

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

Helen Nathalia Thompson

Mudanças Estruturais na Proteína Prion Celular Induzidas por pH Baixo

Porto Alegre, 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

Helen Nathalia Thompson

Mudanças Estruturais na Proteína Príon Celular Induzidas por pH Baixo

**Trabalho de conclusão de curso apresentado junto à
atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de Curso –
QUI” do
Curso de Química, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Bacharel em Química**

**Prof. Dr. Hubert Stassen
Orientador**

Porto Alegre, 2009

Agradecimentos

- * Ao meu orientador, professor Hubert Stassen, pelo apoio, confiança e por ter participado ativamente da confecção do presente trabalho.

- * Ao meu pai, por me servir de inspiração e por sempre ter incentivado meus estudos .

- * A minha mãe, eterno porto seguro.

- * Aos meus irmãos, familiares e amigos pela lealdade e suporte nos momentos difíceis.

Resumo

Príons são proteínas patológicas responsáveis por um grupo de doenças neurodegenerativas invariavelmente fatais. A falta de dados estruturais de alta resolução da proteína alterada (PrP-res) levou a produção de um modelo *in silico*, proposto por DeMarco e Daggett⁸, denominado modelo espiral. A unidade básica, a proteína alterada, utilizada neste modelo foi produzida por Alonso et. al⁹. via metodologia dinâmica molecular, tendo como ponto de partida fragmentos de PrP-sen (resíduos 109-219) protonado (baixo pH, devido a protonação dos resíduos His, Glu e Asp) e não-protonado (mantendo neutro o pH dos resíduos His).

O presente trabalho apresenta um estudo da influência da utilização do campo de forças GROMACS na reprodução dos experimentos realizados por Alonso et. al⁹. Assim como, um estudo da influência do prolongamento da cadeia polipeptídica do fragmento submetido à simulação em baixo pH. De posse dos fragmentos protonados (resíduos 90-231 e 109-219) e não-protonado (109-219), foram realizadas dinâmicas moleculares de 20ns. As análises dos resultados, feitas empregando programas do pacote GROMACS, foram: RMSD Ca, RMSF Ca. superfície acessível ao solvente, raio de giro, ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, análises de estrutura secundária e mapas de contato de resíduos de aminoácidos.

Os resultados apontaram significativas diferenças estruturais entre os fragmentos simulados, neste trabalho, e os apresentados no artigo de Alonso et. al⁹. Diferente do artigo, o fragmento não-protonado produziu maior conteúdo β -sheet que o protonado. Essas diferenças estruturais parecem ser produzidas pela utilização de campos de forças diferentes.

O prolongamento da cadeia polipeptídica também induziu a formação de estruturas diferenciadas para os fragmentos protonados. Essas diferenças estruturais parecem estar relacionadas com o prolongamento da cadeia N-terminal e o consequente aumento de mobilidade desta. É necessário, com isso, estudar esse fragmento prolongado sob a ação de

um terceiro campo de forças para verificar se o padrão de comportamento estrutural será reprodutível.

Para verificar a viabilidade, tanto das estruturas propostas neste trabalho como da proposta por Alonso et. al⁹, faz-se necessário o uso de um terceiro campo de forças, a exemplo do AMBER. Com isto, será possível avaliar com maior confiabilidade os resultados deste trabalho em comparação com os resultados obtidos no artigo de Alonso et. al. Dessa forma, será possível esclarecer se os resultados são realmente confiáveis ou se não passam de artificialismos computacionais.

Palavras-chave: Conversão Estrutural; Modelo Espiral; Dinâmica Molecular; ENCAD; GROMACS; Acidez.

Lista de Siglas

1B10 - código PDB para a proteína príon celular do Hamster Sírio

BSE - Bovine Spongiform Encephalopathy

CJD - Doença de Creutzfeldt-Jakob

DM - Dinâmica Molecular

FFI - Familiar Fatal Insomnia

GSS - Doença de Gerstmann-Straussler-Scheinker

LH - Ligação de Hidrogênio

NP - Não-protonado

P - Protonado

PDB - Protein Data Bank

PME - Particle Mesh Ewald

PRION - Proteinaceous Infectious Only particle

PrP - Proteína Príon celular

PrP-res - Proteína Príon resistente à proteases

PrP-sen - Proteína Príon Celular sensível à proteases

RG - Raio de Giro

RMSD - Root Mean Square Deviation

RMSF - Root Mean Square Fluctuation

SAS - Superfície Acessível ao Solvente

TSE - Transmissible Spongiform Encephalopathy

vCJD - Nova Variante da Doença de Creutzfeldt-Jakob

SUMÁRIO

1. Introdução.....	8
1.1 A História dos Príon.....	8
1.3 Príons: Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis	4
1.4 Hipótese de Indução Conformacional.....	6
1.5 Modelagem Computacional.....	7
2. Objetivos	9
3. Materiais, Métodos e Fundamentação Teórica	10
3.1 Bancos de dados.....	10
3.2 Dinâmica Molecular.....	10
3.3 Campos de Força.....	11
3.4 Análises.....	12
3.5 Análise Estrutural de Proteínas.....	14
3.6 Protocolo de Simulação	16
4. Resultados	19
5. Discussão	30
6. Conclusões.....	36
Referências Bibliográficas	38

1. Introdução

1.1 A História dos Príon

Apesar de existirem relatos das doenças priônicas datados do Império Romano, a primeira descrição dessas doenças remonta do século XVIII¹, na Europa. Mais especificamente, foi descrita pela primeira vez em 1755, na Grã-Bretanha, em um relatório publicado no Diário das Câmaras. Essa doença, então denominada de doença das tremuras, afetava pequenos ruminantes, principalmente os ovinos e, mais raramente, os caprinos. A baixa ocorrência dessa doença tornava-a alvo de importância econômica e sanitária secundária, tendo sido, por isso, praticamente esquecida por quase 200 anos².

Discussões sobre o assunto ressurgiram em 1936, quando dois investigadores da escola veterinária de Toulouse, J. Cuillé e P-L. Chelle, demonstraram que a doença das tremuras era transmissível entre carneiros e que era veiculada por um agente infeccioso não convencional. Esses mesmos pesquisadores mostraram que era impossível detectar a partícula patogênica antes do surgimento dos primeiros sinais clínicos e que a evolução da doença era acompanhada por longos períodos de incubação, que podiam chegar a anos. Com isso, surgiu pela primeira vez a noção de “vírus lento”. Com a eclosão da Segunda Guerra Mundial e a morte prematura de Chelle os avanços nessas pesquisas foram barrados e caíram no esquecimento².

Em 1950, o veterinário Bjorn Sigurdsson, de Reiquejavique, retomou o trabalho dos investigadores franceses. Analisando amostras de cérebro de carneiros infectados, Bjorn constatou longos tempos de incubação, resistência a tratamentos físico-químicos e, inclusive, tamanhos de partículas infecciosas incomuns aos vírus clássicos. Com base nessas análises classificou esta patologia de doença viral de “vírus lento”. Anos mais tarde, o veterinário americano William Hadlow, espantou-se com as semelhanças clínicas e anatomopatológicas entre essa doença ovina e uma patologia humana conhecida como Kuru².

Kuru, que significa arrepio, é a denominação dada a uma desordem neurológica que atingiu aldeias indígenas da Tribo dos montes Fore, na Papua-Nova Guiné. Esta doença atingia cerca de 10 % da população das aldeias e caracterizava-se por movimentos oculares anormais, tremores e demência. No estágio terminal da doença, o indivíduo ficava deficiente, sendo incapaz de gesticular ou engolir. Em 1955, o Dr. Vincent Zigas impressionado pela alta incidência destas perturbações neurológicas afetando aldeias indígenas, alertou as autoridades australianas. Em 1957, acompanhado pelo microbiólogo e pediatra americano Carleton Gajdusek, Zigas estudou os casos clínicos de centenas de mulheres e crianças afetadas pela estranha doença, nas tribos da Nova Guiné².

Através de seus estudos, Zigas e Gajdusek, constataram que a ocorrência da doença se devia à práticas de canibalismo adotadas pelas tribos. Em tais práticas, aos homens eram reservados os músculos, símbolo de força e virilidade, e às mulheres e crianças cabiam o cérebro e as vísceras. Os resultados desses estudos foram publicados por Zigas e Gajdusek, jogando luz às questões neuropatológicas e epidemiológicas desta doença. Assim que as práticas de canibalismo foram proibidas, a ocorrência de Kuru caiu exponencialmente. No entanto, a doença matou cerca de três mil indivíduos em uma população de, aproximadamente, trinta e cinco mil indígenas da Papua Nova-Guiné².

Os estudos de Gajdusek chamaram a atenção de Hadlow, que reconheceu características comuns entre a doença das tremuras e o Kuru. No entanto, foi o grupo de Gajdusek que deu provas quanto a semelhança das duas doenças. Gajdusek convencido da semelhança entre essas doenças, dedicou seu tempo a experimentos de inoculação de tecidos cerebrais de pacientes mortos por Kuru em cérebros de macacos. Após longos períodos de incubação, os macacos eram afetados pela encefalopatia espongiiforme proveniente de humanos. Estes resultados foram publicados em 1966 na revista Nature, conduzindo a comunidade científica da época a apoiar a descoberta da primeira doença humana causada por um vírus lento².

O grupo de Gajdusek deu, no ano de 1968, outra grande contribuição ao estudo das doenças neurodegenerativas ao, instigados pelas semelhanças entre o Kuru e a doença de Creutzfeldt-Jakob (conhecida desde 1921), inocular cérebros de macacos com a doença de Creutzfeldt-Jakob. Tais descobertas de transmissibilidade de doenças neurológicas, rendeu a Gajdusek o Prêmio Nobel de Medicina em 1976².

Neste momento, ainda não se tinha conhecimento da natureza do agente patogênico causador destas doenças. Partindo do pressuposto de se tratar de um agente viral, um grupo liderado por Thykave Alper no Hospital Hammersmith, em Londres, empregou metodologias físicas, mais especificamente a irradiação, para estimar o tamanho da partícula infecciosa. Os resultados apontaram para um agente patogênico de tamanho muito menor que o esperado para um vírus. Com o auxílio de um radiobiólogo francês, Raymond Latarjet, do Instituto Curie, Alper verificou que a amostra infecciosa era sensível à radiações de 280 nm, correspondente ao pico de absorção de proteínas².

A essa altura, o físico e matemático inglês J. S. Griffith já havia proposto, em 1967, um modelo teórico, apresentando a hipótese de uma única proteína ser a causadora destas doenças neurodegenerativas³. Mas foram estudos experimentais posteriores, realizados por um jovem entusiasta pesquisador, Stanley Prusiner, que, de fato, decifraram a natureza destas partículas infecciosas².

Stanley Prusiner, formado pela Faculdade de Medicina da Universidade da Pensilvânia, em 1968, começou a se interessar pelas doenças neurodegenerativas quando fazia residência em neurologia. Foi em 1972 que Prusiner teve seu primeiro contato com a CJD (Doença de Creutzfeldt-Jakob), acompanhando o caso de uma paciente sua que faleceu em menos de 2 meses após o início dos sintomas. Este contato impactante com os efeitos da doença inspirou Prusiner a iniciar uma empreitada para determinar a natureza das partículas responsáveis por essas devastadoras doenças⁴.

Inúmeros foram os pesquisadores que falharam na difícil tarefa de extrair o agente infeccioso a partir de cérebros de carneiros infectados. No entanto, Prusiner, resguardado pelo otimismo da juventude, realizou tal feito. Em 1981, Prusiner e seus colegas provaram que a infectividade de amostras de cérebros de hamsters, inoculados com a doença das tremuras, dependia de uma proteína hidrófoba. Provaram, também, que as propriedades de resistência do agente infeccioso correspondiam a de uma proteína e que o comportamento químico indicava que a amostra era desprovida de ácidos nucleicos². Neste contexto, foi concebido o conceito de PRION (**PR**oteínaceous **I**nfectious **ON**ly particle, do inglês), sugerido pelo grupo de Prusiner, ganhador do Prêmio Nobel de Medicina em 1997³.

Infelizmente, após estes consideráveis avanços, o interesse dado às doenças priônicas voltou a cair, ressurgindo fortemente somente em 1985, quando se teve notícia de uma nova

doença que afetava as manadas de bovinos britânicos. Um ano depois, veterinários britânicos identificaram a doença como encefalopatia espongiforme bovina, também conhecida como doença da vaca louca. Estimativas oficiais apontam que, até o ano 2000, cerca de 185 mil bovinos sucumbiram à doença, sendo que nas primeiras semanas morreram em torno de mil animais por semana².

Investigações epidemiológicas mostraram que a fonte de contaminação provinha de farinhas suplementares adicionadas na alimentação dos bovinos. Estas farinhas eram produzidas a partir de carcaças e restos de carnes, oriundas de matadouros, notadamente, de carneiros. Em 1988 o governo de Margareth Thatcher interditou o uso de farinhas animais. No entanto, os fabricantes das farinhas obtiveram um prazo de cinco semanas para escoar seus estoques. Nesse período, cerca de centenas de animais continuaram a ser infectados por dia².

Em 1995 um artigo científico foi publicado relatando a existência de uma forma atípica da doença de Creutzfeldt-Jakob, que afetava pessoas com menos de 30 anos. Um ano depois, foram publicados artigos sugerindo que príons bovinos poderiam ter sido transmitidos à espécie humana⁵. Estes e outros estudos repercutiram no quadro econômico europeu, fazendo com que no ano 2000, mais de 4 milhões de bovinos tenham sido sacrificados, o que representou um custo de 6,8 bilhões de euros ao Reino Unido, causando uma crise no setor “bovino” deste país².

1.3 Príons: Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis

Na década de 90, estudos revelaram que a mesma proteína encontrada em animais doentes também estava presente em animais sadios. A essa proteína (encontrada principalmente nos neurônios), natural no organismo de mamíferos, se deu o nome de “proteína prion celular”⁴. Mais tarde, foi mostrado que ambas, a proteína natural e a patológica, possuíam a mesma sequência de aminoácidos, diferindo somente em suas estruturas secundárias⁶.

Dessa forma, o termo “príons” é empregado para designar proteínas infecciosas que causam um grupo de doenças neurodegenerativas invariavelmente fatais⁴. Esse grupo de doenças, caracterizado por desencadear no cérebro um aspecto esponjoso, é classificado de Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (TSEs, da sigla em inglês)¹.

As doenças priônicas atingem animais e humanos. Nos animais as formas mais conhecidas são: o scrapie (ou doença das tremuras), que atinge ovelhas e cabras, e o BSE (do inglês, Encephalopathy Spongiform Bovine) ou doença da vaca louca. Menos conhecidas, outras formas dessas encefalopatias já foram verificadas em animais em cativeiro (grandes felinos, ruminantes e primatas), em cervos, em antílopes selvagens, em minks (da família dos mustalídeos) e até mesmo em gatos domésticos¹.

Nos seres humanos essas encefalopatias incluem o Kuru, a doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD, sigla em inglês) que atinge pessoas entre 50 e 60 anos, a nova variante da doença de Creutzfeldt-Jakob (vCJD, sigla em inglês) que atinge jovens de 30 anos, a doença de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS, sigla em inglês) e a insônia familiar fatal (FFI, sigla em inglês)⁵.

São conhecidas três formas de doenças priônicas em humanos: hereditária, esporádica (de origem desconhecida) e transmissível¹. A forma transmissível corresponde a 5 %, enquanto a hereditária é responsável por 15 % dos casos registrados de portadores dessas doenças³.

Além das práticas de canibalismo que propagaram a disseminação do Kuru em aldeias indígenas, outras fontes foram importantes na transmissibilidade das doenças priônicas na espécie humana. Entre elas merecem destaque as causadas por procedimentos médicos, tais como transplante de órgãos (em especial, dura-máter), o uso de derivados hormonais preparados a partir de material humano (destacando-se o tratamento de crianças com hormônio do crescimento) e material cirúrgico (em especial para cirurgias no cérebro)³.

Atualmente, o risco de transmissão via tratamento com hormônio do crescimento foi eliminado, uma vez que agora esse hormônio é produzido em bactérias. Da mesma forma, as metodologias de esterilização e reutilização de materiais cirúrgicos, empregados em biópsias de tecido cerebral contaminado por príons, foram aperfeiçoadas³. A poucos anos, visando evitar a propagação destas doenças, a Organização Mundial da Saúde divulgou normas rígidas nesse sentido. Estas normas também encontram-se disponíveis na página do Ministério da Saúde brasileiro⁷.

As doenças por príons hereditárias são causadas por mutações no gene Prnp. Este gene, localizado no cromossomo 20, é o responsável pela produção da proteína príon celular

presente no organismo humano. Mutações neste gene desencadeiam a produção de uma proteína defeituosa (o príon). Além disso, como a alteração está impressa no DNA, terá 50 % de chances de ser transmitida aos descendentes do portador da mutação. As formas hereditárias humanas mais conhecidas das doenças priônicas são: GSS e CJD⁴.

1.4 Hipótese de Indução Conformacional

Inicialmente, foi possível distinguir as duas isoformas da proteína PrP através de dois critérios: a solubilidade em detergentes e a resistência às proteases. Assim, a proteína príon celular, sensível às proteases e solúvel em detergentes, foi designada PrP-sen (-sen de sensível) . Já a proteína patológica (príon), insolúvel em detergentes e com alta resistência às proteases, foi denominada PrP-res (-res de resistente)⁶.

Mais tarde, a utilização de técnicas espectroscópicas permitiram investigar questões estruturais das proteínas normal e alterada. Estruturas de alta resolução foram obtidas via RMN para fragmentos de PrP-sen (resíduos 121-231) de hamsters, ratos, bois e humanos⁸. Os resultados apontaram para uma conservação de estrutura secundária (representada basicamente por 3 α -hélices e 2 fitas β) nas diferentes espécies de mamíferos analisadas⁶. O que era esperado considerando que essas sequências exibem homologia superior à 90 %⁹. Estudos subsequentes empregando RMN indicaram ampla desordem na região N-terminal (resíduos 23-120)⁴.

No que diz respeito a estrutura de PrP-res, esta é desconhecida, uma vez que ainda não foi possível purificar suficientemente amostras de material infeccioso para a obtenção de dados estruturais de alta resolução. Tentativas de purificar PrP-res, obtida de amostras de cérebro de animais infectados por príon, resultaram em misturas heterogêneas e estados de agregação não-propícios para a caracterização via técnicas de RMN e raios X. Como alternativa, foram empregadas técnicas de baixa resolução, como microscopia eletrônica, com o intuito de estabelecer características dos agregados de príons⁶.

Estudos de espectroscopia ótica foram realizados comparando as duas estruturas de PrP. Através de análises de infravermelho com transformada de Fourier (sigla em inglês – FTIR) e dicroísmo circular (CD) foi encontrada uma diferença notável no conteúdo de estrutura secundária destas isoformas. PrP-sen apresentou baixo conteúdo de folhas- β (em

torno de 3 %) e alto conteúdo de alfa-hélices (cerca de 40%). Enquanto PrP-res mostrou ser composta por cerca de 30 % de alfa-hélices e 45 % de folhas Beta⁴.

A idéia mais aceita atualmente para explicar o caráter infeccioso das doenças priônicas baseia-se na hipótese de indução conformacional. Segundo esta hipótese, a proteína alterada, PrP-res, induz a mudança de conformação da proteína normal, PrP-sen. Este processo implica na conversão de porções α -helcoidais à folhas β . Assim, neste processo, que pode ser considerado um efeito cascata, proteínas alteradas seguem alterando proteínas normais. Essas proteínas alteradas formam pequenos agregados ou protofibrilas que precipitam nas células cerebrais, dando ao cérebro uma aparência esponjosa ¹⁰.

Estudos feitos por James T. L. et al⁵. sugerem que neste processo de transição conformacional haveria, ainda, o envolvimento de uma chaperona molecular (proteína acompanhante) que formaria um complexo com o intermediário metaestável PrP*, diminuindo a barreira de energia de ativação entre PrP-sen e PrP-res, facilitando assim a formação da proteína alterada (PrP-res)⁵.

A hipótese de indução conformacional tem um caráter revolucionário, pois rompe com idéia aceita, até então, em biologia molecular de que somente vírus e bactérias (por conterem material genético) poderiam desencadear doenças infecciosas. Assim, os príons abrem um precedente na história das ciências biológicas, por se tratar do único grupo de agentes patológicos capazes de induzir o desenvolvimento de doenças de caráter tanto infeccioso como hereditário³.

1.5 O Modelo Espiral

Estudos da influência do pH na mudança conformacional foram realizados com formas de PrP-sen de humanos e murídeos. Os resultados apontaram a perda de hélices e ganho de estrutura β na região de pH 4.4-6⁹. Baseados nesses resultados e considerando a falta de dados estruturais disponíveis da proteína alterada, DeMarco M. L. e Daggett V⁸. propuseram um modelo protofibrila *in silico*: o modelo espiral⁸.

A unidade estrutural básica, a proteína alterada, utilizada para a formação deste modelo protofibrila foi produzida por Alonso et. al.⁹ via simulações de dinâmica molecular

(DM) utilizando o campo de forças ENCAD⁸. Para tanto, foi utilizado o fragmento (resíduos 109-219) de PrP-sen do hamster Sírio (resolvido por RMN) depositado no banco de dados do “Protein Data Bank” (PDB)⁵. Os resíduos His, Glu e Asp desta proteína foram protonados (promovendo um ambiente de baixo pH) e a estrutura resultante foi utilizada como ponto de partida para uma simulação de 10 ns⁹. A estrutura correspondente ao tempo de 8 ns foi usada como unidade básica para a formação do modelo protofibrila.

Em seu artigo, Alonso et. al.⁹ ainda desenvolveu a simulação dinâmica molecular, por 10 ns, em meio neutro (tornando neutro o pKa do resíduo His) para o mesmo fragmento de PrP-sen do hamster Sírio. Com isto, pôde analisar as diferenças de estrutura secundária da proteína devido a influência do pH do sistema⁹.

De maneira geral, a caracterização de propriedades conformacionais de proteínas a nível atômico é um grande desafio e torna-se particularmente difícil quando trata-se do processo de conversão PrP-sen → PrP-res. Neste contexto, as simulações computacionais via dinâmica molecular apresentam-se como uma alternativa viável para este tipo de investigação⁹.

A dinâmica molecular é uma técnica computacional na qual são determinados os movimentos das partículas de um sistema, conhecendo o potencial de interação entre as partículas e as equações que regem seu movimento. Com isso, é possível estudar a evolução temporal das configurações dos constituintes do sistema. Partindo das sequências de posições geradas são determinadas as propriedades macrosópicas do sistema, respeitando os princípios fundamentais de Mecânica Estatística¹¹.

A metodologia DM é uma ferramenta para o estudo de sistemas nos quais os efeitos de temperatura não podem ser desconsiderados. Processos reativos requerem energias altas, não podendo ser tratados por técnicas convencionais de DM clássica¹¹. Como o processo de conversão PrP-sen → PrP-res é associado com substancial alteração conformacional e não envolve reações químicas, é ideal para ser investigado por simulações DM.

2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é produzir uma estrutura de proteína alterada, PrP-res, baseado no modelo proposto por Alonso et al ⁹, com o intuito de utilizar esta estrutura em investigações futuras de indução conformacional.

Os objetivos específicos deste trabalho são:

1 – Avaliar o efeito do uso de um campo de forças diferente do utilizado por Alonso et. al. para estudar a influência do pH no processo de conversão da proteína príon celular.

2 - Avaliar o efeito do aumento da cadeia polipeptídica no processo de formação da proteína alterada, PrP-res, sob baixo pH.

3. Materiais, Métodos e Fundamentação Teórica

3.1 Bancos de dados

O principal banco de dados de estrutura de macromoléculas biológicas é o Protein Data Bank (PDB)¹². Este contém estruturas de proteínas, ácidos nucleicos e uns poucos aminoácidos. As estruturas depositadas no PDB são determinadas experimentalmente por técnicas espectroscópicas, entre elas destacam-se a cristalografia por difração de raio X e a ressonância magnética nuclear (RMN)¹³.

3.2 Dinâmica Molecular

Uma das principais ferramentas para o estudo de sistemas atômico-moleculares é a dinâmica molecular. Com esta técnica podem ser estudados desde sistemas homogêneos como gases, fluidos supercríticos, líquidos, soluções, a sistemas pouco (ou nada) homogêneos como biomembranas, lipídios, ácidos nucleicos e proteínas¹¹.

Em dinâmica molecular, sucessivas configurações de um sistema são geradas pela integração numérica das equações de movimento de Newton. O resultado é uma trajetória que especifica como as posições e as velocidades das partículas do sistema variam com o tempo¹⁴.

A força atuando em uma partícula (i) é obtida pelo **gradiente da função energia potencial** relativa às coordenadas desta partícula ¹⁵:

$$\mathbf{f}_i = - \nabla U(\mathbf{r}_i) \quad (1)$$

Onde \mathbf{f}_i é a força que atua em uma partícula i qualquer, ∇ é o operador gradiente e $U(\mathbf{r}_i)$ é a energia potencial do sistema em um dado instante de tempo. Obviamente, cálculos exatos de força e energia potencial para as partículas não são acessíveis. Por isso, são empregados modelos de campos de forças que fornecem aproximações para a função energia potencial.

3.3 Campos de Força

A qualidade de um campo de força depende evidentemente do sistema estudado¹¹. Entre os inúmeros campos de força usados em DM, os mais utilizados para os sistemas biológicos são: AMBER, CHARMM, OPLS e GROMOS.

Cada campo de força possui uma forma específica de calcular as interações. No presente trabalho, o campo de forças empregado foi o GROMOS e a expressão para a determinação do potencial deste para cada uma das moléculas do sistema em estudo, assume a forma geral¹⁷:

$$U_{\text{total}} = U_{\text{bonded}} + U_{\text{nonbonded}} \quad (2)$$

$$U_{\text{bonded}} = \sum_{\text{bonds}} K_r (r_{ij} - r_0)^2 + \sum_{\text{angles}} k_\theta (\cos \theta_{ijk} - \cos \theta_0)^2 + U_{\text{dihedrals}} \quad (3)$$

$$U_{\text{dihedrals}} = \sum_{\text{improper}} \frac{V_n}{2} (\phi_{ijkl} - \phi_0)^2 + \sum_{\text{proper}} V_m [1 + \cos(n\phi)] \quad (4)$$

$$U_{\text{nonbonded}} = \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j>i}^N \alpha_{LJ} \left[(A_{ij} / r_{ij}^{12}) - (B_{ij} / r_{ij}^6) \right] + \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j>i}^N \left[\alpha_{el} (q_i q_j / r_{ij}) \right] \quad (5)$$

$$\begin{aligned} A_{ij} &= 4 \epsilon_{ij} \sigma_{ij}^{12} \\ B_{ij} &= 4 \epsilon_{ij} \sigma_{ij}^6 \end{aligned} \quad (6)$$

$$\begin{aligned} \epsilon_{ij} &= (\epsilon_{ii} \cdot \epsilon_{jj})^{1/2} \\ \sigma_{ij} &= (\sigma_{ii} + \sigma_{jj})/2 \end{aligned} \quad (7)$$

Sendo:

- r_0 = comprimento de equilíbrio da ligação;

- θ_0 = ângulo de equilíbrio da ligação;

- K_r = constante de força de estiramento de ligação;
- K_θ = constante de força de ângulo de ligação;
- V_n = constante de força de deformação angular;
- ϕ_i = ângulo diedro;
- ϵ_{ij} = parâmetro de energia de Lennard-Jones;
- σ_{ij} = parâmetro de diâmetro de Lennard-Jones;
- r_{ij} = separação entre os sítios i e j ;
- q_i/q_j = cargas atômicas parciais para o potencial de Coulomb;
- n = multiplicidade;
- α_{LJ} = fator de amortecimento do potencial de Lennard-Jones;
- α_{Coul} = fator de amortecimento do potencial de Coulomb.

A equação (2) representa os potenciais de interação intermoleculares, também conhecidos por potenciais ligados. Em (3) o primeiro e o segundo termo são potenciais harmônicos. Sendo que o primeiro termo modela os estiramentos de ligação e o segundo, os ângulos de ligação. O terceiro termo em (3), que descreve as torções diedrais, é decomposto em dois termos em (4). O primeiro termo em (4) modela as torções diedrais impróprias, descritas por um potencial harmônico. Enquanto o segundo termo em (4) modela as torções diedrais próprias, descritas por potenciais trigonométricos.

As interações intermoleculares, ou interações não-ligadas, estão representadas na equação (5), onde o primeiro termo modela as interações de VDW (via potenciais de Lennard-Jones) e o segundo, modela as interações eletrostáticas (via potenciais de Coulomb). Para calcular a interação entre sítios de espécies distintas é necessário o uso de alguma regra de combinação para os coeficientes de Lennard-Jones. Neste trabalho, foram empregadas as regras de Lorentz-Berthelot, apresentadas em (7).

3.4 Análises

De posse das trajetórias das simulações de DM, foram realizadas análises empregando programas do software GROMACS¹⁸. As análises realizadas foram: RMSD, RMSF, raio de

giro, superfície acessível ao solvente, ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, mapas de contato de resíduos e estrutura secundária.

O RMSD (do inglês, root mean square deviation) calcula o desvio padrão médio quadrático para todos os átomos da proteína. O RMSD pode ser calculado pela fórmula abaixo:

$$RMSD(t_1, t_2) = \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \|r_i(t_1) - r_i(t_2)\|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (8)$$

$$M = \sum_{i=1}^N m_i \quad (9)$$

Onde $r_i(t_1)$ e $r_i(t_2)$ são as posições do átomo i , respectivamente, nos tempos t_1 e t_2 ; m_i é a massa do átomo i ; M é o somatório da massa de todos os átomos da molécula.

Ou seja, o RMSD é utilizado para estimar os desvios médios da estrutura da proteína, em relação à estrutura referência (onde $t_2 = 0$), no decorrer da simulação. Assim, é vislumbrada a evolução da mudança estrutural total da molécula ao longo da simulação. O RMSD pode ser calculado para os átomos da cadeia principal, para os átomos de carbono alfa ($C\alpha$), ou outras opções disponíveis no programa `g_rms` do pacote GROMACS.

O RMSF (do inglês, root mean square fluctuation) calcula o desvio padrão das posições atômicas ao longo da simulação com relação às posições de uma estrutura tomada como referência. Ou seja, calcula as flutuações atômicas ao longo da simulação¹⁷.

Para ter idéia de quão compacta uma estrutura é, faz-se uma análise de seu raio de giro (RG), que pode ser calculado pela fórmula abaixo¹⁷:

$$R_g = \left(\frac{\sum_i \|r_i\|^2 m_i}{\sum_i m_i} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (10)$$

Onde m_i é a massa do átomo i , r_i é a posição do átomo i com relação ao centro de massa da molécula.

Na análise de superfície acessível ao solvente (SAS) é computada a superfície hidrofílica, hidrofóbica e total disponível na macromolécula para ser acessada pelo solvente¹⁷. O cômputo de SAS é feito empregando uma superfície de Conolly¹⁹.

As ligações de hidrogênio são determinadas pelo estabelecimento de um valor limite para o ângulo acceptor de hidrogênio- doador de hidrogênio – hidrogênio. Esse valor limite é equivalente à 30 graus ¹⁷.

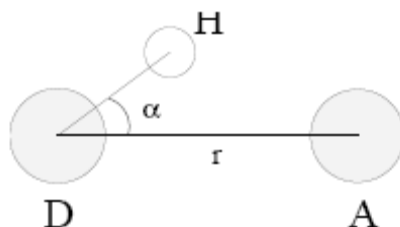


Figura 1: Mostra a relação angular (ângulo α) entre o acceptor de hidrogênio (A), o doador de hidrogênio (D) e o átomo de hidrogênio (H)

Na análise de mapas de resíduos, é considerada como distância mínima entre os resíduos A_i e A_j , a menor distância entre um par de átomos quaisquer i e j pertencentes a esses resíduos (sendo que: $i \in A_i$ e $j \in A_j$) ¹⁷.

A estrutura secundária pode ser computada a partir das trajetórias da proteína durante a simulação. Pode-se coordenar a cada instante de tempo o tipo de estrutura secundária envolvida em cada resíduo ¹⁷.

As imagens de estrutura de proteínas apresentadas neste trabalho foram produzidas utilizando o programa SPDBV²⁰.

3.5 Análise Estrutural de Proteínas

A sequência de aminoácidos de uma proteína determina sua estrutura tridimensional, que, por sua vez, determina suas propriedades. Muitas conformações espaciais são possíveis para uma proteína, mas somente uma ou poucas possuem atividade biológica. Essas conformações são designadas nativas²¹.

Para a realização de análises bem sucedidas relacionando sequências de aminoácidos e estrutura de proteínas, é necessário uma definição precisa de estrutura secundária. As análises estruturais, do presente trabalho, foram realizadas utilizando o programa DSSP²² do pacote

GROMACS. Partindo de uma definição de ligações de hidrogênio, o DSSP define TURNS e BRIDGES; e, baseado nestas, define α -hélices e β -ladders. Entre as características geometricamente definidas, encontra-se BENDS. A seguir são apresentadas algumas definições estruturais empregadas no programa DSSP²²:

Ligações de Hidrogênio as ligações de hidrogênio em proteínas apresentam pequena sobreposição de funções de onda, sendo bem descritas por um modelo eletrostático:

$$E = q_1 q_2 [(1/r(\text{ON}) + 1/r(\text{CH}) + 1/r(\text{OH}) + 1/r(\text{CN}))]$$

Onde q_1 e q_2 são as cargas parciais, sendo que para os átomos de carbono (C), oxigênio (O), nitrogênio (N) e hidrogênio (H) têm-se, respectivamente, as seguintes cargas parciais: $+q_1$, $-q_1$, $-q_2$ e $+q_2$. E r é a distância entre o par de átomos indicado entre parênteses após r .

Estruturas secundárias definidas com base em padrões de ligações de hidrogênio:

n-Turns: o padrão básico das ligações de hidrogênio, envolvidas nas n-turns, é do tipo $(i, i + n)$. A ligação de hidrogênio se estabelece do resíduo CO (i) ao resíduo NH $(i + n)$:

$$n\text{-turn } (i) = \text{Hbond } (i, i + n) \quad , \text{ onde } n = 3,4,5.$$

Bridge: uma bridge ocorre entre os resíduos i e j , se existirem duas ligações de hidrogênio características de estrutura β , em particular:

$$\text{Parallel Bridge } (i,j) = [\text{Hbond } (i - 1, j) \text{ and Hbond } (j, i + 1)]$$

$$\text{Antiparallel Bridge } (i,j) = [\text{Hbond } (i, j) \text{ and Hbond } (j, i)]$$

Hélices: uma hélice mínima é definida por 2 n-turns consecutivas. Com base nos tipos de n-turns são definidos três tipos de hélices mínimas: 3-hélice, 4-hélice e 5-hélice. Hélices maiores são definidas pela sobreposição de hélices mínimas. Assim, a sobreposição de 3-hélices gera uma 3_{10} -hélice; a sobreposição de 4-hélices gera uma α -hélice; e a sobreposição de 5-hélices gera uma π -hélice.

B-ladders e β -sheet: definições:

- Ladder: conjunto de uma ou mais “bridges”, de igual tamanho, consecutivas;
- Sheet: conjunto de uma ou mais ladders conectadas por resíduos compartilhados.

De maneira equivalente, pode-se dizer que duas strands (fitas) pareadas constituem uma ladder. Assim, uma estrutura formada de três strands pareadas possui duas ladders e uma sheet.

Estrutura secundária geometricamente definida:

Bends: são espécies com alta curvatura. Define-se a curvatura da cadeia, em um resíduo central i de 5 resíduos, como o ângulo entre a direção da cadeia principal dos três primeiros resíduos e , a dos três últimos. Para existir uma Bend no resíduo central i , é necessário uma curvatura de pelo menos 70 graus.

3.6 Protocolo de Simulação

No trabalho de Alonso et al.⁹, foi estudado o efeito do pH para a conversão de PrP-sen \rightarrow PrP-res, tendo sido empregado, para tanto, o campo de forças ENCAD. No presente trabalho, tem-se como objetivo avaliar o efeito do uso de um campo de forças diferente no estudo de influência do pH no processo de conversão da proteína príon celular. Assim como, avaliar o efeito do aumento da cadeia polipeptídica no processo de formação da proteína alterada, PrP-res, sob baixo pH.

De tal forma, neste trabalho, foram realizadas três simulações de dinâmica molecular, sendo duas dessas relativas ao fragmento de resíduos 109-219 (simulado em pH baixo e neutro) e uma relativa ao fragmento 90-231 (simulado em pH baixo), ambas correspondentes à proteína PrP-sen do hamster Sírio.

Num primeiro momento foram obtidas as estruturas dos fragmentos protéicos de interesse em arquivos de formato “.pdb” (arquivo de coordenadas dos átomos da proteína). Para tanto, a estrutura correspondente aos resíduos 109-219 foi obtida do banco de dados PDB (código PDB: 1B10)¹² e a estrutura do fragmento 90-231 foi obtida de um site ²³. As estruturas obtidas foram, ambas, resolvidas por RMN⁵. A seguir é apresentada a sequência de

aminoácidos da proteína príon celular do hamster Sírio correspondente ao fragmento de resíduos 90-231:

GQGGGTHNQWNKPSKPKTNMKHMAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMSRPMMHF
 GNDWEDRYYRENMNRYPNQVYYRPVDQYNNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTTKGE
 NFTETDIKIMERVVEQMCTTQYQKESQAYYDGRRS

Antes de iniciar os procedimentos de simulação, foi necessário protonar os resíduos His, Glu e Asp para as simulações em pH baixo e para a simulação em pH neutro foi mantido o pKa da His neutro. Para cada um dos três sistemas simulados, foi, então, realizado o procedimento descrito a seguir.

Empregou-se o programa **pdb2gmx**, do pacote software GROMACS, para gerar o arquivo de topologia, o arquivo de coordenadas cartesianas da macromolécula biológica e, para definir o campo de forças: **GROMOS 96 53a6**²⁴. Na sequência, foi definido o sistema como centrado em uma caixa cúbica, com as faces distando de no mínimo 1,5 nm da proteína. A caixa foi, então, preenchida com moléculas de água (do tipo SPC)²⁵. Com isso, o arquivo de topologia foi alterado, gerando-se um novo arquivo de coordenadas, desta vez contendo proteína e água. Adicionou-se, ainda, íons Na⁺ e Cl⁻ para neutralizar as cargas do sistema e garantir um ambiente fisiológico. A tabela 1, a seguir, ilustra o número de entidades correspondentes a cada um dos componentes do sistema:

Tabela 1: Número de entidades de cada componente dos sistemas simulados.

Simulação	moléculas de H ₂ O	átomos da proteína	íons Na ⁺	íons Cl ⁻	total de átomos
109-219 P	13138	1179	37	52	40682
109-219 NP	13156	1163	38	37	40706
90-231 P	18551	1514	52	74	57293

Onde NP significa não-protonado e P, protonado.

A etapa seguinte consistiu na minimização de energia do sistema proteína-solvente. Para isto, foi utilizado o algoritmo de minimização “Steepest Descent”. Na sequência foi realizada uma dinâmica molecular com restrição de posição (position restraint) de 500 ps, na qual a macromolécula foi restrita, mas as moléculas do solvente tiveram liberdade de

movimento. Desta forma, foi promovida uma relaxação das interações desfavoráveis soluto-solvente.

A última etapa da simulação consistiu na dinâmica molecular propriamente dita (com duração de 20ns, sendo que cada dois ns corresponde, em tempo real, a 1 dia de simulação computacional), na qual todos os graus de liberdade foram amostrados. Para isso foram definidos alguns parâmetros, comuns às três simulações:

- passo de integração de 0.002 ps;
- o algoritmo utilizado para corrigir as interações de longo alcance foi o PME ²⁶;
- temperatura de acoplamento foi mantida pelo uso do algoritmo de Nose-Hoover ²⁷;
- temperatura de acoplamento empregada foi de 300 K;
- a pressão da simulação foi mantida constante pelo uso do algoritmo de Parrinello-Rahman²⁸;
- a pressão do sistema simulado foi mantida em 1 bar;
- os comprimentos de ligação de equilíbrio foram mantidos pelo uso do algoritmo LINCS ²⁹;

Terminadas as dinâmicas, foram feitas as seguintes análises, com base nas trajetórias das simulações: superfície acessível ao solvente, evolução da estrutura média, mobilidade relativa de segmentos, ligações de hidrogênio (proteína-proteína e proteína-solvente), raio de giro, mapas de contato de aminoácidos e, análises de estruturas secundárias.

Todas as simulações foram realizadas no laboratório de Química Teórica, localizado no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4. Resultados

Ao longo do texto serão utilizados os termos “protonado” (P) e “não-protonado” (NP) para referenciar as dinâmicas moleculares simuladas em pH baixo e neutro, respectivamente. Com base na trajetória das dinâmicas moleculares foram realizadas análises utilizando programas do software GROMACS¹⁸. As análises de energias total, diedral, de estiramento e de deformação angular, assim como as análises de pressão, temperatura e densidade foram monitoradas em função do tempo. Estes parâmetros obtiveram rápida convergência, atingindo seus respectivos patamares antes de 1 ns de simulação.

A Figura 2, a seguir, apresenta os gráficos de RMSD de C α em função do tempo de simulação.

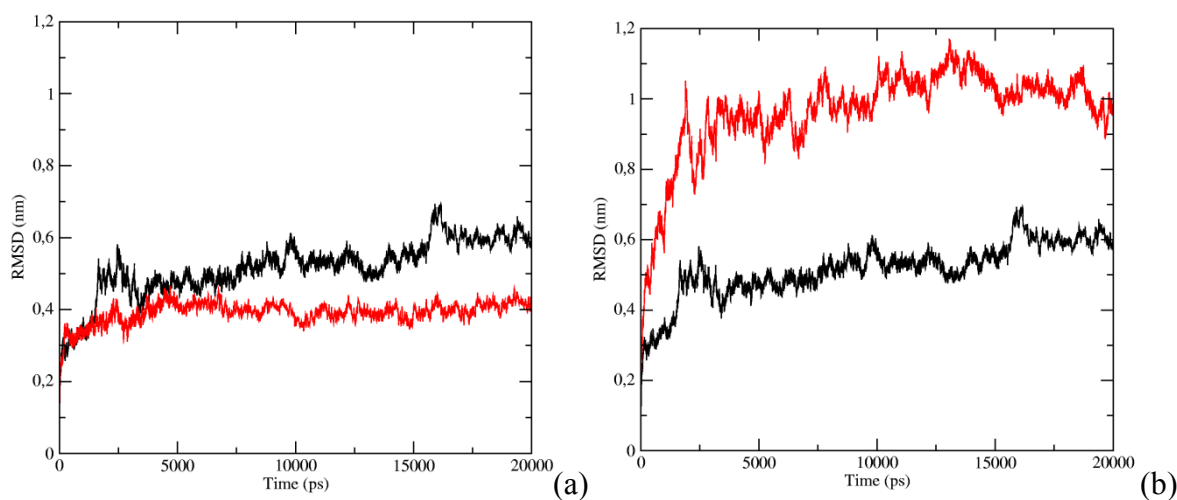


Figura 2: Gráficos de RMSD de C α em função do tempo de simulação. Em (a) é apresentada uma comparação das curvas de RMSD para o fragmento de resíduos 109-219 protonado e não-protonado. A curva em vermelho representa o fragmento não-protonado e a curva em preto, o protonado. Em (b) é apresentada uma comparação das curvas de RMSD para os fragmentos protonados de resíduos 109-219 (curva preta) e 90-231 (curva vermelha).

A Figura 3 apresenta os gráficos de RMSF de C α em função do resíduo de aminoácido da cadeia polipeptídica. As curvas dos fragmentos 109-219 P e NP foram plotadas no mesmo gráfico, enquanto a curva do fragmento 90-231 foi plotada separadamente em outro gráfico.

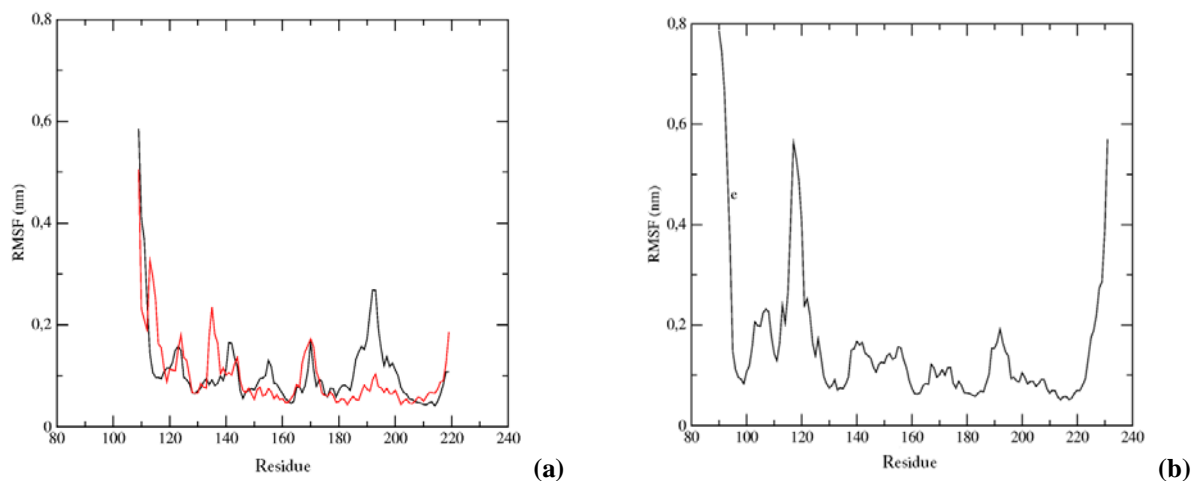


Figura 3: Apresenta os gráficos de RMSF de Ca em função do resíduo, considerando os últimos 2,5 ns de simulação. Em **(a)** são apresentadas as curvas de RMSF para o fragmento 109-219 P (curva em preto) e NP (curva em vermelho). Em **(b)** é apresentado o gráfico de RMSF para o fragmento 90-231 P.

A Figura 4 apresenta os gráficos de raio de giro (RG) em função do tempo de simulação. Na Figura 4 (a) as curvas de RG dos fragmentos 109-219 P e NP são plotadas no mesmo gráfico e na Figura 6 (b) as curvas de RG dos fragmentos protonados de resíduos 109-219 e 90-231 são plotados no mesmo gráfico.

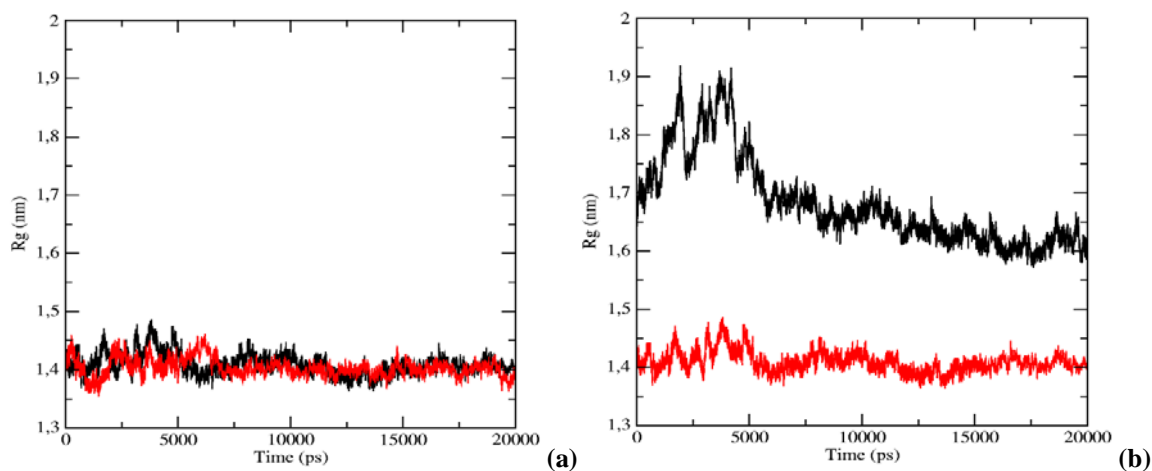


Figura 4: **(a)** Gráfico de RG em função do tempo para os fragmentos 109-219 P e NP. A curva em vermelho representa o fragmento NP e a curva em preto, o P **(b)** Gráfico de RG em função do tempo para os fragmentos protonados. A curva em vermelho representa o fragmento 109-219 e a curva em preto, o fragmento 90-231.

A Figura 5, a seguir, apresenta os gráficos de superfície acessível ao solvente (SAS) em função do tempo para os fragmentos 109-219 P e NP, e para o fragmento 90-231 P.

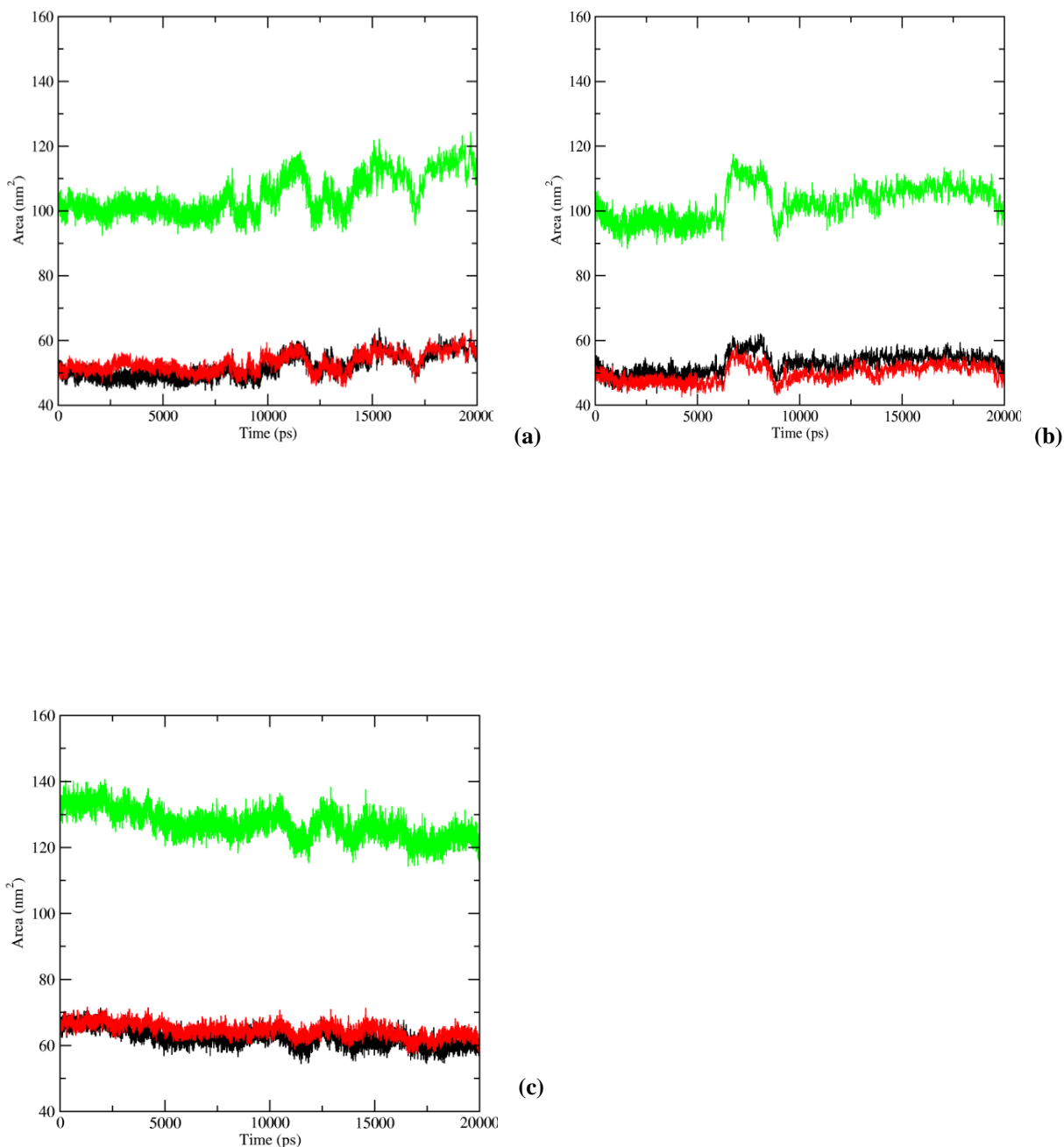


Figura 5: Gráficos de superfície acessível ao solvente em função do tempo de simulação. Em (a) é representado o gráfico para o fragmento 109-219 P; em (b) é apresentado o gráfico para o fragmento 109-219 NP. Em (c), o gráfico para o fragmento 90-231 P. Para os gráficos (a), (b) e (c) as curvas em vermelho, preto e verde representam, respectivamente, superfície hidrofílica, hidrofóbica e total acessível ao solvente.

A Figura 6, apresenta os gráficos de ligações de hidrogênio intramoleculares (proteína-proteína) e intermoleculares (proteína-solvente) para o fragmento 109-219 P e NP em função do tempo de simulação.

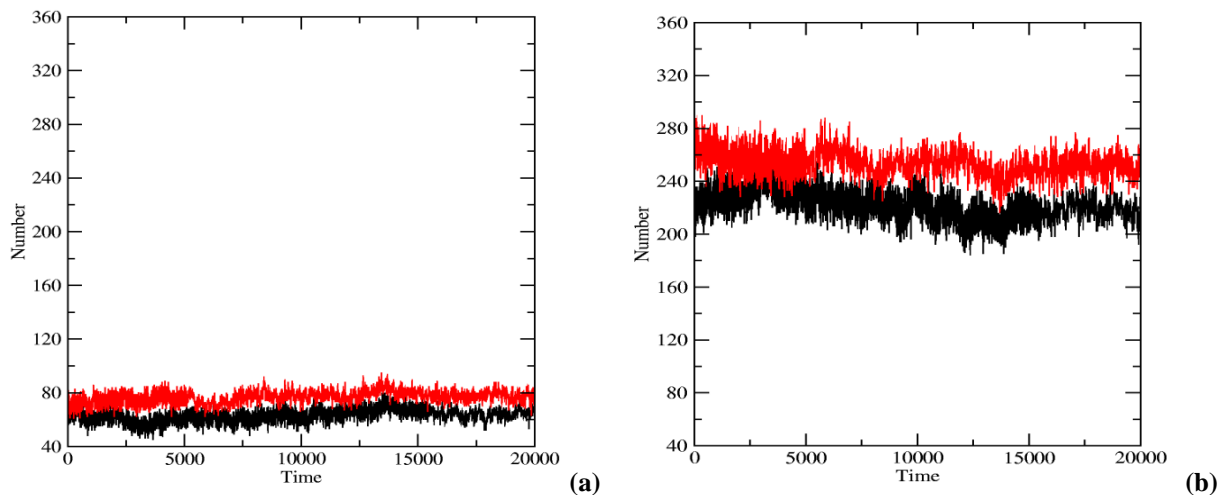


Figura 6: (a) Gráfico de ligações de hidrogênio intramoleculares. (b) Gráfico de ligações de hidrogênio intermoleculares. Para ambos os gráficos, as curvas em preto representam o fragmento 109-219 P e as curvas em vermelho, o NP.

A Figura 7, apresenta os gráficos de ligações de hidrogênio intramoleculares (proteína-proteína) e intermoleculares (proteína-solvente) para o fragmento 90-231 P em função do tempo.

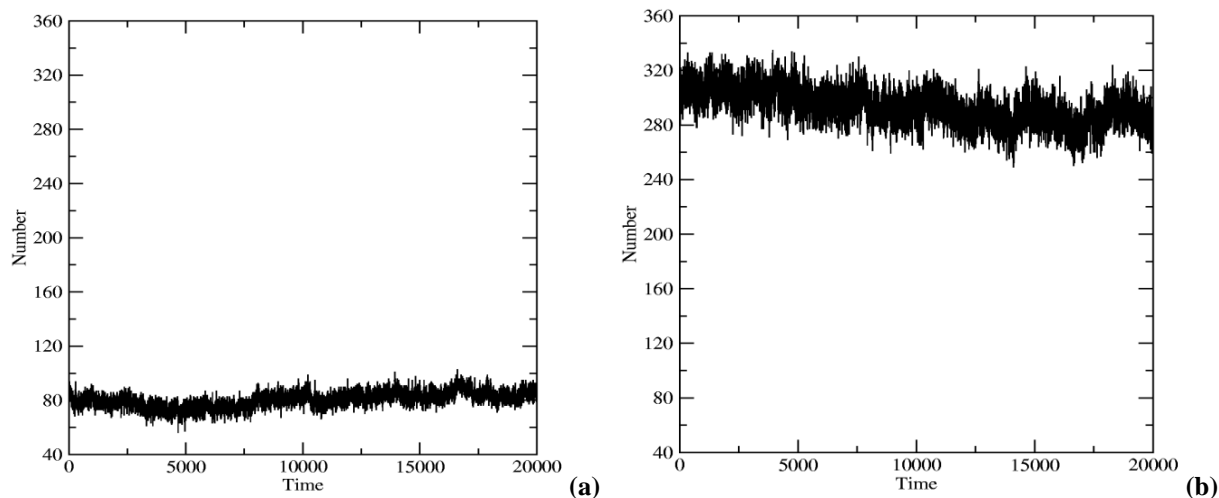


Figura 7: (a) Gráfico de ligações de hidrogênio intramoleculares em função do tempo. (b) Gráfico de ligações de hidrogênio intermoleculares em função do tempo. Para ambos os gráficos, as curvas em preto representam o fragmento 90-231 P.

As Figuras 8, 9 e 10 mostram gráficos de número de resíduos de aminoácidos envolvidos em um dado tipo de estrutura secundária em função do tempo. As figuras 8, 9 e 10 referem-se, respectivamente, os fragmentos 109-219 P, 109-219 NP e 90-231 P.

As Figuras 11, 12 e 13 apresentam, a seguir, os mapas de contato de resíduos de aminoácidos para os tempos de simulação correspondentes à 0 e 20 ns. Juntamente com esses mapas de resíduos estão apresentadas as imagens da estrutura da proteína relativas aos tempos citados em cada um dos mapas de contato. As figuras 11, 12 e 13 referem-se, respectivamente, aos fragmentos 109-219 P, 109-219 NP e 90-231 P.

E as Figuras 14, 15 e 16 referem-se aos gráficos de resíduos de aminoácidos da cadeia polipeptídica em função do tempo de simulação. As diferentes colorações mostradas em cada um dos gráficos indicam o tipo de estrutura secundária na qual o resíduo permaneceu envolvido em cada instante de tempo ao longo da simulação. As Figuras 14, 15 e 16 referem-se, respectivamente, aos fragmentos 109-219 P, 109-219 NP e 90-231 P.

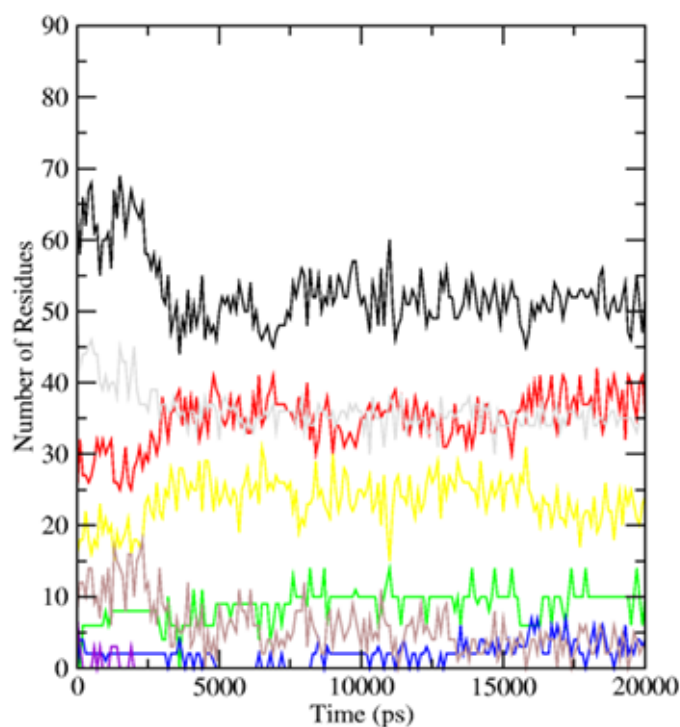


Figura 8: Gráfico de número de resíduos envolvidos com tipos de estrutura secundária em função do tempo para o fragmento 109-219 P. As estruturas secundárias representadas pelas curvas em preto, cinza claro, vermelho, amarelo, rosa, verde, azul e roxo são, respectivamente, structure, α -helix, coil, bend, turn, β -sheet, β -bridge e 3-helix.

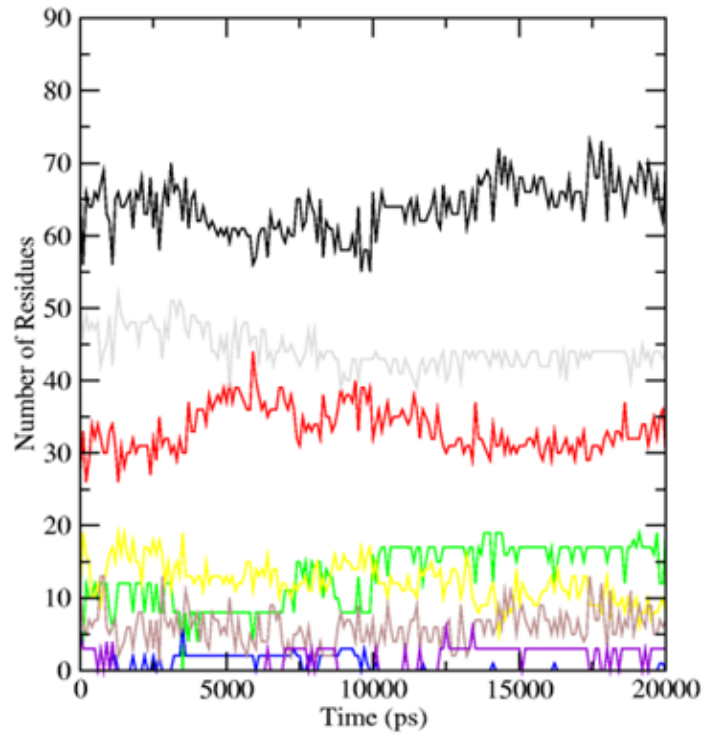


Figura 9: Gráfico de número de resíduos envolvidos com tipos de estrutura secundária em função do tempo para o fragmento 109-219 NP. As estruturas secundárias representadas pelas curvas em preto, cinza claro, vermelho, amarelo, rosa, verde, azul e roxo são, respectivamente, structure, α -helix, coil, bend, turn, β -sheet, β -bridge e 3-helix.

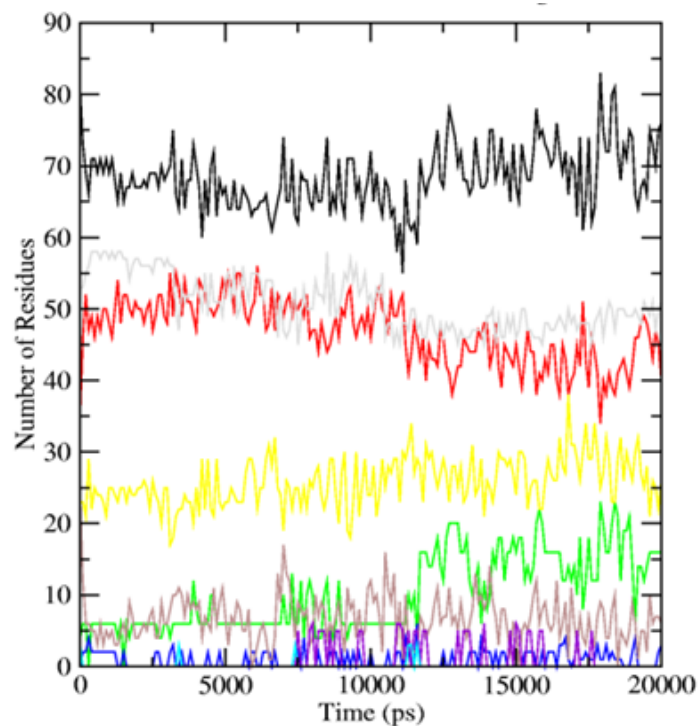


Figura 10: Gráfico de número de resíduos envolvidos com tipos de estrutura secundária em função do tempo do fragmento 90-231 P. As estruturas secundárias representadas pelas curvas em preto, cinza claro, vermelho, amarelo, rosa, verde, azul e roxo são, respectivamente, structure, α -helix, coil, bend, turn, β -sheet, β -bridge e 3-helix.

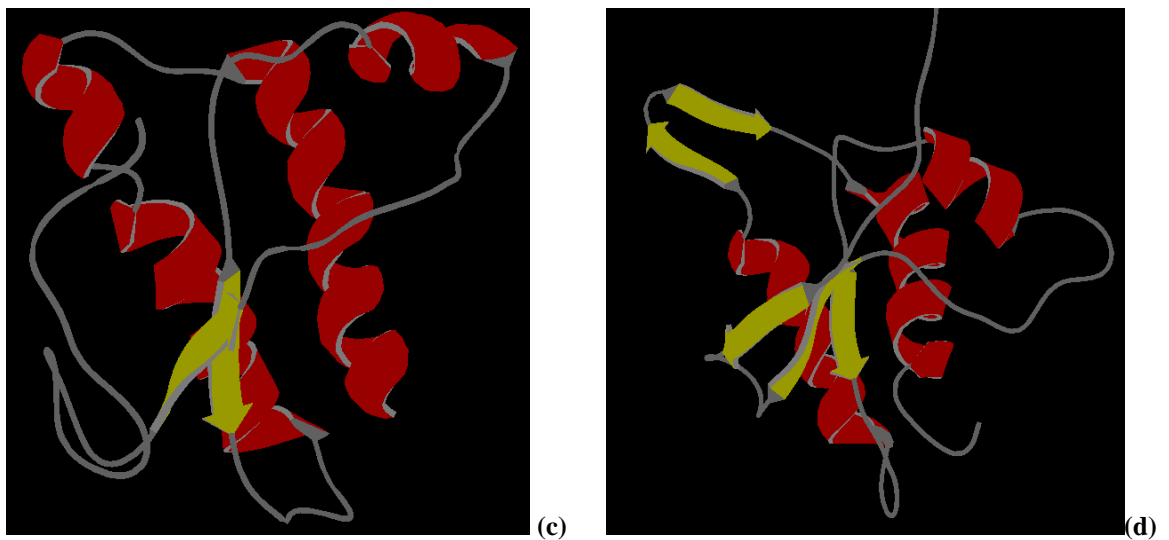
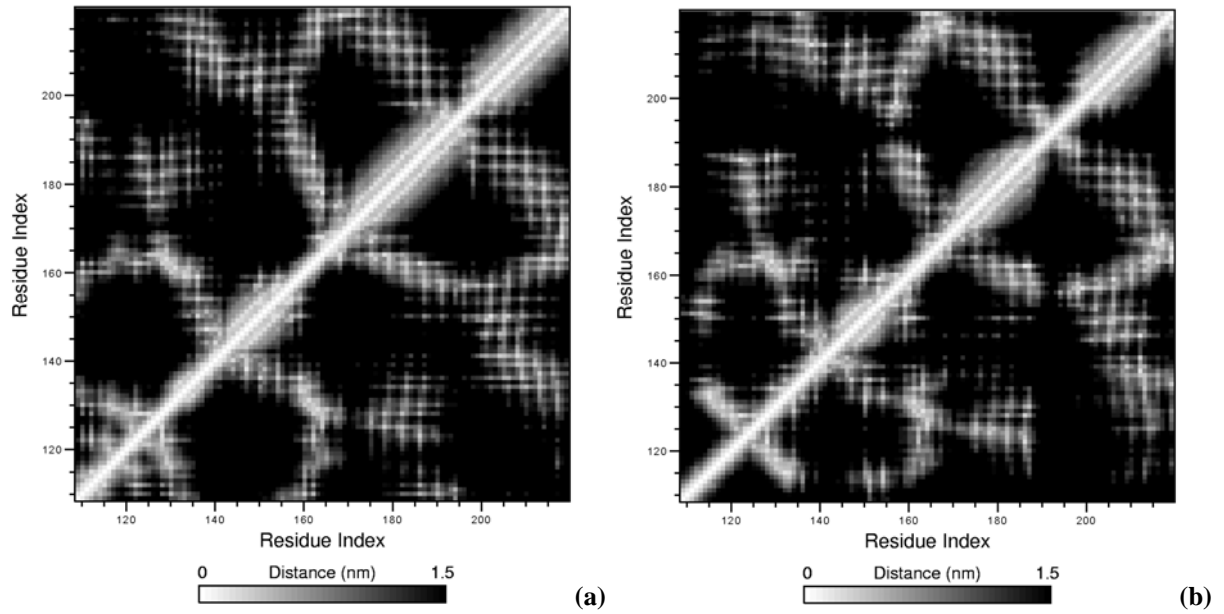


Figura 11: As Figuras (a), (b), (c) e (d) são relativas ao fragmento 109-219 P. Os gráficos (a) e (b) representam os mapas de resíduos de aminoácidos, nos quais os eixos x e y são relativos ao número dos resíduos de aminoácidos. A escala indicada abaixo desses mapas trata sobre a distância dos pares de aminoácidos. Quanto mais próxima do branco mais próximos os aminoácidos da cadeia polipeptídica estarão uns dos outros. As Figuras (a) e (b) referem-se, respectivamente, aos instantes de tempo de 0 e 20 ns. As Figuras (c) e (d) são imagens do fragmento protéico referente, respectivamente, aos instantes de tempo 0 e 20 ns.

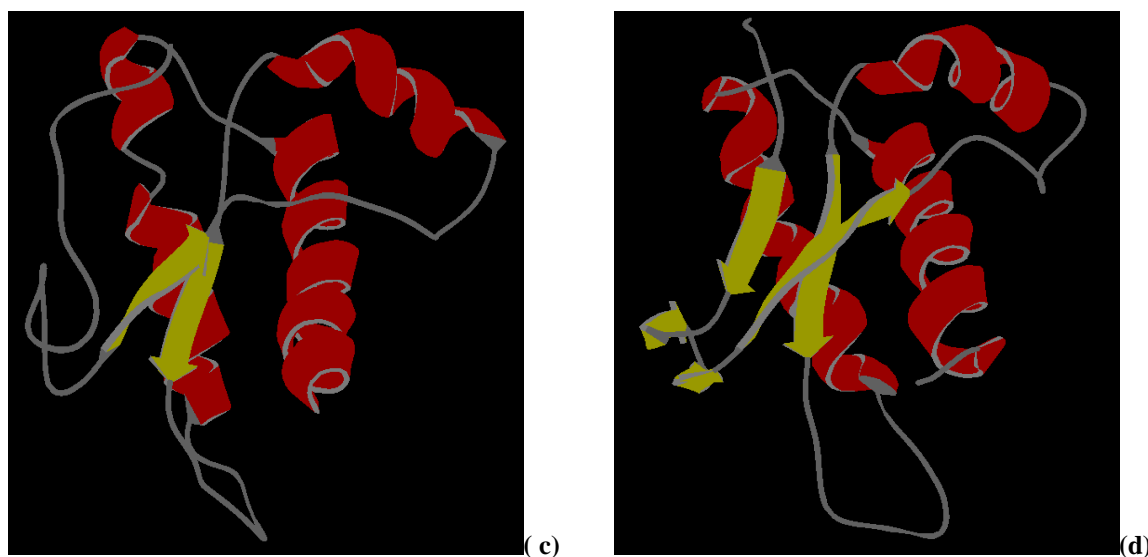
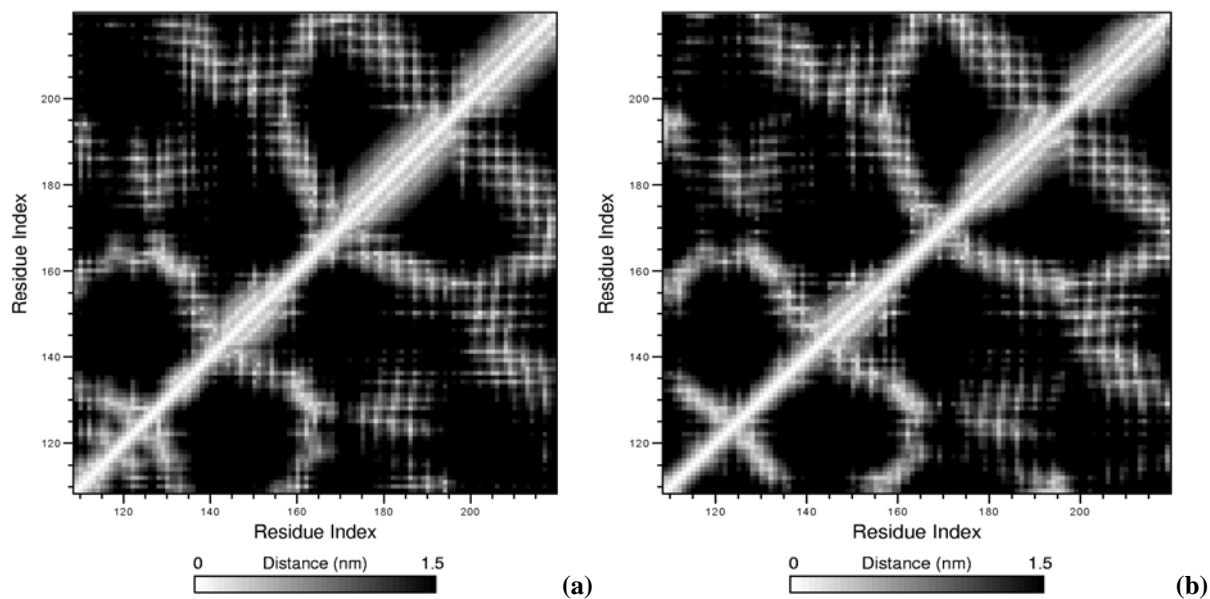


Figura 12: As Figuras (a), (b), (c) e (d) são relativas ao fragmento 109-219 NP. Os gráficos (a) e (b) representam os mapas de resíduos de aminoácidos, nos quais os eixos x e y são relativos ao número dos resíduos de aminoácidos. A escala indicada abaixo desses mapas trata sobre a distância dos pares de aminoácidos. Quanto mais próxima do branco mais próximos os aminoácidos da cadeia polipeptídica estarão uns dos outros. As Figuras (a) e (b) referem-se, respectivamente, aos instantes de tempo de 0 e 20 ns. As Figuras (c) e (d) são imagens do fragmento protéico referente, respectivamente, aos instantes de tempo 0 e 20 ns.

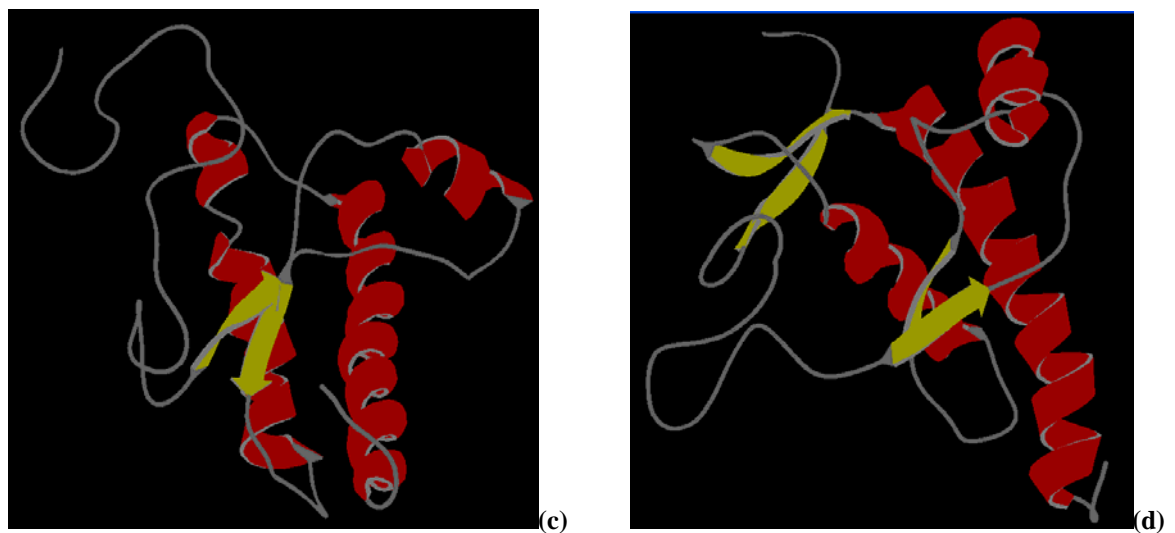
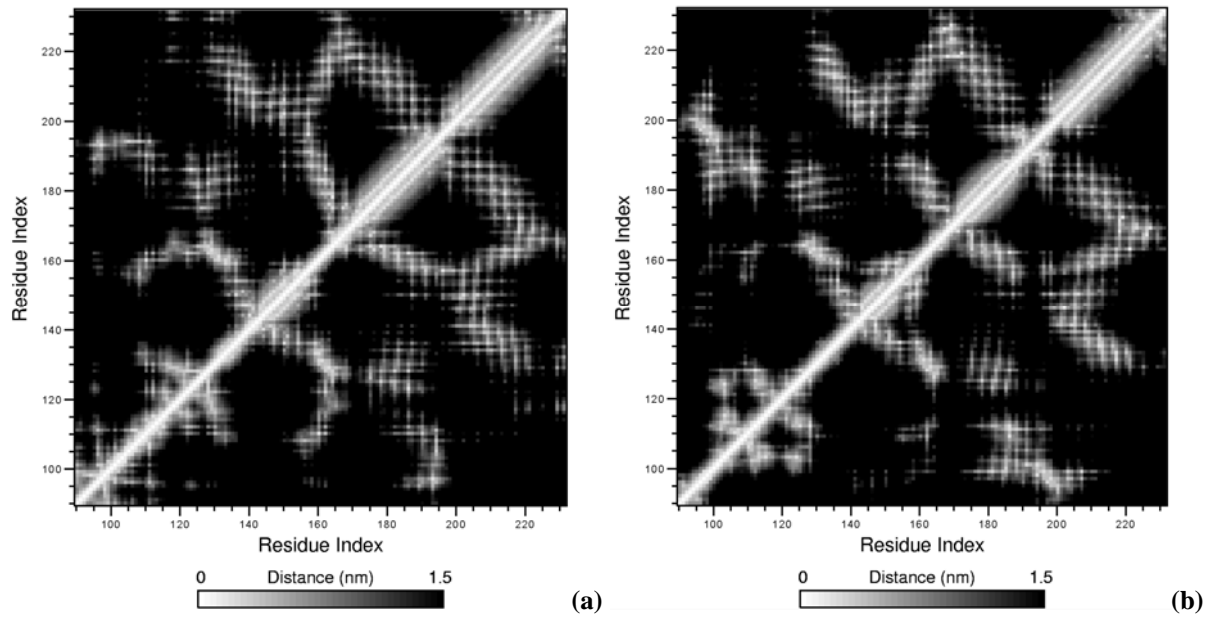


Figura 13: As Figuras (a), (b), (c) e (d) são relativas ao fragmento 90-231 P. Os gráficos (a) e (b) representam os mapas de resíduos de aminoácidos, nos quais os eixos x e y são relativos ao número dos resíduos de aminoácidos. A escala indicada abaixo desses mapas trata sobre a distância dos pares de aminoácidos. Quanto mais próxima do branco, mais próximos os aminoácidos da cadeia polipeptídica estarão uns dos outros. As Figuras (a) e (b) referem-se, respectivamente, aos instantes de tempo de 0 e 20 ns. As Figuras (c) e (d) são imagens do fragmento protéico referente, respectivamente, aos instantes de tempo 0 e 20 ns.

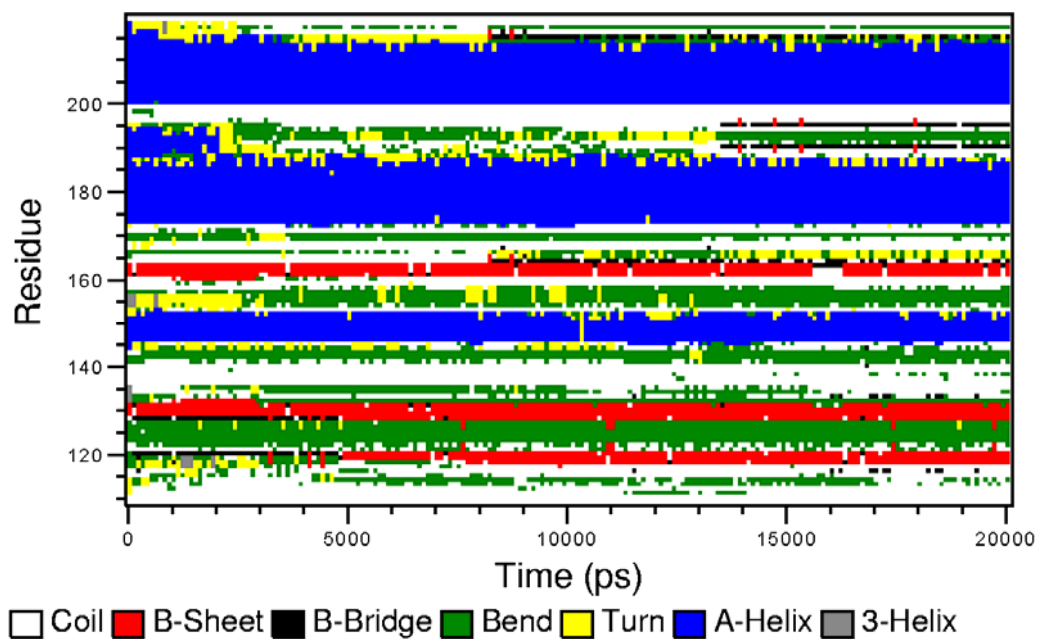


Figura 14: Gráfico de resíduos de aminoácidos do fragmento 109-219 P em função do tempo. As cores branco, vermelho, preto, verde, amarelo, azul e cinza representam, respectivamente, estruturas secundárias do tipo coil, β -sheet, β -bridge, bend, turn, α -helix e 3-helix. Estas são os tipos de estruturas secundárias que os resíduos de aminoácidos podem assumir nos instantes de tempo ao longo da simulação.

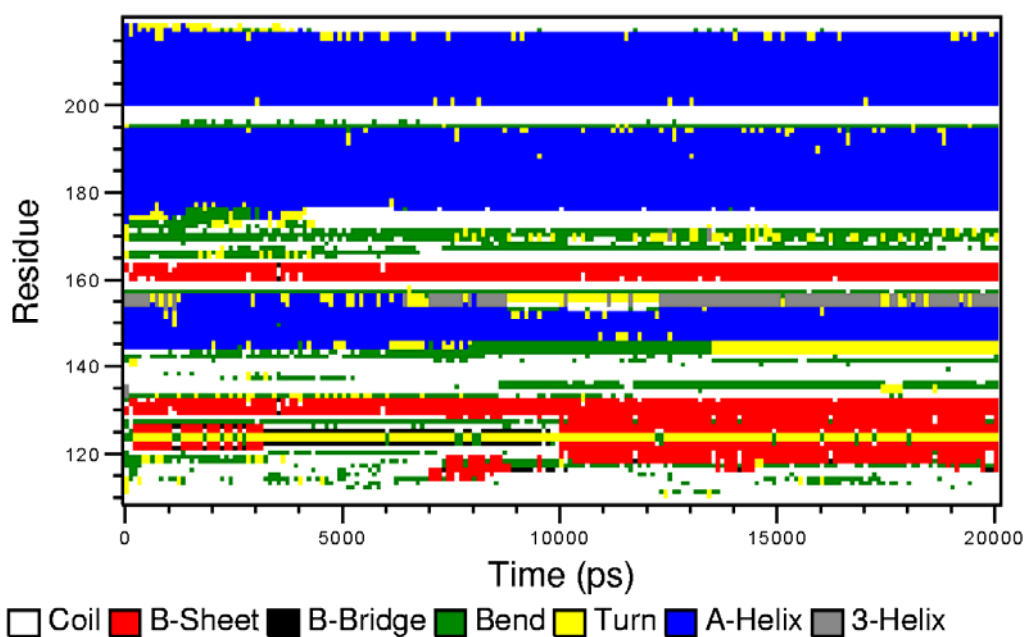


Figura 15: Gráfico de resíduos de aminoácidos do fragmento 109-219 NP em função do tempo. As cores branco, vermelho, preto, verde, amarelo, azul e cinza representam, respectivamente, estruturas secundárias do tipo coil, β -sheet, β -bridge, bend, turn, α -helix e 3-helix. Estas são os tipos de estruturas secundárias que os resíduos de aminoácidos podem assumir nos instantes de tempo ao longo da simulação.

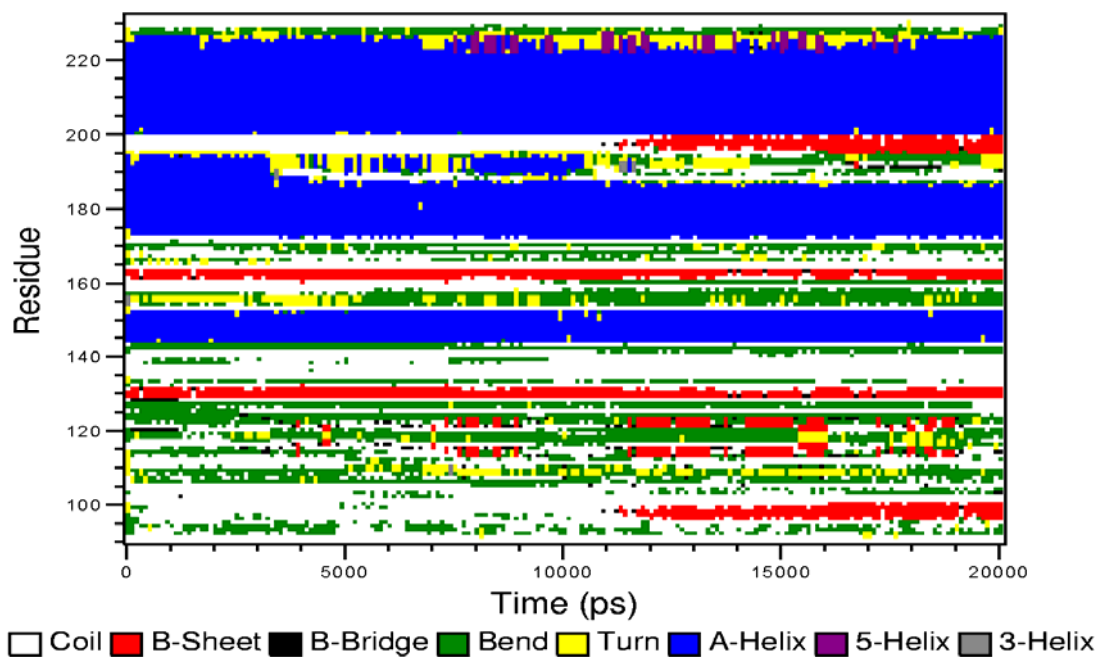


Figura 16: Gráfico de resíduos de aminoácidos do fragmento 90-231 P em função do tempo. As cores branco, vermelho, preto, verde, amarelo, azul, roxo e cinza representam, respectivamente, estruturas secundárias do tipo coil, β -sheet, β -bridge, bend, turn, α -helix, 5-helix e 3-helix. Estas são os tipos de estruturas secundárias que os resíduos de aminoácidos podem assumir nos instantes de tempo ao longo da simulação.

5. Discussão

A sequência de aminoácidos destacada em azul, na seção 3.6 (Protocolo de simulação) representa o fragmento de resíduos 109-219. Esta mesma sequência acrescida das extremidades em vermelho, representa o fragmento 90-231.

Os gráficos de RMSD de $C\alpha$ foram calculados tomando como referência estruturas correspondentes aos tempos de 0 ns de simulação. Nas Figuras 2 (a) e 2 (b) as curvas em preto representam o fragmento 109-219 P e são, obviamente, equivalentes. A Figura 2 (a) apresenta uma comparação das curvas de RMSD de $C\alpha$ dos fragmentos de resíduos 109-219 P e NP. Observa-se que a curva do fragmento P (em preto) atinge um patamar em torno de 0.6 nm nos últimos 5 ns de simulação. Enquanto a curva do fragmento NP (em vermelho) atinge um patamar em torno de 0.4 nm. Estes patamares representam a convergência do parâmetro analisado. No artigo de Alonso et. al.⁹ foram obtidos para o fragmento P e NP, respectivamente, valores em torno de 0.5 e 0.2 nm. Com isso, pode-se inferir que a relação entre os RMSD's dos fragmentos P e NP, produzidos no presente trabalho, é mantida conforme o apresentado no artigo de Alonso e. al.⁹. No entanto, os valores de RMSD obtidos neste trabalho são superiores aos apresentados pelo artigo de Alonso et al.⁹ Isto pode ser explicado pela utilização de campos de forças diferentes.

A Figura 2 (b) compara as curvas de RMSD de $C\alpha$ dos fragmentos protonados 109-219 e 90-231. A curva do fragmento 90-231 converge em torno de 1 nm. Com isso, constata-se que o aumento da cadeia polipeptídica é acompanhado de aumento no valor de RMSD. O que se mostra coerente com o fato de o desvio médio quadrático ter sido calculado sobre um maior número de átomos.

A Figura 3 (a) apresenta o gráfico de RMSF de $C\alpha$ dos fragmentos 109-219 P (em preto) e NP (em vermelho). Para o fragmento P foram observados picos e vales de RMSF. Relacionando a curva de RMSF do fragmento P com o gráfico da Figura 14 (que identifica o tipo de estrutura secundária que cada região deste fragmento apresenta) é possível identificar a mobilidade devida a cada tipo de estrutura secundária do fragmento em questão. Assim, são verificados os seguintes picos centrados nos resíduos 123 (mobilidade 0.15 nm), 143 (0.16 nm), 155 (0.13 nm) e 170 (0.17 nm). Todos estes picos representam regiões de

“bends”. Os vales são observados nos intervalos de resíduos 115-120 (com mínimo em torno de 0.1 nm), 125-135 (0.07 nm), 143-152 (0.06 nm), 161-165 (0.04 nm), 170-185 (0.06 nm) e 202-215 (0.03 nm). As regiões 115-120, 125-135 e 161-165 podem ser relacionadas com estruturas β -sheet, enquanto as regiões 143-152, 170-185 e 202-215 podem ser relacionadas com estruturas α -helix.

De maneira análoga, procede-se para o fragmento 109-219 NP (curva vermelha) apresentado na Figura 3 (a). Assim, pode-se destacar os seguintes picos de RMSF: centrados em 125 (mobilidade em torno de 0.18 nm), 135 (0.23 nm), 170 (0.17 nm) e 194 (0.1nm). Para relacionar o tipo de estrutura secundária com os picos citados, deve-se observar a Figura 15. Assim, verifica-se que o primeiro pico representa uma região de “turn”. O segundo e o terceiro picos estão relacionados com regiões de “bend”. Enquanto o quarto pico está relacionado com a região final de uma helix, sendo essa a causa da diminuição do pico com relação à estrutura protonada. Os vales podem ser observados nos intervalos de resíduos equivalentes à 128-132 (com mínimo em torno de 0.07 nm), 145-162 (0.04 nm), 175-190 (0.04 nm) e 196-216 (0.04 nm). O primeiro vale está relacionado com região de β -sheet, enquanto os demais vales estão relacionados com regiões de α -helix.

Comparando a curva de RMSF do fragmento 109-219 P simulado no presente trabalho com o apresentado no artigo de Alonso et al.⁹ constata-se: as hélices de resíduos 146-152, 200-213 possuem menores mobilidades que as apresentadas no artigo de Alonso et al.⁹, enquanto a hélice 173-186 possui aproximadamente a mesma mobilidade; os picos em 194 e 170 são, respectivamente, mais e menos acentuados do que os apresentados no artigo de Alonso et al.⁹ As regiões β -sheet 128-131 e 161-163 são levemente menos móveis que as do artigo⁹.

Analogamente, comparando a curva de RMSF do fragmento NP do presente trabalho com a produzida pelo artigo de Alonso et al.⁹, verifica-se: as regiões de hélices, produzidas neste trabalho, apresentam mobilidades levemente superiores; o pico em 170 é acentuadamente mais elevado no presente trabalho; o pico centrado em 135 não aparece no RMSF apresentado no artigo de Alonso et al.⁹; e, por fim, a menor mobilidade verificada na região N-terminal do artigo Alonso et al.⁹ deve-se ao surgimento de duas hélices nos resíduos 110-113 e 117-118. De maneira geral, o presente trabalho produziu uma menor diferença entre as curvas de RMSF de $C\alpha$ que a observada na publicação de Alonso et. al.⁹. Essa e outras diferenças podem ser explicadas pela utilização de campos de forças diferentes.

A comparação das curvas de RMSF dos fragmentos protonados 109-219 e 90-231 pode ser feita observando as Figuras 3 (a) e (b). Deve-se levar em conta, ainda, para tal comparação as Figuras 14 e 16 que mostram os tipos de estruturas secundária que apresentam as proteínas em questão. Destacam-se algumas diferenças na comparação destas estruturas: o pico em 190 sofreu sensível diminuição no fragmento 90-231, devido ao surgimento de uma β -sheet na região que separa duas hélices; o pico em 170 é atenuado cerca de 0.6 nm com relação ao fragmento 109-219; o pico em 120 apresentou significativo aumento, devido ao surgimento de uma “bend” na região que antes, no fragmento 109-219, fazia parte de uma β -sheet; por fim, o vale 143-152 apresenta aumento de cerca de 0.04 nm em seu ponto de mínimo, para o fragmento maior, aumentando com isso a mobilidade da α -helix verificada nesta região. O aumento da cadeia gerou um novo pico em 108 (com mobilidade de cerca de 0.22 nm). Verificou-se, ainda, que as extremidades C- e N-terminais do fragmento alongado possuem mobilidades muito maiores do que as verificadas nas extremidades do fragmento 109-219.

A Figura 4 (a) apresenta as curvas de raio de giro (RG) dos fragmentos 109-219 P e NP em função do tempo. Observa-se que a curva do fragmento NP é levemente inferior ao do P, indicando que o primeiro é mais compacto que o segundo. Observando, ainda, a Figura 4 (b) verifica-se que a curva do fragmento 109-219 P (curva preta) possui menor RG, sendo, portanto, mais compacta, que o fragmento 90-231 P (curva vermelha). Isso é coerente com o fato de a cadeia polipeptídica ter sido prolongada.

Nos gráficos da Figura 5 são apresentadas as curvas de superfície total (verde), hidrofóbica (preta) e hidrofílica (vermelha) acessíveis ao solvente. As Figuras 5 (a) e (b), são relativas, respectivamente, aos fragmentos 109-219 P e NP. A superfície acessível ao solvente (SAS) total, hidrofóbica e hidrofílica para o fragmento P ficam, respectivamente, em torno de 115, 57 e 57 nm². Enquanto para o NP, ficam em torno de 100, 52 e 48 nm². Os maiores valores obtidos para o fragmento P podem ser explicados pela protonação de seus resíduos His, Glu e Asp. Esta protonação diminui o número de sítios disponíveis para a realização de ligações de hidrogênio. Com isso, promove-se uma leve abertura da estrutura protéica e, conseqüentemente, é facilitado o acesso de moléculas de solvente no interior da macromolécula biológica.

Compara-se, ainda, os gráficos de SAS dos fragmentos protonados 109-219 e 90-231 apresentados, respectivamente, nas Figuras 5 (a) e (c). Observando a Figura 5 (c) constata-se

valores de SAS total, hidrofóbica e hidrofílica, respectivamente, próximas de 125, 60 e 65 nm². Esses valores são notadamente superiores aos observados na Figura 5(a) para o fragmento 109-219 P. Isto pode ser facilmente explicado pelo aumento do número de resíduos de aminoácidos da cadeia principal da proteína. Além disso, percebe-se que o aumento da cadeia também provocou o aumento do número de resíduos hidrofílicos acessíveis ao solvente, com relação aos hidrofóbicos.

As Figuras 6 (a) e (b) referem-se, respectivamente, às ligações de hidrogênio (LH) intramoleculares (proteína-proteína) e intermoleculares (proteína-solvente) dos fragmentos 109-219 P e NP. Em ambas figuras observa-se que o número de LH é superior para o fragmento NP (curvas em vermelho). O que é coerente com o fato deste fragmento não possuir seus resíduos His, Glu e Asp protonados. A não protonação deste fragmento possibilita um maior número de sítios disponíveis para o estabelecimento de ligações de hidrogênio.

As Figuras 7 (a) e (b) referem-se, respectivamente, às ligações de hidrogênio (LH) intramoleculares (proteína-proteína) e intermoleculares (proteína-solvente) do fragmento 90-231. O número de LH intramoleculares fica em torno de 100, enquanto o número de LH intermoleculares fica em torno de 300. Esses valores são ambos superiores aos apresentados para o fragmento 109-219 P (Figura 6). O que é coerente, pois o aumento da cadeia polipeptídica implica no aumento no número de sítios disponíveis para LH, tanto intra como intermoleculares.

As Figuras 8, 9 e 10 apresentam o número de resíduos envolvidos em tipos de estruturas secundárias ao longo da simulação. O fragmento 109-219 P (Figura 8) apresenta cerca de 10 resíduos β -sheet e 35 resíduos α -helix; o fragmento 109-219 NP apresenta 15 resíduos β -sheet e 44 α -helix; e, o fragmento 90-231 P apresenta 16 resíduos β -sheet e 48 resíduos α -helix. Assim, observa-se que, por influência do pH, é maior o número de resíduos β -sheet e α -helix para o fragmento 109-219 NP do que para o fragmento 109-219 P. Enquanto, por efeito do aumento da cadeia polipeptídica, tem-se um maior número de conteúdo β -sheet e α -helix para o fragmento P de maior cadeia principal. De maneira geral, todas as simulações promoveram aumento de estrutura β -sheet e diminuição de estrutura α -helix.

As Figuras 14, 15 e 16 apresentam uma relação de resíduos em função do tempo. As colorações mostradas nestas figuras indicam o tipo de estrutura secundária na qual cada

resíduo da proteína encontra-se envolvido ao longo do tempo de simulação. Assim, observando a Figura 14, constata-se para o fragmento 109-219 P: β -sheet nas regiões 118-120 (formada a partir de 5 ns), 128-131 e 161-163; β -bridges (formadas a partir de 13,5 ns) nas regiões 189-191 e 194-196; α -helix nas regiões 146-152, 173-186 e 200-213. Os finais das α -helix 200-213 e 173-186 são desnaturadas ao longo da simulação.

Observando a Figura 15 identificam-se as seguintes estruturas secundárias para o fragmento 109-219 NP: regiões β -sheet em 120-122, 125-127 (formada a partir de 10 ns), 129-133 (formada a partir de 10 ns) e 160-163; α -helix em 146-155, 176-193 e 200-216. A α -helix 146-155 sofre desnaturação nos resíduos iniciais e finais que a compõe, enquanto a α -helix 176-193 sofre desnaturação nos resíduos iniciais que a compõe.

Analisando a Figura 16, verifica-se para o fragmento 90-231 P: regiões β -sheet em 98-102 (formada a partir de 11 ns), 130-132, 162-164 e 195-199 (formada a partir de 11 ns); regiões α -helix em 145-153, 174-184 e 200-227 (esta sofre leve desnaturação nos resíduos finais). A α -helix 174-184 sofre forte desnaturação nos resíduos finais. Isso ocorre devido ao surgimento de uma β -sheet na região de separação das duas últimas α -helix da sequência.

Com o intuito de estabelecer a proximidade entre as estruturas secundárias (definidas a partir das Figuras 14, 15 e 16) das proteínas estudadas, foram empregados os mapas de contato de resíduos, apresentados nas Figuras 11, 12 e 13 (relativas ao tempo de 20 ns de simulação). Observando a Figura 11 (b) verifica-se, de fato, uma proximidade das regiões β -sheet 118-120, 128-131 e 161-163 pela representação de áreas brancas nas conexões entre estes fragmentos. As β -bridges, também, mostraram-se próximas entre si. No entanto, as β -bridges não apresentam contatos com as regiões β -sheet, o que corrobora a existência de um núcleo β -sheet formado por somente 3 β -strands.

Analisando a Figura 12 (b) observa-se, para o fragmento NP 109-219, que as strands 120-122, 125-127, 129-133 e 160-163 apresentam-se todas próximas umas das outras. Com isso, tem-se a formação de um núcleo β -sheet composto por 4 β -strands. E, analisando a Figura 13 (b) constata-se, para o fragmento 90-231 P, que a região 98-102 possui contato com a região 195-199. Por sua vez, a região 130-132 é próxima da região 162-164. Com isso, pode-se concluir que existem duas estruturas β -sheet, de duas β -strands cada, neste fragmento protéico.

As Figuras 11 (a), 12 (a) e 13 (a) (relativas ao tempo de 0 ns) mostram proximidade entre os resíduos N-terminais (região 109-135). Essa proximidade é alterada, para os três casos, com o passar do tempo de simulação. As imagens (c) e (d), apresentadas nas Figuras 11, 12 e 13, representam "fotos" das proteínas nos tempos de 0 e 20 ns, respectivamente.

6. Conclusões

Podem ser observadas significativas diferenças estruturais entre os fragmentos protéicos simulados neste trabalho e os propostos pelo artigo de Alonso et al.⁹. Baseados nos resultados deste, compreende-se o surgimento de β -bridges entre as α -helix finais do fragmento 109-219 P (simulado no presente trabalho) como um evento estrutural não esperado.

Os diferentes valores de RMSD e RMSF de C α também apontam para diferenças estruturais entre os fragmentos 109-219 P e NP produzidos neste trabalho e os apresentados por Alonso et al.⁹. Os resultados aqui explanados, indicam uma maior formação de estrutura β -sheet para o fragmento 109-219 simulado em pH neutro, com relação ao simulado em pH baixo. Esse resultado contradiz a proposta do artigo de Alonso et al.⁹, o qual sugere que o fragmento simulado em baixo pH conduz a um aumento significativo do conteúdo β -sheet com relação à simulação realizada em pH neutro.

O estudo da influência do pH na conversão PrP-sen \rightarrow PrP-res, realizado no presente trabalho, aponta que a escolha do campo de forças pode ter um papel chave na aquisição de conformações estruturais modelos para a proteína patológica responsável pelas doenças priônicas. Contudo, a produção de diferentes resultados obtidos pelo uso de diferentes campos de forças enfatiza a necessidade da reprodução dos experimentos utilizando um terceiro campo de forças, a exemplo do AMBER³⁰. Com isso, será possível avaliar se os resultados apresentados pelo artigo de Alonso et al.⁹ são factíveis ou se foram resultados de meros artifícios computacionais.

O aumento da cadeia polipeptídica também resultou em diferenças estruturais. Este aumento induziu conseqüente acréscimo na mobilidade dos resíduos N-terminais. Com isso, propiciou-se o pareamento de resíduos N-terminais com resíduos localizados entre as duas α -helix finais do fragmento 90-231 P. Este fenômeno não poderia ser observado para o fragmento 109-219, uma vez que os resíduos envolvidos em tal pareamento fazem parte, justamente, dos resíduos adicionados à cadeia.

Dentre todos os fragmentos simulados, o que parece ter apresentado maior constituição de um núcleo β -sheet, aos moldes do modelo proposto no artigo de Alonso et al.⁹,

é o 109-219 NP. No entanto, novas simulações devem ser realizadas utilizando um campo de forças diferente. Com isto, pretende-se avaliar a confiabilidade tanto das estruturas produzidas neste trabalho, como aquela estrutura proposta por Alonso et al.⁹ como unidade básica para o "modelo espiral".

Referências Bibliográficas

1. Doenças priônicas, SBPC, v. 37, nº 218, agosto 2005
2. Lledo, Pierre-marie. História das vacas loucas. Instituto Piaget, 2002, 1-160
3. Doenças por príons, SBPC, v. 33, nº 194, junho 2003
4. Prusiner, S. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95, 13363
5. James, T.; Liu, H.; Ulyanov, N.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94, 10086
6. Moore, R.; Taubner, L.; Priola, S.; Current Opinion in Structural Biology, 2009, 19, 14
7. http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31725&janela=1 (acessado em 03/12/2009, 9:10)
8. DeMarco, M.; Daggett, V.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004, 101, 2293
9. Alonso, D.; DeArmond, S.; Cohen, F.; Daggett, V.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, 98, 2985
10. DeMarco, M.; Silveira, J.;Caughey, B.; Biochemistry, 2006, 45, 15573
11. Martinez, L.; Borin, I; Skaf, M.; Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular, Livraria da Física, 2007, 413-451
12. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (acessado em 03/12/2009, 9:10)
13. Lesk, A.; Introdução à Bioinformática, Artmed, 2008, 148-155
14. Leach, A.; Molecular Modelling: Principles and Applications, Pearson Education, 2ª ed.,353-355
15. Amorim, H.; Netz, P.; Molecular Dynamics Simulations of Proteins: Theory and Applications, Research Signpost, 37, 661 (submetido à publicação)
- 16.Scheraga, H.; Khalili, M.; Liwo, A.; Annu. Rev. Phys. Chem., 2007, 58, 57
- 17., Spoel, D.; Kutzner, C.; Buuren, A.; Gromacs User Manual 4.0, 2006
18. Ziff, B; Computers in Physics, 1998, 12, 385
19. L. Connolly, J. Appl. Crystallogr. 1983, 16, 548
20. Guex N, Peitsch MC, ELECTROPHORESIS, 18, 15, 2714, 1997
21. Capbell, M. Bioquímica, 2007, 306-324

22. Kabsch, W.; Sander, C.; *Biopolymers*, 1983, 22, 2577
23. <http://mad-cow.org/^tom/hamster-pdb.html> (acessado em 27/11/2009, 16:00)
24. C. Oostenbrink, A. Villa, A.E. Mark and W.F. van Gunsteren
J. Comp. Chem., 2004, 25, 1656
25. H. J. C. Berendsen; J. P. M. Postma; W. F. van Gunsteren,; J. Hermans,
, D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, 1981, 33, 1342
26. U. Essman, L. Perela; M. L. Berkowitz; T. Darden, H. Lee; L. G. Pedersen, *J. Chem. Phys.* 103, 1995, pp. 8577-8592
27. Nose', *S. Mol. Phys.* 1984, 52, 525
28. M. Parrinello and A. Rahman, *J. Appl. Phys.* , 1981, 52, 7182
29. B. Hess; H. Bekker; H. J. C. Berendsen; J. G. E. M. Fraaije;
J. Comp. Chem. , 1997 , 18, 1463
30. Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz Jr, K. M.; Fergunson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.
J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 5179.