	18,01 ± 0,06	12.998 ± 172	20,0
[*] ***wt* InhA_NADH a 25 °C**	1,60 ± 0,10	17,90 ± 0,10	12.854 ± 136	3,1
***wt* InhA_NADH 25 °C**	1,64 ± 0,28	17,05 ± 0,05	12.594 ± 170	20,0
***wt* InhA_NADH 37 °C**	1,48± 0,06	17,05 ± 0,05	12.976 ± 159	20,0
1ENY		17,90	12.643	

[*] *wt* InhA-NADH a 25 °C : estes valores referem-se aos obtidos em Schroeder em 2004, por simulação por DM com a enzima InhA e seu ligante NADH.

O estudo de Merkley et al. (2008) demonstrou que mudanças conformacionais devido a alterações na temperatura podem estar relacionadas com alterações funcionais. O mais interessante é que estas alterações ocorrem mesmo em variações pequenas de temperatura, como nos níveis fisiológicos.

A seguir serão descritos e comentados alguns parâmetros (Fator-B, distâncias inter-atômicas, interações de hidrogênio) medidos nas estruturas resultantes de ambas as trajetórias dinâmicas, relevantes para a compreensão da relação temperatura, estrutura dinâmica e função.

3.1.3 Fator-B ou Fator de Temperatura

O conhecimento dos movimentos atômicos nas proteínas são fundamentais para o entendimento de sua função biológica (Hünenberger et al., 1995). A flexibilidade protéica é um aspecto importante da relação entre a estrutura protéica e a sua função, como, por ex., as proteínas sofrem alterações conformacionais de forma a encontrar o melhor encaixe com o seu ligante (Teodoro et al., 2003).

Embora seja difícil de se obter informações experimentais sobre a flexibilidade de proteínas, a mesma pode ser facilmente extraída das simulações por DM (Hünenberger et al., 1995).

3.1.3.1 Flutuações posicionais atômicas (RMSF)

A flexibilidade e mobilidade de uma macromolécula são refletidas na flutuação de cada átomo em relação à sua posição média, durante a fase de produção de uma simulação por DM. As flutuações posicionais atômicas (RMSF - *root mean square fluctuation*), podem ser formalmente relacionadas com o Fator-B e assim comparadas com os dados experimentais disponíveis. A Figura 3.8 ilustra os valores do RMSF de ambas as trajetórias.

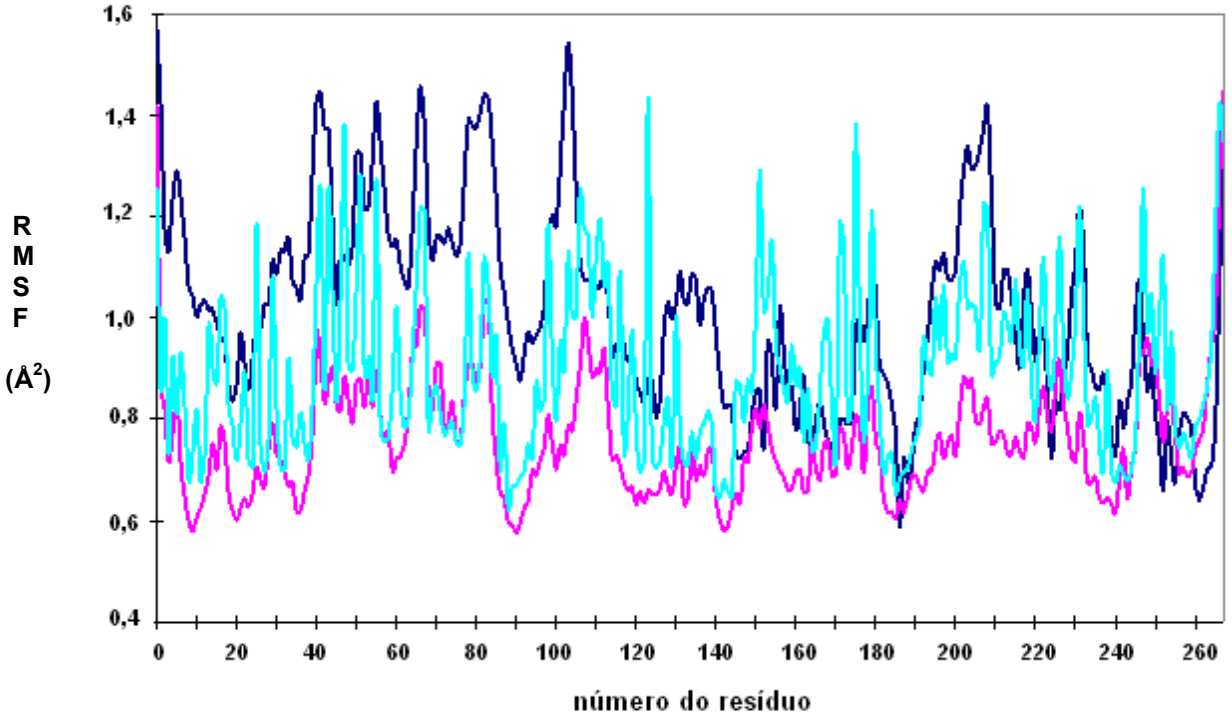

Figura 3.8 - Gráfico do RMSF da cadeia principal da InhA a 25 °C (magenta) e a 37 °C (ciano) em comparação com o RMSF da estrutura inicial (azul escuro). Os valores estão mais elevados na estrutura cristalográfica do que nas simulações.

O Fator-B constitue um conjunto de medidas que refletem a flutuação térmica atômica e outros erros experimentais (Yang et al., 2005). Eles têm sido usados como uma medida de mobilidade e flexibilidade estrutural.

Os RMSF foram obtidos pelo Fator-B, aplicando-se a fórmula:

$$RMSF = \sqrt{\left(\left\langle r_i^2 \right\rangle - \left\langle r_i \right\rangle^2\right)} = \sqrt{\frac{Fator - B \times 3}{8\pi^2}}$$

onde $\left\langle r_i^2 \right\rangle - \left\langle r_i \right\rangle^2 = \left\langle \Delta r_i^2 \right\rangle$ representa as flutuações posicionais médias quadráticas de cada átomo na proteína (Hünenberger et al., 1995). Apartir desta fórmula obtém-se o Fator-B: $Fator - B = \frac{8\pi^2}{3} \times \left(\left\langle r_i^2 \right\rangle - \left\langle r_i \right\rangle^2 \right)$ ou Fator-*B* = $8\pi^2/3 \langle \Delta r^2 \rangle$,

onde $\langle \Delta r^2 \rangle$ representa a flutuação posicional atômica média-quadrática.

3.1.3.2 Fator-B da estrutura cristalina da InhA

O modelo de flexibilidade conformacional das enzimas é altamente dependente da temperatura, o que facilita a adaptação das mesmas às variações térmicas (Svingor et al., 2001). Na Figura 3.9 estão destacadas as regiões de maior mobilidade (Schroeder, 2004; Schroeder et al., 2005) na estrutura cristalina da InhA (cód. pdb: 1ENY).

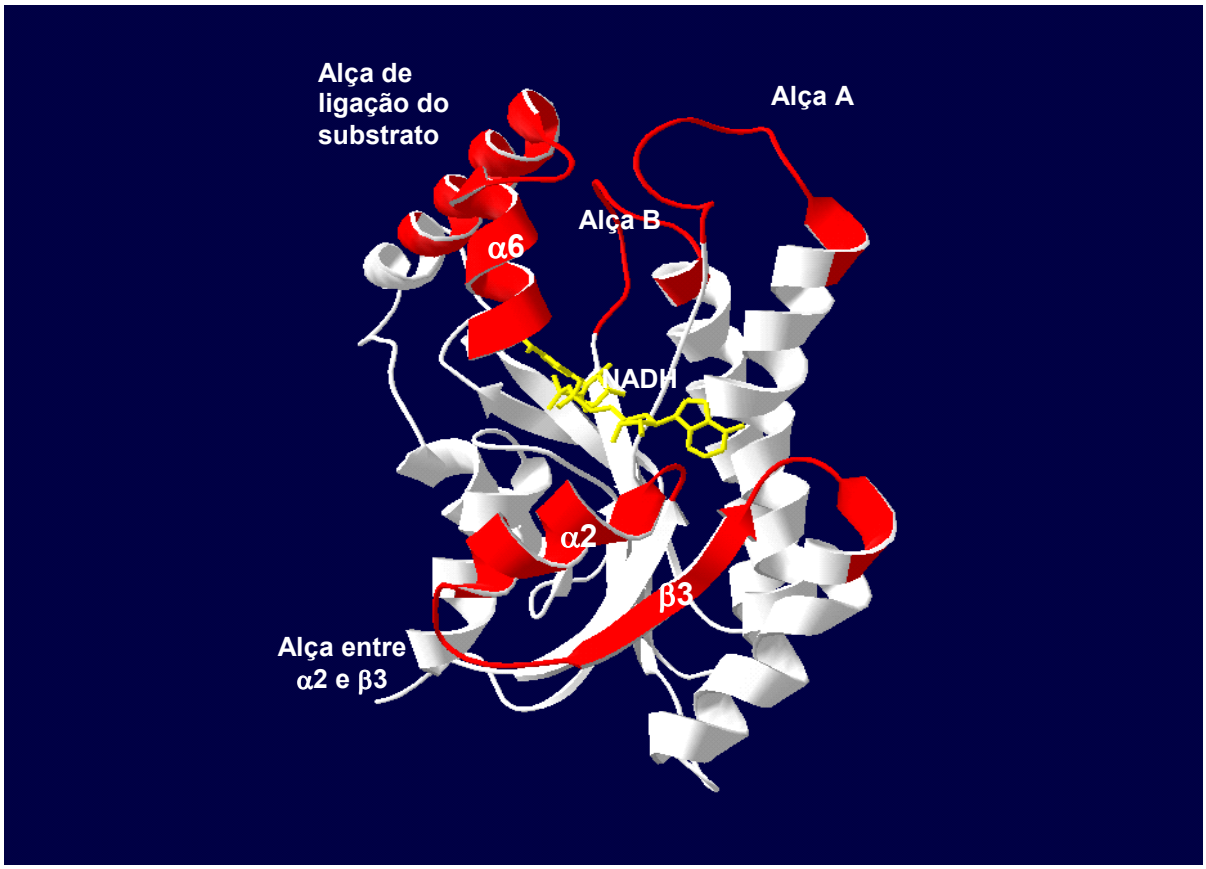

Figura 3.9 Representação das regiões de maior mobilidade da estrutura cristalina da InhA (cód. 1ENY). Os resíduos que compreendem a Alça A são de 100 a 114; a Alça B, de 150 a 161; a alça de ligação do substrato, de 197 a 220. Os resíduos 41 a 69 constituem a hélice α2, a fita β3 e a alça que está compreendida entre as duas estruturas.

Entre as regiões de maior mobilidade estão: (i) a região dos resíduos 41-69 (α2, β3); (ii) as regiões dos resíduos 100-114 (alça entre β4 e α4, Alça A) e 150-161 (alça entre β5 e α5, Alça B) que formam um dos lados da cavidade de ligação do substrato e no cristal também fazem contato com a subunidade vizinha.

3.1.3.3 Fator-B das simulações por DM a 25 °C e 37 °C

Os Fatores-B das trajetórias foram calculados com o programa ptraj (AMBER 9.0), multiplicando-se o quadrado das flutuações ($\langle \Delta r^2 \rangle$) por $8\pi^2/3$.

O Fator-B calculado para a cadeia principal da enzima em relação às respectivas estruturas médias das fases de produção mostrou um perfil de flexibilidade semelhante entre a enzima InhA na temperatura de 25 °C e a mesma enzima na temperatura de 37 °C, embora a amplitude a 37°C seja maior (Figura 3.10).

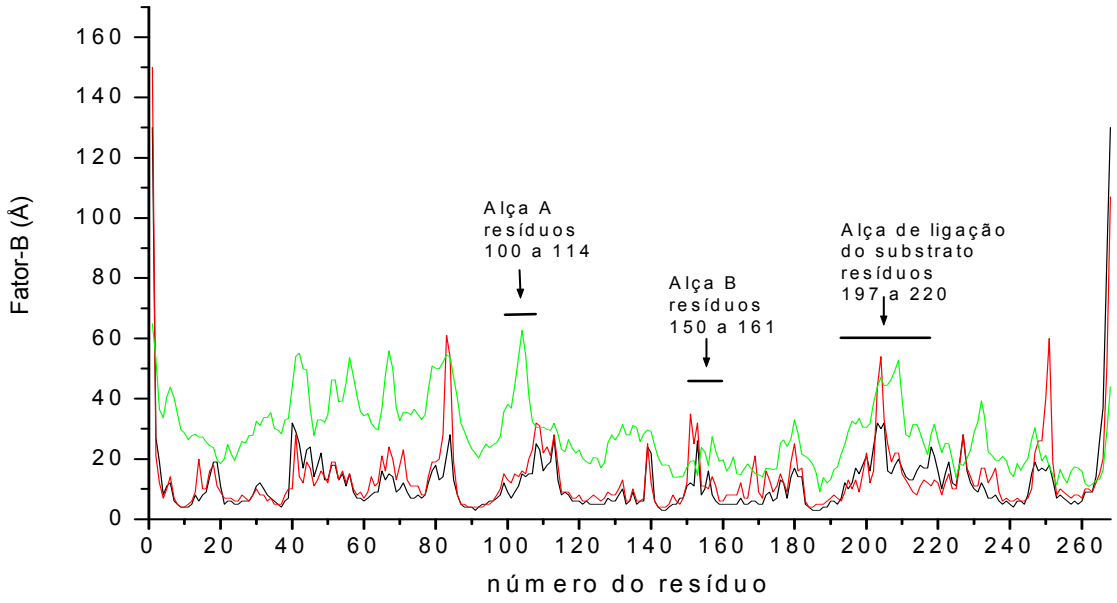

Figura 3.10 Fator-B da cadeia principal (átomos N, Cα, C, O) da enzima InhA nas simulações a 25 °C (preto), 37 °C (vermelho) calculados sobre os últimos 5 ns de simulação. Em verde está representada a curva do Fator-B da estrutura cristalina da InhA (cód. pdb: 1ENY).

Em ambas as simulações, as regiões correspondentes às fitas β e à maioria das hélices α apresenta um Fator-B menor, enquanto que nas alças e regiões de maior mobilidade estes valores são maiores.

Na Alça B percebe-se um nítido aumento dos fatores de temperatura aos 37 °C. A região que corresponde à parte da alça de ligação do substrato e compreende as hélices α6 e α7, também mostra-se mais flexível aos 37 °C.

O aumento da flexibilidade com a elevação da temperatura também pode ser percebido na maioria dos resíduos localizados no sítio de ligação da coenzima, a 4 Å de distância do NADH (Figura 3.11).

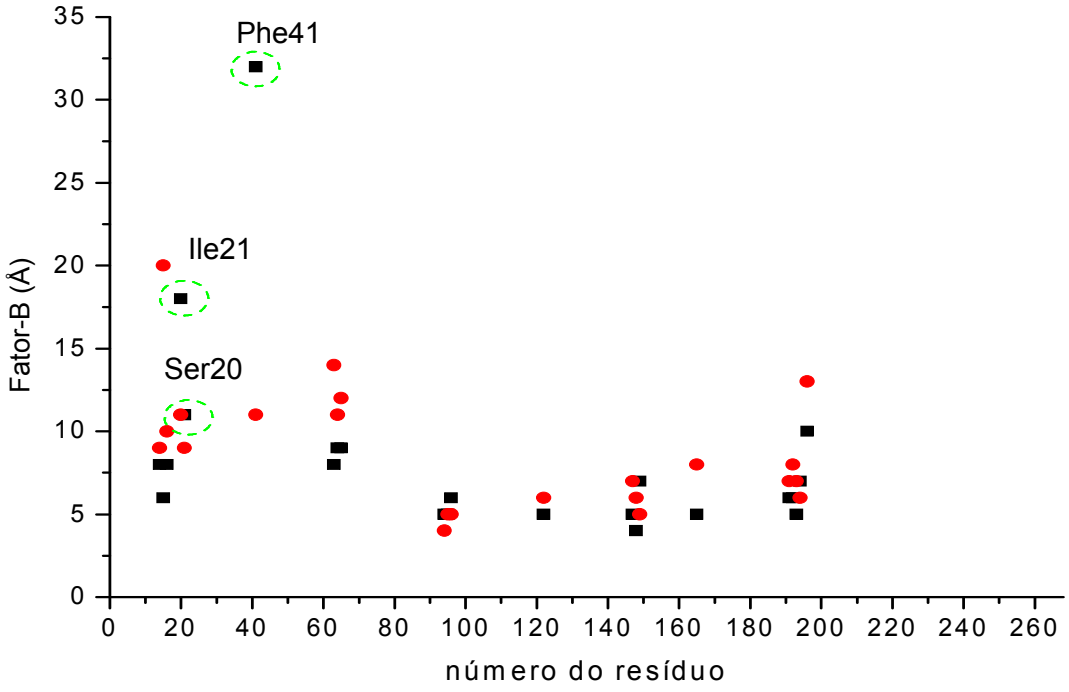

Figura 3.11 Fator-B dos resíduos da InhA que estão a 4 Å do NADH. Em preto estão representados os Fatores-B dos resíduos a 25 °C e em vermelho, os Fatores-B dos resíduos a 37 °C. Os três círculos em preto que estão circunscritos por uma linha verde, correspondem aos resíduos (Ser20, Ile21, Phe41) cujos valores do Fator-B são significativamente maiores a 25 °C em relação a 37 °C. Nos demais resíduos, o Fator-B é maior a 37 °C ou não se altera com o aumento da temperatura. Neste gráfico não foi utilizado o mesmo padrão de cores dos demais gráficos (preto e cinza claro) por optar-se por cores que tornasse mais nítida a interpretação dos dados (vermelho e preto).

Os resíduos a 4 Å do NADH são: Gly14, Ile15, Ile16, Ser20, Ile21, Phe41, Leu63, Asp64, Val65, Ser94, Ile95, Gly96, Ile122, Met147, Asp148, Phe149, Lys165, Ala191, Gly192, Pro193, Ile194, Thr196. Os valores do Fator-B de cada resíduo nas duas temperaturas podem ser vistos no Apêndice.

Os resíduos Ser20 e Ile21 interagem com o P_i do NADH e a Phe41 interage com a porção adenina do NADH. Estes três resíduos, diferentemente dos demais, apresentaram uma diminuição significativa da flexibilidade com o aumento da temperatura.

Um tipo de representação gráfica bastante esclarecedor quanto à diferença do padrão de flexibilidade entre duas estruturas (Norberto de Souza & Ornstein, 1999; Bandyopadhyay & Meher, 2006) consegue-se através dos valores resultantes da diferença entre os fatores de 37 ^{o}C e os de 25 ^{o}C (Figura 3.12).

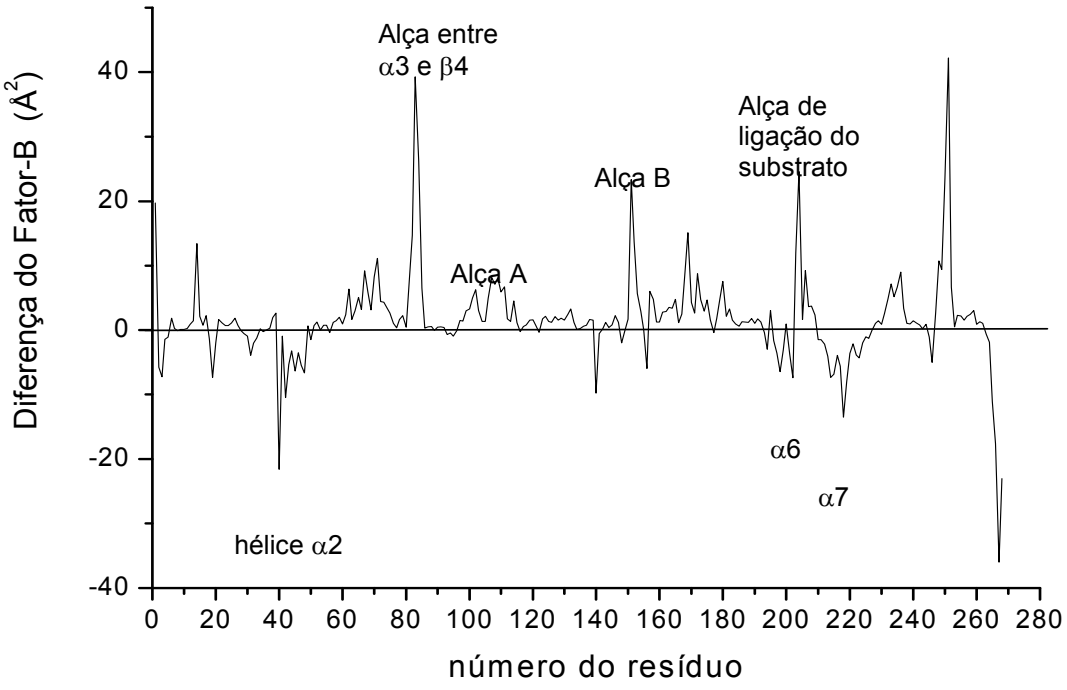

Figura 3.12 – Gráfico das diferenças do Fator-B da cadeia principal (átomos N, Cα, C, O) da enzima InhA calculadas sobre os últimos 5 ns de simulação. A diferença foi obtida subtraindo-se o valor do Fator-B do resíduo a 25 °C do valor do Fator-B do mesmo resíduo a 37 °C (Fator-B 37 °C - Fator-B 25 °C). Se o valor do Fator-B a 37 °C for maior do que o valor do Fator-B a 25 °C, o resultado da diferença será positivo e o ponto ficará acima da linha que passa pelo zero.

Uma diferença significativa entre os fatores de temperatura das duas trajetórias é observada na Figura 3.12. Aos 37 ^{o}C, três alças apresentam uma flexibilidade nitidamente maior: alça entre α3 e ß4, a alça B e a alça de ligação ao substrato. A alça A, mesmo que com valores menores, também mostra-se mais flexível aos 37 ^{o}C. A região de ligação do substrato, portanto, está significativamente (ANOVA, $p<0,01$) mais flexível na temperatura do organismo humano. Por outro lado, três helices (α2, α6 e α7) estão bem mais rígidas a esta mesma temperatura (37 ^{o}C), sendo que duas delas (α6 e α7) formam a base da estrutura à qual prende-se a extremidade da alça de ligação do substrato. A figura 3.13 mostra as regiões de maior flexibilidade aos 37 ^{o}C.

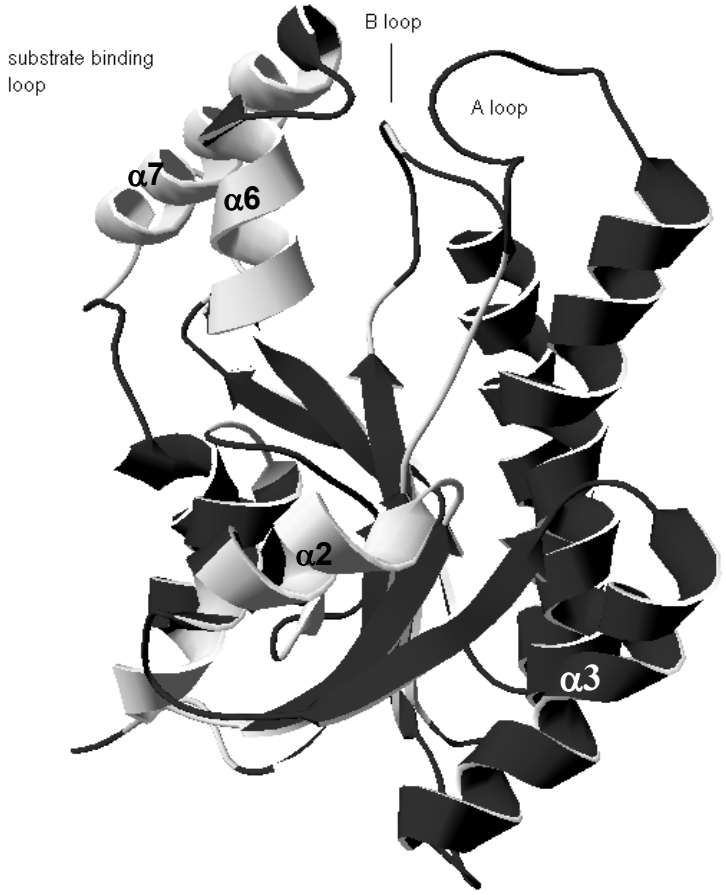

Figura 3.13 – Representação do tipo ribbons da cadeia principal da estrutura terciária da enzima InhA colorida de acordo com a diferenças dos valores do Fator-B. Em preto, temos os valores positvos da diferença entre o Fator-B de 37 ^{o}C e o Fator-B de 25 ^{o}C. Em cinza claro, esta diferença é negativa. Em preto, portanto, temos as regiões mais flexíveis a 37 ^{o}C.

É interessante observar como, aos 37 ^{o}C, as hélices α6 e α7 tornam-se mais rígidas, formando um “apoio” ou “alavanca” para que a extremidade da alça de ligação ao substrato possa apresentar maior flexibilidade.

Esta distribuição irregular da flexibilidade com o aumento da temperatura, também foi observada em simulações por DM com a ribonuclease A em nove temperaturas diferentes (Tilton et al., 1992). O Fator-B médio nas temperaturas mais baixas (inferior a 180 K) foi semelhante ao observado experimentalmente em muitas pequenas moléculas orgânicas. Já o aumento da temperatura, não só resulta em um aumento global do Fator-B, mas também em um aumento da magnitude, mas com distribuição heterogênea. As distribuições mais complexas, nas altas temperaturas, podem refletir em um aumento desarmônico dos movimentos atômicos.

Um estudo de simulação por DM de duas enzimas homólogas da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi realizado nas temperaturas de 25 ^{o}C e 37 ^{o}C. Comparando-se os Fatores-B dos resíduos em ambas as temperaturas, observaram-se grandes diferenças nas regiões de ligação do NAD e na região de ligação do substrato, o que indica que os ajustes evolutivos da flexibilidade ocorrem em regiões vitais para a função enzimática (Hajdú et al., 2008). Este fenômeno pode estar relacionado com a busca de uma conformação que ofereça uma melhor funcionabilidade nas condições de temperatura ótima.

Neste trabalho, também foram encontradas alterações significativas dos valores dos Fatores-B nas regiões de ligação do NAD e nas regiões de ligação do substrato ao elevar-se a temperatura do experimento a 37 ^{o}C. As informações sobre o Fator-B das simulações mostram que a alteração da flexibilidade, com a elevação da temperatura, se dá de forma heterogênea, pois a proteína não apresenta um aumento global de sua flexibilidade.

3.1.3.4 Amplitude do RMSF e do Fator-B

Na Figura 3.8, os valores de RMSF da estrutura cristalina são maiores do que aqueles obtidos nas fases de produção das trajetórias a 25 °C e 37 °C. O mesmo comportamento pode ser observado no estudo realizado por Merkley et al. (2008), onde os RMSFs de seis trajetórias em seis temperaturas diferentes da enzima RNase A estão nitidamente abaixo dos valores de RMSF obtidos da estrutura cristalina.

Na Figura 3.10, da mesma forma que ocorreu com o RMSF, observa-se que os valores dos fatores de temperatura da estrutura cristalina (1ENY) são mais elevados do que os das trajetórias dinâmicas da InhA nos últimos 5 ns. Na Figura 3.14, pode-se visualizar que a grande maioria dos resíduos apresentou fatores de temperatura com valores inferiores a 25 Å.

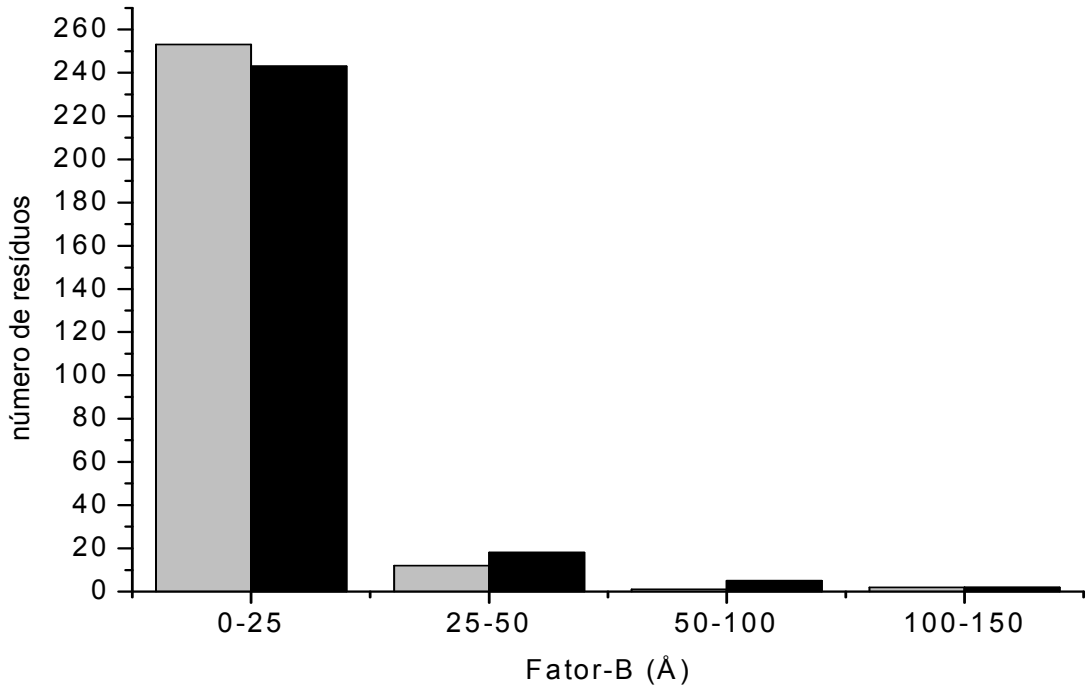

Figura 3.14 - Distribuição do Fator-B da InhA de acordo com os seus valores. As colunas cinza claras representam os valores a 25 ^{o}C, enquanto que as colunas pretas referem-se à temperatura de 37 ^{o}C. A grande maioria dos resíduos, em ambas as temperaturas, apresentam Fatores-B com valores inferiores a 25 Å.

As simulações por DM foram realizadas com o campo de força *ff99SB*. Segundo Hünenberger et al. (1995), o campo de força pode interferir na mobilidade atômica do sistema tanto favorável como desfavoravelmente. A extensão da trajetória também pode influenciar na amplitude do Fator-B, sendo inversamente proporcional ao mesmo. Quanto maiores os comprimentos das trajetórias das simulações, portanto, esperam-se encontrar valores menores para os Fatores-B calculados.

No estudo de Tai et al. (2001) os valores do Fator-B da acetilcolinesterase do rato de uma trajetória de 10 ns se mostraram inferiores ao Fator-B de sua estrutura cristalina.

3.1.4 Região de ligação do NADH

Atualmente, tem-se disponível uma descrição detalhada da região do sítio ativo da InhA, o que auxilia no entendimento do mecanismo de sua reação enzimática e facilita o planejamento do desenho de possíveis fármacos (Dessen et al., 1995; Quemard et al., 1995; Rozwarski et al., 1998).

A InhA catalisa a redução NADH-dependente dos ácidos graxos insaturados de cadeia longa, que são essenciais para a parede celular bacteriana (Pantano et al., 2005; Rozwarski et al., 1998). Durante esta fase de catálise, o NADH costuma adotar uma forma estendida, cuja medida é obtida através da distância entre o carbono 6 (C6) da adenina e o carbono 2 (C2) do anel nicotinamida (ver materiais e métodos). Esta distância é, aproximadamente, de 12,5 Å (Bell et al., 1997). Com a finalidade de se avaliar o comportamento da conformação do NADH com a elevação da temperatura, foi medida a distância entre o C6 do anel adenina (anel A) e o C2 da porção da nicotinamida (anel N) em ambas as simulações (Figura 3.15).

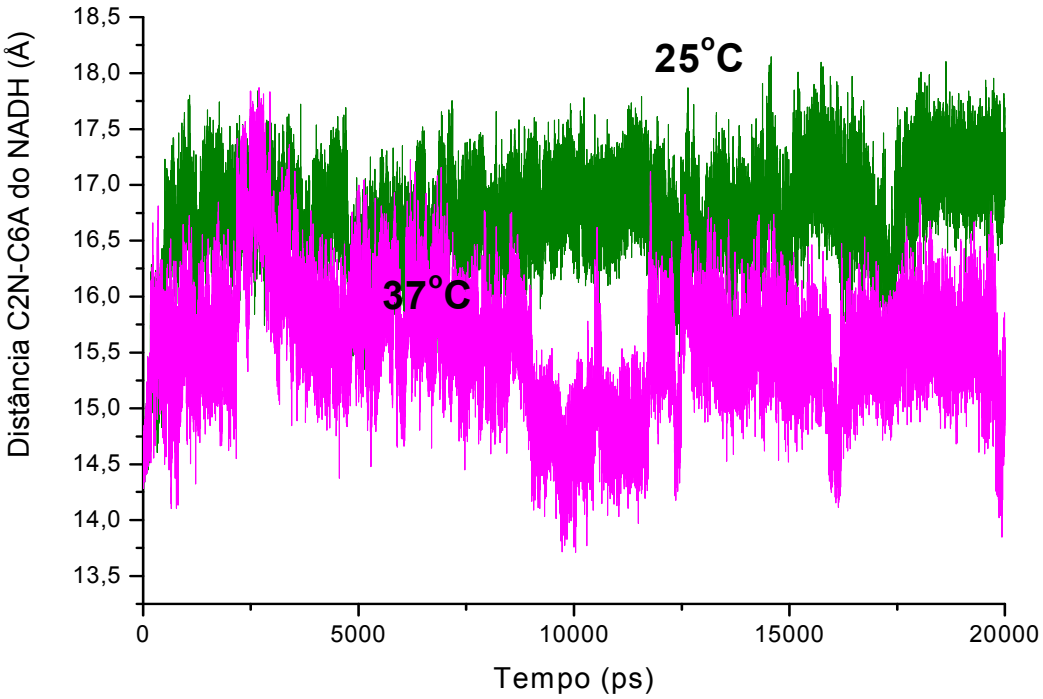

Figura 3.15 Extensão da coenzima NADH. Este parâmetro é medido pela distância entre os átomos C2 do anel nicotinamida e C6 do anel adenina em ambas as temperaturas. A curva em verde representa a distância C2N-C6A do NADH aos 25 °C. A curva em magenta, com os valores mais baixos, corresponde a esta mesma distância aos 37 °C.

Aos 25 °C, a distância média do C2N-C6A foi maior (16,7 ± 0,4 Å) do que a 37 °C (15,5 ± 0,5 Å). Aos 37 °C, observa-se uma diminuição da distância C2N-C6A do NADH. Essas informações nos permitem perceber que, em temperatura fisiológica humana, a conformação do NADH sofre alterações, ficando menos estendida do que aos 25 °C (Figura 3.16).

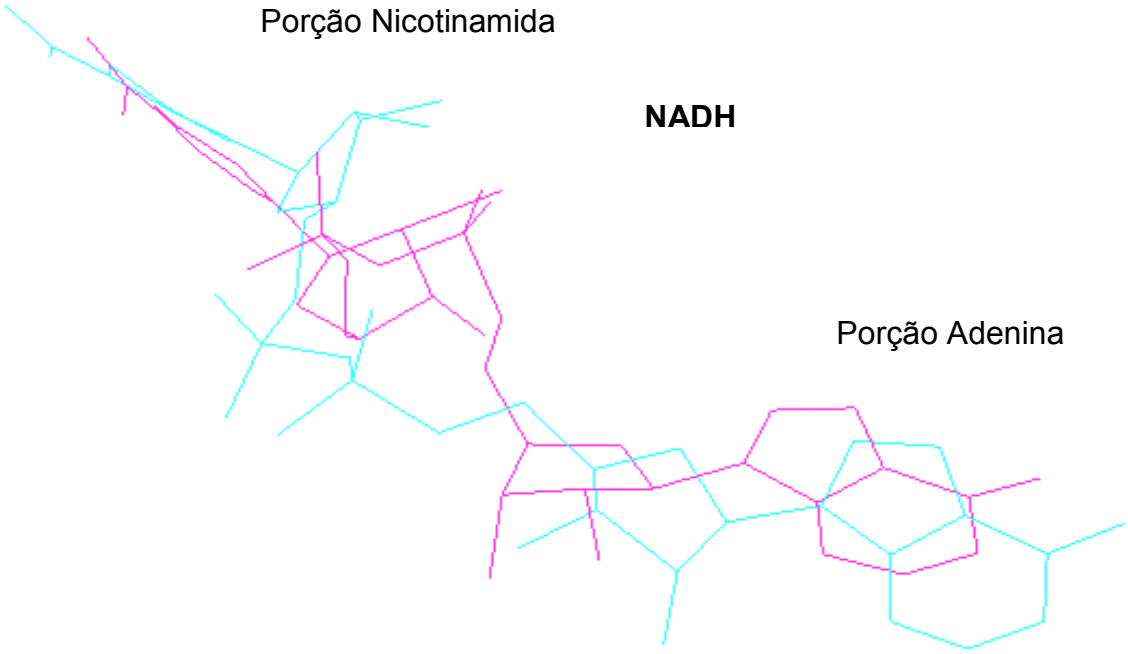

Figura 3.16 – Representação do NADH aos 25 °C (ciano) e 37 °C (magenta). Foram utilizados os *snaphots* mais próximos das estruturas médias dos últimos 5 ns de ambas as trajetórias. Percebe-se uma maior distorção do NADH aos 37 °C, diminuindo sua distância C2N-C6A. Aos 37 °C, portanto, o NADH fica menos estendido.

Nos últimos 5 ns, o número médio de interações de hidrogênio (H) entre o NADH e a InhA foram 7 aos 25 °C e 8 aos 37 °C. A elevação da temperatura, portanto, foi responsável pelo aumento de 1 interação de H entre a coenzima e a proteína.

Considerou-se interação de H (ver materiais e métodos) toda relação entre hidrogênio e resíduo da InhA que apresentasse distância igual ou menor a 3,35 Å.

Os resíduos da InhA que, com maior freqüência, fazem interação com o NADH são: Asp64, Ser20, Lys165, Val65, Gly14, Ile21, Ile 194, Thr 196 (Figura 3.17).

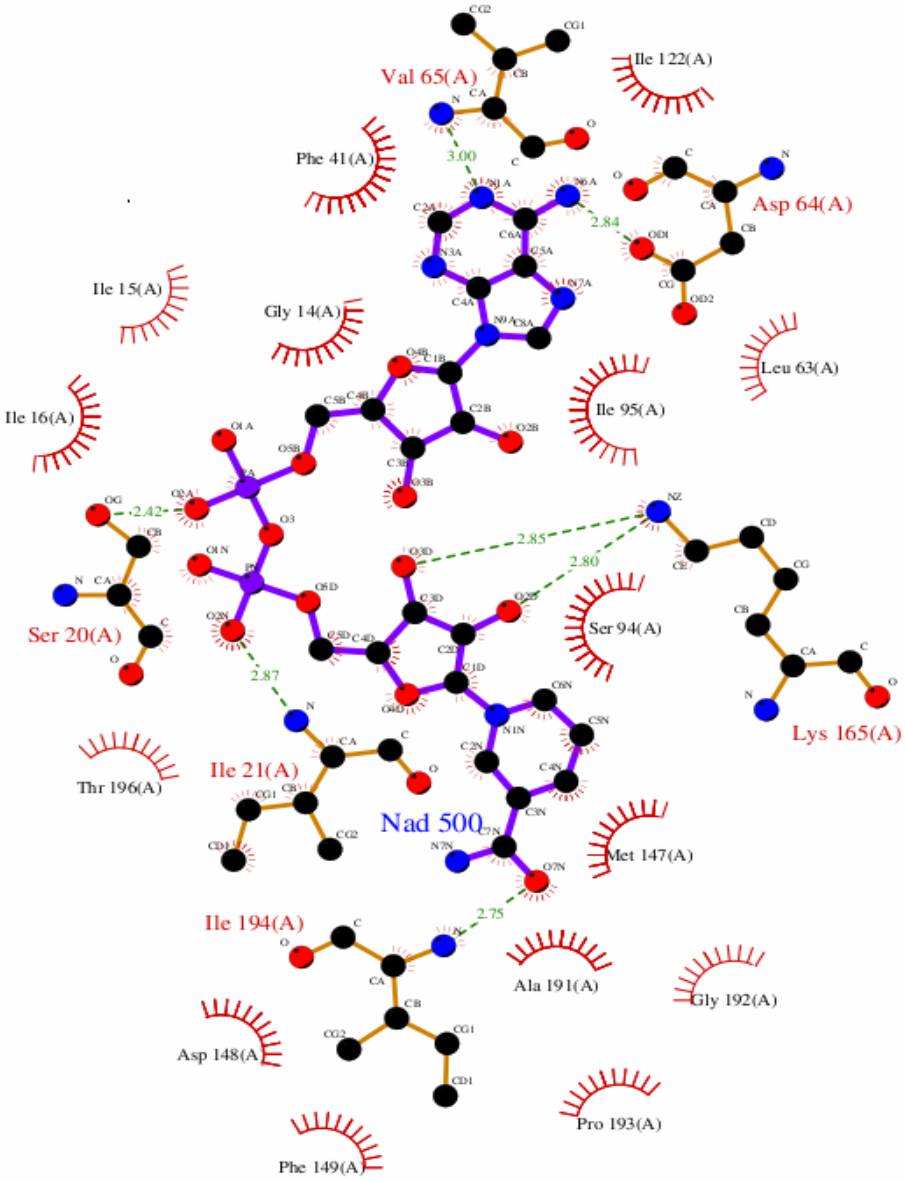

Figura 3.17 – Estrutura cristalina da InhA (cód. pdb: 1ENY) mostrando a interação entre o NADH e os resíduos da proteína. Figura obtida através do programa LIGPLOT (Wallace et al., 1995).

Análises cinéticas mostram que a resistência à isoniazida deve-se à uma diminuição da afinidade da proteína mutante ao NADH. As estruturas 3D da InhA selvagem e mutante revelam que a resistência à droga está diretamente relacionada à perturbação na rede de hidrogênio que estabiliza a ligação do NADH (Schroeder et al., 2005).

Monitoramos as ligações de hidrogênio formadas entre o NADH e seu sítio de ligação na enzima InhA durante toda a trajetória de ambas as simulações. Na tabela 3.6 estão descritas as interações de H observadas nos últimos 5 ns da simulação.

Tabela 3.6 – Ligações de hidrogênio[a] formadas entre o NADH e a proteína InhA nas temperaturas de 25 °C e 37 °C nos últimos 5 ns.

Resíduo	*Grupo do aa*	*Átomo do NADH[b]*	*Ocorrência a 25 °C (%)*	*Ocorrência a 37 °C (%)*
Gly14	O	O3B	66	9,5
Ile15	O	O3B	0	9,5
Ser20	OG	O2A	33	0
Ile21	N	O2N	38	0
Asp64	OD1	N6A	71	81
Val65	N	N1A	33	38
Gly96	N	O4B	95	100
	N	O5B	0	76
Lys165	NZ	O2D	66	0
	NZ	O3D	28	0
	NZ	O1A	0	57
	NZ	O1N	0	95
Ile194	C=O	N7N	71	66
	N	O7N	95	91
Thr196	OG1	N7N	48	15
	OG1	O1N	5	5
	OG1	O2N	0	95
	OG1	O5D	5	0

[a]Interação de hidrogênio: distância de 3,35 ou < entre H e o outro átomo
[b]Nome dos átomos das moléculas do NADH de acordo com o Apêndice 1

Define-se como ocorrência de uma ligação ou interação, a probabilidade desta interação ocorrer durante um determinado período de tempo da simulação por DM. Neste caso específico, o período considerado foi o dos últimos 5 ns da trajetória. Como se pode observar na tabela 3.6, as ocorrências das interações de H entre os resíduos da InhA e os átomos do NADH sofrem algumas alterações com o aumento da temperatura. Observa-se, aos 37 °C, um aumento significativo na ocorrência das

interações de H entre a Gly96 e o NADH. Por outro lado, diminui a probabilidade de interação entre os resíduos Gly14, Ser20, Ile 21 e Ile194 e o NADH aos 37 ^{o}C.

Nos resíduos Lys165 e Thr196, ao elevarmos a temperatura da simulação por DM, ocorre uma mudança quanto ao tipo de átomo que interage com o NADH.

A porção de pirofosfato do NADH está próxima à alça que conecta β1 a α1 (Figura 3.18).

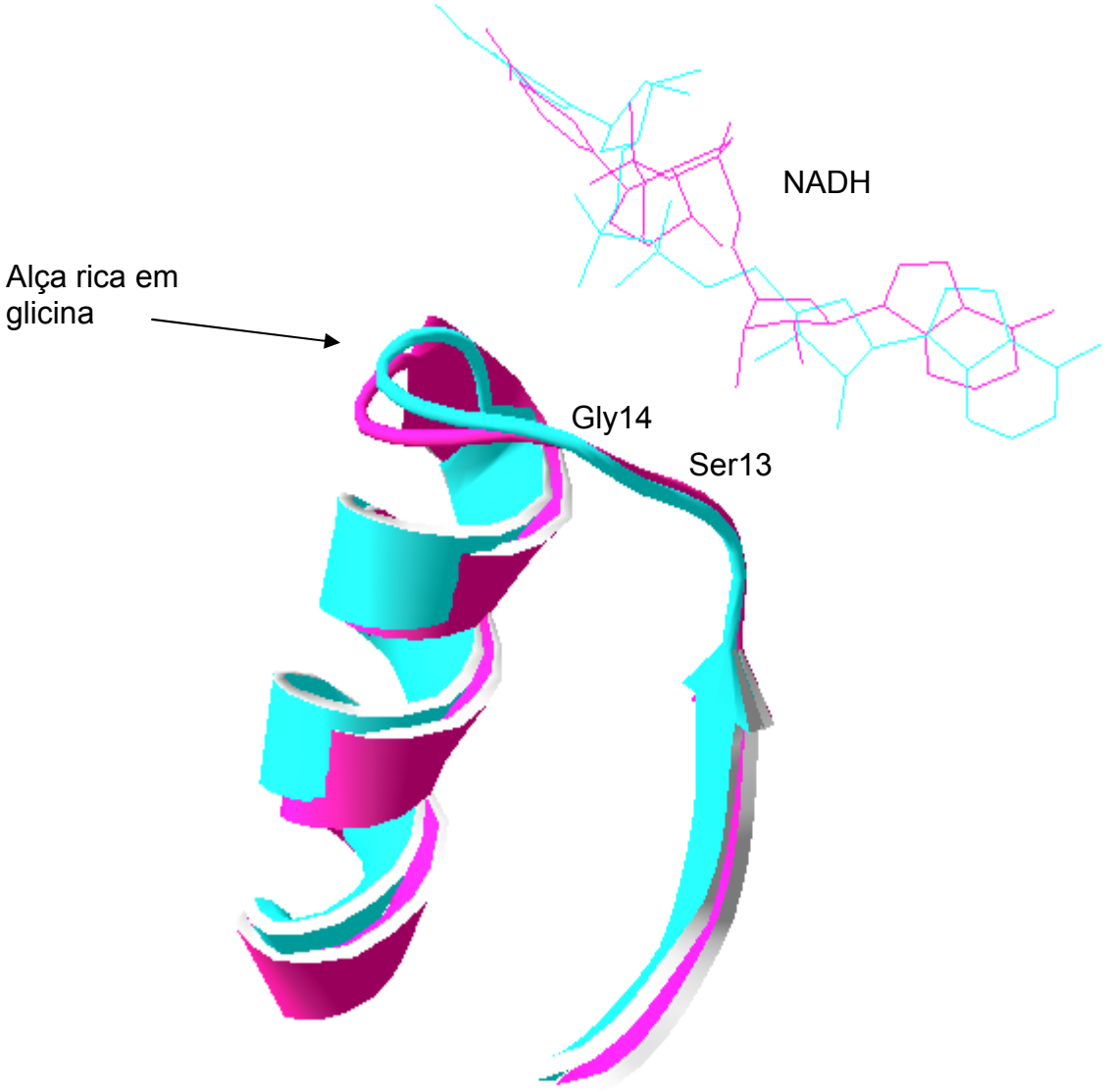

Figura 3.18 Posição da alça rica em glicina em relação ao NADH em ambas as temperaturas: 25 ^{o}C (ciano) e 37 ^{o}C (magenta). Com o aumento da temperatura diminuem consideravelmente as interações de hidrogênio que ocorrem entre o NADH e a alça rica em glicina.

Embora as conformações dos sítios ativos e a posição do NADH nas enzimas selvagem e mutantes sejam muito semelhantes, uma notável diferença encontrou-se na posição dos átomos da cadeia principal (Gly14), o primeiro resíduo da alça 1. Na Tabela 3.6 nota-se que a percentagem de ligações da Gly14 diminuiram notavelmente aos 37 ^{o}C (de 66 a 9,5%). A Gly14 desempenha um importante papel no mutante S94A, pois este resíduo rompe uma ligação de H formada entre uma molécula de água e o NADH da InhA selvagem, diminuindo a afinidade da coenzima pela a proteína (Dessen et al., 1995).

O comprimento das interações de H entre as duas simulações, para este resíduo, não se modificou significativamente (Tabela 3.7), assim como sua ASAS e seu Fator-B. A flexibilidade da Ser94 mantém-se baixa (Fator-B de 9 Å aos 25 ^{o}C e de 11 Å aos 37 ^{o}C) como deveria se esperar pela localização deste resíduo em região de ligação com a coenzima.

A alça rica em glicina (Gly14, Ile15, Ser20 e Ile21) é responsável pela maioria das ligações diretas com a porção pirofosfato do NADH (Figura 3.18). Aos 37 ^{o}C, as ligações de hidrogênio entre os aminoácidos Ser20 e Ile21 e os átomos do NADH desapareceram e a ocorrência das ligações da Gly14 diminuiram consideravelmente (Tabela 3.6).

Esta redução importante das interações de hidrogênio entre a alça rica em glicina da InhA e o NADH com o aumento da temperatura modifica o padrão de distribuição das ligações que ocorrem entre a proteína e sua coenzima.

O mutante I21V apresenta uma diminuição desta afinidade pela substituição da Ile21 por uma Valina e por não ter interação nenhuma entre a Ser20 e o NADH.

Tabela 3.7 – Comprimento das ligações de hidrogênio formadas entre o NADH e a proteína InhA nas temperaturas de 25 ^{o}C e 37 ^{o}C

Resíduo	*Grupo do aa*	*Átomo do NADH*[a]	*Comprimento da interação a 25 ^{o}C (%)*	*Comprimento da interação a 37 ^{o}C (%)*
Gly14	O	O3B	2,9	3,0
Ile15	O	O3B	-	3,1
Ser20	OG	O2A	2,6	-
Ile21	N	O2N	2,9	-
Asp64	OD1	N6A	3,0	2,9
Val65	N	N1A	3,2	3,1
Gly96	N	O4B	3,1	3,1
	N	O5B	-	2,9
Lys165	NZ	O2D	3,0	-
	NZ	O3D	3,0	-
	NZ	O1A	-	2,8
	NZ	O1N	-	2,8
Ile194	C=O	N7N	2,9	3,0
	N	O7N	3,0	3,0
Thr196	OG1	N7N	3,0	3,2
	OG1	O1N	3,2	2,8
	OG1	O2N	-	2,7
	OG1	O5D	3,0	-

[a]Nome dos átomos das moléculas do NADH de acordo com o Apêndice 1

Não se observou diferença significativa na ocorrência das ligações de hidrogênio entre os resíduos Asp64 e Val65 e o NADH, em ambas as temperaturas.

Já para a Gly96, as ligações de hidrogênio que ocorriam apenas entre o nitrogênio (N) do resíduo e a porção O4B do NADH em temperatura ambiente, passaram a ocorrer com duas oxidrilas da coenzima (O4B e O5B) aos 37 ^{o}C.

A Lys165 forma ligações de hidrogênio com as hidroxilas (OH) da ribose da nicotinamida do NADH (Figura 3.19) e é um dos resíduos que, juntamente com a Tyr158 e a Phe149, estão relacionados com o mecanismo catalítico da enzima InhA (Rozwarski et al., 1999). Os três resíduos encontram-se conservados em enzimas homólogas, o que reforça a importância de suas funções catalíticas.

Na Figura 3.19, observa-se que as interações entre as hidroxilas O2D e O3D do NADH a 25 ^{o}C transferem-se para as hidroxilas O1A e O1N aos 37 ^{o}C (Tabela 3.6). Esta mudança é evidente e importante e acompanha a alteração conformacional da redução do comprimento do NADH (distância C2N-C6A) com a elevação da temperatura.

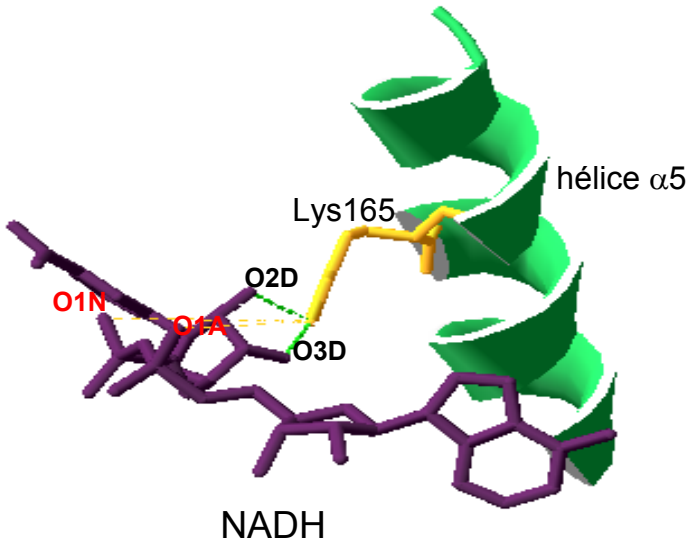

Figura 3.19 – Visualização da coenzima NADH, resíduo Lys165 e parte da hélice α5 na estrutura cristalina 1ENY. As linhas verdes tracejadas representam as ligações de H que ocorrem entre o resíduo Lys165 e os átomos O2D e O3D da porção nicotinamida do NADH. Estas ligações também são observadas nas estruturas resultantes das simulações por DM aos 25 ^{o}C. Aos 37 ^{o}C, por outro lado, a Lys165 passa a ligar-se ao NADH através de ligações de H com os átomos O1N e O1A da porção pirofosfato (linhas tracejadas em amarelo). Optou-se por utilizar uma imagem da estrutura cristalina da InhA (pdb 1ENY) ao invés de estruturas resultantes das simulações por DM por conseguir uma imagem mais nítida desta região e dos resíduos envolvidos na interação.

A mobilidade deste resíduo é bastante reduzida, por ele estar envolvido com a ligação da coenzima no seu sítio de ligação da InhA. O Fator-B a 25 ^{o}C é de 5 Å e a

37 °C é de 8 Å. Na presença do NADH, não se observou diferença na área acessível ao solvente nas duas temperaturas.

A Tyr158 mostra um aumento maior da flexibilidade aos 37 °C do que a Lys165, apresentando uma elevação do Fator-B (de 8 Å para 14 Å). Por outro lado, a área acessível ao solvente diminui com a elevação da temperatura, tanto na ausência (14% a 6% valor da área) como na presença do NADH (7 a 3%). Na Figura 3.20 podem ser visualizadas as interações entre os resíduos LYS165, TYR158 e o NADH em ambas as temperaturas.

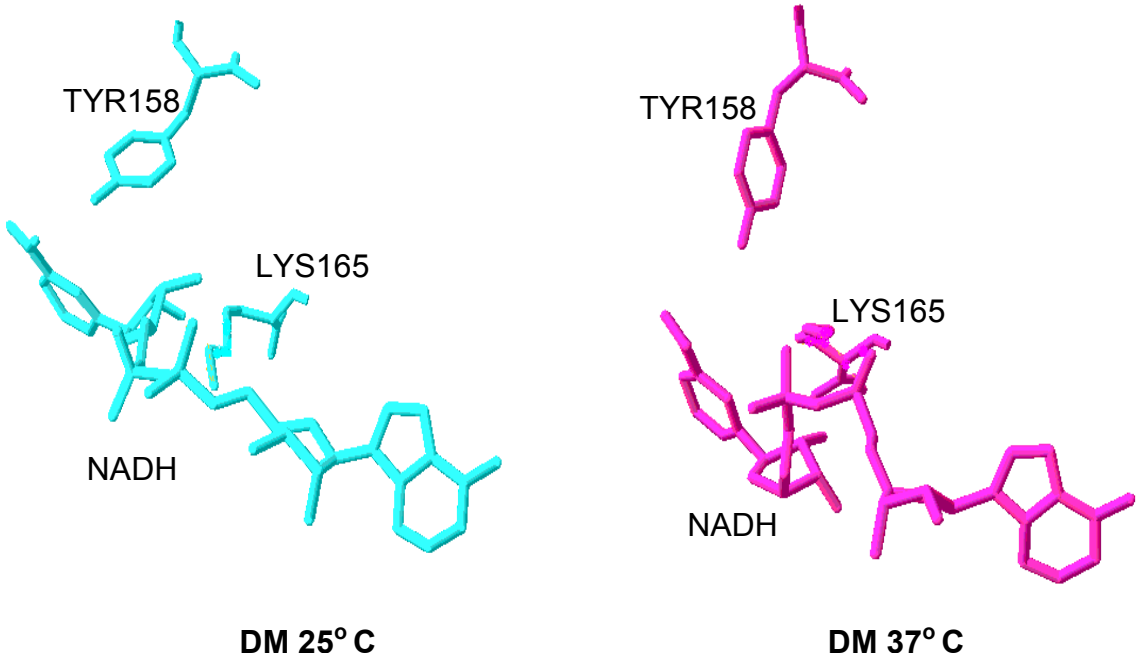

Figura 3.20 – Interação entre os resíduos Lys165 e Tyr158 e o NADH a 25 °C (ciano) e a 37 °C (magenta). Foram utilizados os *snapshots* mais próximos da estrutura média de ambas as trajetórias.

A Phe149 estende-se acima do anel de nicotinamida, protegendo a porção reativa do NADH do solvente. Este é o único resíduo que sofre alguma alteração significativa na presença da isoniazida (INH). Na presença do grupo acil isonicotínico da INH, a cadeia lateral da Phe149 faz uma rotação fora do anel nicotinamida,

criando espaço para este grupo. Após, a cadeia lateral da Phe149 se coloca ao lado do anel piridínico do grupo acil isonicotínico, permitindo que participe de uma interação aromática *anel-stacking* (anel tipo empilhamento) (Rozwarski et al., 1998).

O fator de temperatura e a área acessível ao solvente da Phe149 não se alteram nas duas simulações.

O resíduo Ile194 não mostrou diferenças significativas nas interações de H entre o complexo InhA-NADH nas duas temperaturas.

Quanto à Thr196 (Figura 3.21), as interações de hidrogênio que se faziam no átomo N7N do NADH aos 25 ^{o}C (48%) reduziram para 15% aos 37 ^{o}C. Nesta temperatura surgiram outras ligações associadas ao O2N da coenzima (95%).

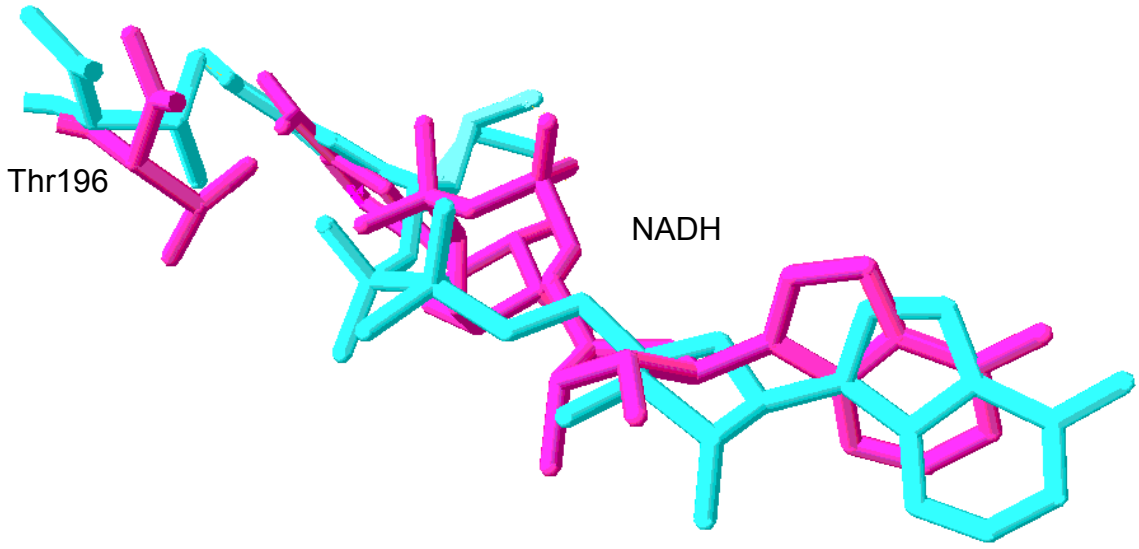

Figura 3.21 - Interação entre o resíduo de Thr196 e o NADH a 25 ^{o}C (ciano) e a 37 ^{o}C (magenta). Foram utilizados *snaphots* que apresentam maior semelhança com as estruturas médias nos últimos 5 ns das trajetórias. Com a elevação da temperatura, grande parte das ligações entre a Thr196 e o átomo N7N da nicotinamida do NADH transferiram-se para o átomo O2N.

Ainda no sítio de ligação do NADH, tem-se um resíduo de extrema importância para o mecanismo de resistência da InhA, que é a S94 (Figura 3.22) (Quemard et al., 1996). A substituição deste aminoácido por uma Alanina resulta em uma diminuição da afinidade da enzima pelo NADH, levando a um enfraquecimento da ligação à INH.

A inibição isoniazida-dependente da InhA tipo selvagem requer a presença do NADH, sendo que a inibição do mutante S94A ocorre somente quando a concentração do NADH está aumentada (Rozwarski et al., 1998). Existe, portanto, uma correlação entre a habilidade da enzima ligar-se ao NADH e o fato de tornar-se inibida pela isoniazida ativada (Basso et al., 1998).

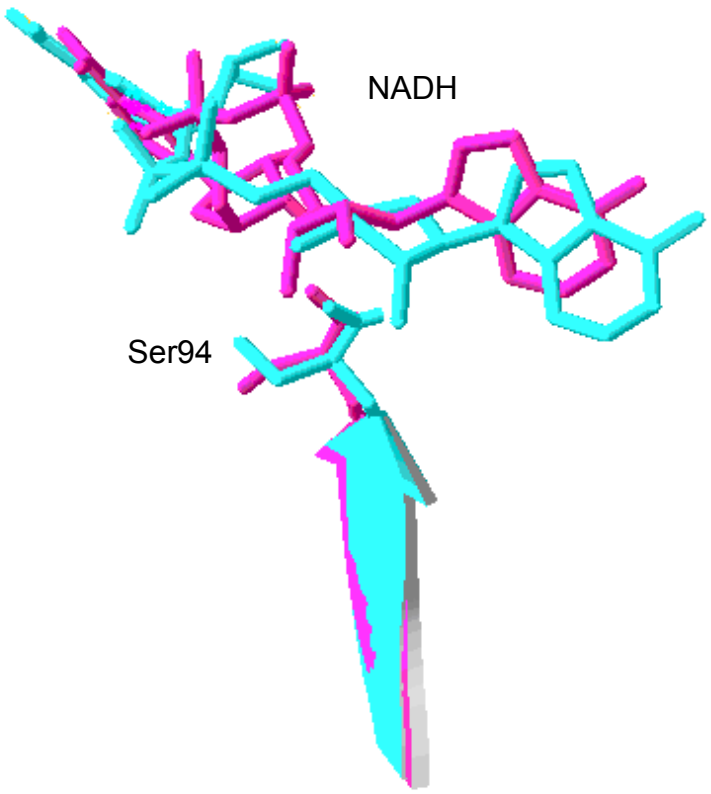

Figura 3.22 - Interação entre o resíduo de Ser94 e o NADH a 25 ^{o}C (ciano) e a 37 ^{o}C (magenta). Foram utilizados *snaphots* que apresentam maior semelhança com as estruturas médias nos últimos 5 ns das trajetórias.

A enzima mutante S94A, portanto, confere, ao MTB, resistência à INH. No nosso estudo, não houve diferença estatisticamente significativa no fator de temperatura e na área acessível ao solvente deste resíduo em ambas as temperaturas. Não se observou, portanto, alteração na flexibilidade da S94, aos 37 ^{o}C. Sugere-se repetir o mesmo estudo com o respectivo mutante.

Analisando-se as ocorrências das interações de hidrogênio entre os resíduos da InhA e o NADH, os valores dos Fatores-B e as ASAS destes mesmos resíduos, pode-se afirmar que a elevação da temperatura de 25 ^{o}C a 37 ^{o}C foi responsável por uma nítida alteração conformacional do sítio de ligação do NADH e da própria coenzima.

CAPÍTULO 4

4.1 Artigo científico

4.1 ARTIGO CIENTÍFICO

Flexibility of *Mycobacterium tuberculosis* 2-*trans*-Enoyl ACP (CoA) Reductase (InhA) at Two Temperatures: A Molecular Dynamics Simulation Study

Furia Gargano,* Osmar Norberto de Souza, *

*Laboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biossistemas – LABIO; Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - PPGBCM, Faculdade de Biociências, PUCRS, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brasil.

Address reprint requests and inquiries to Omar Norberto de Souza,

E-mail osmar.norberto@pucrs.br

4.1.1 - Abstract

Most computer experiments by the molecular dynamics simulation (MD) method are conducted at 298 K, considered the room temperature. We know, however, that the physiologic temperature of homeothermic animals is around 310 K. In this work, we report results of a MD study of the 2-*trans*-enoyl ACP (CoA) reductase (InhA) enzyme (E.C. 1.3.1.9) from *Mycobacterium tuberculosis* at two temperatures, 298 K and 310 K, for 20 ns each. In particular, we observe that the loop involved with the substrate binding site is more conformationally restricted at physiologic temperature. We also find important differences in B-factor values for the two trajectories, resulting in interesting conclusions about the effect of temperature in the flexibility of InhA, one of the major targets for development of new drugs against tuberculosis.

4.1.2 - Artigo tipo Letter

Biological macromolecules exist in an equilibrium between different conformations as a function of environment – number of molecules for each of the molecular species present in the system – and thermodynamics – temperature, pressure – conditions (1). Molecular dynamics (MD) simulations are important tools for understanding the physical basis of the structure and function of biological macromolecules and can help understand the contentious question concerning the effect of temperature on the protein structure and dynamics, particularly those that lead to conformational changes (2). However, there is the question whether the distribution of protein conformations plays a role in the kinetics of biologically important processes at room or other temperature (3).

MD simulations at different temperature for several proteins have been performed (4-9). We have previously carried out explicit aqueous MD simulations studies of the *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) 2-trans-enoyl ACP(CoA) reductase (Wt-InhA) enzyme (E.C. 1.3.1.9) in complex with its native NADH coenzyme and two mutants in order to understand InhA-NADH affinity in the context of the isoniazid mechanism of resistance for this enzyme (10). In the present work we extended those studies to investigate the effect of temperature in the structure and dynamics of the InhA-NADH complex at two different temperatures: 298 K and 310 K. The molecular system preparation an MD simulations were performed with the SANDER module of AMBER 9.0 (11) with the same protocol used by Schroeder et al. (10), except that here we used the force field ff99SB of Simmerling and co-workers (12). The initial structure for the InhA-NADH complex was taken from the 2.2 Å crystal structure (PDB ID: 1ENY) (13) with 41 crystallographic water molecules.

We performed a total of 20 ns of MD simulation for each temperature and used the last 5.0 ns as the production phase based on the convergence of the root-mean square deviation (RMSD) of the trajectory from the initial conformation (13).

FIGURE 1 Ribbon representation of the InhA (PDB ID: 1ENY) tertiary structure. The major regions involved in substrate entrance and binding are labeled A-loop, B-loop, and the substrate binding loop. The structure is colored according to the difference in B-factor values (ΔB) at both temperatures (see Fig. 3). For regions in black ΔB is positive. In the grey regions ΔB is negative. In short, the black regions indicate the most flexible InhA motifs at 310 K, while in the grey regions InhA is most flexible at 298 K.

Analysis of variance (ANOVA) showed significant differences ($p<0.01$) in the global conformational parameters (RMSD, radius of gyration, and solvent accessible area (data not shown), between the trajectory at 298 K and 310 K. Specific conformational changes were observed for the A- and B-loops, as well as for the substrate binding loop, which are involved in NADH binding and substrate entrance, binding, and product exit (10). We measured the distance between the centers of mass of the amino acids that make up these loops and looked at their absolute differences ($\Delta D_{310-298}$) between the two temperatures (Table1).

TABEL 1 Absolute distance differences ($\Delta D_{310-298}$) between the A-, B-, and substrate binding loops at 310 K and 298 K.

Loops	Distances (Å) at Temperatures:		$\Delta D_{310-298}$ (Å)
	298 K	310 K	
A-loop and substrate binding loop	16.5 ± 0.4	14.9 ± 0.3	1.6
A-loop and B-loop	13.0 ± 0.3	12.3 ± 0.4	1.3
B-loop and substrate binding loop	13.3 ± 0.3	12.6 ± 0.2	0.7

The distances between the A-, B-, and substrate binding loops and the A- and B-loops are smaller at 310 K. We also notice that $\Delta D_{310-298}$ for the substrate binding loop (residues 197-220) and A-loop (residues 100-111) at two temperatures (Fig. 2) is bigger than the other distances (Table 1).

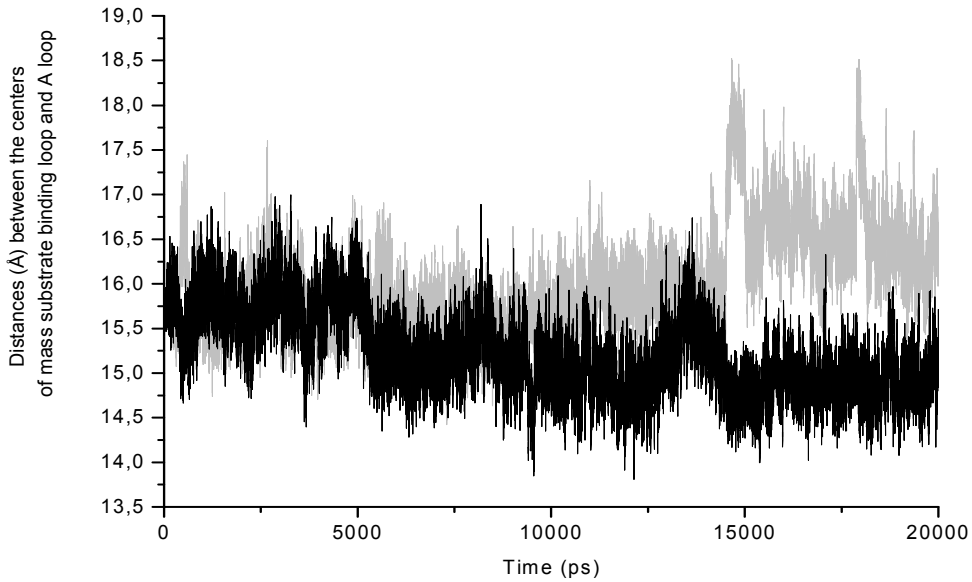

FIGURE 2 Distances (Å) between the centers of mass of the A-loop and the substrate binding loop at 298 K (gray) and 310 K (dark). $\Delta D_{310\text{-}298}$ is 1,6 Å in the last 5.0 ns of the trajectory.

These results suggest that the loops involved with substrate entrance and binding present, at physiologic temperature (310 K), have a more closed conformation (Fig. 1). If this behavior occurs in the presence of the substrate it might help keep the substrate closely bound to its biding site. Accordingly, the same could be expected for a drug-like small molecule which should preferably bind in the same site in order to inhibit MTB's InhA enzyme.

Receptor flexibility plays a major role in substrate, coenzyme, cofactor and drug binding (14,15). In order to verify which regions differ most in flexibility in MTB's InhA at the two different temperatures, we calculated the atomic isotropic B-factors using the equation

B-factor$_i$ = $\left(8\pi^2/3\right)\left(\left\langle r_i^2\right\rangle - \left\langle r_i\right\rangle^2\right)$ where $\left\langle r_i^2\right\rangle - \left\langle r_i\right\rangle^2$ is the mean-square positional fluctuation of atom *i* (16, 17).

B-factors reflect the local mobility of protein atoms, and were first used by Vihinen to compare the flexibility of mesophilic and thermophilic enzymes (18). We calculated the B-factor for the last 5.0 ns of both trajectories. Fig. 3 shows the B-factor differences ($\Delta B_{310-298}$) for the two temperatures (19). The values were plotted as a function of residue number.

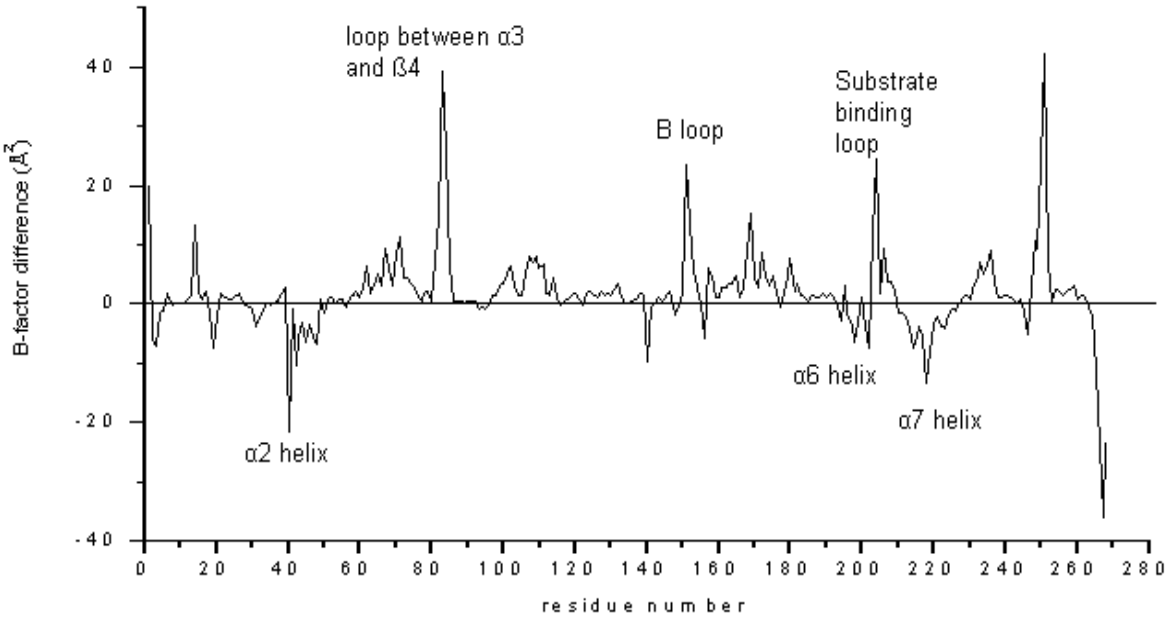

FIGURE 3 B-factor differences ($\Delta B_{310-298}$) as a function of InhA's residue number. Some InhA functionally important regions are highlighted (see Fig. 1). (a) α2 helix; (b) loop between α3 and β4; (c) B-loop; (d) α6 helix; (e) substrate binding loop and (f) α7 helix.

Mapping Fig. 3 onto Fig. 1, we observe that the areas with more flexibility at physiologic temperature are the loop between α3 and β4 and two loops related with the substrate entrance and binding (B-loop and substrate binding loop). The regions with less flexibility at 310 K are α2, α6 and α7 helices. The latter α-helices belong to the substrate binding loop. It is interesting to observe that the two helicoidal components of the substrate binding loop becomes more rigid with an increase in temperature (gray regions in Fig. 1), while the loop connecting them show more flexibility at 310 K. The increase of InhA flexibility, therefore, is not homogeneous.

It is possible that the rigidity of the substrate binding loop, with increasing temperature, may favor a more stable binding mode for the substrate and, accordingly, for efficient drug binding to this import MTB drug target (20). Experiments with MTB InhA-NADH complex together with other drug candidates and at physiological temperature may confirm our findings and reveal novel ways to search for InhA inhibitors.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof. Dr. João Feliz, Dr. Evelyn K. Schroeder, and our colleagues at LABIO for assistance in the initial stages of this work . This work is supported by grants (410505/2006-4 and 312027/2006-0) from MCT-CNPq-DECIT to ONS. FG was on leave from UFSM during the execution of this projetct. ONS is a CNPq Research fellow.

4.1.3 – References and footnotes

1. Daura X. 2006. Molecular dynamics simulation of peptide. *Theor. Chem. Acc.* 116:297-306.
2. Karplus M., McCammon A. 2002. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat. Struct. Biol.* 9:646-652.
3. Karplus M. 2000. Aspects of protein reaction dynamics: Deviations from simple behavior. *J. Phys. Chem. B* 104:11-27.
4. Blumenschein T. M. A., Gillis T. E., Tibbits G. F., Sykes B. D. 2004. Effect of temperature on the structure of trout troponin C. *Biochemistry*. 43:4955-4963.
5. Kaur K., Andrew L. C., Wishart D. S., Vederas J. C. 2004. Dynamic relationships among type IIa bacteriocins: Temperature effects on antimicrobial activity and on structure of the C-terminal amphipathic α-helix as a receptor-binding region. *Biochemistry*. 43:9009-9020.
6. Roccatano D., Sahoo H., Zacharias M., Nau W. M. 2007. Temperature dependence of looping rates in a short peptide. *J. Phys. Chem. B* 111:2639-2646.
7. Smolin N. & Winter R. 2008. Effect of temperature, pressure and cosolvents on structural and dynamic properties of the hydration shell of SNase: A molecular dynamics computer simulation study. *J. Phys. Chem*. *B* 112, 997-1006.
8. Merkley E. D., Bernard B., Daggett V. 2008. Conformational changes below the T_m: Molecular dynamics studies of the thermal pretransition of ribonuclease A. *Biochemistry*. 47: 880-892.

9. Motono C., Gromiha M. M., Kumar S. 2008. Thermodynamic and kinetic determinants of *Thermotoga maritima* cold shock protein stability: A structural and dynamic analysis. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. 71:655-669.

10. Schroeder E. K., Basso L. A., Santos D. S., Norberto de Souza O., 2005. Molecular dynamics simulation studies of the wild-type, I21V and I16T mutants of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase (InhA) in complex with NADH: Toward the understanding of NADH-InhA different affinities. *Biophys. J*. 89:876-884.

11. Case D. A., Darden T. A., Cheatham III T. E., Simmerling C. L., Wang J., Duke R. E, Luo R., Merz K. M., Pearlman D. A., Crowley M., Walker R. C., Zhang W., Wang B., Hayik S., Roitberg A., Seabra G., Wong K. F., Paesani F., Wu X., Brozell S., Tsui V., Gohlke H., Yang L., Tan C., Mongan J., Hornak V., Cui G., Beroza P., Mathews D. H., Schafmeister C., Ross W. S., Kollmann P. A. 2006. AMBER 9, University of California, San Francisco.

12. Hornak V., Abel R., Okur A., Strockbine B., Roitberg A., Simmerling C. 2006. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. 65:712-725.

13. Dessen A., Quémard A., Blanchard J. S., Jacobs Jr. W. R., Sacchettini J. C. 1995. Crystal structure and function of the isoniazid target of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 267:1638-1641.

14. McCammon, J. A. Target Flexibility in Molecular Recognition. Bioch. Biophys. Acta, 2005, 1754:221-224.

15. Carlson H. & McCammon J. A. 2000. Accommodating protein flexibility in computacional drug design. *Mol. Pharm*. 57:213-218.

16. Hünenberger P. H., Mark A. E. and van Gunsteren W. F. 1995. Fluctuation and cross-correlation analysis of protein motions observed in nanosecond molecular dynamics simulations. *J. Mol. Biol.* 252:492-503.

17. van Gunsteren G. F. and Mark A. E. 1998. Validation of molecular dynamics simulation. *J. Chem. Phys.* 108:6109-6116.

18. Vihinem M. 1987. Relationship of protein flexibility to thermostability. *Prot. Eng.* 1:477-80.

19. Norberto de Souza O. and Ornstein R. L. 1999. Molecular dynamics simulations of a protein-protein dimmer: particle-mesh Ewald electrostatic model yields far superior results to standard cutoff model. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 16:1205-1218.

20. Agüero, F., Al-Lazikani B., Alstett M., Berriman M., Buckner, F. S., Campbell R. K., Carmona S., Carruthers I. M., Chan A. W. E., Chen F., Crowther G. J., Doyle M. A., Hertz-Fowler C., Hopkins A. L., McAllister G., Nwaka S., Overington J. P., Oain A., Paolini G. V., Pieper U., Ralph S. A., Riechers A., Roos D. S., Sali, A., Shanmungan D., Suzuki T., Van Voorhis C., Verlinde C. L. M. J. 2008. Genomic-scale prioritization of drug targets: the TDR targets database. *Nat. Rev. Drug Disc*. 7:900-907.

4.1.4 - Carta de submissão do artigo

MS ID#: BIOPHYSJ/2009/163618
MS TITLE: Flexibility of <I>Mycobacterium tuberculosis</I> 2-trans-Enoyl ACP (CoA) Reductase (InhA) at Two Temperatures: A Molecular Dynamics Simulation Study

Dear Dr. Norberto de Souza:

Thank you for sending the above-mentioned manuscript, which has been entered into our online submission system (http://submit.biophysj.org).

IMPORTANT: Note that to take advantage of Society membership benefits of reduced page charges and approved free color, the corresponding author MUST be a member of the Society at the time of first submission of your paper. No exceptions will be made.

Your paper will be assigned to an editor for consideration, on the understanding that it has not been submitted for publication to another journal and will not be submitted for publication elsewhere unless it is rejected.

As the paper moves through the editorial process, you will be able to track its status online.

Thank you for choosing to submit your article to Biophysical Journal.
Please refer to your manuscript number, BIOPHYSJ/2009/163618, when contacting the Editorial Office. For immediate assistance, please call the office at (301) 634-7255.

Thank you for giving Biophysical Journal this opportunity to consider your work.

Sincerely,
Dr. Edward H. Egelman
Editor-in-Chief

CAPÍTULO 5

5.1 Considerações finais e perspectivas

5.1 – CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O presente trabalho refere-se ao primeiro estudo computacional via simulação por DM que investiga os efeitos da temperatura sobre a estrutura 3D do complexo enzimático InhA-NADH do *Mycobacterium tuberculosis*. Os parâmetros obtidos de duas simulações por DM com a enzima InhA e sua coenzima NADH, a 25 ^{o}C e 37 ^{o}C, foram analisados e comparados, obtendo-se as seguintes conclusões:

- Existem diferenças conformacionais estatisticamente significativas entre as estruturas 3D resultantes das simulações por DM aos 25 ^{o}C e 37 ^{o}C.

- Na região de ligação do substrato (alça A, alça B, alça de ligação do substrato) observou-se um importante aumento da flexibilidade (Fator-B aumentado nos resíduos desta região) aos 37 ^{o}C.

- A medida da distância entre as alças do substrato, alça A e alça B mostra que a InhA assume uma conformação mais aberta aos 25 ^{o}C (temperatura ambiente) nesta região. Já, aos 37 ^{o}C, estas distâncias se reduzem, tornando a região destas alças, mais reclusa. Um dado interessante a ser observado é que a distância entre a alça de ligação do substrato e a alça B da InhA na temperatura fisiológica humana é igual a esta distância na estrutura cristalina. A mesma semelhança ocorre entre a InhA a temperatura ambiente e suas formas mutantes. Este parâmetro, relacionado com a conformação das alças que estão em contato com o substrato, nos faz alertar sobre o quanto o ajuste de um fator ambiental como a temperatura pode interferir no resultado conformacional da estrutura protéica.

- Nas hélices α6, α7 e α2 da InhA, os Fatores-B de seus resíduos diminuíram aos 37 ^{o}C, o que demonstra que a alteração da temperatura ambiental não interfere de forma linear na flexibilidade da enzima. Uma maior elevação da estabilidade estrutural das proteínas está relacionada com o aumento de sua rigidez, enquanto que uma maior flexibilidade pode favorecer sua atividade (Meinhold et al., 2008). As hélices α6 e α7 oferecem "sustento" para a alça de ligação do substrato, mostrando-se mais firmes, aos 37 ^{o}C. A hélice α2 faz parte da região de contato com o NADH, justificando sua maior estabilidade com o aumento da temperatura.

- Na região do sítio de ligação da coenzima, a grande maioria dos resíduos localizados a 4 Å do NADH apresentaram a sua flexibilidade aumentada aos 37 ^{o}C, com exceção dos resíduos Ser20, Ile21, Phe41. Os resíduos Ser20 e Ile21 fazem parte da alça rica em glicina e, além do Fator-B diminuído, aos 37 ^{o}C deixam de ter interações de hidrogênio com o NADH.

- Pode-se concluir, portanto, que até mesmo pequenos aumentos de temperatura afetam significativamente a conformação de uma proteína em regiões importantes para o desempenho de suas funções. A elevação da temperatura aumenta a flexibilidade da estrutura protéica, mas de forma heterogênea, preservando regiões que necessitam de maior estabilidade no contexto dinâmico de sua funcionabilidade. A influência da temperatura sobre a flexibilidade, portanto, não se dá de forma global e uniforme, seguindo um padrão de distribuição que permita um melhor desempenho enzimático naquelas condições ambientais.

- O comprimento do NADH diminui de 16,7 Å para 15,5 Å com o aumento da temperatura. Isso confirma as mudanças que ocorrem no nível de coenzima e sítio de ligação do NADH ao alterar-se a temperatura.

- Quanto às interações de hidrogênio entre o NADH e os resíduos da InhA, observou-se uma mudança na disposição destas ligações na temperatura fisiológica humana. A mudança conformacional do NADH aos 37 ^{o}C acompanha-se da diminuição de suas interações de hidrogênio com a alça rica em glicina. Outra mudança observa-se na Lys165 que deixa de partilhar suas ligações de hidrogênio com os átomos O2D e O3D do NADH para interagir com os átomos O1 da adenosina e O1 da nicotinamida. As alterações na distribuição das ligações de hidrogênio entre o NADH e os resíduos da proteína, confirmam as mudanças conformacionais que ocorrem no sítio de ligação da coenzima com o aumento da temperatura.

- Um maior entendimento dos eventos mecânicos associados à ligação do substrato e do NADH à InhA é essencial para permitir a projeção de novos fármacos inibidores desta enzima (Hornak & Simmerling, 2006). As nítidas modificações da enzima InhA e sua coenzima NADH durante um processo de alteração de temperatura de 25 ^{o}C para 37 ^{o}C devem ser consideradas no decorrer do planejamento e *design* de algum fármaco tuberculostático. O conhecimento detalhado das estruturas alvo, portanto, deve levar em conta as condições ambientais (pressão, temperatura, pH) às quais serão submetidas em in *vivo*.

- O conhecimento detalhado que o estudo computacional com simulações por DM nos oferece sobre as alterações estruturais que as macromoléculas biológicas

podem sofrer com as mudanças dos fatores ambientais pode aprimorar os conhecimentos fisiopatológicos das doenças.

- Considerando que as alterações conformacionais das proteínas podem afetar sua habilidade de ligar-se a outras moléculas e que qualquer progresso na modelagem do movimento protéico e flexibilidade contribuirá para o entendimento do mecanismo das funções biológicas (Fersht, 2008), os resultados do presente trabalho enfatizam a importância do estudo sobre as mudanças estruturais que as enzimas podem sofrer com a variação dos fatores ambientais.

Entre as perspectivas futuras que podemos vislumbrar a partir deste trabalho científico, temos:

- Realização e análise de outras simulações por DM com InhA e NADH com temperaturas mais elevadas (39 ^{o}C, 40 ^{o}C e 42 ^{o}C). Vários trabalhos na literatura (Morita et al., 2006) apontam para diferenças cinéticas, metabólicas, estruturais e dinâmicas das proteínas a temperaturas correspondentes a estado febril (40 ^{o}C). Estes dados sugerem um estudo mais detalhado, da InhA e outras enzimas, nestas temperaturas. No estudo de Pritchard (2005) verificou-se que o aumento da temperatura pode funcionar como um elemento facilitador para a síntese de mediadores químicos no processo inflamatório.

- Comparação do comportamento das águas envolvidas na ligação entre a InhA e o NADH nas diferentes temperaturas.

- Elaboração de estudos de *docking* com complexos InhA-NADH provenientes de simulações a diferentes temperaturas.

REFERÊNCIAS

Anfinsen, C. B. **Principles that govern the folding of protein chains.** *Science*, 181, 223-230, 1973.

Baldock C.; Rafferty J.B.; Sedelnikova S.E.; Backer P.J.; Stuitje A.R.; Slabas A.R.; Hawkes T.R.; Rice D.W. **A mechanism of drug action revealed by structural studies of enoyl reductase.** *Science*, 274, 2107-2110, 1996.

Bakker P.I.W.; Hünenberger P.H.; McCammon J.A. **Molecular dynamics simulations of the hyperthermophilic protein Sac7d from *Sulfolobus acidocaldarius*: contribution of salt bridges to thermostability.** *J. Mol. Biol.*, 285, 1811-1830, 1999.

Bandyopadhyay P. & Meher B.R. **Drug resistance of HIV-1 protease against JE-2147: I47V mutation investigated by molecular dynamics simulation.** *Chem Biol Drug Des*., 67, 155-161, 2006.

Banerjee A.; Dubnau E.; Quemard A.; Balasubramanian V.; Um K. S.; Wilson T.; Collins D.; de Lisle G.; Jacobs Jr. W.R. **InhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*.** *Science*, 263, 227-230, 1994.

Basso L.A.; Zheng R.; Blanchard J.S. **Kinetics of inactivation of wild-type and C243S mutant of *Mycobacterium tuberculosis*: enoyl reductase by activated isoniad.** *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 11301-11302, 1996.

Basso L.A.; Zheng R.; Musser J.M.; Jacobs W.R.; Blanchard J.S. **Mechanisms of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: enzymatic characterization of enoyl reductase mutants identified in isoniazid-resitant clinical isolates.** *J. Infect. Dis.*, 178, 769-775, 1998.

Bayly C.I.; Cieplak P.; Cornell W.D.; Kollman P.A. **A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model.** *J. Phys. Chem.*, 97, 10269-10280, 1993.

Becker O.M. & Karplus M. **Temperature Echoes in molecular dynamics simulations of proteins.** *Physical Review Letters*, 70(22), 3514-3517, 1993.

Bell C.E.; Yeates T.O.; Eisenberg D. **Unusual conformation of nicotinamide adenine dinucleotid (NAD) bound to diphtheria toxin: A comparison with NAD bound to the oxidoreductase enzymes.** *Protein Science*, 6, 2084-2096, 1997.

Benkovic S.J.; Hammes G.G.; Hammes-Shiffer S. **Free-energy landscape of enzyme catalysis.** *Biochemistry*, 11, 3317-3321, 2008.

Berg, J.M.; Tymoczko J.L. Stryer L. **Bioquímica** - 6. ed – Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2008.

Burden C.J. & Oakley A.J. **Anisotropic atomic motions in high-resolution protein crystallography molecular dynamics simulations.** *Physical Biology*, 4, 79-90, 2007.

Burova T.V.; Grinberg N.V.; Grinberg V.Y.; Rariy R.V.; Klibanov A.M. **Calorimetric evidence for a native-like conformation of hen egg-white lysozyme dissolved in glycerol**. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1478, 309-317, 2000.

Campbell N.A. **Biology** 3ª ed, California: Benjamim-Cummings, 790p., 1987.

Campbell M.K. **Bioquímica** 3ª ed., São Paulo, Artmed, 752 p., 2006.

Case D.A.; Darden T.A.; Cheatham, III, T.E.; Simmerling C.L.; Wang J.; Duke R.E.; Luo R.; Merz K.M.; Pearlman D.A.; Crowley M.; Walker R.C.; Zhang W.; Wang B.; Hayik A.; Seabra R.G.; Wong K.F.; Paesani F.; Wu X.; Brozell S.; Tsui V.; Gohlke H.; Yang L.; Tan C.; Mongan J.; Hornak V.; Cui G.; Beroza P.; Mathews D.H.; Schafmeister C.; Ross W.S.; Kollman P.A. **AMBER 9**, University of California, San Francisco, 2006.

Cheatham T.E.III & Kollman P.A. **Observation of the A-DNA to B-DNA transition during unrestrained molecular dynamics in aqueous solution**. *J. Mol. Biol*., 259, 434-444, 1996.

Cheatham T.E.III; Crowley M.F.; Fox T.; Kollman P.A. **A molecular level picture of the stabilization of A-DNA in mixed ethanol-water solutions**. *Proc. Natl. Acad. Sci*., USA, 94, 9626-9630, 1997.

Cornell W.D.; Cieplak P.; Bayly C.I.; Gould I.R.; Merz Jr. K.M.; Ferguson D.M.; Spellmeyer D.C.; Fox T.; Caldwell J.W.; Kollman P.A. **A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids and organic molecules.** *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 5179-5197, 1995.

D´Amico S.; Marx JC.; Gerday C.; Feller G., **Activity-stability relationships in extremophilic enzymes**. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 7891-7896, 2003.

Daniel R.M.; Dunn R.V.; Finney J.L.; Smith J.C. **The role of dynamics in enzyme activity.** *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct*., 32, 69-92, 2003.

Darden T.; York D.; Pedersen L. **Particle mesh Ewald: an N log(N) method for Ewald sums in large systems.** *J. Chem. Phys*., 98, 10089-10092, 1993.

Daune M.; Duffin W.J. **Molecular biophysics – structures in motions**. Ed. Pg.217 Cap. 9.4

Deng H., Brewer S.; Vu D.M.; Clinch K.; Calleder R.; Dyer R. B. **On the pathway of forming enzymatically productive ligand-protein complexes in lactate dehydrogenase.** *Biophysical Journal*, 95, 804-813, 2008.

Dessen A.; Quémard A.; Blanchard J.S.; Jacobs Jr. W.R.; Sacchettini J.C. **Crystal structure of the isoniazid target of *Mycobacterium tuberculosis.*** *Science*, 267, 15582-9, 1995.

Dvorsky R.; Sevcik J.; Caves L.S.D.; Hubbard R.E.; Verma C.S. **Temperature effects on protein motions: a molecular dynamics study of rnase-*Sa*.** *J. Phys. Chem. B*, 104, 10387-97, 2000.

Eisman L. **Biology and human progress.** Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall, 125p., 1972.

Essmann U.; Perera L.; Berkowitz M.L.; Darden T.; Lee H.; Pedersen L.G. **A smooth particle mesh Ewald method.** *J. Chem. Phys*., 103, 8577-8593, 1995.

Fan H.; Kashi R.S.; Middaugh C.R.; **Conformational lability of two molecular chaperones Hsc70 and gp96: effects of pH and temperature.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 447, 34-45, 2006.

Farewell A. & Neidhardt F.C. **Effect of temperature on in vivo protein synthetic capacity in *Escherichia coli***. *Journal of Bacteriology*, 180(17), 4704-10, 1998.

Fersht A.R. **From the first protein structures to our current knowledge of protein folding: delights and scepticisms.** *Nature*, 9, 650-654, 2008.

Fonseca, L.C.; Corrêa N.C.R.; Garrote-Filho M.S.; Cunha C.C.; Penha-Silva N. **Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas.** *Quim. Nova,* 29, 543-548, 2006.

Fox T. & Kollman P.A. **The application of different solvation and electrostatic models in molecular dynamics simulations of ubiquitin: how well is the S-ray structure "maintained"?** *Proteins*, 25, 315-334, 1996.

Garofoli S.; Falconi M.; Desideri A. **Thermophilicity of wild type and mutant cold shock proteins by molecular dynamics simulation.** *Journal of Biomolecular Strucuture & Dynamics*, 21, 771-780, 2004.

Georlette D.; Damien B.; Blaise V.; Depiereux E.; Uversky V.N.; Gerday C.; Feller G. **Structural and functional adaptations to extreme temperatures in psychrophilic, mesophilic and thermophilic DNA ligases**. *The Journal of Biological Chemistry,* 278, 37015-37023, 2003.

Gunasekaran K. & Nussinov R. **How different are structurally flexible and rigid binding sites? Sequence and structural features discriminating proteins that do and do not undergo conformational change upon ligand binding.** *J. Mol. Biol.*, 365, 257-273, 2007.

Hajdú I.; Böthe C.; Szilágyi A.; Kardos J.; Gál P.; Závodszky P. **Adjustment of conformational flexibility of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a**

means of thermal adaptation and allosteric regulation. *Eur Biophys J*., 37, 1139-1144, 2008.

Hammes-Schiffer S. & Benkovic S.J. **Relating protein motion to catalysis.** *Annu. Rev. Biochem.*, 75, 519-541, 2006.

Harcourt A.V. On the observation of the course of chemical change. *J. Chem. Soc.* 20, 460-495, 1867.

Herdade S. **Espalhamento de neutrons térmicos e o prêmio Nobel de física de 1994**. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, 16, 1-4, 1994.

Holliman L. **Going for fold in Asilomar.** *Modern Drug Discovery – from Concept to Development*, 3(9), 41-42, 45-46, 2000..

Hornak V.; Abel R.; Okur A.; Strockbine B.; Roitberg A.; Simmerling C. **Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters.** *Proteins*, 65, 712-725, 2006.

Hornak V. & Simmerling C. **Targeting structural flexibility in HIV-1 protease ingibitor binding.** *Drug Discovery Today,* 12, 132-138, 2006.

Hou H.; Qi Z.; OuYang Y.; Liao F.; Zhang Y.; Liu Y. **Studies on interaction between vitamin B12 and human serum albumin.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47, 134-139, 2008.

Hübbard S.J. & Thornton J.M. **NACCESS, computer program,** *Department of Biochemistry and Molecular Biology*, University College London, 1993.

Hünenberger P.H.; Mark A.E.; van Gunsteren W.F. **Fluctuation and cross-correlation analysis of protein motions observed in nanosecond molecular dynamics simulations.** *J. Mol. Biol*., 252, 492-403, 1995.

Hünenberger P.H. & McCammon J.A. **Ewald artifacts in computer simulations of ionic solvation and ion-ion interaction: a continuun electrostatics study**. *J. Chem. Phys*., 110, 1856-1872, 1999a.

Hünenberger P.H. & McCammon J.A. **Effect of artificial periodicity in simulations of biomoleculares under Ewald boundary conditions: a continuum electrostatic study.** *Biophys. Chem*., 78, 69-88, 1999b.

Jaenicke R. & Závodszky P. **Proteins under extreme physical conditions**. *FEBS Letters*, 268(2), 344-349, 1990.

Karplus M. & Petsko G.A. **Molecular dynamics simulations in biology.** *Nature*, 347, 631-639, 1990.

Karplus, M. **Aspects of protein reaction dynamics: deviations from simple behavior**. *J. Phys. Chem*., *B* 104, 11-27, 2000.

Karplus M. & McCammon A. **Molecular dynamics simulations of biomoleculares.** *Nature Structural Biology,* 9, 646-652, 2002.

Kaur K.; Andrew L.C.; Wishart D.S.; Vederas J.C. **Dynamic relationships among type lla bacteriocins: temperature effects on antivmicrobial activity and on structure of the C-terminal amphipathic α helix as a receptor-binding region.** *Biochemistry*, 43, 9009-9020, 2004.

Konkel M.E. & Tilly K. **Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes.** *Microbes Infect*., 2, 157-166, 2000.

Ibragimova G.T. & Wade R.C. **Importance of explicit salt íons for protein stability in molecular dynamics simulation.** *Biophys. J.,* 74, 2906-2911, 1998.

LaConte L.E.W.; Voelz V.; Nelson W.; Enz M.; Thomaz D. **Molecular dynamics simulation of site-directed spin labeling: experimental validation in muscle fibers.** *Biophysical Journal*, 83, 1854-1866, 2002.

Leach A.R. **Molecular modelling: principles and applications.** England: Ed. Longman A.W. Ldt., Essex, 1996.

Lee B.K. & Richards F.M. **The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility.** *J. Mol. Biol*., 55, 379-400, 1971.

Lehninger A.L.; Yarborough C.; Yarborough K. **Princípios de bioquímica.** 4ª ed. Editora Sarvier, 1202 pg., ISBN: 8573781661, 2006.

Lesk A.M. **Introdução à Bioinformática**. Tradução Andrade A.E.B.; Schroeder E.K.; Machado K.S.; Norberto de Souza O. – 2ª ed. – Porto Alegre : Artmed, 2008.

Levy R.M.; Sheridan R.P.; Keepers J.W.; Dubey G.S. **Molecular dynamics of myoglobin at 298 K – results from a 300-ps computer simulation.** *Biophys J*., 48(3), 509-518, 1985.

Liang J.; Edelsbrunner H.; Fu P.; Sudhakar P.V.; Subramaniam S. **Analytical shape computation of macromolecules: I. Molecular area and volume through alpha shape.** *PROTEINS: structure, function and genetics,* 33, 1-17, 1998.

Low P.S.; Bada J.L.; Somero G.N. **Temperature adaptation of enzymes: roles of the free energy, the enthalpy and the entropy of activation.** *Proc. Nat. Acad. Sci.* USA., 70, 430-432, 1973.

Lu H.P.; Xun L.; Xie X.S. **Single-molecule enzymatic dynamics.** *Science*. 282, 1877-82, 1998.

Mackoviak P.A.; Wasserman S.S.; Levine M.M. A critical appraisal of 98.6 degrees F, the upper limito f the normal body temperature and other legacies of Carl Reinhold August Wunderlich. *Journal of the American Medical Association*, 268, 1578-1580, 1992.

Meinhold L.; Clement D.; Tehei M.; Daniel R.; Finney J.L.; Smith J.C. **Protein dynamics and stability: the distribution of atomic fluctuations in thermophilic and mesophilic dihydrofolate reductase derived using elastic incoherent neutron scattering.** *Biophysical Journal*, 94, 4812-4818, 2008.

Melchionna S.; Falconi M.; Desideri A. **Effect of temperature and hydration on protein fluctuations: molecular dynamics simulation of Cu, Zn superoxide dismutase at six different temperatures. Comparison with neutron scattering data.** *Journal of Chemical Physics*, 108, 6033-6041, 1998.

Mereghetti L.; Sitkiewicz I.; Green N.M.; Musser J.M. **Extensive adaptive changes occur in the transcriptome of *Sreptococcus agalactiae* (Group B**

***Streptococcus*) in response to incubation with human blood.** *PlosOne* – **www.plosone.org**, 3, 1-10, 2008.

Merkley E.D., Bernard B., Daggett V. **Conformational changes below the T_m: molecular dynamics studies of the thermal pretransition of ribonuclease A.** *Biochemistry*, 47, 880-92, 2008.

Morita S.; Tsujinaka T.; Yano M.; Ebisui C.; Morimoto T.; Fujita J.; Ogawa A.; Taniguchi M.; Shiozaki H.; Monden M. **Temperature-dependent enhancement of proteolysis in C2C12 myotubes in association with the activation of 26S proteasome.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 228, 813-818, 1996.

Moritsugu K. & Smith J.C. **Temperature-dependent protein dynamics: A simulation-based probabilistic diffusion-vibration Langevin description.** *J. Physc. Chem. B*, 110, 5807-5816, 2006.

Motono C.; Gromiha M. M.; Kumar S. **Thermodynamic and kinetic determinants of *Thermotoga maritima* cold shock protein stability: a structural and dynamic analysis.** *Proteins*, 71, 655-669, 2008.

Murray R.K. & Harper H.A. **Harper: Bioquímica**. 8ª ed. São Paulo: Atheneu, 860p., 1998.

Namba A.M.; da Silva V.B.; da Silva C.H.T.P. **Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos.** *Ecl. Química*, 33(4):13-24, 2008. FT

Norberto de Souza O. **Intrinsic curvature of DNA: a molecular dynamic study**. Ph.D. Thesis. Department of Crystallografphy, Birbeck College, University of London, London, England, 1994.

Norberto de Souza O. & Ornstein R.L. **Effect of periodic box size on aqueous molecular dynamics simulations of a DNA dodecamer with Particle-Mesh Ewald method.** *Biophys. J.*, 72, 2395-2397, 1997.

Norberto de Souza O. & Ornstein R.L. **Molecular dynamic simulations of a protein-protein dimer: Particle-Mesh Ewald electrostatic model yields far superior results to standard cutoff model.** *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 16, 1205-18, 1999.

Oliveira J.S.; Pereira J.H.; Canduri F.; Rodrigues N.C.; Norberto de Souza O; de Azevedo Jr W.F.; Basso L.A.; Santos D.S. **Crystallographic and pre-steady-state kinetics studies on binding of NADH to wild-type and Isoniazid-resistant enoyl-ACP(CoA) reductase enzymes from *Mycobacterium tuberculosis*.** *J. Mol. Biol*., 359, 646-666, 2006.

Pandya U.; Allen C.A.; Watson D.A.; Niesel D.W. **Global profiling of *Streptococcus pneumoniae* gene expression at different growth temperatures.** *Gene*, 360, 45-54, 2005.

Pantano S.; Alber F.; Lamba D.; Carloni P. **NADH interactions with WT- and S94A-acyl carrier protein reductase from *Mycobacterium tuberculosis*: an ab initio study.** *PROTEINS: Structure, Function and Genetics*, 47, 62-68, 2002.

Pearlman D.A.; Case D.A.; Caldwll J.W.; Ross W.S.; Cheatham III T.E., DeBolt S.; Ferguson D.; Seibel G.L.; Kollman P.A. **AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules.** *Comput. Phys. Commun*., 91, 1-41, 1995.

Pierce M.M.; Raman C.S.; Nall B.T**. Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions.** *METHODS*, 19, 213-221, 1999.

Pritchard M.T.; Li Z.; Repasky E.A. **Nitric oxide production is regulated by fever-range thermal stimulation of murine macrophages.** *Journal of Leukocyte Biology*, 78, 630-638, 2005.

Quémard A.; Sacchettini J.C.; Dessen A.; Vilcheze C.; Bittman R.; Jacobs Jr. W.R.; Blanchard J.S. **Enzymatic characterization of the target for isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*.** *Biochemistry*, 34, 8235-8241, 1995.

Quémard A.; Dessen A.; Sugantino M.; Jacobs Jr. W.R.; Sacchettini J.C.; Blanchard J.S. **Binding of catalase-peroxidase-activated isoniazid to wild-type and mutant**

Mycobacterium tuberculosis **enoyl-ACP reductases**. *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 1561-1562, 1996.

Rader S.D. & Agard D.A. **Conformational substates in enzyme mechanism: the 120 K structure ofa α-lytic protease at 1.5 Å resolution**. *Protein Science*, 6, 1375-1386, 1997.

Rozak D.A.; Orban J.; Bryan P.N. **G148-GA3: A streptococcal virulence module with atypical thermodynamics of folding optimally binds human serum albumin at physiological temperatures.** *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1753, 226-233, 2005.

Rozwarski D.A.; Grant, A.G.; Barton, D.H.R.; Jacobs Jr.; Sacchettini, J.C., **Modification of the NADH of the isoniazid target (inhA) from *Mycobacterium tuberculosis***. *Science*, 279, 98-102, 1998.

Rozwarski D.A.; Vilchèze C.; Sugantino M.; Bittman R.; Sacchettini J.C. **Crystal structure of the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-ACP reductase, InhA, in complex with NAD^+ and a C16 fatty acyl substrate.** *J. Biol. Chem.*, 274, 15582-15589, 1999.

Ryde U. **Molecular dynamic simulations of alcohol dehydrogenase with a four- or five-coordinate catalytic zinc zinc ion.** *Proteins*, 21, 40-56, 1995.

Sarkar S.K.; Takeda Y; Kanamaru S; Arisaka F. **Association and dissociation of the cell puncturing complex of bacteriophage T4 is controlled by both pH and temperature.** *Biochimica et Biophysica Acta ,*1764, 1487-1492, 2006.

Schroeder E.K.; Norberto de Souza O.; Santos D.S.; Blanchard J.S.; Basso L.A. **Drugs that inhibit mycolis acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*.** *Curr. Pharm. Biotechnol*., 3, 197-225, 2002.

Schroeder E.K. **Efeito das mutações I16T, I21V, K47T e S94A na afinidade da enzima 2-trans-enoil-ACP (CoA) redutase de *Mycobacterium tuberculosis* pelo cofactor NADH: Estudos por simulação pela dinâmica molecular e docking molecular.** Tese do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - UFRGS, 1-203, 2004.

Schroeder E. K., Basso L. A., Santos D. S., de Souza O. N. **Molecular dynamics simulation studies of the wild-type, I21V and I16T mutants of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase (InhA) in complex with NADH: toward the understanding of NADH-InhA different affinities.** *Biophysical Journal*, 89, 876-884, 2005.

Showalter S.A.; Johnson E.; Rance M.; Brüschweiler R. **Toward quantitative interpretation of methyl side-chain dynamics from NMR by molecular dynamics simulations**. *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 14146-14147, 2007.

Showalter S.A. & Brüschweiler R. **Validation of molecular dynamics simulations of biomolecules using NMR spin relaxation as benchmarks: application to the AMBER99SB force field.** *Journal of Chemical Theory and Computation*, 3, 961-975, 2007.

Simmers L. **Diversified health occupations**. 2ed, Canadá: Delmar, 1988, 150-151p.

Smith J.; Kuczera K.; Karplus M. **Dynamics of myoglobin: comparision of simulation results with neutron scattering spectra.** *Proc. Natl. Acad. Sci*., Biophysics, 87, 1601-1605, 1990.

Smoot L.M.; Smoot J.C.; Graham M.R.; Somerville G.A.; Sturdevant D.E.; Migliaccio C.A.L.; Sylva G.L.; Musser G.M. **Global differential gene expression in response to growth temperature alteration in group A Streptococcus**. *Proc. Natl. Acad. S*ci., U.S.A., 98, 10416-10421, 2001.

Somero G.N. **Protein adaptations to temperature and pressure: complementary roles of adaptive changes in amino acid sequence and internal milieu.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 136, 577-91, 2003.

Somero G.N. **Adaptation of enzyme to temperature: searching for basic "strategies"**. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 139, 321-33, 2004.

Song X.; Flynn P.F.; Sharp K.A.; Wand A.J. **Temperature dependence of fast dynamics in proteins.** *Biophysical Journal-Biophysical Letters*, 15, 92(6), 43-45, 2007.

Steinbach P.J. **Introduction to macromolecular simulation**. Center for molecular modeling for information technology – National Institutes of Health. Disponível em **http://cmm.cit.nih.gov/intro_simulation/intro_simulation.pdf** . Acesso em: 16 jun. 2009.

Stintzi A. **Gene expression profile of *Campylobacter jejuni* in response to growth temperature variation**. *J. Bacteriol*., 185, 2009-2016, 2003.

Sund-Levander M. & Grodzinsky E. **Time for a change to assess and evaluate body temperature in clinical practice.** *Int J. Nurs Pract.*, 15(4), 241-9, 2009.

Svingor A.; Kardos J.; Hajdú I.; Németh A.; Závodszky P. **A better enzyme to cope with cold.** *The Journal of Biological Chemistry*. 276, 28121-5, 2001.

Sytina O.A.; Heyes D.J.; Hunter C.N.; Alexandre M.T.; van Stokkum I.H.; van Grondelle R.; Groot M.L. **Conformational changes in an ultrafast light-driven enzyme determine catalytic activity.** *Nature*, 18, 456(7224), 1001-4, 2008.

Tai K.; Shen T.; Börjesson U.; Philippopoulos M., McCammon J.A. **Analysis of a 10-ns molecular dynamics simulation of mouse acetylcholinesterase.** *Biophys J.*, 81(2), 715-24, 2001.

Teodoro M.L.; Phillips G.N.Jr; Kavraki L.E. **Understanding protein flexibility through dimensionality reduction.** *Journal of Computational Biology*, 10, 617-634, 2003.

Thomas A.S. & Elcock A.H. **Molecular simulations suggest protein salt bridges are uniquely suited to life at high temperatures.** *J. Am. Chem. Soc*, 126, 2208-2214, 2004.

Tilton R.F.; Dewan J.C.; Petsko G.A. **Effects of temperature on protein structure and dynamics: X-ray crystallographic studies of the protein ribonuclease-A at nine different temperatures from 98 to 320 K**. *Biochemistry*, 31, 2469-2481, 1992.

Tucherman M.E. & Martyna G.J. **Understanding modern molecular dynamic: techniques and applications.** *J. Phys. Chem. B.*, 104(2), 159-178, 2000.

van Gunsteren W.F. & Berendsen H.J.C. **Computer simulation of molecular dynamics: methodology, applications and perspectives in chemistry.** *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.,* 29, 992-1023, 1990. FALTA TUDO

van Gunsteren, W.F. & Mark, A.E. **On the interpretation of biochemical data by molecular dynamics computer simulation.** *Eur. J. Biochem*., 2045, 947-961, 1992.

van Gunsteren W.F. & Mark A.E. **Validation of molecular dynamics simulations.** *Journal of Chemical Physics*, 108, 6109-6116, 1998.

Vieira L.L.; Sacerdoti-Sierra N.; Jaffe C.L. **Effect of pH and temperature on protein kinase release by *Leishmania donovani*.** *International Journal for Parasitology*, 32, 1085-1093, 2002.

Villeneuve M.; Kawai M.; Kanashima H.; Watanabe M.; Minnikin D.E.; Nadahara H. **Temperature dependence of the Langmuir monolayer packing of mycolic acids from *Mycobacterium tuberculosis*.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1715, 71-80, 2005.

Voet D.; Voet J.G.; Pratt C.W. **Fundamentos de Bioquímica.** Trad. Arthur Germano Fett Neto … [et al.]. – 1ª ed. *Porto Alegre: Artes Médicas Sul,* 1-931, 2000.

Voltarelli J.C. **Febre e Inflamação**. Simpósio de semiologia e fisiopatologia clínicas – Capítulo 1 - Medicina, Ribeirão Preto, 27, 7-48, 1994.

Voss N.R.; Gerstein M.; Steitz TA; Moore P.B. **The geometry of the ribosomal polypeptide exit tunnel.** *J. Mol. Biol.* 360(4), 893-906, 2006.

Wallace A.C.; Laskowski R.A.; Thornton J.M. **LIGPLOT: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions.** *Prot. Eng*., 8, 127-134, 2005.

Weber W.; Hünenberger P.H.; McCammon J.A**. Molecular dynamics simulations of a polyalanine octapeptide under Ewald boundary conditions: influence of artificial periodicity on peptide.** *J. Phys. Chem. B*, 104, 3668-3675, 2000.

Weiner S.J.; Kollman P.A.; Case D.A.; Singh U.C.; Ghio C.; Alagona G.; Profeta S.; Weiner P. **A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins.** *J. Am. Chem. Soc*., 106, 765-784, 1984.

Wintrode P.L.; Zhang D.; Vaidehi N.; Arnold F.H.; Goddard III WA. **Protein dynamics in a family of evolved thermophilic enzyme.** *J. Mol. Biol*., 327, 745-7, 2003.

Wolfenden R.; Snider M.; Ridgway C.; Miller B. **The temperature dependence of enzyme rate enhancements.** *J. Am. Chem. Soc*., 121, 7419-20, 1999.

Wong L. **Temperature of a healty human - body temperature.** The Physics Factbook™, Edited by Glenn Elert, an educational, fair use website. Disponível em: http://hypertextbook.com/facts/LenaWong.shtml Acesso em: 16 jun. 2009.

Wood K.; Grudinin S.; Kessler B.; Weik M.; Johnson M.; Kneller G. R.; Oesterhelt D.; Zaccai G. **Dynamical heterogeneity of specific amino acids in bacteriorhodopsin.** *JMB*., 380,581-91, 2008.

World Book Encyclopedia. Chicago: **Temperature body**, Field Enterprises, 1996.

Xu S.; Yang Y.; Jin R.; Zhang M.; Wang H. **Purification and characterization of a functionally active *Mycobacterium tuberculosis* prephenate dehydrogenase.** *Protein Expression & Purification*, 49(2), 151-8, 2006.

Yang R, Lee MC, Yan H, Duan Y. **Loop conformation and dynamics of the *Eschericichia coli* HPPK apo-enzyme and its binary complex with MgATP.** *Biophysical Journal*, 89, 95-106, 2005.

Závodszky P.; Kardos J.; Svingor A.; Petsko G.A. **Adjustment of conformational flexibility is a key event in the thermal adaptation of proteins.** *Proc. Natl. Acad. Sci*., USA, 95, 7406-11, 1998.

Zhang J.; Zhang L.; Zhou L**. Thermostability of protein studied by molecular dynamics simulation.** *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 21, 657-662, 2004.

Zoidakis J.; Loaiza A.; Vu K.; Abu-Omar M.M. **Effect of temperature, pH, and metals on the stability and activity of phenylalanine hydroxylase from *Chromobacterium violaceum*.** *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99, 771-775, 2005.

GLOSSÁRIO

Análise de componentes principais (ACP)

Consiste em reescrever as coordenadas das amostras em outro sistema de eixo mais conveniente para a análise dos dados.

As n-variáveis originais geram, através de suas combinações lineares, n-componentes principais, cuja principal característica, além da ortogonalidade, é que são obtidos em ordem decrescente de máxima variância. A componente principal 1 detém mais informação estatística que a componente principal 2, que por sua vez tem mais informação estatística que a componente principal 3 e assim por diante.

Este método permite a redução da dimensionalidade dos pontos representativos das amostras pois, embora a informação estatística presente nas n-variáveis originais seja a mesma dos ncomponentes principais, é comum obter em apenas 2 ou 3 das primeiras componentes principais mais que 90% desta informação.

Análogos do estado de transição

Assemelham-se ao estado de transição da reação.

Chaperonina

Uma família de proteínas do choque térmico, dentro da qual é feito o dobramento das proteínas.

Configuração

Relação geométrica entre um dado conjunto de átomos.

Conformação

Arquitetura tridimensional de uma proteína e relações espaciais de todos os átomos com os demais (Murray et al., 1998). Conformação refere-se à disposição espacial de grupos diversos sem o rompimento de ligações, em conseqüência da rotação em torno de laços simples na molécula (Lehninger et al, 2006). Uma proteína pode apresentar inúmeras conformações. Cada uma delas caracteriza um micro-estado (Fonseca et al., 2006).

Dicroísmo circular - DC

É uma forma de espectroscopia que faz uso da absorção diferenciada da luz polarizada no sentido horário ou no sentido anti-horário. Este fenômeno é rotineiramente utilizado no estudo da estrutura secundária de proteínas.

Distribuição de Boltzmann

Em física, a **Distribuição de Boltzmann** permite calcular a função distribuição para um número fracionário de partículas N_i / N ocupando um conjunto de estados i cada um dos quais tem energia E_i:

$$\frac{N_i}{N} = \frac{g_i e^{-E_i/k_B T}}{Z(T)}$$

onde k_B é a **constante de Boltzmann**, T é a temperatura (admitida como sendo uma quantidade precisamente bem definida), g_i é a degeneração, ou número de estados tendo energia E_i, N é o total do número de partículas:

$$N = \sum_i N_i$$

e $Z(T)$ é chamada função partição, a qual pode ser tratada como sendo igual a

$$Z(T) = \sum_i g_i e^{-E_i/k_B T}.$$

Enovelamento

As proteínas são polímeros formados por uma seqüência definida de aminoácidos. O material genético de cada célula é capaz de produzir uma única seqüência de aminoácidos de uma maneira bastante reprodutível. Entrentanto, esta seqüência unidimensional de aminoácidos necessita, no entanto, sofrer arranjos se dobrando sobre si mesma para que, ao final, forme-se uma proteína com uma estrutura 3D definida dotada de função biológica. Este processo é conhecido como enovelamento protéico e a proteína enovelada é dita nativa. Portanto, uma estrutura secundária (alfa hélices, folhas beta e voltas), terciárias (arranjo tridimensional) e quaternária completamente definida.

***Ensemble* canônico**

Estado termodinâmico que corresponde por um número de átomos N, volume V e temperatura T constantes (NVT).

***Ensemble* isobárico-isotérmico**

Estado termodinâmico caracterizado por número de átomos N, pressão P e temperatura T constantes (NPT).

***Ensemble* microcanônico**

Estado termodinâmico que corresponde a um sistema isolado, e é caracterizado por número de átomos N, volume V e energia total E constantes (NVE).

Entalpia

É a grandeza física que descreve a energia interna total de um sistema. A unidade da entalpia é o joule (J) no Sistema Internacional de Unidades e sua representação é feita pelo símbolo H.

Entropia

É uma grandeza termodinâmica que representa o grau de desordem. Ela mede a parte da energia que não pode ser transformada em trabalho.

Espalhamento incoerente de neutrons

As técnicas de espalhamento de neutrons desempenham um importante papel no estudo da matéria condensada. Elas complementam as técnicas mas conhecidas de espalhamento de raios X, elétrons e luz. A utilidade dos nêutrons térmicos provem do fato destas partículas possuírem comprimentos de onda de Broglie (λ_n) da ordem das distâncias interatômicas na matéria condensada, ou seja 1 a 4 Å e, correspondentemente, energias da ordem de 5 x 10^{-3} a 8 x 10^{-2} eV, isto é, da ordem das energias quânticas características excitadas em temperaturas ordinárias. O espalhamento de nêutrons pela matéria condensada é devido a dois tipos de interação: (a) a interação neutron-núcleo, via forças nucleares, corresponde a seções de choque σ e amplitiudes de espalhamento b, com $\sigma = 4\pi b^2$, que são características de um particular núcleo, e que devem ser determinadas experimentalmente; (b) o momento do nêutron (-1,91 magnetons

nucleares) interage com campos magnéticos locais na amostra em estudo, em particular com campos de quaisquer momentos magnéticos tais como aqueles relacionados com camadas incompletas nos íons de elementos de transição e terras raras. O espalhamento pode ser elátstico e inelático, coerente e incoerente. O espalhamento elástico coerente (espalhamento de Bragg) é utilizado no estudo de arranjos de átomos e de spins nos sólidos, enquanto que o espalhamento inelático (com perda ou ganho de energia pelo neutron) é utilizado no estudo de movimentos atômicos (difusão, rotações, vibrações na rede cristalina) e de ondas de spin (magnons). O neutron é mais sensível ao movimento de àtomos leves como o hidrogênio e o carbono sendo, portanto uma ponta de prova ideal para o estudo da dinâmica de moléculas orgânicas (Herdade, 1994).

Espectroscopia de infravermelho (espectroscopia IV)

É um tipo de espectroscopia de absorção a qual usa a região do ingravermelho do espectro eletromagnético. Ela pode ser usada para identificar um composto ou investigar a composição de uma amostra. A espectroscopia IV baseia-se no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem freqüências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (níveis vibracionais). Tais freqüências dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e eventualmente do acoplamento vibrônico.

Estado de transição

Para se superar a energia de ativação de uma reação, passa-se pela formação de um estado intermediário chamado “estado de transição”, sempre um composto instável e de alta energia, representado por “Ts”, ligado com altíssima afinidade ao sítio catalítico.

Considerando uma reação de substituição, em que um grupo de saída **L**, ligado, inicialmente, a **R**, é substituído por um grupo que entra, **E**:

$$E + R\text{-}L = E\text{-}R + L$$

Essa substituição envolve um estado de transição, E... R... L, cuja formação e subseqüente decomposição pode ser representada por duas “reações parciais”, cada uma com uma variação característica em energia livre:

$$E+R\text{-}L=E...R...L \qquad \Delta G_F$$

$$E...R...L = E\text{-}R+L \quad \Delta G_D$$

com ΔG_F = variação em energia livre da formação do estado de transição

ΔG_D = variação em energia livre da decomposição do estado de transição

Estequiometria

É o cálculo das relações quantitativas dos reagentes e produtos em uma reação química equilibrada.

Equação de Arrhenius

Define a relação logarítmica entre a constante da velocidade e a temperatura:

$$\log (k_2/ k_1) = E_a/2{,}303R(1/T_1 – 1/T_2)$$

Interações

A proteína nativa é mantida por um somatório de interações fracas (pontesde hidrogênio, interações iônicas, interações hidrofóbicas).

Hinge-bending

É uma expressão que traduz um movimento molecular. Significa movimento flexível tipo dobradiça.

Marginalmente estáveis

A estabilidade das proteínas é controlada para manter suas funções. Em condições fisiológicas, o estado nativo corresponde à conformação termodinamicamente mais estável. O estado nativo é apenas ligeiramente mais estável que o estado desnaturado. Uma estabilidade maior tornaria a proteína pouco flexível.

Macroestado

É o estado termodinâmico de qualquer sistema que está exatamente caracterizado pelas medidas das propriedades do sistema e número de moles de cada constituinte. O conjunto (“*ensemble*”) desses micro-estados compõe o macro-estado da proteína.

Microestado

Refere-se a uma "foto estantânea" da localização e momento de cada molécula e átomo em todo macroestado. Na mecânica clássica, para um sistema constituído por um conjunto {q} de graus de liberdade, seus microestados podem completamente ser especificados através de pontos no espaço de fase definidos ao se conhecer as coordenadas generalizadas das posições, r1, r2 ...rN, e momentos, p1, p2...pN, das N partículas do sistema.

Movimento anarmônico

É um movimento periódico em que a lei de variação com o tempo não é uma função harmônica.

Nativo

Estado em que a proteína apresenta a função para a qual foi produzida (Fonseca et al., 2006).

Proteína quinase constitutiva

Quinase cuja síntase não depende da presença de um indutor ou substrato específico.

Psicrófilos

Organismos que vivem em baixas temperaturas.

Temperatura ambiente:

Em condições Normais de Temperatura e Pressão (NTP) a temperatura é de 25 $^{\circ}$C.

Temperatura fisiológica (basal)

Nos endotérmicos (regulação interna da temperatura) ou homeotérmicos (temperaturas pouco variadas), como o homem, verifica-se a temperatura fisiológica. O organismo tem a capacidade de regular a temperatura interna através de mensagens nervosas. Homeotérmicos – Animais que podem manter a temperatura do corpo constante, mesmo com a variação da temperatura ambiente. São as aves e os mamíferos.

Zeólitos

São um numeroso grupo de minerais que possuem uma estrutura porosa. Os zeólitos naturais formam-se em locais onde camadas de rochas vulcânicas e cinza vulcânica reagem com água alcalina; também ocorrem em ambientes pós-deposicionais em que cristalizaram ao longo de milhares ou mesmo milhões de anos em bacias marinhas pouco profundas.

APÊNDICES

Apêndice 1

Parâmetros do NADH - (Ryde, 1995)

```
NADH, AMBER 5.0 compatible; U. Ryde, Osmar NORBERTO DE SOUZA, 02/10/2001
NAH.res
NAH   INT     0
CORRECT  OMIT  DU  BEG
   0.00000
   1  DUMM  DU    M    0  -1  -2      .000      .000      .000    .00000
   2  DUMM  DU    M    1   0  -1     1.000      .000      .000    .00000
   3  DUMM  DU    M    2   1   0     1.000    90.000      .000    .00000
   4  C6N   CA    M    3   2   1     1.000    80.257   304.544   -.35520
   5  H6N   H4    E    4   3   2     1.086    86.845   113.956    .22190
   6  C5N   CA    M    4   3   2     1.403    39.816   260.797   -.17300
   7  H5N   HA    E    6   4   3     1.080   118.831   322.829    .12570
   8  C4N   CT    M    6   4   3     1.395   120.143   142.477    .13480
   9  H41   HC    E    8   6   4     1.093   106.309   122.831    .01960
  10  H42   HC    E    8   6   4     1.093   107.814   239.002    .01960
  11  C3N   CA    M    8   6   4     1.407   120.163     2.543   -.22270
  12  C7N   C     B   11   8   6     1.505   119.504   173.166    .82850
  13  O7N   O     E   12  11   8     1.233   117.812    21.930   -.60990
  14  N7N   N     B   12  11   8     1.352   117.707   203.001   -.99350
  15  H71   H     E   14  12  11     1.004   120.682   179.872    .40470
  16  H72   H     E   14  12  11     1.009   120.477     1.302    .40470
  17  C2N   CA    M   11   8   6     1.382   119.053   355.721   -.18400
  18  H2N   H4    E   17  11   8     1.084   118.597   179.611    .14220
  19  N1N   N*    M   17  11   8     1.387   120.593     1.805    .22930
  20  C1D   CT    M   19  17  11     1.488   116.524   174.865   -.03840
  21  H1D   H2    E   20  19  17     1.094   110.618    20.227    .16170
  22  C2D   CT    M   20  19  17     1.508   117.258   142.452    .06700
  23  H2D   H1    E   22  20  19     1.088   113.807    46.086    .09720
  24  O2D   OH    S   22  20  19     1.436   111.340   277.899   -.61390
  25  HO2D  HO    E   24  22  20      .959   106.795    89.056    .41860
  26  C3D   CT    M   22  20  19     1.520    99.733   162.298    .20220
  27  H3D   H1    E   26  22  20     1.091   114.651   198.096    .06150
  28  O3D   OH    S   26  22  20     1.423   109.790    79.530   -.65410
  29  HO3D  HO    E   28  26  22      .960   105.431    40.651    .43760
  30  C4D   CT    M   26  22  20     1.521   103.900   322.360    .10650
  31  H4D   H1    E   30  26  22     1.090   111.514   142.236    .11740
  32  O4D   OS    E   30  26  22     1.435   104.712    23.472   -.35480
  33  C5D   CT    M   30  26  22     1.521   114.250   264.249    .05580
  34  H5D1  H1    E   33  30  26     1.029   113.342   288.300    .06790
  35  H5D2  H1    E   33  30  26     1.092   118.256   168.168    .06790
  36  O5D   OS    M   33  30  26     1.440   108.747    48.875   -.56610
  37  PN    P     M   36  33  30     1.620   117.474   190.938   1.37290
  38  O1N   O2    E   37  36  33     1.473   105.958   176.012   -.85580
  39  O2N   O2    E   37  36  33     1.481   109.032   308.271   -.85580
  40  O3    OS    M   37  36  33     1.574   100.139    62.417   -.57600
  41  PA    P     M   40  37  36     1.611   136.620   195.390   1.37290
  42  O1A   O2    E   41  40  37     1.485   106.319   337.227   -.85580
  43  O2A   O2    E   41  40  37     1.477   109.295   207.094   -.85580
  44  O5B   OS    M   41  40  37     1.580   103.587    92.769   -.56610
  45  C5B   CT    M   44  41  40     1.420   121.317    75.897    .05580
  46  H5B1  H1    E   45  44  41     1.024   108.046   267.459    .06790
  47  H5B2  H1    E   45  44  41     1.093   115.908    35.989    .06790
  48  C4B   CT    M   45  44  41     1.503   100.744   154.082    .10650
  49  H4B   H1    E   48  45  44     1.104   106.529    59.863    .11740
  50  O4B   OS    E   48  45  44     1.414   106.546   175.953   -.35480
  51  C3B   CT    M   48  45  44     1.523   112.631   292.482    .20220
  52  H3B   H1    E   51  48  45     1.092   111.048   -18.541    .06150
  53  O3B   OH    S   51  48  45     1.434   110.551   135.535   -.65410
```

```
  54   HOB3   HO     E    53   51   48       .962    106.326    273.873     .43760
  55   C2B    CT     M    51   48   45      1.511    103.289    252.113     .06700
  56   H2B    H1     E    55   51   48      1.091    107.136     88.678     .09720
  57   O2B    OH     S    55   51   48      1.429    112.235    212.910    -.61390
  58   HOB2   HO     E    57   55   51       .961    108.105     20.361     .41860
  59   C1B    CT     M    55   51   48      1.500    102.172    330.379     .03940
  60   H1B    H2     E    59   55   51      1.096    110.904    284.037     .20070
  61   N9A    N*     M    59   55   51      1.481    115.254    161.267    -.02510
  62   C8A    CK     M    61   59   55      1.339    126.756    321.228     .20060
  63   H8A    H5     E    62   61   59      1.081    125.157    359.651     .15530
  64   N7A    NB     M    62   61   59      1.344    111.176    179.494    -.60730
  65   C5A    CB     M    64   62   61      1.335    102.981       .509     .05150
  66   C6A    CA     M    65   64   62      1.375    123.335    180.071     .70090
  67   N6A    N2     B    66   65   64      1.334    120.288    352.032    -.90190
  68   H61    H      E    67   66   65      1.001    123.250    184.224     .41150
  69   H62    H      E    67   66   65      1.004    122.140      3.982     .41150
  70   N1A    NC     M    66   65   64      1.334    115.111    179.506    -.76150
  71   C2A    CQ     M    70   66   65      1.345    122.289    359.037     .58750
  72   H2A    H5     E    71   70   66      1.079    119.198    180.231     .04730
  73   N3A    NC     M    71   70   66      1.345    121.528      1.544    -.69970
  74   C4A    CB     M    73   71   70      1.341    119.342    358.936     .30530

CHARGE NADH
 -0.3552  0.2219 -0.1730  0.1257  0.1348
  0.0196  0.0196 -0.2227  0.8285 -0.6099
 -0.9935  0.4047  0.4047 -0.1840  0.1422
  0.2293 -0.0384  0.1617  0.0670  0.0972
 -0.6139  0.4186  0.2022  0.0615 -0.6541
  0.4376  0.1065  0.1174 -0.3548  0.0558
  0.0679  0.0679 -0.5661  1.3729 -0.8558
 -0.8558 -0.5760  1.3729 -0.8558 -0.8558
 -0.5661  0.0558  0.0679  0.0679  0.1065
  0.1174 -0.3548  0.2022  0.0615 -0.6541
  0.4376  0.0670  0.0972 -0.6139  0.4186
  0.0394  0.2007 -0.0251  0.2006  0.1553
 -0.6073  0.0515  0.7009 -0.9019  0.4115
  0.4115 -0.7615  0.5875  0.0473 -0.6997
  0.3053

IMPROPER
 C6N  C2N  N1N  C1B
 N1N  C3N  C2N  H2N
 C2N  C4N  C3N  C7N
 C4N  C6N  C5N  H5N
 C5N  N1N  C6N  H6N
 C3N  N7N  C7N  O7N
 C7N  H71  N7N  H72
 C8A  C4A  N9A  C1D
 C6A  H61  N6A  H62
 N7A  N9A  C8A  H8A
 N1A  N3A  C2A  H2A
 C5A  N1A  C6A  N6A

LOOP
 N1N  C6N
 C1B  O4B
 O4D  C1D
 C4A  C5A
 C4A  N9A

DONE
```

Parâmetros do campo de força do NADH:

```
Special force constants for NAD+, NADH, NADP+, and NADPH; Ulf Ryde, 24
April, 1998
BOND
CA-N*   448.00        1.344 NAD: N1-C2 and N1-C6

ANGL
CA-C -O       80.00      119.80  NAD, Vanhommerig, BBA 1295(96)125
CA-C -N       70.00      115.70  NAD, Vanhommerig, BBA 1295(96)125
C -CA-CT      63.00      120.00  NAD
CA-CA-N*      70.00      119.50  NAD, Vanhommerig, BBA 1295(96)125
CT-CA-HA      35.00      120.00  NAD
H4-CA-N*      35.00      114.00  NAD
CA-CT-CA      63.00      120.00  NAD
CA-N*-CA      70.00      121.20  NAD, Vanhommerig, BBA 1295(96)125
CA-N*-CT      70.00      120.60  NAD, Vanhommerig, BBA 1295(96)125

DIHE
X -CA-N*-X   4             7.40         180.0            2.    NAD; =X-CM-
N*-X
CA-CA-C -O   1             0.02         180.0            1.    NAD,
Vanhommerig, BBA 1295(96)125
CA-CA-C -O   1             0.45         180.0            2.    NAD,
Vanhommerig, BBA 1295(96)125
CA-CA-C -N   1             0.02         180.0            1.    NAD,
Vanhommerig, BBA 1295(96)125
CA-CA-C -N   1             0.45         180.0            2.    NAD,
Vanhommerig, BBA 1295(96)125

IMPR
CA-CA-N*-CT               1.0          180.             2.    NAD
CA-CA-CA-C                1.1          180.             2.    NAD
CA-CT-CA-C                1.1          180.             2.    NAD
CT-CA-CA-C                1.1          180.             2.    NAD

END
```

Apêndice 2

Arquivos de entrada para as simulações da dinâmica molecular:

mini_00.in

```
#Minimização do 1ENY_NADH_cWAT(276-316) + CIO. NTR=1 Restraint=25.0
 &cntrl
    imin=1, nmropt=0, ntx=1, irest=0, ntrx=1, ntxo=1, ntpr=50,
    ntwr=50, iwrap=0, ntwx=50, ntwv=0, ntwe=0, ioutfm=0, ntwprt=0,
     idecomp=0,
    ibelly=0, ntr=1, restraint_wt=25.0, restraintmask=':1-316',
    maxcyc=200, ncyc=100, ntmin=1, dx0=0.01, drms=1.0E-4,
    ntc=1, tol=0.00001, jfastw=0,ivcap=0,
    ntf=1, ntb=2, ntp=1, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25,
ipol=0, ifqnt=0,
    igb=0, ievb=0, iamoeba=0,
 &ewald
    verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1,
netfrc=0,
```

mdcp_00.in

```
#Equilibrando a Densidade da Caixa D'água por 20ps (apenas H2O AMBER)
 &cntrl
    imin=0, ntx=1, irest=0, ntrx=1,
    ntxo=1, ntpr=250, ntwr=250, iwrap=0, ntwx=250, ntwv=0, ntwe=0,
    ioutfm=0, ntwprt=0, idecomp=0,
    ibelly=1, ntr=0, bellymask=':317-10807', restraint_wt=100.0,
restraintmask=':2-823',
    nstlim=10000, nscm=1000, t=0.0, dt=0.002, nrespa=1,
    isgld=0, tsgavg=0.2, tempsg=1.0, sgft=0.0, isgsta=1, isgend=1,
    ntt=1,temp0=298.16, tempi=10.0, ig=71277, tautp=1.0, gamma_ln=0,
vrand=0, vlimit=20.0,
    ntp=1, pres0=1.0, comp=44.6, taup=2.0,
    ntc=2, tol=0.00001,jfastw=0,
    ivcap=0,
    ntf=2, ntb=2, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25, ipol=0,
ifqnt=0,
    igb=0, ievb=0, iamoeba=0,
 &ewald
    verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1,
netfrc=0,
```

mini_01.in

```
#Minimização do 1ENY_NADH_cWAT(276-316) + CIO. NTR=1 Restraint=1.0
 &cntrl
    imin=1, nmropt=0, ntx=1, irest=0, ntrx=1,
    ntxo=1, ntpr=50,
    ntwr=50, iwrap=0, ntwx=50, ntwv=0, ntwe=0,
    ioutfm=0, ntwprt=0, idecomp=0,
    ibelly=0, ntr=1, restraint_wt=1.0, restraintmask=':1-316',
    maxcyc=200, ncyc=100, ntmin=1, dx0=0.01, drms=1.0E-4,
    ntc=1, tol=0.00001, jfastw=0, ivcap=0,
    ntf=1, ntb=2, ntp=1, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25,
ipol=0, ifqnt=0, igb=0, ievb=0, iamoeba=0,
 /
 &ewald
    verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1,
netfrc=0,
```

mini_02.in

```
#Minimização do 1ENY_NADH_cWAT(276-316) + CIO. NTR=1 Restraint=10.0
 &cntrl
    imin=1, nmropt=0, ntx=1, irest=0, ntrx=1,
    ntxo=1, ntpr=50,
    ntwr=50, iwrap=0, ntwx=50, ntwv=0, ntwe=0,
    ioutfm=0, ntwprt=0, idecomp=0,
    ibelly=0, ntr=1, restraint_wt=10.0, restraintmask=':1-316',
    maxcyc=200, ncyc=100, ntmin=1, dx0=0.01, drms=1.0E-4,
    ntc=1, tol=0.00001, jfastw=0,
    ivcap=0,
    ntf=1, ntb=2, ntp=1, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25,
ipol=0, ifqnt=0,
    igb=0, ievb=0, iamoeba=0,
 /
 &ewald
    verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1,
netfrc=0,
 /
```

mini_03.in

```
#Minimização do 1ENY_NADH_cWAT(276-316) + CIO. NTR=1 Restraint=5.0
 &cntrl
    imin=1, nmropt=0, ntx=1, irest=0, ntrx=1,
    ntxo=1, ntpr=50,
    ntwr=50, iwrap=0, ntwx=50, ntwv=0, ntwe=0,
    ioutfm=0, ntwprt=0, idecomp=0,
    ibelly=0, ntr=1, restraint_wt=5.0, restraintmask=':1-316',
    maxcyc=200, ncyc=100, ntmin=1, dx0=0.01, drms=1.0E-4,
    ntc=1, tol=0.00001, jfastw=0,
    ivcap=0,
    ntf=1, ntb=2, ntp=1, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25,
ipol=0, ifqnt=0,
    igb=0, ievb=0, iamoeba=0,
 /
 &ewald
    verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1,
netfrc=0,
 /
```

mini_04.in

```
#Minimização do 1ENY_NADH_cWAT(276-316) + CIO. NTR=1 Restraint=1.0
 &cntrl
    imin=1, nmropt=0, ntx=1, irest=0, ntrx=1,
    ntxo=1, ntpr=50,
    ntwr=50, iwrap=0, ntwx=50, ntwv=0, ntwe=0,
    ioutfm=0, ntwprt=0, idecomp=0,
    ibelly=0, ntr=1, restraint_wt=1.0, restraintmask=':1-316',
    maxcyc=200, ncyc=100, ntmin=1, dx0=0.01, drms=1.0E-4,
    ntc=1, tol=0.00001, jfastw=0,
    ivcap=0,
    ntf=1, ntb=2, ntp=1, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25,
ipol=0, ifqnt=0,
    igb=0, ievb=0, iamoeba=0,
 /
 &ewald
    verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1,
netfrc=0,
 /
```

mini_05.in

```
#Minimização do 1ENY_NADH_cWAT(276-316) + CIO. NTR=0, Without Restraint
 &cntrl
    imin=1, nmropt=0, ntx=1, irest=0, ntrx=1,
    ntxo=1, ntpr=50,
    ntwr=50, iwrap=0, ntwx=50, ntwv=0, ntwe=0,
    ioutfm=0, ntwprt=0, idecomp=0,
    ibelly=0, ntr=0, restraint_wt=1.0 restraintmask=':1-316',
    maxcyc=200, ncyc=100, ntmin=1, dx0=0.01, drms=1.0E-4,
    ntc=1, tol=0.00001, jfastw=0, ivcap=0,
    ntf=1, ntb=2, ntp=1, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25,
ipol=0, ifqnt=0, igb=0, ievb=0, iamoeba=0,
 /
 &ewald
    verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1,
netfrc=0,
 /
```

mdcp_01.in

```
#Molecular Dynamics Warm-Up 10K-50K
 &cntrl
    imin=0, ntx=1, irest=0, ntrx=1, ntxo=1, ntpr=250,
    ntwr=250, iwrap=0, ntwx=250, ntwv=0, ntwe=0,
    ioutfm=0, ntwprt=0, idecomp=0,
    ibelly=0, ntr=0, bellymask=':1-1', restraint_wt=100.0,
restraintmask=':2-823',
    nstlim=10000, nscm=1000, t=0.0, dt=0.002, nrespa=1,
    isgld=0, tsgavg=0.2, tempsg=1.0, sgft=0.0, isgsta=1, isgend=1,
    ntt=1,temp0=50.0, tempi=10.0, ig=71277, tautp=1.0, gamma_ln=0, vrand=0,
vlimit=20.0,
    ntp=1, pres0=1.0, comp=44.6, taup=2.0,
    ntc=2, tol=0.00001,jfastw=0, ivcap=0,
    ntf=2, ntb=2, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25, ipol=0,
ifqnt=0,
    igb=0, ievb=0, iamoeba=0,
 &ewald
    verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1,
netfrc=0,
 /
```

mdcp_02.in

```
#Molecular Dynamics Warm-Up 50K-100K  em 20ps.
 &cntrl
    imin=0, ntx=1, irest=0, ntrx=1, ntxo=1, ntpr=250,
    ntwr=250, iwrap=0, ntwx=250, ntwv=0, ntwe=0, ioutfm=0, ntwprt=0,
idecomp=0,
    ibelly=0, ntr=0, bellymask=':1-1', restraint_wt=100.0,
restraintmask=':2-823',
    nstlim=10000, nscm=1000, t=0.0, dt=0.002, nrespa=1,
    isgld=0, tsgavg=0.2, tempsg=1.0, sgft=0.0, isgsta=1, isgend=1,
    ntt=1,temp0=100.0, tempi=50.0, ig=71277, tautp=1.0, gamma_ln=0,
vrand=0, vlimit=20.0,
    ntp=1, pres0=1.0, comp=44.6, taup=2.0,
    ntc=2, tol=0.00001,jfastw=0, ivcap=0,
    ntf=2, ntb=2, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25, ipol=0,
ifqnt=0,
    igb=0, ievb=0, iamoeba=0,
 &ewald
    verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1,
netfrc=0,
```

mdcp_03.in

```
##Molecular Dynamics Warm-Up 100K-150K  em 20ps.
 &cntrl
    imin=0, ntx=1, irest=0, ntrx=1,
    ntxo=1, ntpr=250,
    ntwr=250, iwrap=0, ntwx=250, ntwv=0, ntwe=0,
    ioutfm=0, ntwprt=0, idecomp=0,
    ibelly=0, ntr=0, bellymask=':1-1', restraint_wt=100.0,
restraintmask=':2-823',
    nstlim=10000, nscm=1000, t=0.0, dt=0.002, nrespa=1,
    isgld=0, tsgavg=0.2, tempsg=1.0, sgft=0.0, isgsta=1, isgend=1,
    ntt=1,temp0=150.0, tempi=100.0, ig=71277, tautp=1.0, gamma_ln=0,
vrand=0, vlimit=20.0,
    ntp=1, pres0=1.0, comp=44.6, taup=2.0,
    ntc=2, tol=0.00001,jfastw=0,
    ivcap=0,
    ntf=2, ntb=2, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25, ipol=0,
ifqnt=0,
    igb=0, ievb=0, iamoeba=0,
 /
 &ewald
    verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1,
netfrc=0,
 /
```

mdcp_04.in

```
##Molecular Dynamics Warm-Up 150K-200K  em 20ps.
 &cntrl
    imin=0, ntx=1, irest=0, ntrx=1,
    ntxo=1, ntpr=250,
    ntwr=250, iwrap=0, ntwx=250, ntwv=0, ntwe=0,
    ioutfm=0, ntwprt=0, idecomp=0,
    ibelly=0, ntr=0, bellymask=':1-1', restraint_wt=100.0,
restraintmask=':2-823',
    nstlim=10000, nscm=1000, t=0.0, dt=0.002, nrespa=1,
    isgld=0, tsgavg=0.2, tempsg=1.0, sgft=0.0, isgsta=1, isgend=1,
    ntt=1,temp0=200.0, tempi=150.0, ig=71277, tautp=1.0, gamma_ln=0,
vrand=0, vlimit=20.0,
    ntp=1, pres0=1.0, comp=44.6, taup=2.0,
    ntc=2, tol=0.00001,jfastw=0,
    ivcap=0,
    ntf=2, ntb=2, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25, ipol=0,
ifqnt=0,
    igb=0, ievb=0, iamoeba=0,
 /
 &ewald
    verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1,
netfrc=0,
 /
```

mdcp_05.in

```
##Molecular Dynamics Warm-Up 200K-250K  em 20ps.
 &cntrl
    imin=0, ntx=1, irest=0, ntrx=1,
    ntxo=1, ntpr=250,
    ntwr=250, iwrap=0, ntwx=250, ntwv=0, ntwe=0,
    ioutfm=0, ntwprt=0, idecomp=0,
    ibelly=0, ntr=0, bellymask=':1-1', restraint_wt=100.0,
restraintmask=':2-823',
    nstlim=10000, nscm=1000, t=0.0, dt=0.002, nrespa=1,
    isgld=0, tsgavg=0.2, tempsg=1.0, sgft=0.0, isgsta=1, isgend=1,
    ntt=1,temp0=250.0, tempi=200.0, ig=71277, tautp=1.0, gamma_ln=0,
vrand=0, vlimit=20.0,
    ntp=1, pres0=1.0, comp=44.6, taup=2.0,
    ntc=2, tol=0.00001,jfastw=0,
    ivcap=0,
    ntf=2, ntb=2, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25, ipol=0,
ifqnt=0,
    igb=0, ievb=0, iamoeba=0,
 /
 &ewald
    verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1,
netfrc=0,
 /
```

mdcp_06.in

```
#Molecular Dynamics Warm-Up 250K-298.16K  em 20ps.
 &cntrl
    imin=0, ntx=1, irest=0, ntrx=1,
    ntxo=1, ntpr=250,
    ntwr=250, iwrap=0, ntwx=250, ntwv=0, ntwe=0,
    ioutfm=0, ntwprt=0, idecomp=0,
    ibelly=0, ntr=0, bellymask=':1-1', restraint_wt=100.0,
restraintmask=':2-823',
    nstlim=10000, nscm=1000, t=0.0, dt=0.002, nrespa=1,
    isgld=0, tsgavg=0.2, tempsg=1.0, sgft=0.0, isgsta=1, isgend=1,
    ntt=1,temp0=298.16, tempi=250.0, ig=71277, tautp=1.0, gamma_ln=0,
vrand=0, vlimit=20.0,
    ntp=1, pres0=1.0, comp=44.6, taup=2.0,
    ntc=2, tol=0.00001,jfastw=0,
    ivcap=0,
    ntf=2, ntb=2, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25, ipol=0,
ifqnt=0,
    igb=0, ievb=0, iamoeba=0,
 /
 &ewald
    verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1,
netfrc=0,
 /
```

mdcp_07.in

```
##Molecular Dynamics at 298.16K from 120-200ps. Restart!!!! Atenção.
 &cntrl
    imin=0, ntx=5, irest=1, ntrx=1,
    ntxo=1, ntpr=250,
    ntwr=250, iwrap=0, ntwx=250, ntwv=0, ntwe=0,
    ioutfm=0, ntwprt=0, idecomp=0,
    ibelly=0, ntr=0, bellymask=':1-1', restraint_wt=100.0,
restraintmask=':2-823',
    nstlim=40000, nscm=1000, t=0.0, dt=0.002, nrespa=1,
    isgld=0, tsgavg=0.2, tempsg=1.0, sgft=0.0, isgsta=1, isgend=1,
    ntt=1,temp0=298.16, tempi=298.16, ig=71277, tautp=1.0, gamma_ln=0,
vrand=0, vlimit=20.0,
    ntp=1, pres0=1.0, comp=44.6, taup=2.0,
    ntc=2, tol=0.00001,jfastw=0,
    ivcap=0,
    ntf=2, ntb=2, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25, ipol=0,
ifqnt=0,
    igb=0, ievb=0, iamoeba=0,
 /
 &ewald
    verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1,
netfrc=0,
 /
```

mdcp_prod.in

```
#Molecular Dynamics at 298.16K.
 &cntrl
    imin=0, ntx=5, irest=1, ntrx=1,
    ntxo=1, ntpr=250,
    ntwr=250, iwrap=0, ntwx=250, ntwv=0, ntwe=0,
    ioutfm=0, ntwprt=0, idecomp=0,
    ibelly=0, ntr=0, bellymask=':1-1', restraint_wt=100.0,
restraintmask=':2-823',
    nstlim=50000, nscm=1000, t=0.0, dt=0.002, nrespa=1,
    isgld=0, tsgavg=0.2, tempsg=1.0, sgft=0.0, isgsta=1, isgend=1,
    ntt=1,temp0=298.16, tempi=298.16, ig=71277, tautp=1.0, gamma_ln=0,
vrand=0, vlimit=20.0,
    ntp=1, pres0=1.0, comp=44.6, taup=2.0,
    ntc=2, tol=0.00001,jfastw=0,
    ivcap=0,
    ntf=2, ntb=2, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25, ipol=0,
ifqnt=0,
    igb=0, ievb=0, iamoeba=0,
 /
 &ewald
    verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1,
netfrc=0,
 /
```

Apêndice 3

Sistemas das simulações da enzima InhA de *Mycobacterium tuberculosis*:

cWAT InhA_NADH e suas 41 moléculas de águas cristalográficas, a 25 ^{o}C e 37 ^{o}C

- Coordenadas iniciais: 1ENY.pdb
- Tempo total de simulação: 20 ns

cWAT InhA_NADH	RESÍDUOS	ÁTOMOS
InhA	1 - 268	1 – 4.008
NADH	269	4.009 – 4.079
6 Na+	270 - 275	4.080 – 4.085
Águas cristalinas	276 – 316	4.086 – 4.208
TIP3P (10.491 moléculas)	317 – 10.807	4.209 – 35.681
Total	10.807 resíduos	35.681 átomos

Apêndice 4

Número de interações de hidrogênio (H) entre o NADH e a InhA

Snapshot da trajetória (ps)	Número de interações de H a 25 ^{o}C	Número de interações de H a 37 ^{o}C
15000	9	7
15250	6	10
15500	9	6
15750	7	10
16000	8	8
16250	6	8
16500	5	8
16750	5	9
17000	5	9
17250	7	9
17500	6	8
17750	6	7
18000	6	9
18250	8	7
18500	8	9
18750	7	7
19000	6	9
19250	7	7
19500	8	6
19750	7	6
20000	8	6
Número médio	7	8

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