

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

COMPORTAMENTO CONFORMACIONAL DA UREASE DE
CANAVALIA ENSIFORMIS

Rodrigo Ligabue Braun

Porto Alegre – Brasil
Julho de 2010

COMPORTAMENTO CONFORMACIONAL DA UREASE DE *CANAVALIA ENSIFORMIS*

Rodrigo Ligabue Braun

Dissertação de mestrado elaborada no Grupo de Bioinformática Estrutural do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob orientação do professor doutor

Hugo Verli

e no Laboratório de Proteínas Tóxicas do Departamento de Biofísica e do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob orientação da professora doutora

Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini

Porto Alegre – Brasil

Julho de 2010

COMPORTAMENTO CONFORMACIONAL DA UREASE DE *CANAVALIA ENSIFORMIS*

Rodrigo Ligabue Braun

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Banca Examinadora:

Hugo Verli (Centro de Biotecnologia - UFRGS) (Presidente)

Célia R. Carlini (Centro de Biotecnologia e Depto. Biofísica - UFRGS) (Presidente)

Arthur Germano Fett Neto (Centro de Biotecnologia - UFRGS)

Hubert Karl Stassen (Instituto de Química - UFRGS)

Cristian Follmer (Instituto de Química - UFRJ)

Fernanda Stanisçuaski (Centro de Biotecnologia - UFRGS) (Suplente)

Esta dissertação foi realizada sob a orientação dos Professores Doutores Hugo Verli e Célia Regina Carlini, com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, junto ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

FICHA CATALOGRÁFICA

LIGABUE-BRAUN, Rodrigo.

**Comportamento conformacional da urease
de *Canavalia ensiformis***

Rio Grande do Sul, UFRGS, Centro de Biotecnologia, 2010.

Dissertação: Mestre em Ciências (Biologia Celular e Molecular)

1. Dinâmica Molecular
2. Ureases
3. Multifuncionalidade protéica
4. Modelagem molecular

I. Hugo Verli

II. Célia Regina Carlini

III. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Centro de Biotecnologia

IV. Títulos

AGRADECIMENTOS

Sinceros e amplos à Professora Célia e ao Professor Hugo, exemplos de conduta científica. Sinto-me honrado por ter sido aceito em seus grupos de pesquisa.

Aos membros da comissão de acompanhamento, Dra. Marilene Vainstein e, especialmente, Dra. Evelyn Schroeder, pelo suporte na fase embrionária desse projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Sílvia e ao Luciano, pelo profissionalismo e pelo bom humor, mantidos até nas situações mais peculiares.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite.

Aos alunos do Grupo de Bioinformática Estrutural e do Laboratório de Proteínas Tóxicas. Obrigado por me fazerem rir mesmo quando isso não é permitido.

Aos amigos. Aqueles pré- e extra-laboratório, os que estão comigo desde muito tempo. Qualquer coisa que eu escreva aqui vai parecer vulgar e inadequado em comparação ao que eu realmente sinto. “Obrigado”, então.

Aos meus pais e à minha irmã, pelo apoio incondicional (estendido, também, ao presente trabalho). Plagiando descaradamente o Dr. Randy Pausch, eu tirei a sorte grande na loteria dos pais e gostaria que todos soubessem disso.

*“The purpose of models is not to fit the data
but to sharpen the questions.”*

Samuel Karlin,

R. A. Fisher Memorial Lecture, Royal
Society of London, 20 de abril de 1983.

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| LISTA DE ABREVIATURAS | x |
| RESUMO | xi |
| ABSTRACT | xii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | xiii |
| 1 Introdução..... | 1 |
| 1.1 Ureases: um breve histórico | 1 |
| 1.2 Estrutura de ureases | 4 |
| 1.3 Propriedades catalíticas e catálise-dependentes em ureases..... | 8 |
| 1.4 Propriedades catálise-independentes em ureases..... | 11 |
| 1.5 Modelagem molecular comparativa..... | 13 |
| 1.6 O papel da dinâmica molecular na caracterização conformacional de biomoléculas..... | 15 |
| 2 Objetivos..... | 19 |
| 3 Metodologia | 20 |
| 3.1 Programas utilizados | 20 |
| 3.2 Construção do modelo estrutural da urease de <i>C. ensiformis</i> | 20 |
| 3.3 Simulações de DM..... | 21 |
| 3.3.1 Protocolo de simulação em nível atômico | 21 |
| 3.3.2 Protocolo de simulação <i>coarse-grained</i> | 22 |
| 3.3.3 Validação das simulações de DM..... | 24 |
| 4 Resultados..... | 25 |
| 4.1 Preâmbulo | 25 |
| Conformational characterization of a Jack bean (<i>Canavalia ensiformis</i>) urease | 26 |
| 5 Discussão geral..... | 50 |

| | | |
|-----|---|----|
| 5.1 | Estrutura e conformação da JBURE-IIB | 50 |
| 5.2 | A abordagem <i>coarse-grained</i> como ferramenta na simulação de biomoléculas..... | 52 |
| 6 | Conclusões..... | 54 |
| 7 | Perspectivas..... | 55 |
| 8 | Referências Bibliográficas | 56 |
| 9 | Apêndices..... | 70 |
| 9.1 | Apêndice A | 70 |
| 9.2 | Apêndice B | 71 |
| 9.3 | Apêndice C | 73 |
| 9.4 | Apêndice D | 75 |
| 9.5 | Apêndice E | 84 |
| 9.6 | Apêndice F | 86 |
| | Curriculum Vitæ..... | 88 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------|---|
| CG | <i>coarse-grained</i> |
| DM | dinâmica molecular |
| EC | Enzyme Comission |
| JBURE-I | urease de <i>Canavalia ensiformis</i> , isoforma predominante |
| JBURE-IIB | urease de <i>Canavalia ensiformis</i> , isoforma alternativa |
| MD | <i>molecular dynamics</i> |
| PDB | Protein Data Bank |
| PME | Particle-Mesh Ewald |
| RMN | ressonância magnética nuclear |

RESUMO

Ureases, apesar de sua importância histórica para a Bioquímica, ainda são enigmáticas. Pouco se sabe a respeito de suas propriedades não-catalíticas, por exemplo. Nesse contexto, o presente trabalho submeteu uma urease de *Canavalia ensiformis* (JBURE-IIB) a simulações de dinâmica molecular, nos níveis de detalhamento atômico e *coarse-grained*, buscando obter uma caracterização conformacional dessa urease, tanto como monômero quanto como trímero. Os dados assim obtidos sugerem que os domínios da proteína apresentam diferentes mobilidades, sendo o domínio γ o mais flexível. Esse domínio é também o principal responsável pela compactação do monômero da urease isolado, quando comparado à sua conformação cristalográfica. A mobilidade do domínio γ foi também associada ao processo de oligomerização da enzima. A forma trimérica da urease de *C. ensiformis* também se tornou mais compacta após a simulação, apontando as ureases como moléculas altamente flexíveis, principalmente devido às regiões de alças que conectam domínios estruturais, no caso de ureases vegetais. Sendo uma propriedade não necessariamente associada à catálise, a análise de tal flexibilidade pode auxiliar tentativas futuras de explicar a participação não-catalítica da urease em suas propriedades multifuncionais.

ABSTRACT

Ureases, despite their historical importance in biochemistry, are still enigmatic. For instance, little is known about their non-catalytic properties. In this context, the current work submitted a *Canavalia ensiformis* urease (JBURE-IIB) to molecular dynamics simulations at both atomistic and coarse-grained levels in order to obtain a conformational characterization of such urease in both monomeric and trimeric forms. The data suggest that the domains of the protein present different mobilities, with the γ domain being the most flexible one. This domain is also the main responsible for the compactness of the isolated urease monomer when compared to its crystallographic conformation. The γ domain mobility was also associated with the oligomerization process of the enzyme. The trimeric form of *C. ensiformis* urease also became more compact after simulation, pointing to ureases as highly flexible molecules, mainly due to coiled regions connecting the structural domains, in the case of plant ureases. As a property not necessarily related to catalysis, the analysis of this flexibility may enlighten further efforts to solve the non-catalytic aspects of urease in its moonlighting properties.

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Comparação esquemática das subunidades estruturais das ureases de organismos selecionados. O número de aminoácidos é apresentado à direita (adaptado de Sirko & Brodzik, 2000)..... | 4 |
| Figura 2: Estruturas tridimensionais das ureases nativas de <i>K. aerogenes</i> (PDB ID 1FWJ), <i>B. pasteurii</i> (PDB ID 2UBP) e <i>H. pylori</i> (PDB ID 1E9Z), coloridas por subunidades. | 6 |
| Figura 3: Estrutura tridimensional da urease de <i>B. pasteurii</i> (PDB ID 2UBP), colorida de acordo com a estrutura secundária (α -hélices em vermelho, β -fitas em amarelo, alças em verde). No detalhe, a aba do sítio ativo é apresentada em azul. São ainda apresentadas as subunidades estruturais α , β e γ | 7 |
| Figura 4: (A) Representação esquemática do sítio ativo das ureases (adaptado de Benini <i>et al.</i> , 1999). (B) Representação espacial do sítio ativo das ureases (estrutura de referência: PDB ID 2UBP). | 8 |
| Figura 5: Esquema da reação catalisada pelas ureases (adaptado de Estiu & Merz, 2007). | 9 |
| Figura 6: Passos na modelagem comparativa por homologia (adaptado de Fernandes, 2002). | 14 |
| Figura 7: Funções de energia que compõem o campo de força GROMOS. As funções dividem-se em físicas (<i>phys</i> , ①), que descrevem interações interatômicas, e especiais (<i>special</i> , ②), utilizadas com objetivos diferenciados, em diferentes tipos de restrições. As funções físicas dividem-se em funções que descrevem interações ligadas (<i>bonded</i> , ③) e não ligadas (<i>nonbondend</i> , ④). As primeiras dividem-se em equações que descrevem ⑤ o estiramento de ligações químicas, ⑥ ângulos de | |

ligação, ⑦ diedros impróprios e ⑧ diedros próprios; enquanto as últimas descrevem interações intermoleculares do tipo ⑨ interações de Lennard-Jones e ⑩ interações de carga (baseado em Scott *et al.*, 1999)..... 16

Figura 8: Funções de energia que compõem o campo de força MARTINI. As funções dividem-se em funções que descrevem interações ligadas (*bonded*, ①) e não ligadas (*nonbonded*, ②). As primeiras dividem-se em equações que descrevem ③ o estiramento de ligações químicas, ④ ângulos de ligação, ⑤ diedros impróprios e ⑥ diedros próprios; enquanto as últimas descrevem interações intermoleculares do tipo ⑦ potencial de Lennard-Jones e ⑧ interações eletrostáticas (baseado em Monticelli *et al.*, 2008)..... 18

Figura 9: Representação *coarse-grained* para aminoácidos. Cores diferentes representam diferentes classes de *beads* (adaptado de Monticelli *et al.*, 2008). 23

Figure 1. (A) JBURE-IIB structural scheme, highlighting its three domains; (B-D) All-atom RMSD from original model for metal-bound (grey) and metal-free (black) JBURE-IIB, separated by domain: (B) α -domain, (C) β -domain, (D) γ -domain all based on GROMOS96 43a1 force field simulations. 32

Figure 2. All-atom RMSD, from GROMOS96 43a1 force field simulations, for the original model separated by domains for (A) metal-free JBURE-IIB and (B) metal-bound JBURE-IIB. The RMSD for coils is colored red, for helices+strands in blue and the total RMSD is colored black..... 34

Figure 3. RMSF analyses, from GROMOS96 43a1 force field simulations, as a function of both residue number and time for (A) metal-free and (C) metal-bound JBURE-IIB; and solely as a function of residue number (B) (where black represents metal-free and red represents metal-bound urease; structural domains are marked). Residues involved in catalysis are highlighted with red tick marks in panel A. 35

- Figure 4. (A) Interdomain distance fluctuations for monomeric urease and (B) radii of gyration of urease in its monomeric and trimeric forms, both based on MARTINI force field simulations. 37
- Figure 5. Conformational changes, from MARTINI force field simulations, of the (A) urease monomer, (B) urease trimer and (C) trimer-forming urease monomers, set apart to show less-evident conformational differences. Structural domains are colored in red for α domain, blue for β domain and green for γ domain..... 38
- Figure 6. Differences in flexibility, from MARTINI force field simulations, between isolated and oligomerized urease monomers. (A) Structural representation of the regions showing differences in flexibility as identified by RMSF in (B) (colored as black). The right panel illustrates the potential interaction character of these regions when considering the oligomerized urease, giving a rationale for the increased flexibility of these regions in the isolated urease monomer. (B) Root mean square fluctuations (RMSF) for the isolated JBURE-IIB monomer (black) and for the monomeric components in the JBURE-IIB trimer (red, green and blue). I, II and III indicate regions of the isolated monomer with remarkable increase in flexibility when compared to the oligomerized monomers. 39
- Figure 7S. Distance fluctuation, from GROMOS96 43a1 force field simulations, between different catalytically-relevant residues showing the active site stability (black represents metal-free and grey represents metal-bound urease). 47
- Figure 8S. Distance fluctuation, from GROMOS96 43a1 force field simulations, between the catalytically-relevant residues and the two Zn^{+2} atoms (grey represents Zn1 and black represents Zn2)..... 48
- Figure 9S: Protein flexibility, from GROMOS96 43a1 force field simulations, as described by interdomain distance fluctuations. (A) α - β distance fluctuation; (B) α - γ

distance fluctuation; (C) β - γ distance fluctuations; (D) α -active-site flap distance fluctuation (black represents metal-free and grey represents metal-bound urease). 49

Figura 10: Cortes "transversais" dos trímeros de JBURE-IIB em (A) sua forma cristalográfica e (B) após 1,05 μ s de simulação *coarse-grained*. 53

1 Introdução

1.1 Ureases: um breve histórico

Ureases (uréia amidohidrolases, EC 3.5.1.5) são enzimas amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em plantas, fungos e bactérias. Mesmo apresentando organizações estruturais diferentes, todas as ureases possuem a mesma propriedade catalítica: hidrolisar uréia a amônia e ácido carbâmico (Krajewska, 2009).

Tanto a uréia quanto ureases representam marcos da investigação científica (Mobley *et al.* 1995). A uréia foi descoberta em 1773, por Hillaire Rouelle, em urina humana, tornando-se posteriormente o primeiro composto orgânico a ser sintetizado a partir de compostos inorgânicos, por Wöhler, em 1828. Em 1798, Fourcroy e Vauquelin propuseram que a amônia da urina provinha da fermentação da uréia, mas o isolamento do primeiro microorganismo ureolítico (*Micrococcus ureae*), por van Teghem, deu-se apenas em 1864. Em 1874, Musculus obteve uma enzima ureolítica a partir de urina pútrida, sendo tal enzima chamada, a partir de 1890, de *urease*, conforme proposição de Miquel (dados retirados de Fearon, 1923).

A urease tornou-se amplamente disponível a partir de 1909, quando Takeuchi e Inone descobriram que sementes de soja (*Glycine max*) eram ricas nesta enzima. Este trabalho foi, também, o primeiro a identificar a urease nos chamados vegetais superiores. Em 1916, Matter e Marshall descobriram que o feijão-de-porco, ou *Jack bean* (*Canavalia ensiformis*), apresentava até quinze vezes mais urease que a soja, transformando-o em material ideal para estudos dessa enzima (dados retirados de Sumner, 1937).

Em 1926, James Sumner cristalizou a urease a partir de feijão-de-porco (Sumner, 1926), sendo este trabalho de importância fundamental para a Bioquímica ao demonstrar, pela primeira vez, que enzimas são proteínas e que podem ser cristalizadas. À época (e até meados da década de 1930), as enzimas eram consideradas compostos diferentes de todos os outros conhecidos até então (sendo descritas como colóides possivelmente associados a proteínas), o que dificultou a aceitação e a divulgação adequada deste trabalho pioneiro (Sumner, 1937). Em 1946, Sumner recebeu um Prêmio Nobel pela “descoberta de que enzimas podem

ser cristalizadas”, sendo tal prêmio dividido com John Northrop e Wendell Stanley pela “preparação de enzimas e proteínas virais em forma pura”.

Em 1975, em trabalho igualmente importante, liderado por Zerner, foi demonstrado que a urease de feijão-de-porco possuía íons de níquel em seu sítio ativo e que estes eram essenciais para catálise (Dixon *et al.*, 1975). Até então, o níquel era tratado como um metal sem relevância biológica (Thauer, 2001), mesmo quando consideradas as dificuldades analíticas que impediam uma análise adequada deste metal naquela época (Zerner, 1991). Além da urease, outras cinco enzimas contendo níquel foram descritas até o momento, todas apresentando sítios catalíticos únicos e catalisando reações diferentes: metil-coenzima A redutase, Ni-Fe hidrogenase, Ni-CO desidrogenase, acetil-CoA sintase/decarboxilase e superóxido dismutase contendo níquel (Ermler *et al.*, 1998, Thauer, 2001).

Desde a descoberta de sua presença em soja, em 1909, a urease tem sido alvo de intensas pesquisas, incluindo análises de sua ocorrência e papel na natureza; mecanismo e especificidade de ação; reação a compostos diversos; seqüenciamento; organização gênica e cristalização (Krajewska, 2009). Um trabalho desenvolvido por nosso grupo descreveu uma neurotoxina oriunda do feijão-de-porco, a canatoxina (Carlini & Guimarães, 1981), que posteriormente foi identificada como uma isoforma da urease majoritária da planta (Follmer *et al.*, 2001). Interessantemente, as propriedades neurotóxicas da canatoxina mostraram-se independentes de sua capacidade ureolítica, o que deu início à busca de outras propriedades catálise-independentes em ureases (Carlini & Polacco, 2008).

Considera-se que o papel principal de ureases seja o de permitir que os organismos utilizem a uréia, gerada interna ou externamente, como fonte de nitrogênio (Jabri *et al.*, 1995, Krajewska, 2009). Além deste papel, todavia, as ureases apresentam grande versatilidade de aplicações, podendo atuar no transporte de nitrogênio, na defesa em plantas e na neutralização do ambiente gástrico de mamíferos para colonização bacteriana (Ha *et al.*, 2001).

Além das plantas, algumas bactérias, fungos e raramente invertebrados sintetizam ureases. As ureases animais são pouco caracterizadas, tendo sido identificadas como coadjuvantes no processo de formação de inclusões de carbonato de cálcio no molusco *Aplysia californica* (Pedrozo *et al.*, 1996a,b). É possível, nesse caso, que a urease seja oriunda de alguma bactéria simbiote, e não produzida pelo próprio molusco. Além disso, foi demonstrado que o bicho-da-

seda (*Bombyx mori*) não sintetiza urease, utilizando em seu metabolismo a enzima absorvida da dieta (constituída exclusivamente por folhas da amoreira *Morus alba*), indicando que a urease vegetal passa intacta do intestino à hemolinfa, estando associada à degradação de uréia após o estágio ingestivo do inseto (Hirayama *et al.*, 2000a).

As ureases têm papel importante na patogênese de várias espécies bacterianas, incluindo *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophiticus*, *Yersinia enterocolitica* e *Ureaplasma urealiticum* (Mobley *et al.*, 1995). O exemplo mais freqüente na literatura é o da urease de *Helicobacter pylori*, devido à alta prevalência desse microorganismo como patógeno humano e pelo papel essencial da enzima em sua patogênese (Eaton *et al.*, 1991, Sirko & Brodzik, 2000, Olivera-Severo *et al.*, 2006).

A atividade ureásica foi encontrada em várias espécies de fungos, mas a descrição genética correspondente está disponível para apenas algumas delas (Sirko & Brodzik, 2000). Exemplos incluem *Schizosaccharomyces pombe* (Tange & Niwa, 1997) e os patógenos humanos *Coccidioides immitis* (Yu *et al.*, 1997) e *Cryptococcus neoformans* (Cox *et al.*, 2000).

Em relação a ureases de plantas, os dados genéticos mais abrangentes estão disponíveis para soja (*G. max*) (Polacco & Holland, 1993, Polacco & Holland, 1994). Genes separados, que codificam duas isoformas da urease, uma ubíqua e uma embrião-específica, assim como genes não ligados, codificadores de proteínas acessórias, foram identificados em soja (Meyer-Bothling & Polacco, 1987). A urease embrião-específica é uma proteína abundante em sementes de várias espécies de plantas, incluindo soja, feijão-de-porco (Polacco & Holland, 1994) e *Arabidopsis thaliana* (Zonia *et al.*, 1995), enquanto a forma ubíqua é encontrada em baixas quantidades nos tecidos vegetativos da maioria das plantas (Sirko & Brodzik, 2000).

Recentemente, a urease das folhas da amoreira *M. alba* foi purificada e caracterizada (Hirayama *et al.*, 2000b), bem como a urease das sementes do algodoeiro, *Gossypium hirsutum* (Menegassi *et al.*, 2008). Entretanto, bioquimicamente, a urease vegetal melhor caracterizada é a isoforma majoritária da urease de *C. ensiformis*, JBURE-I (Hirai *et al.*, 1993, Karmali & Domingos, 1993, Riddles *et al.*, 1991, Takishima *et al.*, 1988). Sabe-se menos a respeito das isoformas minoritárias, sendo reconhecidas pelo menos duas: a canatoxina (Carlini

et al., 1997; Follmer *et al.*, 2001) e a JBURE-IIB (Pires-Alves *et al.*, 2003, Mulinari, 2008).

1.2 Estrutura de ureases

As ureases de plantas e fungos são proteínas homo-oligoméricas (isto é, formadas por subunidades idênticas), enquanto as ureases bacterianas são multímeros formados por complexos de duas ou três subunidades (Mobley *et al.*, 1995, Tange & Niwa, 1997). Observa-se uma similaridade significativa entre as seqüências peptídicas de todas as ureases conhecidas (Sirko & Brodzik, 2000). Resíduos amino-terminais dos monômeros das enzimas fúngicas e vegetais são similares aos das subunidades menores das enzimas bacterianas, enquanto as subunidades maiores de ureases bacterianas assemelham-se às porções carboxi-terminais de ureases de plantas e fungos (Figura 1). A alta similaridade entre as seqüências de ureases indica que são todas variantes de uma mesma enzima e que, provavelmente, possuem estruturas terciárias e mecanismos catalíticos similares (Mobley *et al.*, 1995), o que permite que dados obtidos para ureases bacterianas sejam extrapolados para as enzimas vegetais (Follmer, 2008).

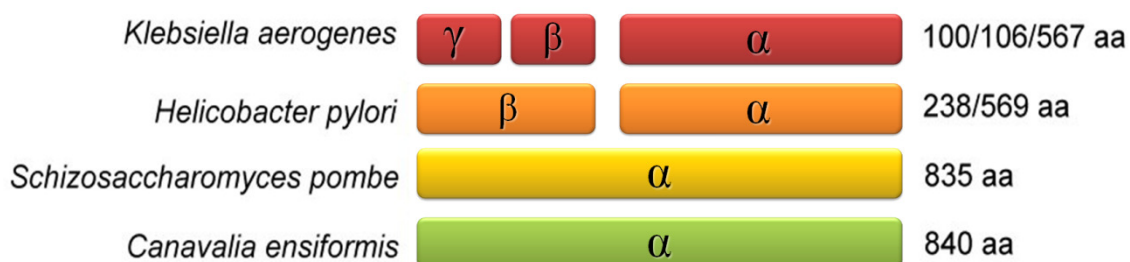


Figura 1: Comparação esquemática das subunidades estruturais das ureases de organismos selecionados. O número de aminoácidos é apresentado à direita (adaptado de Sirko & Brodzik, 2000).

As subunidades idênticas que compõem as ureases de plantas e fungos (com aproximadamente 90 kDa cada) são geralmente organizadas em trímeros α_3 ou hexâmeros α_6 (Krajewska, 2009). Exemplos de ureases vegetais homo-hexaméricas incluem as enzimas de soja (*G. max*), feijão-de-porco (*C. ensiformis*), feijão-guandu (*Cajanus cajan*) e sementes de algodoeiro (*G. hirsutum*) (Polacco & Havir, 1979, Das *et al.*, 2002, Menegassi *et al.*, 2008). Organizações alternativas incluem α_2 para canatoxina, urease de amoreira (*M. alba*) e do fungo *S. pombe* e α_4 para urease do

fungo *C. immitis* (Lubbers *et al.*, 1996, Hyraiyama *et al.*, 2000b, Follmer *et al.*, 2001, Mirbod *et al.*, 2002).

As ureases bacterianas são compostas por três subunidades distintas, uma maior (α , 60-76 kDa) e duas menores (β , 8-21 kDa e γ , 6-14 kDa) (Figura 1), geralmente formando trímeros do tipo $(\alpha\beta\gamma)_3$ (Sirko & Brodzik, 2000, Krajewska, 2009). Os exemplos típicos são as ureases de *Klebsiella aerogenes* (Jabri *et al.*, 1995) e de *Bacillus pasteurii* (Benini *et al.*, 1999). Organizações alternativas incluem $(\alpha\beta\gamma)_4$ para a enzima de *Staphylococcus saprophyticus* (Schäfer & Kaltwasser, 1994) e $(\alpha\beta\gamma)_5$ para a de *Staphylococcus leei* (Jin *et al.*, 2004). Em contraste à organização geral das ureases bacterianas, as ureases de *Helicobacter* spp. são compostas por duas subunidades, α (61-66 kDa) e β (26-31 kDa), que em *Helicobacter pylori* se organizam em um complexo dodecamérico $((\alpha\beta)_3)_4$ (Ha *et al.*, 2001).

Até o momento, apenas ureases bacterianas tiveram suas estruturas tridimensionais definidas por cristalografia de raios X. As estruturas das enzimas de *K. aerogenes* (PDB ID 1FWJ), *B. pasteurii* (PDB ID 2UBP) e *H. pylori* (PDB ID 1E9Z) foram determinadas e analisadas¹ (Figura 2) (Jabri *et al.*, 1995, Benini *et al.*, 1999, Ha *et al.*, 2001). Mesmo sendo a primeira enzima cristalizada (Sumner, 1926), apenas a cristalização e a análise preliminar por raios X da urease de *C. ensiformis* foram descritas (Jabri *et al.*, 1992, Sheridan *et al.*, 2002, Balasubramanian & Ponnuraj, 2009). Dados preliminares sobre cristalização da urease de *Cajanus cajan* (feijão-guandu) foram publicados recentemente (Balasubramanian & Ponnuraj, 2008)².

¹ Uma listagem detalhada das estruturas tridimensionais de ureases e suas variantes, depositadas no Protein Data Bank, encontra-se no Apêndice A.

² Durante a etapa final de redação da presente dissertação, foi publicado um artigo descrevendo a estrutura 3D da urease majoritária de *C. ensiformis*, JBURE-I, obtida por cristalografia de raios X (Balasubramanian & Ponnuraj, 2010). Entretanto, a referida estrutura não foi disponibilizada no PDB até o momento, impedindo análises aprofundadas. Por esse motivo, o presente texto mantém a informação de que não há disponibilidade de uma estrutura de urease de cadeia única determinada por cristalografia de raios X.

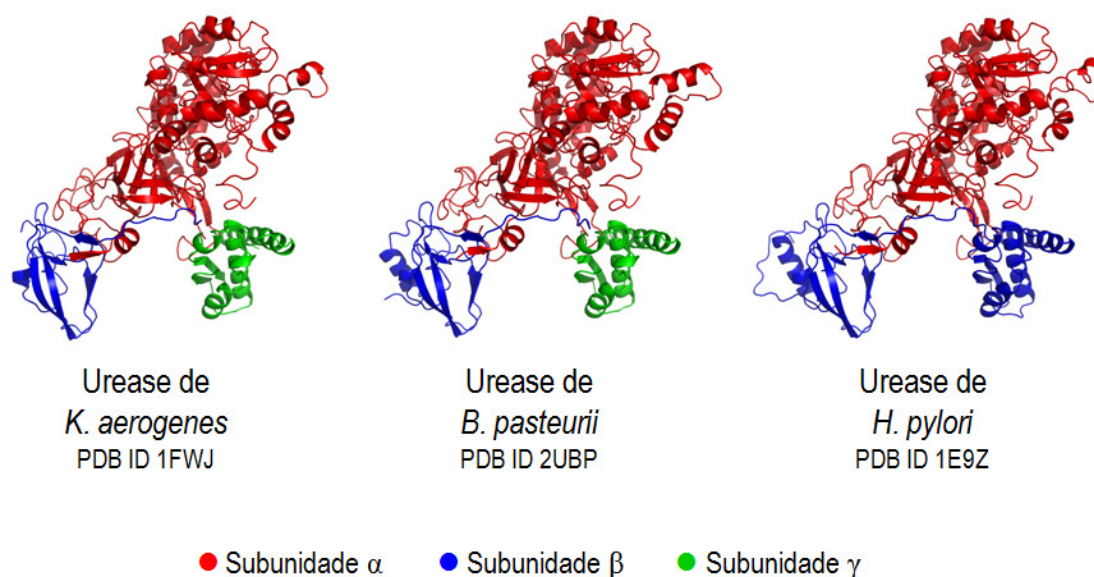


Figura 2: Estruturas tridimensionais das ureases nativas de *K. aerogenes* (PDB ID 1FWJ), *B. pasteurii* (PDB ID 2UBP) e *H. pylori* (PDB ID 1E9Z), coloridas por subunidades.

As ureases apresentam um enovelamento típico das amidohidrolases, caracterizado pela presença de um barril $(\alpha\beta)_8$ (barril TIM) ligeiramente distorcido, onde se localiza o sítio ativo com dois átomos de níquel, seguido por um conjunto de fitas β (Nagano *et al.*, 2002), ambos formando a subunidade α (ou domínio α , no caso de ureases de plantas e fungos). A subunidade β apresenta predominantemente estruturas em β folhas, enquanto a subunidade γ é formada por estruturas $\alpha\beta$ (Jabri *et al.*, 1995) ([Figura 3](#)).

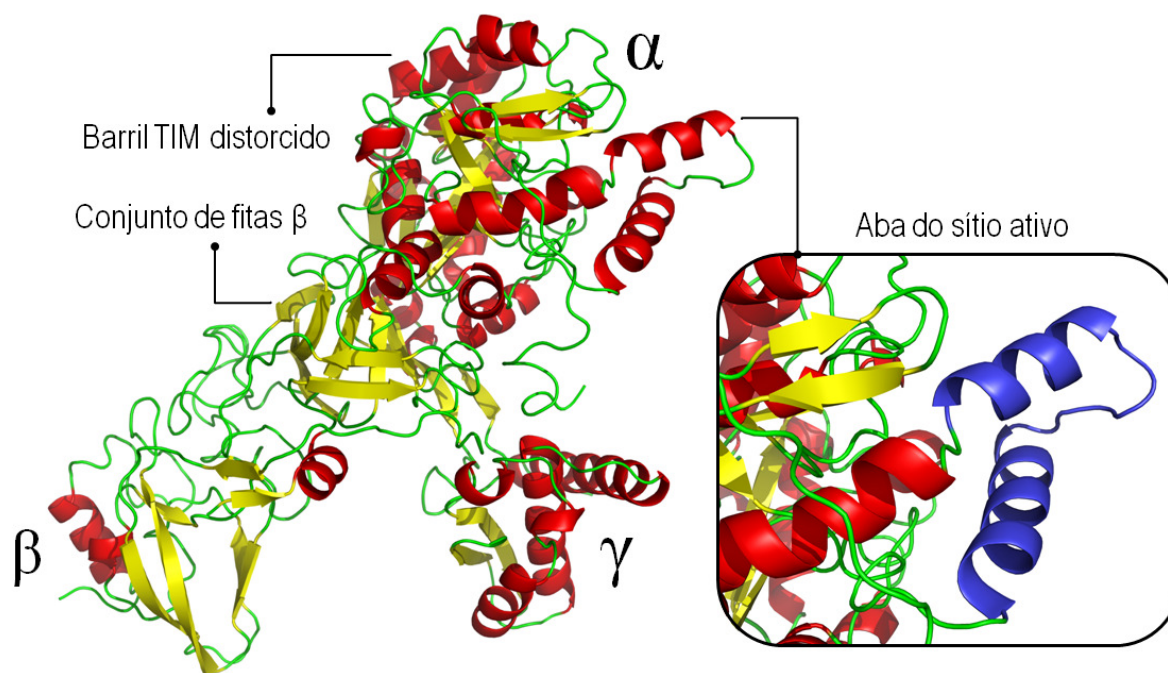


Figura 3: Estrutura tridimensional da urease de *B. pasteurii* (PDB ID 2UBP), colorida de acordo com a estrutura secundária (α -hélices em vermelho, β -fitas em amarelo, alças em verde). No detalhe, a aba do sítio ativo é apresentada em azul. São ainda apresentadas as subunidades estruturais α , β e γ .

Uma estrutura do tipo hélice-volta-hélice forma uma aba (*flap*) sobre o sítio ativo, sendo esta associada à alta especificidade das ureases pelo seu substrato, a uréia (Jabri *et al.*, 1995). Esta aba, por mecanismos ainda não totalmente elucidados, encontrar-se-ia aberta enquanto a enzima não recebesse do meio o substrato, fechando-se de forma simultânea à aproximação e entrada da uréia no sítio ativo (Benini *et al.*, 1999, Benini *et al.*, 2001). A movimentação desta aba seria facilitada por regiões sem estrutura secundária definida (alças), que são conformacionalmente mais flexíveis.

A resolução das estruturas cristalográficas de três ureases bacterianas permitiu uma melhor análise do sítio ativo destas enzimas. É importante destacar que estes são praticamente sobreponíveis, o que implica que um mesmo perfil de enovelamento deva ser comum a todas as ureases (Krajewska, 2009). O sítio ativo possui um centro binuclear de níquel. Os íons de níquel(II) são ligados a uma lisina carbamilada (KCX490)³ por meio de seus átomos de oxigênio, com o Ni(1), coordenado com duas histidinas (H519 e H545) por meio de seus átomos de nitrogênio, e com o Ni(2), coordenado também pelos átomos de nitrogênio de duas

³ A numeração apresentada corresponde à numeração dos resíduos da JBURE-IIB.

histidinas (H407 e H409) e, adicionalmente, pelo átomo de oxigênio do ácido aspártico (D633) (Figura 4). Além disso, os íons de Ni^{+2} estão conectados a um íon hidróxido (WB) que, juntamente com duas moléculas de água terminais, W1 no Ni(1) e W2 no Ni(2), e W3, próxima à saída do sítio ativo, forma um agrupamento tetraédrico de água unido por ligações de hidrogênio, que preenche a cavidade do sítio ativo. É esse agrupamento que a uréia substitui quando na reação catalisada pela urease (Estiu *et al.*, 2006).

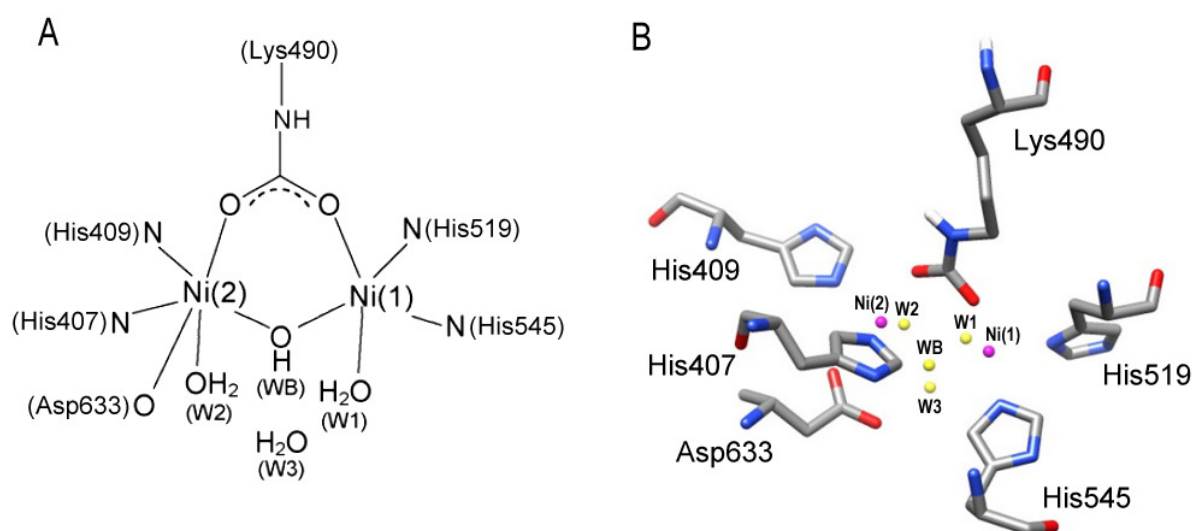


Figura 4: (A) Representação esquemática do sítio ativo das ureases (adaptado de Benini *et al.*, 1999). (B) Representação espacial do sítio ativo das ureases (estrutura de referência: PDB ID 2UBP).

1.3 Propriedades catalíticas e catálise-dependentes em ureases

A urease é considerada uma das enzimas mais proficientes conhecidas até o momento (Krajewska, 2009). Devido principalmente ao fato de a hidrólise não catalisada da uréia nunca ter sido observada, é difícil estabelecer um valor inequívoco para a proficiência da enzima. Baseando-se em comparações com a reação não catalisada de eliminação, esse valor foi estimado em 10^{14} , enquanto estudos teóricos propuseram um valor de 10^{32} (Estiu & Merz, 2004a).

Os mecanismos de hidrólise da uréia catalisados pela urease (Figura 5) atualmente considerados são aqueles propostos por Karplus *et al.* (1997) e por Benini *et al.* (1999). Baseados em trabalhos anteriores, eles assumem que, no sítio ativo da enzima, a uréia liga-se ao íon Ni(1), mais eletrofílico, ao átomo de oxigênio do grupo carbonila, tornando o carbono da uréia mais eletrofílico e, portanto, mais susceptível a ataque nucleofílico. Após tomar o lugar das moléculas de água W1-

W3, a uréia liga-se ao Ni(2), por meio do átomo de nitrogênio de um dos seus grupos amino, tornando sua ligação bidentada com a urease. Acredita-se que essa ligação facilite o ataque nucleofílico da água sobre o átomo carbono do grupo carbonila, resultando na formação de um intermediário tetraédrico, do qual NH₃ e carbamato são liberados. Enquanto Benini e colaboradores (1999) propõem que o ataque nucleofílico é executado pelo hidróxido-ponte, que atua também como ácido geral, fornecendo prótons para o grupo NH₃, Karplus e colaboradores (1997) defendem que é uma histidina, localizada na aba do sítio ativo, que age como ácido geral nessa protonação. Ainda, Karplus e colaboradores (1997) consideram como possibilidade alternativa a ligação monodentada da urease ao Ni(1), com o Ni(2) fornecendo a molécula de água como nucleófilo para o átomo de carbono do grupamento carbonila da uréia. Adicionalmente, Estiu & Merz (2007) propõem que os mecanismos de hidrólise e eliminação poderiam ocorrer de maneira competitiva na urease, e que um mecanismo batizado por eles de “eliminação assistida por proteína” seria favorecido. Considera-se, atualmente, que os mecanismos catalíticos propostos para a urease apresentam várias controvérsias que permanecem não esclarecidas (Krajewska, 2009).

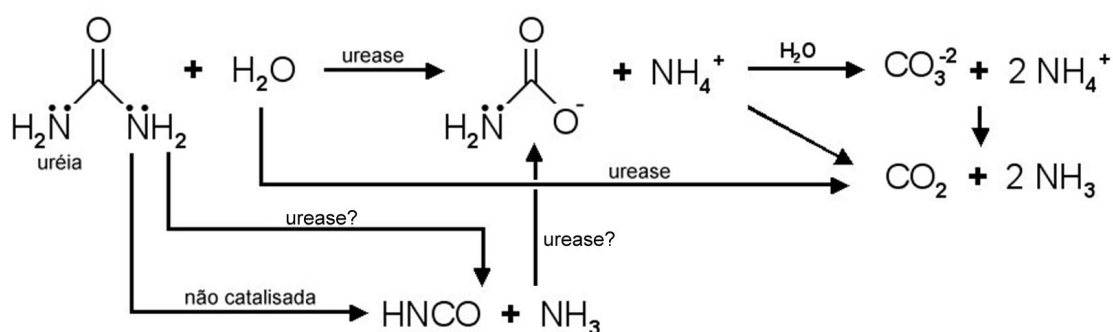


Figura 5: Esquema da reação catalisada pelas ureases (adaptado de Estiu & Merz, 2007).

Independente da maneira como ocorre, a hidrólise da uréia possui papel importante em diversos organismos. Em plantas, a urease se junta à arginase e à glutamina sintetase no grupo das enzimas-chave no metabolismo de uréia. Nesses organismos, quantidades significativas de nitrogênio fluem na forma de uréia, derivada da arginina e, possivelmente, da degradação de purinas e ureídos (Polacco & Holland, 1994). O nitrogênio presente na uréia não está disponível para a planta até que seja hidrolisado pela urease. Após a hidrólise, a amônia gerada é

incorporada em compostos orgânicos por meio da glutamina sintetase, principalmente (Sirko & Brodzik, 2000).

Ureases também possuem papel importante na germinação e no metabolismo de nitrogênio das plântulas, podendo atuar conjuntamente à arginase na utilização das reservas protéicas da semente durante a germinação (Polacco & Holland, 1993). Enquanto a urease ubíqua (encontrada em virtualmente todos os tecidos vegetais) é responsável pela reciclagem da uréia oriunda do metabolismo da planta, a urease embrião-específica, originalmente descrita para soja, tem papel fisiológico desconhecido. É proposto que ela esteja envolvida na proteção contra predadores devido à toxicidade da amônia produzida (Polacco & Holland, 1994, Follmer, 2008), embora mecanismos adicionais de toxicidade, independentes da atividade catalítica da enzima, venham sendo propostos (ver adiante).

Entre as bactérias ureolíticas, as patogênicas são as mais frequentemente estudadas, uma vez que a patogênese é devida a efeitos da hidrólise da uréia, ocasionando aumento do pH e toxicidade pela amônia e seus derivados (Burne & Chen, 2000). A uréia é o principal produto de excreção de nitrogênio da maioria dos animais terrestres, sendo amplamente disponível para bactérias ureolíticas. Em humanos, os sistemas urinário e digestório são os locais mais comuns de infecção por essas bactérias (Burne & Chen, 2000, Follmer, 2010).

O aumento do pH da urina pode causar várias complicações em humanos, incluindo a precipitação de íons solúveis presentes na urina, causando a formação de cálculos renais e, em casos extremos, a necrose do tecido renal. Tais cálculos são compostos, principalmente, por estruvita e apatita, e seu principal agente causador é a bactéria *Proteus mirabilis* (Moblely *et al.*, 1995, Burne & Chen, 2000). No trato digestório, a bactéria ureolítica *Helicobacter pylori* é o principal causador de infecção. Ela normalmente coloniza a mucosa estomacal, aumentando localmente o pH altamente ácido, o que permite que a bactéria sobreviva nesse ambiente hostil (Ha *et al.*, 2001). Simultaneamente, ocorre dano ao tecido do hospedeiro, causando gastrite e úlceras gastrointestinais. Os principais agentes danosos são amônia, derivada da ureólise, e monocloramina (NH₂Cl), derivada da reação oxidativa das células imunitárias (Burne & Chen, 2000, Follmer, 2010).

A atividade ureolítica que ocorre no solo é de grande importância para a agricultura. Apesar de microrganismos serem relevantes para esse processo, ele deriva principalmente das chamadas “ureases de solo” (Bremner & Krogmeier,

1989). Essas ureases são resíduos de plantas e células bacterianas mortas, e sua estabilidade no meio extracelular se deve à imobilização em argilas e substâncias húmicas do solo (Gianfreda *et al.*, 1995). A alta estabilidade destas ureases é o que permite que a uréia seja utilizada como fertilizante de maneira eficiente (Krajewska, 2009). Adicionalmente, as ureases podem promover a formação de carbonato de cálcio em sedimentos geológicos, solos, e águas naturais. Apesar de não estar totalmente resolvido, o papel das ureases bacterianas nesse processo parece ser triplo, aumentando a alcalinidade de forma favorável à precipitação de CaCO_3 , aumentando a concentração de carbono inorgânico dissolvido no meio e, por fim, servindo de sítio de nucleação para os cristais (Castanier *et al.*, 1999, Métayer-Levrel *et al.*, 1999).

1.4 Propriedades catálise-independentes em ureases

A capacidade de catalisar a hidrólise de uréia a amônia e ácido carbâmico é considerada a característica fundamental das ureases. Tem-se demonstrado, entretanto, que essas enzimas são proteínas multifuncionais, apresentando várias propriedades independentes da catálise.

Descoberta em 1981, a canatoxina é uma proteína altamente tóxica de *C. ensiformis* que induz convulsão e morte em ratos e camundongos quando injetada intraperitonealmente (Carlini & Guimarães, 1981). Posteriormente, a canatoxina foi identificada como uma isoforma menos abundante de urease (Follmer *et al.*, 2001) e uma família de genes relacionados a ureases foi descoberta nessa planta (Pires-Alves *et al.*, 2003). Além de neurotóxica em mamíferos, essa isoforma de urease apresenta atividade inseticida contra besouros (Coleoptera) e percevejos (Hemiptera), propriedade esta compartilhada com a isoforma majoritária da enzima de *C. ensiformis* e com a urease ubíqua de soja (Carlini *et al.*, 1997, Carlini & Grossi-de-Sá, 2002, Follmer *et al.*, 2004, Stanisçuaski *et al.*, 2005). Esses grupos de insetos possuem catepsinas como principais enzimas digestivas, contrastando com grupos que possuem tripsinas realizando tal função, que são imunes à toxicidade da canatoxina. Essa diferença evidencia a importância da chamada “ativação proteolítica” das ureases. Nesse processo, originalmente descrito para canatoxina, um peptídeo entomotóxico de 10 kDa é liberado pela digestão da enzima por catepsinas, sendo o principal responsável pela atividade inseticida da canatoxina

(Carlini *et al.*, 1997; Ferreira-daSilva *et al.*, 2000). Adicionalmente, os efeitos inseticidas das ureases de soja e feijão-de-porco persistem após tratamento com inibidores irreversíveis de ureases, demonstrando que um domínio distinto do sítio ativo está envolvido nas propriedades inseticidas (Follmer *et al.*, 2004, Carlini & Polacco, 2008).

O mecanismo de ação associado à atividade inseticida de ureases ou de seus peptídeos derivados aguarda elucidação. Recentemente, a diminuição da diurese em *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) foi investigada, revelando que o peptídeo e a urease intacta modulam diferentes cascatas de sinalização em túbulos de Malpighi intactos: enquanto a urease ativa a via dos eicosanóides e transporte de cálcio, o peptídeo altera os níveis de cGMP e o potencial trans-epitelial (Carlini & Polacco, 2008, Stanisçuaski *et al.*, 2009).

Além de propriedades inseticidas, as ureases possuem outros efeitos que são independentes da catálise. As enzimas de soja, feijão-de-porco e, em menor grau, de *H. pylori*, inibem o crescimento vegetativo de diversos fungos, possivelmente induzindo plasmólise e danos à parede celular. O peptídeo inseticida derivado não apresenta efeitos sobre fungos, indicando que outros domínios da proteína devem estar envolvidos nesse evento (Becker-Ritt *et al.*, 2007). Outras propriedades testadas para essas ureases incluem a ligação a glicoconjugados (Follmer *et al.*, 2001) e a ativação de plaquetas (Follmer *et al.*, 2004), que na urease de *H. pylori* ocorre por meio da via das lipoxigenases (Wassermann *et al.*, 2010). Uma propriedade proposta, mas ainda não testada, é a de que a urease extravasada de *B. pasteurii*, uma das “ureases de solo” presentes na rizosfera, possa atuar sobre células de raízes, induzindo secreção de compostos que podem ser consumidos, em última instância, pela bactéria (Carlini & Polacco, 2008).

Embora a maioria dos casos estudados retrate propriedades “belicosas” destas enzimas, as ureases podem ter papel importante na interação positiva entre diferentes organismos. É o que ocorre em algumas associações líquênicas. Ureases com glicosilações específicas, aderidas à parede celular da alga, são ligantes específicos para lectinas secretadas pelo fungo, tendo papel fundamental no reconhecimento da compatibilidade interespecífica do líquen (Sacristán *et al.*, 2006).

Por apresentarem pelo menos duas funções não relacionadas, as ureases podem ser incluídas no grupo das chamadas *moonlighting proteins*: cadeias polipeptídicas únicas com funções múltiplas, que não são efeito de fusão gênica,

variação de *splicing* ou atividade enzimática promíscua (Jeffery, 1999; Jeffery, 2009). Esse grupo de proteínas tem sido mais extensivamente estudado em mamíferos e leveduras, tornando as ureases um exemplo interessante de multifuncionalidade em proteínas vegetais e microbianas.

1.5 Modelagem molecular comparativa

A modelagem molecular comparativa é uma técnica que permite a construção de modelos tridimensionais para uma proteína de estrutura desconhecida, baseando-se em estruturas de proteínas similares a ela em suas seqüências de aminoácidos (Martí-Renom *et al.*, 2000). Tais estruturas, determinadas por cristalografia de raios X e/ou ressonância magnética nuclear (RMN), são empregadas como moldes para predizer a estrutura da proteína de interesse, chamada de proteína-alvo.

A modelagem comparativa consiste de quatro passos seqüenciais (Figura 6): seleção do molde, alinhamento molde – proteína-alvo, construção do modelo e avaliação/validação do modelo. Se o modelo não for satisfatório, os três primeiros passos podem ser repetidos até que um modelo satisfatório seja obtido (Sánchez & Šali, 2000).

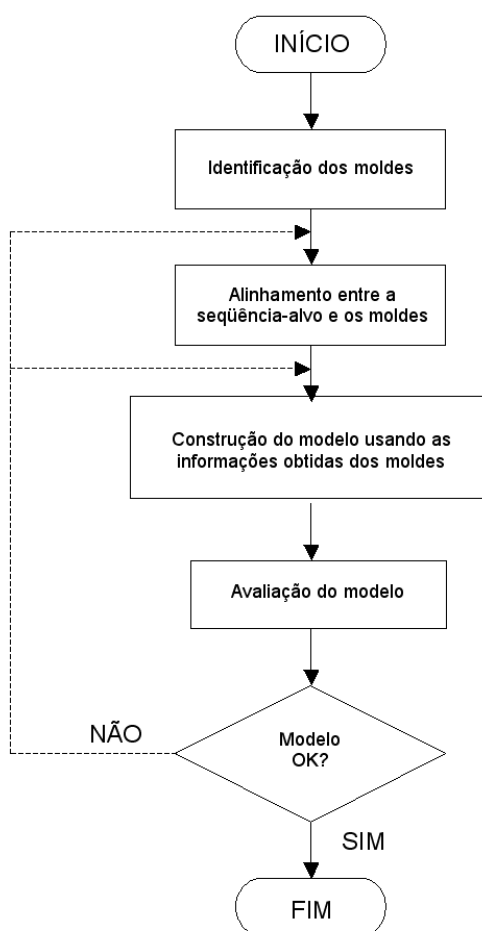


Figura 6: Passos na modelagem comparativa por homologia (adaptado de Fernandes, 2002).

Uma vez alinhados molde e proteína-alvo, uma variedade de métodos pode ser utilizada para construir o modelo tridimensional de interesse. Entre eles, destaca-se a modelagem por satisfação de restrições espaciais, que utiliza distâncias geométricas ou técnicas de otimização para satisfazer restrições espaciais extraídas do alinhamento. Tais restrições são geralmente complementadas por restrições estereoquímicas de comprimentos de ligação, ângulos de ligação, ângulos diedro e contatos entre átomos não ligados, obtidas do campo de força de mecânica molecular. O modelo é então derivado ao minimizarem-se as violações de todas as restrições obtidas.

Após sua construção, o modelo é avaliado e validado. As avaliações de modelos estruturais podem ser de dois tipos: internas, quando avaliam a auto-consistência do modelo, se ele satisfaz ou não as restrições usadas para calculá-lo; ou externas, quando baseadas em informações que não foram utilizadas para

calcular o modelo. Entre as variedades de avaliação externa tem-se o cálculo de perfis de energia do modelo e por avaliação estereoquímica (Forster, 2001).

1.6 O papel da dinâmica molecular na caracterização conformacional de biomoléculas

As simulações de dinâmica molecular (DM), procedimentos baseados na computação do movimento dos átomos em uma molécula, remontam à década de 1950 (Maginn & Elliot, 2010). Vêm sendo empregadas desde a década de 1970 no estudo de biomoléculas, quando se analisou um sistema protéico envolvendo um inibidor pancreático de tripsina bovina (McCammon *et al.*, 1977). Atualmente, tais simulações tornaram-se ferramentas amplamente difundidas. Seu emprego inclui a investigação da estrutura e dinâmica de biomoléculas em geral, abrangendo estudos de interação de compostos com suas proteínas-alvo, desnaturação e enovelamento protéicos (Ponder & Case, 2003), e o estudo do movimento de tRNAs no ribossomo (Sanbonmatsu *et al.*, 2005).

A integração da equação de movimento de Newton $d^2r_i(t)/dt^2 = F_i / m_i$ — sendo $d^2r_i(t)/dt^2$ a aceleração, m_i a massa e F_i a força sobre um determinado átomo i — é a característica fundamental dos cálculos de DM que, quando realizada sucessivamente e sobre todos os átomos do sistema, gera uma seqüência de diferentes posições dos átomos em função do tempo, ou seja, uma trajetória de movimento das moléculas em estudo (Leach, 2001). A integração é realizada de forma que uma força F_i causa uma aceleração sobre um determinado átomo i e, em conseqüência, acarreta mudança de sua posição num intervalo de tempo Δt relativo à aceleração. Esta equação, entretanto, não é capaz de determinar a magnitude e a direção da força F_i sobre os átomos do sistema, nem sua relação com as características químicas de cada molécula em estudo (Leach, 2001). Tais parâmetros são calculados em função de mudanças na energia potencial/cinética entre a posição atual e a posição seguinte (a que representará o próximo passo da simulação) sobre cada átomo separadamente. Esta superfície de energia potencial representa a energia de cada molécula, sendo descrita pelo denominado Campo de Força (Schlick, 2006).

O campo de força pode ser definido como um conjunto de funções e parametrizações usadas em cálculos de mecânica molecular (de Sant'Anna, 2002).

Estas funções definem as energias de estiramento de ligação e de distorção de ângulo de ligação (tanto de valência quanto de diedro) de uma molécula quando comparadas com a sua conformação não tensionada (aquela caracterizada pelos valores-padrão de comprimentos e de ângulos de ligação) (Figura 7). Nesse contexto, os campos de força, juntamente com possíveis termos adicionais (e.g. de interação entre átomos não ligados, de efeitos eletrostáticos, de ligação de hidrogênio e de outros efeitos estruturais), expressam o somatório das funções de energia potencial de cada átomo e calculam a energia dos sistemas em função das posições dos núcleos dos átomos, que são, por sua vez, representados por esferas unidas por molas (Leach, 2001, Schlick, 2006).

$$V(\vec{r}(t); \lambda, \mu) = V_{\textcircled{1}}^{\text{phys}}(\vec{r}(t); \lambda, \mu) + V_{\textcircled{2}}^{\text{special}}(\vec{r}(t))$$

$$V_{\textcircled{3}}^{\text{bon}}(\vec{r}(t); \lambda, \mu) + V_{\textcircled{4}}^{\text{nonb}}(\vec{r}(t); \lambda, \mu) \quad V^{\text{pr}}(\vec{r}^{\text{3D}}(t)) + V^{\text{dr}}(\vec{r}(t)) + V^{\text{dtr}}(\vec{r}^{\text{3D}}(t)) + V^{\text{jr}}(\vec{r}^{\text{3D}}(t)) + V^{\text{le}}(\vec{r}^{\text{3D}}(t)) + V^{\text{fdr}}(\vec{r}^{\text{4thD}}(t))$$

$$V_{\textcircled{5}}^{\text{bond}}(\vec{r}(t)) = \frac{1}{4} \sum_{n=1}^{N_b} K_{b_n} [b_n^2(t) - b_{0_n}^2]^2$$

$$V_{\textcircled{6}}^{\text{angle}}(\vec{r}(t)) = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^{N_\theta} K_{\theta_n} [\cos(\theta_n(t)) - \cos(\theta_{0_n})]^2$$

$$V_{\textcircled{7}}^{\text{dih}}(\vec{r}(t)) = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^{N_\xi} K_{\xi_n} [\xi_n(t) - \xi_{0_n}]^2$$

$$V_{\textcircled{8}}^{\text{trig}}(\vec{r}(t)) = \sum_{n=1}^{N_\phi} K_{\phi_n} [1 + \cos(\delta_n) \cos(m_n \phi_n(t))]$$

$$\textcircled{9} \sum_{\text{nonbonded pairs } (i,j)} \left[\frac{C_{12}(i,j)}{r_{ij}^{\text{4D}}(t)^6} - C_6(i,j) \right] \frac{1}{r_{ij}^{\text{4D}}(t)^6} +$$

$$\textcircled{10} \sum_{\text{nonbonded pairs } (i,j)} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_1} \left[\frac{1}{r_{ij}^{\text{4D}}(t)} - \frac{C_{\text{rf}} r_{ij}^{\text{3D}}(t)^2}{2R_{\text{rf}}^3} - \frac{1 - 1/2 C_{\text{rf}}}{R_{\text{rf}}} \right]$$

Figura 7: Funções de energia que compõem o campo de força GROMOS96. As funções dividem-se em físicas (*phys*, ①), que descrevem interações interatômicas, e especiais (*special*, ②), utilizadas com objetivos diferenciados, em diferentes tipos de restrições. As funções físicas dividem-se em funções que descrevem interações ligadas (*bonded*, ③) e não ligadas (*nonbonded*, ④). As primeiras dividem-se em equações que descrevem ⑤ o estiramento de ligações químicas, ⑥ ângulos de ligação, ⑦ diedros impróprios e ⑧ diedros próprios; enquanto as últimas descrevem interações intermoleculares do tipo ⑨ interações de Lennard-Jones e ⑩ interações de carga (baseado em Scott *et al.*, 1999).

Diversos campos de força estão disponíveis para simulações de DM, destacando-se AMBER (Case *et al.*, 2005), CHARMM (MacKerell *et al.*, 1998), CVFF (Kitson & Hagler, 1988), TRIPOS (Clark *et al.*, 1989), OPLS (Jorgensen & Tirado-Rives, 1988) e GROMOS96 (van Gunsteren *et al.*, 1996). Apesar de a maioria dos

campos de força atuais ser capaz de lidar com proteínas, existe uma carência de parâmetros específicos para outras classes de biomoléculas, como ácidos nucleicos, lipídios, compostos sintéticos e carboidratos (Pol-Fachin, 2009).

Mesmo com os avanços na área e com a ampla disponibilidade de recursos computacionais, a simulação de grandes sistemas biomoleculares, como a formação de micelas ou interação de complexos protéicos, ainda é desafiadora, especialmente no que diz respeito ao seu maior tamanho e às escalas de tempo necessárias para observação dos eventos de interesse (e.g. $\geq 1\mu\text{s}$) (Sherwood, *et al.*, 2008, Tozzini, 2010). Nesse sentido, a aplicação de sistemas *coarse-grained* (CG) tem recebido interesse considerável no estudo de proteínas e outros sistemas biomoleculares. Nos sistemas desse tipo, uma quantidade variável de átomos ligados covalentemente é tratada como uma única partícula, ou *bead*. Essa prática pode tornar as simulações ordens de magnitude mais rápidas que as simulações de modelos atomísticos, permitindo a observação de processos inacessíveis a tais modelos, como a movimentação de domínios protéicos ou a formação de micelas, com a penalidade de perder o detalhamento atômico, dificultando a representação acurada de alguns fenômenos, como o desenovelamento protéico (van Gunsteren *et al.*, 2006, Monticelli *et al.*, 2008).

Assim como ocorre nas simulações de DM com detalhamento atomístico, as simulações empregando modelos CG dependem de campos de força capazes de descrever de maneira adequada suas propriedades físico-químicas. Entre os campos de força utilizados em simulações CG, destaca-se o MARTINI (Marrink *et al.*, 2007, Marrink *et al.*, 2008) (Figura 8). Originalmente aplicado a lipídeos, esse campo de força já conta com módulos para simulação de proteínas (Monticelli *et al.*, 2008) e alguns carboidratos (López *et al.*, 2009). Em vários casos, além da adoção de modelos CG, é proposta a combinação desses a modelos atomísticos, em uma abordagem conhecida como modelagem em multiescala, buscando amostrar os diferentes eventos envolvidos em um único processo biológico (Clementi, 2008, Messer *et al.*, 2010, Tozzini, 2010).

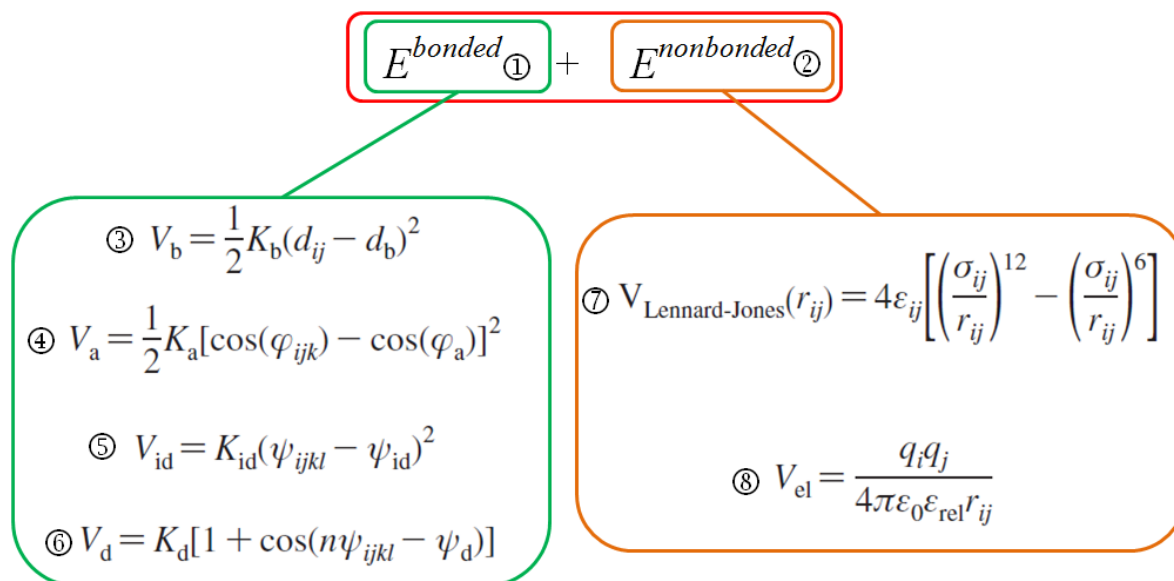


Figura 8: Funções de energia que compõem o campo de força MARTINI. As funções dividem-se em funções que descrevem interações ligadas (*bonded*, ①) e não ligadas (*nonbonded*, ②). As primeiras dividem-se em equações que descrevem ③ o estiramento de ligações químicas, ④ ângulos de ligação, ⑤ diedros impróprios e ⑥ diedros próprios; enquanto as últimas descrevem interações intermoleculares do tipo ⑦ potencial de Lennard-Jones e ⑧ interações eletrostáticas (baseado em Monticelli *et al.*,2008).

2 Objetivos

A partir do exposto, o presente trabalho se insere no contexto do estabelecimento de uma relação entre a estrutura e as diferentes propriedades biológicas de ureases. Desta forma, o trabalho visa caracterizar a dinâmica de ureases em solução aquosa, considerando suas diferentes formas oligoméricas, na busca de propriedades estruturais que possam ser indicativos de associação às diferentes propriedades já analisadas para essas enzimas. Além disso, o trabalho visa analisar a contribuição da modelagem do tipo *coarse-grained* para o estudo de macromoléculas biológicas e sua possível aplicação em abordagens de modelagem em multiescala. Espera-se, a partir dos resultados alcançados, obter indicações do comportamento conformacional das ureases em solução aquosa. Adicionalmente, a avaliação da estratégia empregada no estudo em questão será promissora para o nosso grupo, tendo em vista sua possível aplicação em estudos futuros, envolvendo outros sistemas macromoleculares.

Para o presente trabalho, as seguintes metas foram estabelecidas:

- Determinação de um modelo tridimensional para isoforma minoritária da urease de *Canavalia ensiformis*, JBURE-IIB;
- Avaliação do comportamento conformacional da JBURE-IIB em solução por meio de dinâmica molecular;
- Análise da influência de fatores estruturais na dinâmica de ureases:
 - Cofatores metálicos;
 - Estado de oligomerização.

3 Metodologia

3.1 Programas utilizados

Diversas metodologias de modelagem molecular foram utilizadas no presente trabalho, incluindo modelagem comparativa, DM e CG. Os protocolos referentes a cada um destes métodos estão descritos em detalhes a seguir.

As ferramentas de visualização de moléculas empregadas neste trabalho incluem VMD (Humphrey *et al.*, 1996), PyMol (DeLano, 2002) e Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

3.2 Construção do modelo estrutural da urease de *C. ensiformis*

A isoforma JBURE-IIB da urease de *C. ensiformis* foi escolhida como alvo para modelagem comparativa. A escolha baseia-se em dois fatores principais: (i) tal isoforma foi descoberta em nosso grupo de pesquisa e (ii) todos os esforços de cristalização de ureases de *C. ensiformis* concentram-se na isoforma majoritária, JBURE-I, ignorando as isoformas minoritárias JBURE-IIB e canatoxina.

A seqüência primária da proteína foi obtida de Mulinari (2008). Em uma abordagem inicial, verificou-se qual seria a sugestão de moldes fornecida pelo Swiss-Model (Guex & Peitsch, 1997). Posteriormente, uma busca por seqüências similares à JBURE-IIB que tivessem estrutura tridimensional definida foi feita por BlastP (Altschul *et al.*, 1997), via NCBI (Wheeler *et al.*, 2008). Nessa etapa, confirmaram-se os moldes que haviam sido pré-selecionados, *i.e.* as três ureases bacterianas que possuem estrutura 3D definida. Nesse contexto, a estrutura do molde foi escolhida como sendo a urease de *B. pasteurii* (PDB ID 2UBP), principalmente por sua resolução, obtida do Research Collaboratory for Structural Bioinformatics - Protein Data Bank (RCSB PDB, ou simplesmente PDB) (Berman *et al.*, 2000). O molde selecionado apresentava grau de identidade de seqüência com o alvo superior a 30% (~55%), valor adequado para uma modelagem bem sucedida (Eswar *et al.*, 2000).

O alinhamento das seqüências molde e alvo foi realizado pelo ClustalW (Larkin *et al.*, 2007). A modelagem molecular foi realizada por meio do programa Modeller 9v4 (Eswar *et al.*, 2000; Martí-Renom *et al.*, 2000), por meio de sua rotina “model-loop-define” (Apêndice B). Esta rotina é indicada para casos onde alças (ou

outras regiões) do modelo não apresentam equivalentes no molde, requerendo atenção especial. Este é o caso das duas regiões de ligação de domínios presentes nas ureases de plantas e fungos, que não ocorrem em bactérias. Foram construídos dez modelos, cada um deles com dez sub-modelos representando possibilidades alternativas para as regiões sem molde, totalizando cem modelos construídos.

Em um primeiro momento, os modelos foram inspecionados visualmente, sendo descartados aqueles que apresentavam padrões estruturais não realísticos, causados por modelagem inadequada de regiões sem molde maiores que quinze resíduos de aminoácidos (Šali, 2008). Na etapa seguinte, os modelos restantes foram avaliados pelo mapa de Ramachandran (Ramachandran *et al.*, 1963) e demais análises geradas pelo Procheck (Laskowski *et al.*, 1993), e pelos resultados do Verify3D (Lüthy *et al.*, 1992), transpostos às estruturas tridimensionais por meio do GeneSilico Metaserver (Kurowski & Bujnicki, 2003). Foi eleito como melhor modelo aquele que apresentou melhor avaliação nessas análises (Apêndice C).

3.3 Simulações de DM

3.3.1 Protocolo de simulação em nível atômico

O protocolo geral de simulação foi baseado em procedimentos previamente descritos (de Groot & Grubmüller, 2001). Foram realizadas duas simulações com nível de detalhamento atômico: JBURE-IIB em sua forma apoprotéica e JBURE-IIB com íons metálicos no seu sítio ativo. Ambas simulações foram realizadas à temperatura de 300 K, com duração de 0,05 μ s. Cada proteína foi solvatada numa caixa retangular utilizando condições periódicas de contorno, empregando o modelo de água SPC (Berendsen *et al.*, 1981). Contra-íons (sódio) foram adicionados, conforme a necessidade, de forma a neutralizar as cargas dos sistemas estudados. O método Lincs (Hess *et al.*, 1997) foi aplicado na restrição de ligações covalentes de forma a permitir um passo de integração de 2 fs, enquanto as interações eletrostáticas foram calculadas utilizando o método Particle-Mesh Ewald (PME, Darden *et al.*, 1993) utilizando raios de corte de *Coulomb* e de van der Waals de 9 Å. A temperatura e a pressão do sistema foram mantidas constantes através do acoplamento do soluto, íons e solvente a banhos externos de temperatura e pressão, utilizando constantes de acoplamento de, respectivamente, $\tau = 0,1$ ps e $\tau = 0,5$ ps (Berendsen *et al.*, 1984). A constante dielétrica do meio foi tratada como $\epsilon =$

1. Exemplos de arquivos com parâmetros empregados nas simulações encontram-se no Apêndice D.

As simulações por dinâmica molecular geralmente iniciam com uma etapa de termalização. Nessa etapa ocorre o aquecimento gradativo do sistema, visando uniformizar as energias contidas na estrutura analisada (seja cristalográfica, derivada de RMN ou obtida por modelagem estrutural) para que sejam evitadas deformações nas moléculas em estudo. Nesta etapa, após 1 ps de restrição de posição, cada um dos sistemas foi aquecido lentamente de 50 K a 300 K de maneira que, em cada um dos seis passos de 5 ps, há o aumento da temperatura em 50 K. Após a termalização do sistema, a simulação prosseguiu na temperatura de equilíbrio de 300 K, até o tempo de 0,05 μ s.

A maioria das ureases apresenta níquel em seu sítio ativo. Esse metal não é parametrizado para o campo de força GROMOS, tornando necessária uma substituição. No presente caso, o metal escolhido para substituir o Ni^{2+} foi o Zn^{2+} . Além disso, a maioria das ureases também apresenta uma lisina carbamilada (“lisina ativada” ou carboxilisina) em seu sítio ativo. Esse resíduo incomum foi adicionado manualmente ao campo de força, sendo sua topologia baseada em aminoácidos similares (Lys e GLu, conforme apresentado no Apêndice E).

3.3.2 Protocolo de simulação *coarse-grained*

O protocolo geral de simulação foi baseado em procedimentos previamente descritos (Monticelli *et al.*, 2008). Foram realizadas três simulações do tipo *coarse-grained*: JBURE-IIB nas formas monomérica, trimérica e hexamérica, todas realizadas à temperatura de 300 K. A duração das simulações foi de 1,05 μ s para os dois primeiros sistemas e de 0,15 μ s para o último sistema. Cada proteína, monomérica ou oligomérica, foi solvatada numa caixa retangular utilizando condições periódicas de contorno, empregando o modelo de água de Marrink e colaboradores (Marrink *et al.*, 2007). Contra-íons (sódio) foram adicionados, conforme a necessidade, de forma a neutralizar as cargas dos sistemas estudados. Um passo de integração de 10 fs foi empregado após uma minimização de energia utilizando o algoritmo Steepest Descent, enquanto as interações eletrostáticas foram calculadas de acordo com a metodologia MARTINI (Marrink *et al.*, 2007, Marrink *et al.*, 2008). A temperatura e a pressão do sistema foram mantidas constantes através

do acoplamento do soluto, íons e solvente a banhos externos de temperatura e pressão, utilizando constante de acoplamento de $\tau = 1,0$ ps (Monticelli *et al.*, 2008). Devido à natureza simplificada dos sistemas CG, a lisina carbamilada e os íons metálicos do sítio ativo foram desconsiderados. Exemplos de arquivos com parâmetros empregados nas simulações encontram-se no Apêndice F.

A conversão das estruturas atômicas em estruturas CG foi realizada por meio do script 'atom2cg'. Nessa conversão, cada resíduo é substituído por seu equivalente *coarse-grained* formado por *beads* com diferentes propriedades, geralmente respeitando um mapeamento 4-para-1, onde em média quatro átomos são agrupados em um *bead* (Figura 9). As topologias referentes a essas estruturas CG foram construídas por meio do script 'seq2itp', uma ferramenta que utiliza informações da seqüência primária e da estrutura secundária da proteína para descrever sua topologia. Os parâmetros empregados nas simulações CG foram sempre comparados aos parâmetros de referência atualizados, presentes no *website* oficial do campo de força MARTINI (<http://md.chem.rug.nl/cgmartini/>). As ferramentas de conversão estrutural e de construção de topologias foram obtidas do mesmo local.

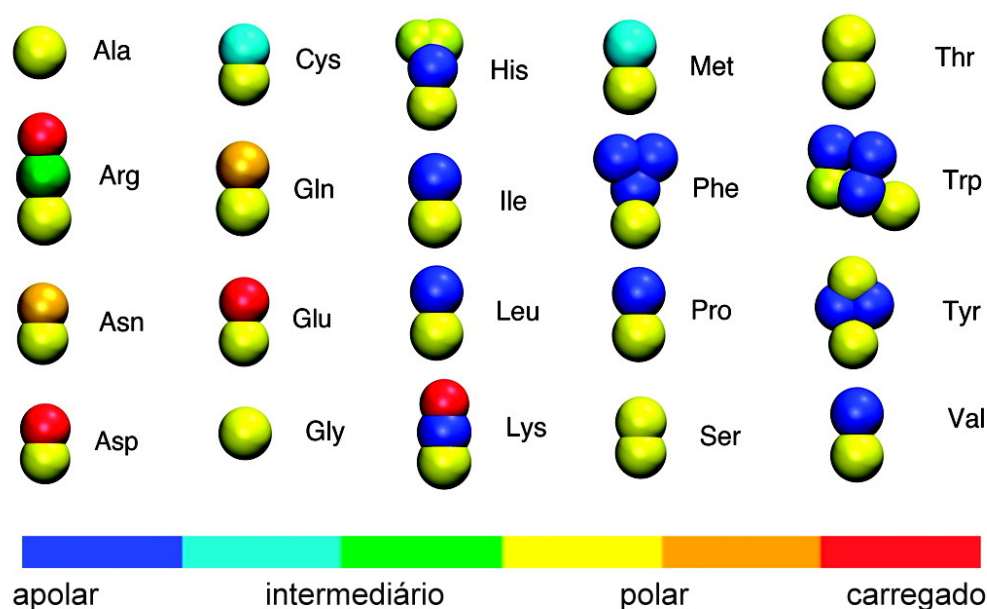


Figura 9: Representação *coarse-grained* para aminoácidos. Cores diferentes representam diferentes classes de *beads* (adaptado de Monticelli *et al.*, 2008).

3.3.3 Validação das simulações de DM

Os resultados obtidos nas simulações de DM foram validados por comparação a dados experimentais prévios, como estruturas cristalográficas e dados bioquímicos. Além disso, a manutenção de determinadas propriedades, como a estrutura secundária, foi utilizada para avaliar a estabilidade dos sistemas estudados durante as simulações.

4 Resultados

4.1 *Preâmbulo*

Os resultados obtidos durante a realização da presente dissertação serão apresentados sob a forma de um trabalho a ser submetido à publicação. A seguir, será apresentado o resumo e a íntegra do referido manuscrito, seguindo os padrões⁴ do periódico “Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics”, possível local de publicação desse trabalho. Conforme recomendação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, as figuras foram inseridas ao longo do texto do manuscrito.

⁴ Disponíveis em «<http://www3.interscience.wiley.com/journal/36176/home/ForAuthors.html>»

Conformational characterization of a Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease

Jack bean urease dynamics

Additional key words: coarse-grained, molecular dynamics, monomer, oligomer, multifunctional protein

Rodrigo Ligabue-Braun 1

Evelyn Koeche Schroeder 1

Hugo Verli 1,2

Célia Regina Carlini 1,3

1 Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

2 Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

3 Departamento de Biofísica, IB, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

This work was performed at the Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

Author for correspondence:

Hugo Verli

Faculdade de Farmácia and Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, CEP 91501-970.

Phone: +55 51 3308 7770

Fax: +55 51 3308 7309

E-mail: hverli@cbiot.ufrgs.br

ABSTRACT

Ureases, despite their historical importance in Biochemistry, are still enigmatic. For instance, little is known about their non-catalytic properties. In this context, the current work submitted a *Canavalia ensiformis* urease to molecular dynamics simulations at both atomistic and coarse-grained levels in order to analyze the possible roles of structural metal ions other than their catalytic function and to obtain a conformational characterization of such urease in both monomeric and trimeric forms. The obtained data suggest that the domains of the protein

present different mobilities, with the γ domain being the most flexible one. This domain is also the main responsible for the compactness of the isolated urease monomer when compared to its crystallographic conformation. In this process, little or no structural effects were observed associated to the structural metal ions. Similarly, the trimeric form of *C. ensiformis* urease also became more compact after simulation, pointing to ureases as highly flexible molecules. As a property not necessarily connected to catalysis, it may enlighten further efforts to solve the non-catalytic participation of urease in its moonlighting properties.

INTRODUCTION

Ureases (urea amidohydrolases, EC 3.5.1.5) are nickel-dependent enzymes which catalyze the hydrolysis of urea to ammonia and carbon dioxide [1]. They are widely found in plants, fungi and bacteria [2]. In plants and fungi, monomeric ureases have three structural domains (α , β and γ), in a total of approximately 840 amino acids, and form biologically active trimers or hexamers [3, 4]. On the other hand, bacterial ureases have two or three smaller subunits, equivalent to the plant and fungi domains, sharing 50-60% sequence identity. This 2:1 or 3:1 bacteria-to-plant relation in the number of chains associated to the minimum structural unit of ureases usually gives origin to oligomerizations of 6:3 or 9:3, equivalent to those of plant ureases in its trimeric biologically active forms. Additionally, it is known that plant and microbial ureases display several moonlighting properties, that is, biological properties that are independent of their enzymatic activity [5]. Originally described for Jack bean (*Canavalia ensiformis* (L.) DC) ureases, these unusual properties include the activation of blood platelets, interaction with glycoconjugates and insecticidal activity [6], posing a complex picture for relations between structure and function for this class of proteins.

Jack bean urease was the first enzyme to be crystallized, in 1926 [7]. Nevertheless, these crystals were of low quality and at the present time, despite major efforts in the field [8-10], only three bacterial ureases had their 3D structures determined from *Bacillus pasteurii* (PDB id 2UBP), *Klebsiella aerogenes* (PDB id 1FWJ) and *Helicobacter pylori* (PDB id 1E9Z). As observed for soy bean [11], jack bean also presents urease isoforms [12], including the most abundant isoform (JBURE-I) [13, 14], an alternative isoform (JBURE-IIB) [15] and canatoxin [16, 17]. The difficulties in separating these isoforms may consist in an important factor hindering proper crystallization of the enzyme.

In this context, considering the lack of structural information on plant and fungal ureases, the current work presents a structural model for JBURE-IIB, obtained from comparative modeling, and its further use to characterize the urease dynamics. Additionally, the conformational behavior of the monomeric and oligomeric enzyme was also investigated with coarse-grained models in order to offer robust conformational sampling of such large macromolecular complex.

MATERIALS AND METHODS

Comparative modeling

The construction of a 3D model for JBURE-IIB was performed using comparative modeling techniques, employing MODELLER9v4 [18]. The target sequence was taken from NCBI Accession EU938655. The *B. pasteurii* urease structure (PDB id 2UBP) was chosen as template (approximately 55% identity with the investigated urease and 2.0Å resolution). Two connecting regions (E102-H132 and E253-P269) are entirely or partially missing in the chosen structure and have no suitable template available. Taking these gaps into account, a loop-modeling option from MODELLER was employed. Briefly, ten models were built, each

one of them leading to sets of ten sub-models, presenting refinements on the missing regions, on a total of one hundred models built. These models were first visually inspected for unrealistic structures (such as “knots”) and those passing this stage had their stereochemical evaluation and theoretical validation of 3D profile assessed with PROCHECK [19] and Verify3D [20], respectively. The best model was selected based on these assessments.

Molecular dynamics simulations

The model obtained for JBURE-IIB was used to build two urease systems, one with metal ions and one without metal ions in their active sites (located in the α domain). Almost all ureases have two Ni^{2+} ions in their active sites (except for canatoxin that apparently has Zn^{2+} and Ni^{2+}) [17]. Nickel, however, is not parameterized for the GROMOS96 43a1 force field, making a substitution required. Metal replacement in computational studies of proteins is somewhat common [21, 22], and this very same substitution (Zn^{2+} as a substitute for Ni^{2+}) was used for urease docking simulations previously [23]. These systems were then subjected to 50 ns molecular dynamics (MD) simulations with GROMACS 3.3 suite [24] using the GROMOS96 43a1 [25] force field. As ureases have a carbamylated lysine (KCX) in their active site, the topology for this residue was built based on similar amino acids and manually added to the GROMOS96 43a1 force field. The systems were solvated in triclinic boxes using periodic boundary conditions and SPC water models [26]. Counterions (Na^+) were added to neutralize the systems. The employed MD protocol was based on previous studies [27, 28]. The Lincs method [29] was applied to constrain covalent bond lengths, allowing an integration step of 2 fs after an initial energy minimization using Steepest Descent algorithm. Electrostatic interactions were calculated with Particle Mesh Ewald method [30]. Temperature and pressure were kept constant by coupling proteins, ions, and solvent to external

temperature and pressure baths with coupling constants of $\tau = 0.1$ and 0.5 ps [31], respectively. The dielectric constant was treated as $\epsilon = 1$, and the reference temperature was adjusted to 300 K. The systems were slowly heated from 50 to 300 K, in steps of 5 ps, each step increasing the reference temperature by 50 K, allowing a progressive thermalization of the molecular systems. Each simulation was then performed to $0.05 \mu\text{s}$, without any restraint, while a reference value of 3.5 \AA between heavy atoms was considered for a hydrogen-bond and a cutoff angle of 30° was used between hydrogen-donor-acceptor [24]. The motion of domains was evaluated using HingeProt [32].

Coarse-grained molecular dynamics simulations

Additionally, the JBURE-IIB model in both monomeric and oligomeric forms (trimer) was subjected to $1.05 \mu\text{s}$ coarse-grained (CG) molecular dynamics (MD) simulations with GROMACS 3.3.1 using the MARTINI [33, 34] force field. The standard MARTINI CG MD protocol for proteins [34] was employed. The CG models were solvated in triclinic boxes using periodic boundary conditions and the water models of Marrink and co-workers [33]. Counterions (Na^+) were added to neutralize the systems. An integration step of 10 fs was applied after an initial energy minimization using Steepest Descent algorithm. Electrostatic interactions were calculated according to MARTINI description. Temperature and pressure were kept constant by coupling proteins, ions, and solvent to external temperature and pressure baths with coupling constants of $\tau = 1.0$ ps. The reference temperature was adjusted to 300 K. The JBURE-IIB trimer was assembled using the *B. pasteurii* urease quaternary structure (PDB id 2UBP) as a reference. Due to the simplified nature of the coarse-grained systems, metal ions and the carbamylated lysine were not considered in these simulations.

RESULTS & DISCUSSION

Obtaining a model for JBURE-IIB 3D structure

The choice of modeling the alternative isoform (JBURE-IIB) of Jack bean urease instead of the classical JBURE-I isoform had two motivations: it was discovered by our group [12, 35] and all efforts of obtaining a structure for Jack bean urease focused on the classical isoform, not taking into account the alternative forms of the enzyme.

The main challenge in modeling JBURE-IIB concerned the somewhat long connecting regions of the enzyme, absent in bacterial ureases. Since no suitable template was available for these regions, they required special attention on their prediction. A large amount of models was built in an attempt to sample some favorable conformations for these regions. About 10% of the models were structurally viable and among them, the best model was chosen based on stereochemical assessments (Fig. 1A).

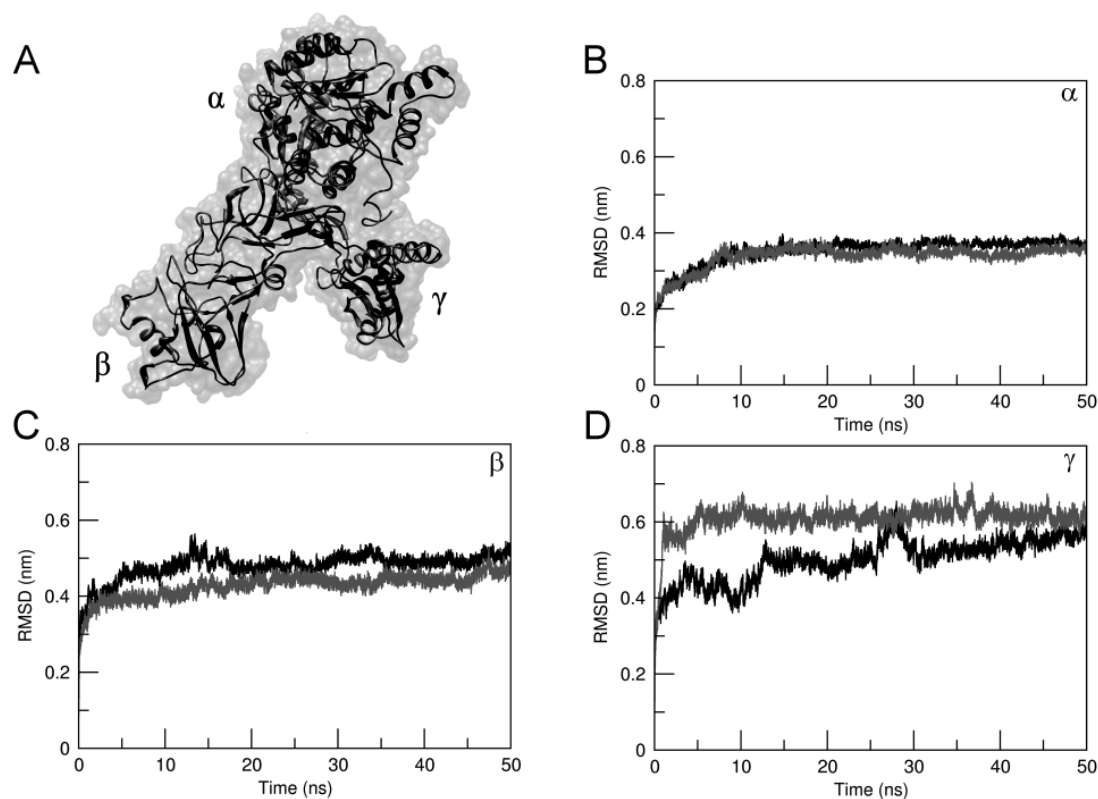


Figure 1. (A) JBURE-IIB structural scheme, highlighting its three domains; (B-D) All-atom RMSD from original model for metal-bound (grey) and metal-free (black) JBURE-IIB, separated by domain: (B) α -domain, (C) β -domain, (D) γ -domain all based on GROMOS96 43a1 force field simulations.

Besides their employment on conformational characterization, the MD simulations of JBURE-IIB were also used as a refinement tool for the modeled structure, as suggested elsewhere [36]. From the simulations we observed that the second connecting region (β - α connection) lost some flexibility, possibly due to accommodation of the somewhat loose coil encompassing this region. Still, the connecting regions (E102-H132 and E253-P269) are the most flexible regions of the protein, being mostly composed by coils.

Simulation systems

In order to evaluate the dynamic behavior of JBURE-IIB, four systems were considered. At the atomic level of detail, the urease monomer was subjected to two 0.05 μ s MD simulations, one of them considering the metal ions on the active site (metal-bound system) as a control of the metal-free system. To evaluate the so-called larger scale dynamics, two coarse-grained systems were simulated for 1.05 μ s: JBURE-IIB monomer and urease trimer.

Dynamics of monomeric urease at the atomic level of detail

Accordingly, in order to explore the structural aspects on JBURE-IIB, in addition to the metal-bound protein, a metal-free enzyme was simulated. Both systems converged during simulation to stable patterns on root mean square deviation (RMSD) values (Fig. 1), suggesting the absence of major conformational modification processes. Such convergence also appears to include the structural role of the ion, which appears to be only of minor influence on the simulated systems within the performed timescale. On the other hand, each domain of JBURE-IIB presents a distinct flexibility pattern, with the γ domain being the most flexible domain, followed by the β and α domains (Fig. 1), independently on the presence of absence of the structural ion. This may be due to the differential content of secondary structure on each of the domains (Fig. 2). The γ domain has more coils than the other domains, while the α domain is the most structured, with a TIM-barrel region, where the catalytic site is located, and a β -sheet region. The β domain can be considered as structurally intermediate, with more secondary structure elements than the γ domain but not so well structurally defined as the α domain.

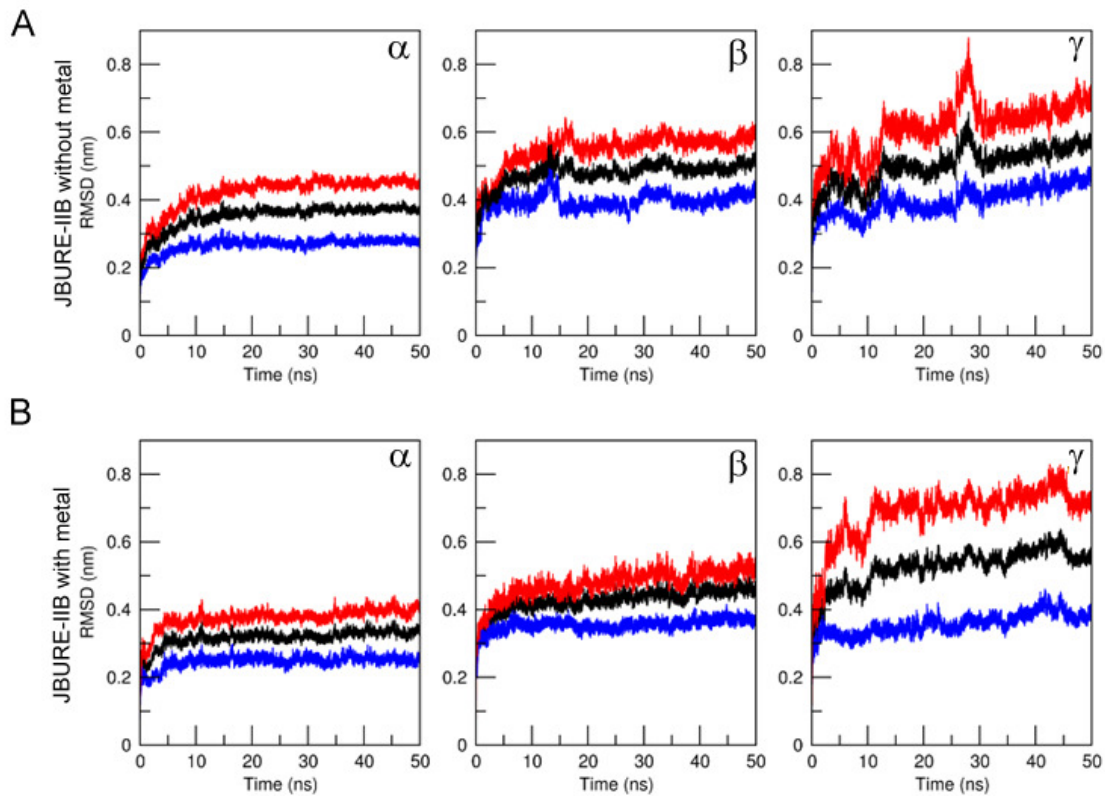


Figure 2. All-atom RMSD, from GROMOS96 43a1 force field simulations, for the original model separated by domains for **(A)** metal-free JBURE-IIB and **(B)** metal-bound JBURE-IIB. The RMSD for coils is colored red, for helices+strands in blue and the total RMSD is colored black.

The conformational behavior observed for JBURE-IIB systems, as observed from RMSD analyses, may be detailed at the residue-level by means of time-dependent root mean square fluctuation (tRMSF), as previously reported [27, 28]. Clearly, the α domain is the most rigid one, with the residues participating in catalysis (H407, H409, KCX490, H519, H545, D633) showing no significant increase in flexibility throughout the simulation (Fig. 3 and Sup. Fig 7S-8S). On the other hand, the β and γ domains present a consistent increased flexibility during all MD trajectory, not associated to specific phenomena in specific regions of the polypeptidic sequence or simulation time. It is important to note that such domains are not related to the catalytic properties of ureases and may take part on the moonlighting

properties presented by this protein. The first 20 ns of simulation can be considered different for metal-free and metal-bound urease, with this effect being especially evident for the β domain. Since the template chosen for the urease molecular modeling was the native (metal-bound) urease from *B. pasteurii*, this difference in flexibility may be considered as a consequence of the metal-free structure accommodating itself to the absence of metal ions (Fig. 3). The distance between domains as a function of time of simulation was evaluated and revealed no difference between metal-free and metal-bound structures (Sup. Fig. 9S).

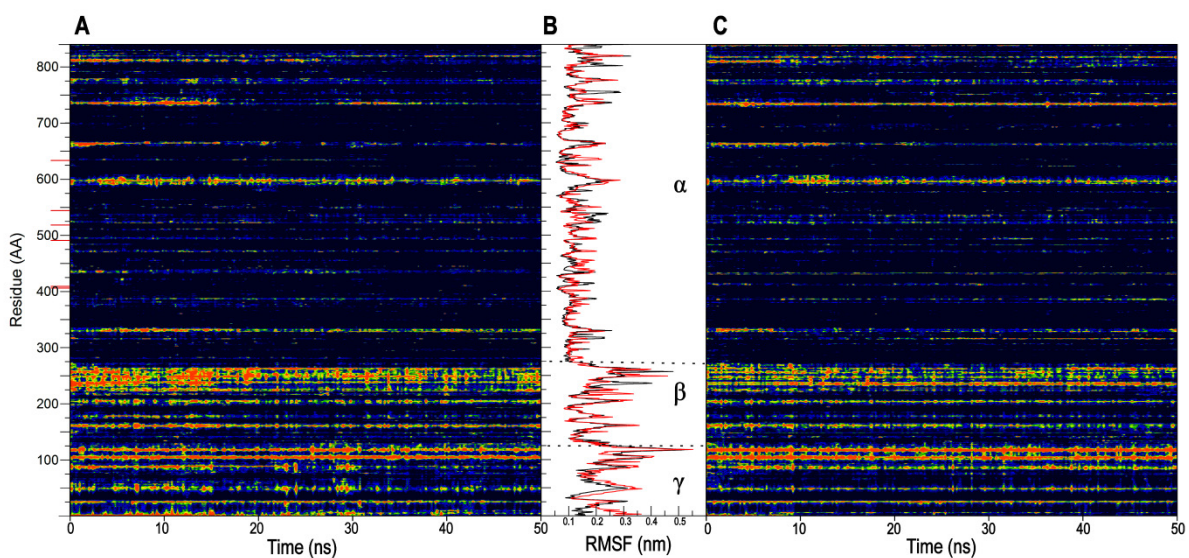


Figure 3. RMSF analyses, from GROMOS96 43a1 force field simulations, as a function of both residue number and time for (A) metal-free and (C) metal-bound JBURE-IIB; and solely as a function of residue number (B) (where black represents metal-free and red represents metal-bound urease; structural domains are marked). Residues involved in catalysis are highlighted with red tick marks in panel A.

To confirm the expected interdomain flexibility provided by coil segments, the JBURE-IIB structure was subjected to a hinge movement prediction analysis with HingeProt [32]. The program identified two hinge residues, found in coil regions: E136 and T400,

connecting three regions of the protein that are practically identical to the three structural domains of urease.

Coarse-grained urease models: insights into domain movements and oligomerization

In order to increase the simulation sampling and to analyze the expected domain motions of the monomer, coarse-grained models of the urease were generated based on the all-atom JBURE-IIB model. The monomeric form was simulated for 1.05 μ s. One can observe from the interdomain distances during the trajectory that, despite their oscillatory behavior, all distances tended to stabilize themselves at 0.75 μ s of simulation (see Fig. 4A). Likewise, the radius of gyration of the monomeric JBURE-IIB decreased abruptly for the first 0.04 μ s and continued to decrease until 0.75 μ s of simulation, when it became stable (\sim 2.7nm) (see Fig. 4B). Taken together, the radius of gyration and interdomain distance measurements indicate that JBURE-IIB tends to become more compact when in solution in its monomeric form. Visual inspection of the MD trajectories showed a remarkable swing movement of the γ domain, ultimately leading to stabilization of the β - γ domain interaction (Fig. 5A). These movements were very similar to those predicted by HingeProt.

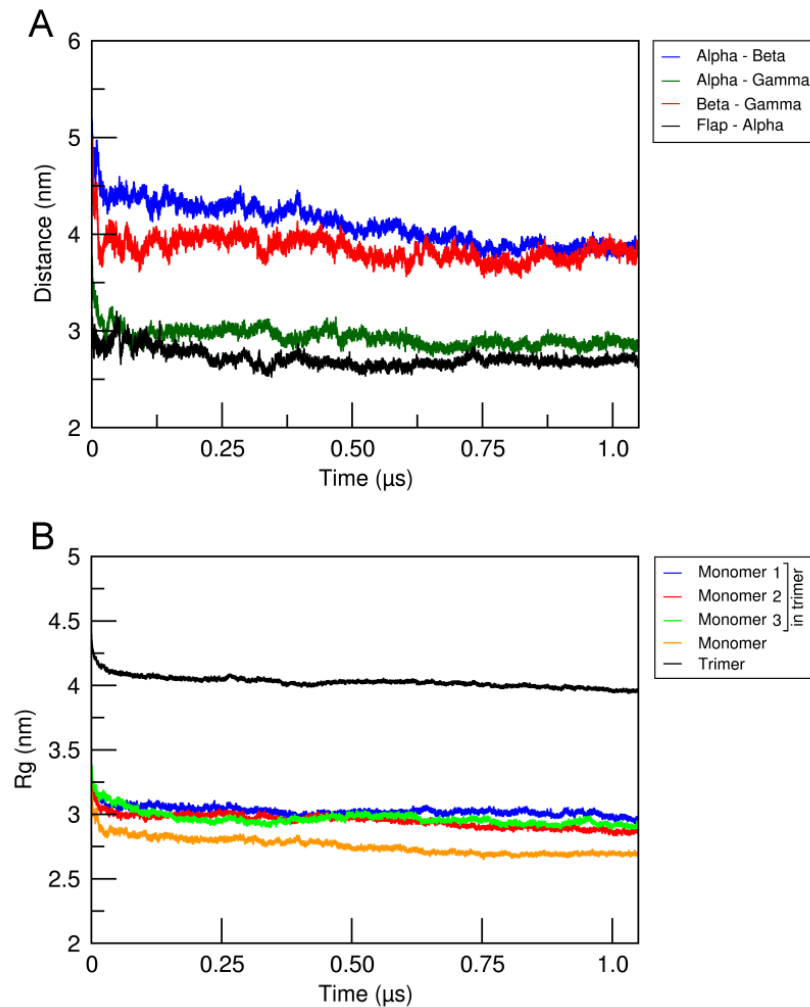


Figure 4. (A) Interdomain distance fluctuations for monomeric urease and (B) radii of gyration of urease in its monomeric and trimeric forms, both based on MARTINI force field simulations.

In vivo and *in vitro* JBURE-I is chiefly found as trimers that can associate as hexamers [4]. Considering JBURE-I as a reference to JBURE-IIB, his oligomeric form of the urease was reconstructed based on the 2UBP crystalline structure and served as a template for a trimeric JBURE-IIB coarse-grained model, which was then subjected to 1.05 μs of MD simulation. The trimeric urease became more globular after this experiment, losing some of its crystallographic pyramidal shape (Fig. 5). The effect of the oligomerization on the structure of the monomeric enzyme can be observed when comparing the radius of gyration of each of the

monomeric components of the oligomer with that of the monomer in solution (see Fig. 4B). When oligomerized, the monomeric form of the urease is less compact than when it is found in solution. This reflects the inter-monomeric interactions, especially those that keep the γ and β domain of the same monomer away from each other. As suggested elsewhere [37], this kind of interaction is favored in the recovery of the entropic penalty of losing multiple translational and rotational degrees of freedom in the immobilization of the subunits within a single entity.

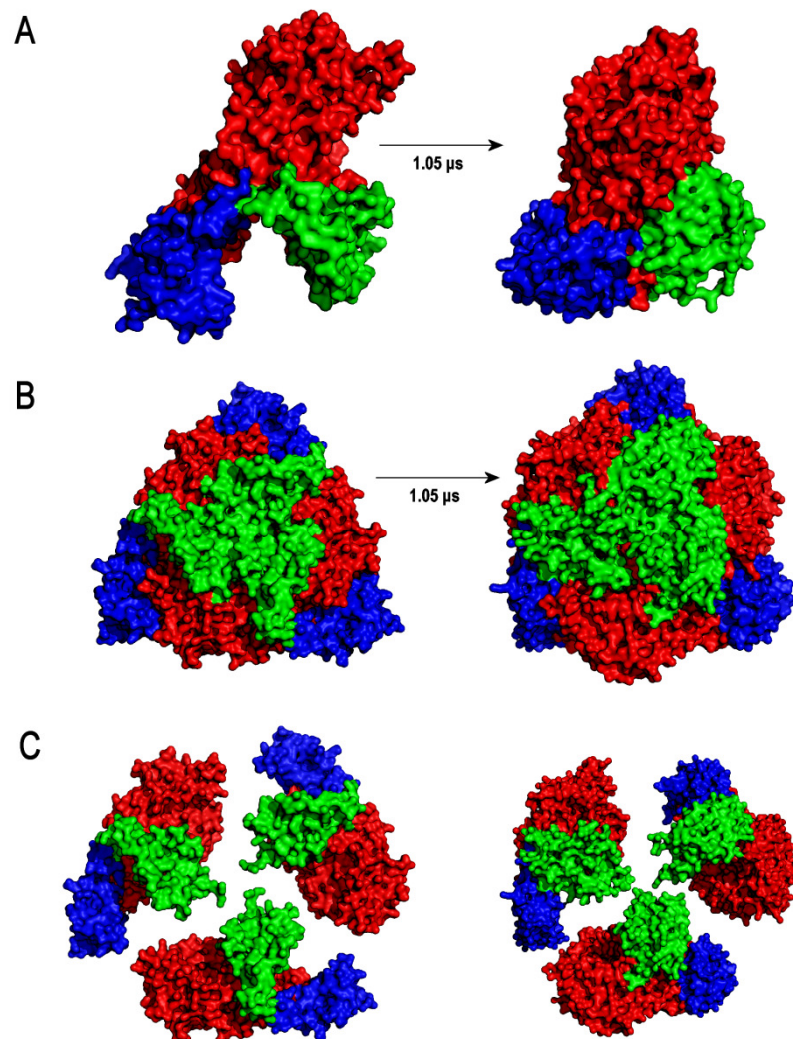


Figure 5. Conformational changes, from MARTINI force field simulations, of the (A) urease monomer, (B) urease trimer and (C) trimer-forming urease monomers, set apart to show less-evident conformational differences. Structural domains are colored in red for α domain, blue for β domain and green for γ domain.

Even though *C. ensiformis* ureases have never been found as a free monomer, either *in vitro* or *in vivo*, the dynamics study of the monomeric form is especially interesting when one considers its implications in the oligomerization process. The differences in flexibility when comparing the urease monomer in aqueous solution to the oligomerized monomers revealed regions that may be implicated in the oligomerization process (Fig. 6).

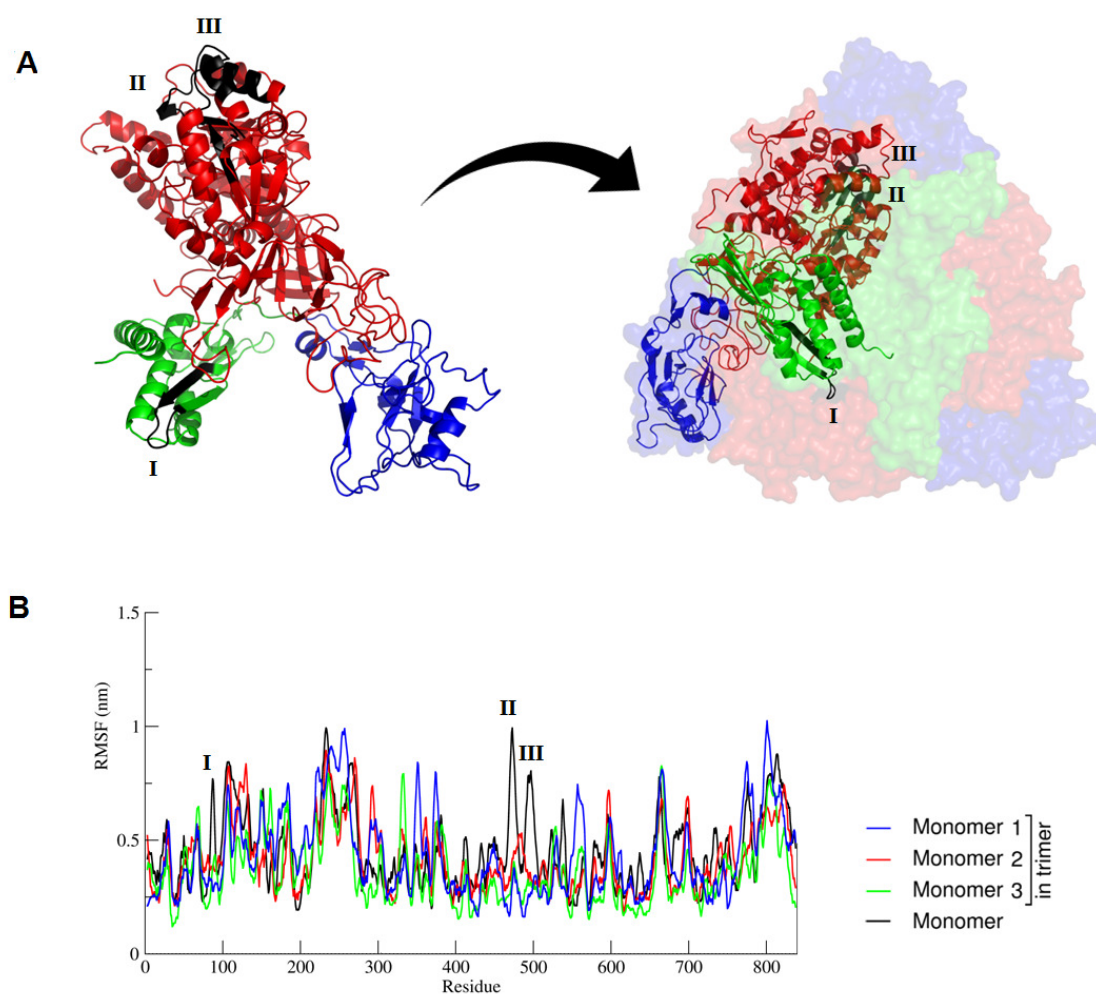


Figure 6. Differences in flexibility, from MARTINI force field simulations, between isolated and oligomerized urease monomers. (A) Structural representation of the regions showing differences in flexibility as identified by RMSF in (B) (colored as black). The right panel illustrates the potential interaction character of these regions when considering the oligomerized urease, giving a rationale for the increased flexibility of these regions in

the isolated urease monomer. **(B)** Root mean square fluctuations (RMSF) for the isolated JBURE-IIB monomer (black) and for the monomeric components in the JBURE-IIB trimer (red, green and blue). I, II and III indicate regions of the isolated monomer with remarkable increase in flexibility when compared to the oligomerized monomers.

CONCLUSIONS

Ureasases have been extensively studied by computational means [38-46]. These studies, however, focused on the catalytic mechanism of the enzyme, rather than on its general structural properties. In this work we presented an overview of the structural behavior of ureases in solution, in their monomeric and oligomeric forms. Additionally, our studies were conducted on a single-chain urease, obtained by comparative molecular modeling. This model is of special interest, since no single-chain urease has been successfully crystallized so far.

Despite small divergences, both metal-bound and metal-free JBURE-IIB molecular dynamics simulations can be considered as equivalent. Inter-domain hinge movements were postulated, with the γ domain being the most flexible domain of the protein. This flexibility, associated with a tendency of γ to establish contacts with the β domain, was considered a major factor influencing the propensity of the urease monomer to aggregate into trimers.

Being *C. ensiformis* urease not only an important enzyme involved in nitrogen metabolism but also a moonlighting protein, multiscale molecular modeling and dynamics simulation studies offer a powerful approach in understanding structure-function relationships concerning this enzyme.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), MCT, and by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), MEC, Brasília, DF, Brazil.

REFERENCES

- [1] Zerner B. Recent advances in the chemistry on an old enzyme, urease.; *Bioorg Chem* 1991;19:116-131.
- [2] Sirko A, Brodzik R. Plant ureases: roles and regulation. *Acta Bioch Pol* 2000;4:1189-1195.
- [3] Mobley HL, Island MD, Hausinger RP. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev* 1995;59:451-480.
- [4] Follmer C. Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry* 2008;69:18-28.
- [5] Jeffery, CJ. Moonlighting proteins. *TIBS* 1999;24:8-11.
- [6] Olivera-Severo D, Wassermann G, Carlini CR. Ureases display biological effects independent of enzymatic activity. Is there a connection to diseases caused by urease-producing bacteria? *Braz J Med Bio Res* 2006;39:851-861.
- [7] Sumner JB. The isolation and crystallization of the enzyme urease. *J Biol Chem* 1926;69:435-441.
- [8] Sheridan L, Wilmot CM, Cromie KD, van der Logt P, Phillips SE. Crystallization and preliminary X-ray structure determination of jack bean urease with a bound antibody fragment. *Acta Cryst* 2002;D58:374-376.
- [9] Balasubramanian A, Ponnuraj K. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of urease from pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Acta Cryst* 2008;F64: 662-664.
- [10] Balasubramanian A, Ponnuraj K. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of urease from jack bean (*Canavalia ensiformis*). *Acta Cryst* 2009;F65:949-951.
- [11] Polacco JC, Holland MA Genetic control of plant ureases. In: Setlow JK, editor. *Genetic Engineering*, vol 16. New York: Plenum Press; 1994. p. 33-48.

- [12] Pires-Alves M, Grossi-de-Sá MF, Barcellos GB, Carlini CR, Moraes MG. Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene family from jackbean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC]. *Plant Cell Physiol* 2003;44:139-145.
- [13] Mamiya G, Takishima K, Masakuni M, Kayumi T, Ogawa K, Sekita T. Complete amino acid sequence of jack bean urease. *Proc Japan Acad* 1985;61: 395-398.
- [14] Riddles PW, Whan V, Blakeley RL, Zerner B. Cloning and sequencing of a jack bean urease-encoding cDNA. *Gene* 1991;108:265-267.
- [15] Mulinari F, Stanisçuaski F, Bertholdo-Vargas LR, Postal M, Oliveira-Neto OB, Rigden DJ, Grossi-de-Sá MF, Carlini CR. Jaburetox-2Ec: An insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. *Peptides* 2007;28:2042-2050.
- [16] Carlini CR, Oliveira AE, Azambuja P, Xavier-Filho J, Wells MA. Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsin-like enzymes. *J Econ Entomol* 1997;90: 340-348.
- [17] Follmer C, Barcellos GB, Zingali RB, Machado OL, Alves EW, Barja-Fidalgo C, Guimarães JA, Carlini CR. Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochem. J* 2001;360:217-224.
- [18] Sánchez R, Šali A. Comparative protein structure modeling. Introduction and practical examples with Modeller. *Methods Mol Biol* 2000;143:97-129.
- [19] Laskowski RA, McArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst* 1993;26:283-291.
- [20] Lüthy R, Bowie J, Eisenberg D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* 1992;356:83-85.

- [21] Shukla KL, Gund TM, Meshnick SR. Molecular modeling studies of the artemisinin (qinghaosu)-hemin interaction: docking between the antimalarial agent and its putative receptor. *J Mol Graph* 1995;13:215-222.
- [22] Cheng F, Shen J, Luo X, Zhu W, Gu J, Ji R, Jiang H, Chen K. Molecular docking and 3-D-QSAR studies on the possible antimalarial mechanism of artemisinin analogues. *Bioorg Med Chem* 2002;10:2883-2891.
- [23] Ansari FL, Wadood A, Ullah A, Iftikhar F, Ul-Haq Z. *In silico* studies of urease inhibitors to explore ligand-enzyme interactions. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2009;24:151-156.
- [24] van der Spoel D, Lindahl E, Hess B, van Buuren AR, Apol E, Meulenhoff PJ, Tieleman DP, Sijbers ALTM, Freenstra KA, van Drunen R, Berendsen HJC. GROMACS user manual 3.3. 2005. <http://www.gromacs.org>
- [25] van Gunsteren WF, Billeter SR, Eising AA, Hünenberger PH, Krüger P, Mark AE, Scott WRP, Tironi IG. Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide. vdf Hochschulverlag, ETH Zürich, Switzerland, 1996.
- [26] Berendsen HJC, Grigera JR, Straatsma TP. The missing term in effective pair potentials. *J Phys Chem* 1987;91: 6269-6271.
- [27] Verli H, Guimarães JA. Molecular dynamics simulation of a decasaccharide fragment of heparin in aqueous solution. *Carbohydr Res* 2004;339:281–290.
- [28] Pol-Fachin L, Fernandes CL, Verli H. GROMOS96 43a1 performance on the characterization of glycoprotein conformational ensembles through molecular dynamics simulations. *Carbohydr Res* 2009;344:491-500.
- [29] Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije JGEM. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J Comput Chem* 1997;18:1463-1472.

- [30] Darden T, York D, Pedersen L. Particle Mesh Ewald – an $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys* 1993;98:10089-10092.
- [31] Berendsen HJC, Postma JPM, DiNola A, Haak JR. Molecular-dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* 1984;81:3684-3690.
- [32] Emekli U, Schneidman-Duhovny D, Wolfson HJ, Nussinov R, Haliloglu T. HingeProt: automated prediction of hinges in protein structures. *Proteins* 2008;70:1219-1227.
- [33] Marrink SJ, Risselada HJ, Yefimov S, Tieleman DP, de Vries AH. The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations. *J Phys Chem B* 2007;111:7812-7824.
- [34] Monticelli L, Kandasamy SK, Periole X, Larson RG, Tieleman DP, Marrink SJ. The MARTINI coarse grained forcefield: extension to proteins. *J Chem Theory Comput* 2008;4: 819-834.
- [35] Mulinari F, et al., unpublished results.
- [36] Fan H, Mark AE. Refinement of homology-based protein structures by molecular dynamics simulation techniques. *Protein Sci* 2004;13:211-20.
- [37] Poon GM. Enhancement of oligomeric stability by covalent linkage and its application to the human p53tet domain: thermodynamics and biological implications. *Biochem Soc Trans* 2007;35:1574-1578.
- [38] Csiki C, Zimmer M. A molecular mechanical analysis of the active site of urease with a special emphasis on determining the binding conformations available to oxygen-bound urea. *J Biomol Struct Dyn*, 1999;17:121-131.
- [39] Zimmer M. Molecular mechanics evaluation of the proposed mechanisms for the degradation of urea by urease. *J Biomol Struct Dyn* 2000;17:787-797.
- [40] Musiani F, Arnofi E, Casadio R, Ciurli S. Structure-based computational study of the catalytic and inhibition mechanisms of urease. *J Biol Inorg Chem* 2001;6:300-314.

- [41] Suárez D, Díaz N, Merz KM Jr. Ureases: quantum chemical calculations on cluster models. *J Am Chem Soc* 2003;125:15324-15337.
- [42] Estiu G, Merz KM Jr. The hydrolysis of urea and the proficiency of urease. *J Am Chem Soc* 2004;126:6932-6944.
- [43] Estiu G, Merz KM Jr. Enzymatic catalysis of urea decomposition: elimination or hydrolysis? *J Am Chem Soc* 2004;126:11832-11842.
- [44] Estiu G, Suárez D, Merz KM. Quantum mechanical and molecular dynamics simulations of ureases and Zn beta-lactamases. *J Comput Chem* 2006;27:1240-1262.
- [45] Estiu G, Merz KM Jr. Catalyzed decomposition of urea. Molecular dynamics simulations of the binding of urea to urease. *Biochemistry* 2006;45:4429-4443.
- [46] Estiu G, Merz KM Jr. Competitive hydrolytic and elimination mechanisms in the urease catalyzed decomposition of urea. *J Phys Chem B* 2007;111:10263-10274.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

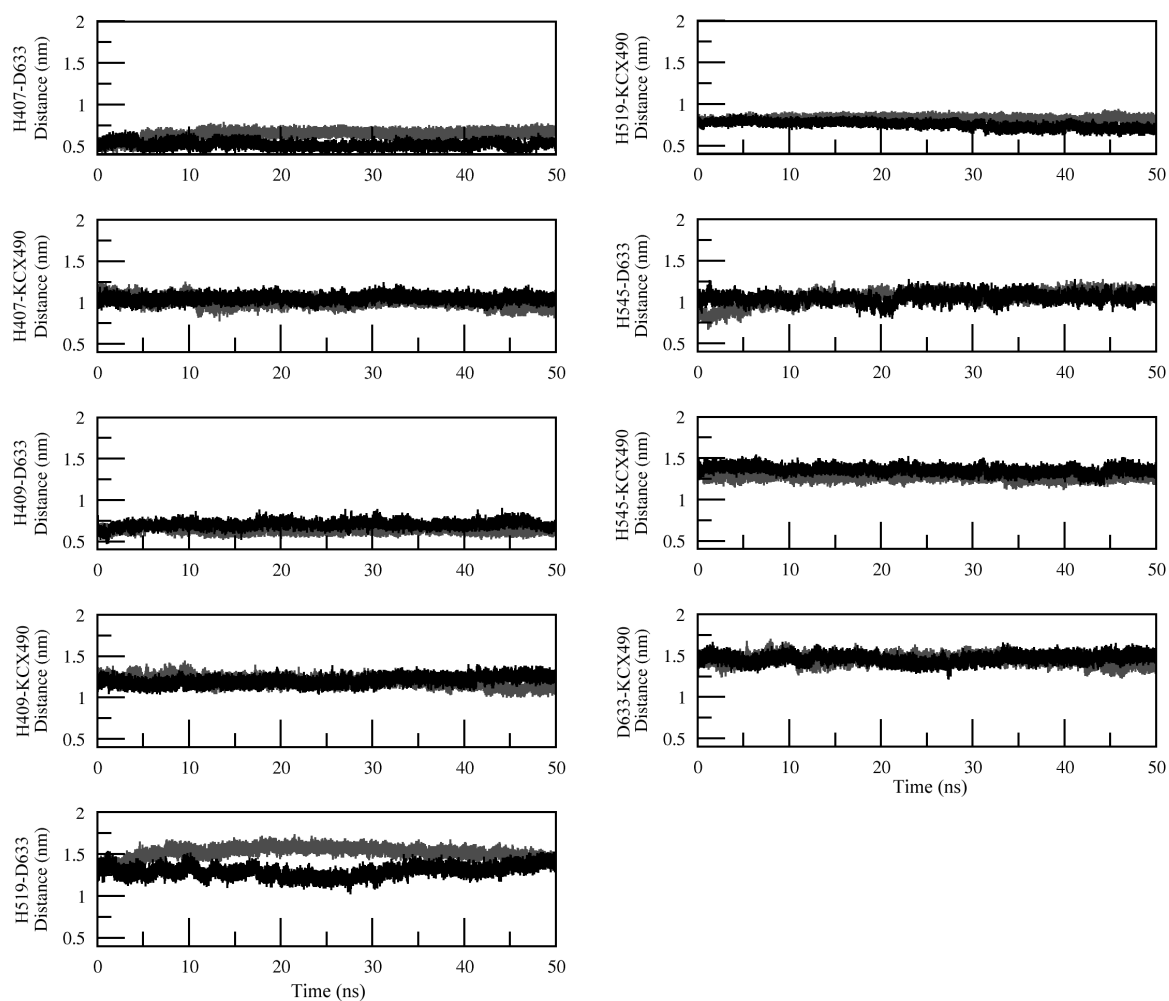


Figure 7S. Distance fluctuation, from GROMOS96 43a1 force field simulations, between different catalytically-relevant residues showing the active site stability (black represents metal-free and grey represents metal-bound urease).

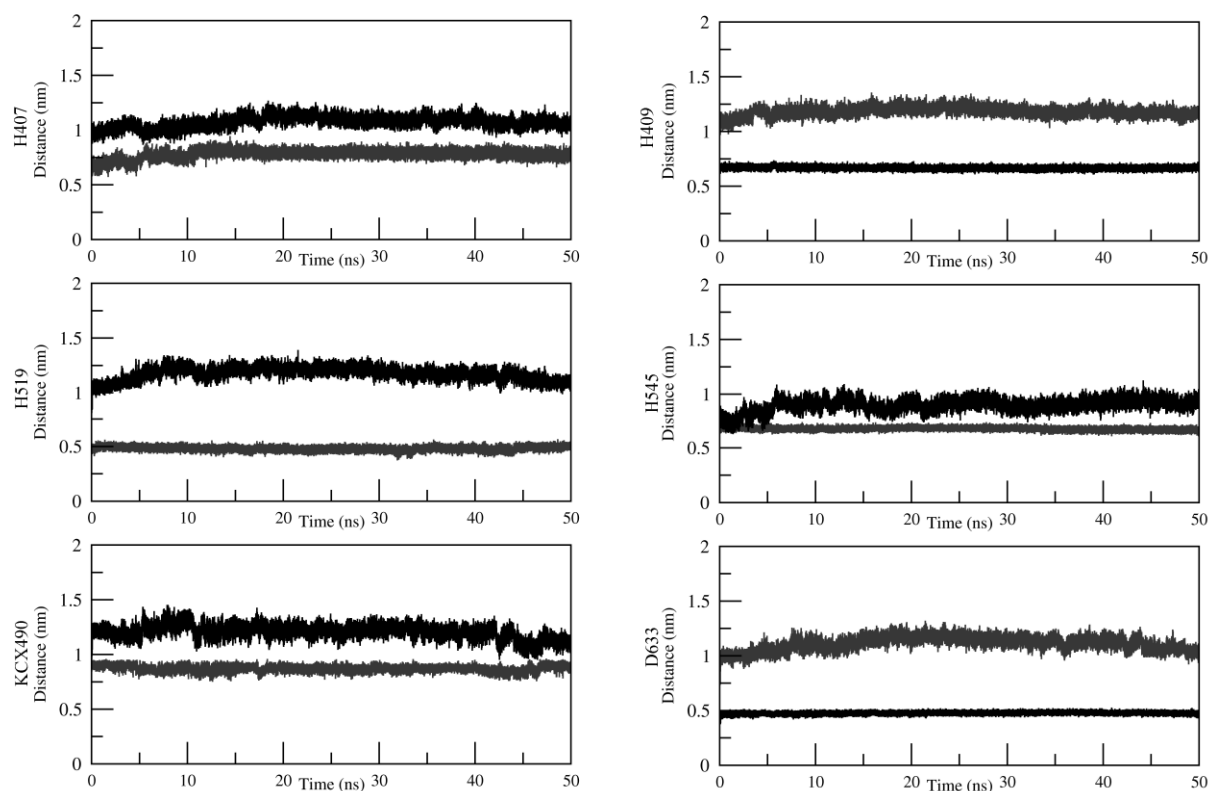


Figure 8S. Distance fluctuation, from GROMOS96 43a1 force field simulations, between the catalytically-relevant residues and the two Zn^{+2} atoms (grey represents Zn1 and black represents Zn2).

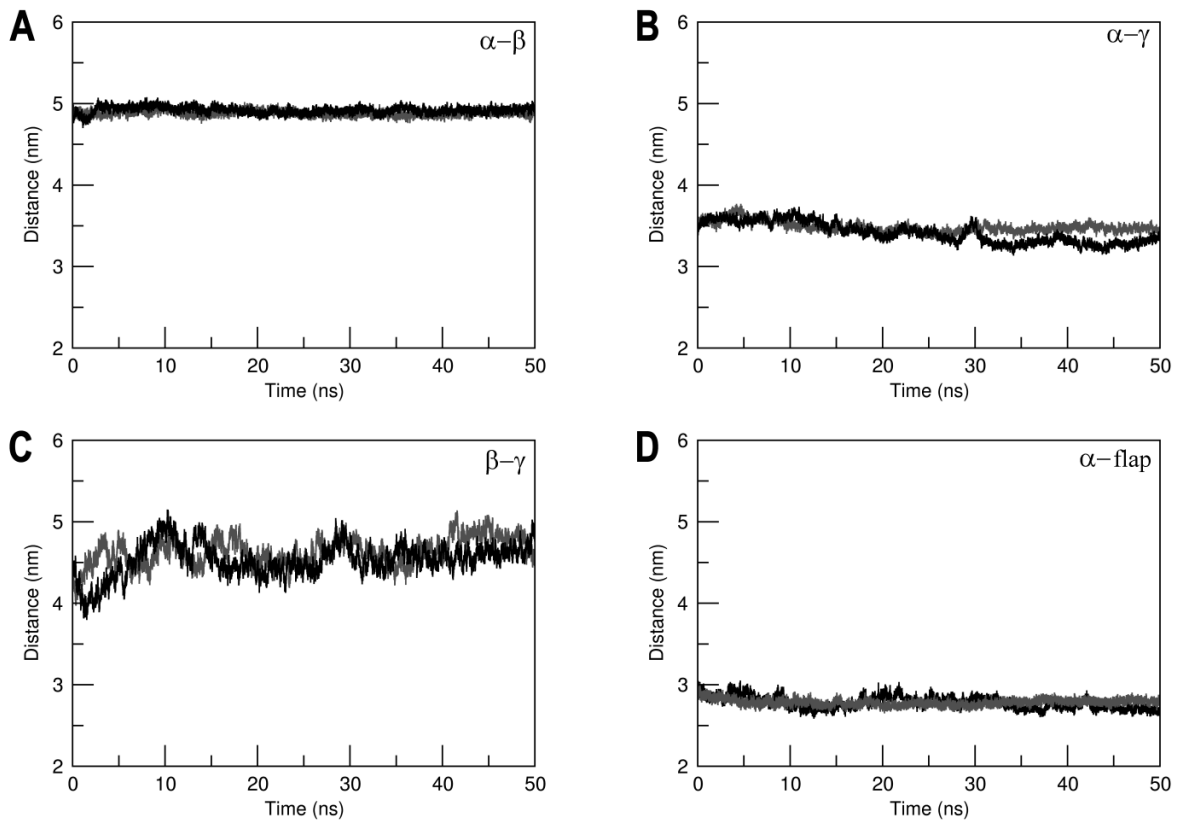


Figure 9S. Protein flexibility, from GROMOS96 43a1 force field simulations, as described by interdomain distance fluctuations. **(A)** α - β distance fluctuation; **(B)** α - γ distance fluctuation; **(C)** β - γ distance fluctuations; **(D)** α -active-site flap distance fluctuation (black represents metal-free and grey represents metal-bound urease).

5 Discussão geral

5.1 Estrutura e conformação da JBURE-IIB

A urease clássica de *C. ensiformis*, apesar de ter sido a primeira enzima a ser cristalizada (Sumner, 1926), ainda não teve a sua estrutura tridimensional resolvida. Até o momento, apenas dados preliminares e estruturas de baixa resolução foram obtidas para ureases de *C. ensiformis* e de outras plantas (Jabri *et al.*, 1992, Sheridan *et al.*, 2002, Balasubramanian & Ponnuraj, 2008, Balasubramanian & Ponnuraj, 2009). A grande heterogeneidade, insolubilidade, polidispersão e oligomerização variável da JBURE-I em solução, associada à possível contaminação dos cristais com isoformas da enzima (JBURE-IIB e canatoxina), podem estar associadas ao insucesso da determinação da estrutura da enzima por cristalografia de raios-X (Follmer, 2008).

Nesse contexto, a obtenção de um modelo estrutural para uma urease de *C. ensiformis* mostra-se necessária para uma melhor compreensão de eventos conformacionais relacionados a essa enzima. A escolha da isoforma alternativa JBURE-IIB, em vez da isoforma clássica (JBURE-I ou “majoritária”), foi devida a dois fatores: (i) a isoforma alternativa foi descoberta por nosso grupo de pesquisa (Mulinari, 2008) e (ii) todos os esforços de obtenção de uma estrutura de urease de *C. ensiformis* baseiam-se na isoforma clássica, tornando necessária uma análise estrutural da isoforma alternativa. Por outro lado, devido à grande semelhança entre a JBURE-I e a JBURE-IIB (aproximadamente 82% de identidade mais 14% de similaridade), as análises feitas com a isoforma alternativa podem ser extrapoladas à isoforma clássica de maneira segura.

As ureases têm sido estudadas por meios computacionais há mais de dez anos (Csiki & Zimmer, 1999; Zimmer, 2000; Musiani *et al.*, 2001; Suárez *et al.*, 2003; Estiu & Merz, 2004a,b; Estiu *et al.*, 2006; Estiu & Merz, 2006; Estiu & Merz, 2007). Todos esses estudos, entretanto, se concentraram no mecanismo catalítico da enzima, deixando de lado os aspectos conformacionais da mesma. O fato de a modelagem comparativa da enzima requerer atenção especial, devido principalmente a seus trechos sem molde disponível, pode ter colaborado para que não houvesse uma proposta estrutural detalhada para essa enzima, um ícone nos estudos de Bioquímica.

A alta flexibilidade das regiões de ligação entre domínios, já esperada baseando-se em sua predição como regiões de alças, reflete a independência estrutural das três cadeias presentes na urease bacteriana, utilizada como molde. Ainda não está claro, evolutivamente, se houve fusão das cadeias bacterianas, originando a cadeia única das ureases vegetais e fúngicas, ou se ocorreu o contrário, com a ruptura de uma cadeia única dando origem às subunidades bacterianas. Tentativas de avaliar o fenômeno filogeneticamente ainda não foram bem sucedidas (Moblely *et al.*, 1995, Braun, 2008). Talvez não seja possível associar o “caminho evolutivo” tomado pelas ureases a algum modelo evolutivo pré-definido, tornando necessária a obtenção de mais dados para se responder com clareza qual foi o evento principal, se fusão ou dissociação de cadeias. É possível, adicionalmente, que tal evento possa ter ocorrido mais de uma vez, ou de forma diferente nos diversos grupos de organismos.

A alta flexibilidade da enzima em sua forma monomérica foi também postulada, no presente trabalho, como possivelmente associada à sua oligomerização. Já foi proposto na literatura que as regiões de ligações interdomínio, por encontrarem-se ausentes em ureases bacterianas, não sejam essenciais para associação oligomérica das ureases (Mulinari *et al.*, 2007). Entretanto, é possível que haja alguma vantagem na presença dessas regiões, mesmo que seja uma melhor estabilização do complexo. Esse pode ser o caso da urease de *H. pylori*, uma das únicas ureases bacterianas com duas subunidades ligadas (de maneira semelhante às ureases vegetais e fúngicas). Nessa enzima, a organização oligomérica diferenciada (dodecamérica) pode indicar que a ligação das subunidades seja vantajosa do ponto de vista estrutural.

No presente trabalho, não foi possível associar a presença de metais no sítio ativo a algum evento conformacional relevante. Pode-se argumentar que a substituição do níquel pelo zinco alterou os possíveis efeitos associados ao metal “nativo”. Esse não parece ser o caso, considerando-se a natureza dos cálculos de dinâmica molecular, que não avaliam eventos eletrônicos (Schlick, 2006), a utilização de substituições desse tipo em outros estudos (Shukla *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 2002; Ansari *et al.*, 2009) e a presença de zinco em pelo menos uma urease vegetal (Follmer *et al.*, 2002).

5.2 A abordagem coarse-grained como ferramenta na simulação de biomoléculas

A associação da modelagem molecular comparativa à dinâmica molecular clássica e aos modelos *coarse-grained* permitiu a avaliação de eventos conformacionais em diferentes escalas temporais e espaciais, desde a localização de resíduos específicos até avaliação do efeito da mobilidade dos domínios sobre a compactação da urease trimérica em solução.

Na presente dissertação, a perda do detalhamento atômico, inerente à abordagem *coarse-grained*, foi compensada pelo ganho de informações relativas à chamada “dinâmica lenta”, eventos conformacionais que ocorrem em escalas de tempo muito superiores às aquelas obtidas com a dinâmica molecular tradicional (Tozzini, 2010). Nesse caso, passou de 0,05 μ s para 1,05 μ s de simulação, aumentando em vinte vezes o tempo de amostragem do sistema. Além disso, os modelos *coarse-grained* para os estudos da urease oligomerizada mantiveram uma característica estrutural de grande interesse para nosso grupo: uma cavidade central (Figura 10), possivelmente associada à capacidade putativa de ureases atuarem também como canais seletivos para íons (Piovesan, 2009).

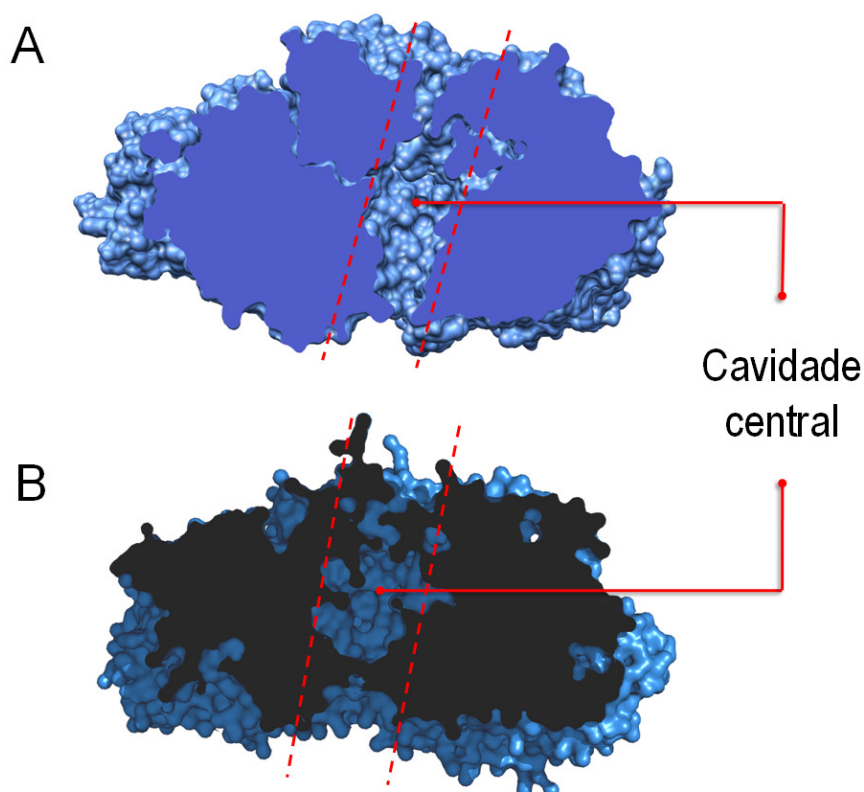


Figura 10: Cortes "transversais" dos trimeros de JBURE-IIB em (A) sua forma cristalográfica e (B) após 1,05 μ s de simulação *coarse-grained*.

Ainda não é possível determinar se essa representação do túnel é equivalente à sua representação atômica mas, considerando-se os resultados obtidos para a urease oligomérica, parece haver potencial para analisar-se o possível papel das ureases como canais transmembrana por meio da abordagem *coarse-grained*. A manutenção do poro após a simulação também serviu como indicativo do grau de conservação de estruturas particularmente delicadas em simulações do tipo *coarse-grained*. Adicionalmente, o tamanho da JBURE-IIB também se constituiu em um importante fator no emprego de simulações desse tipo.

6 Conclusões

Considerando os objetivos propostos, o presente trabalho permitiu:

- Construção de um modelo estrutural para a isoforma alternativa JBURE-IIB da urease de *C. ensiformis*, baseado na estrutura de uma urease bacteriana;
- Caracterização do comportamento conformacional da enzima em solução aquosa;
- Avaliação do papel de fatores estruturais na dinâmica da enzima, como oligomerização e presença cofatores metálicos.

Além disso, o trabalho também possibilitou:

- Identificar as regiões de ligação entre domínios como sendo as mais flexíveis da proteína;
- Caracterizar a compactação da enzima em suas formas monomérica e oligomérica, quando em solução aquosa;
- Identificar regiões potencialmente envolvidas na oligomerização da enzima;
- Consolidar da metodologia *coarse-grained* como abordagem válida no estudo de grandes sistemas biomoleculares, por manter características estruturais de interesse, mesmo com a simplificação inerente ao método.

De forma geral, os resultados obtidos reforçam o potencial de ferramentas de modelagem comparativa e dinâmica molecular no estudo de sistemas biológicos, com especial interesse na caracterização do comportamento conformacional de ureases, permitindo sua correlação com dados experimentais prévios.

7 Perspectivas

Considerando-se os procedimentos de modelagem e simulação empregados no presente trabalho, especialmente relacionados ao estudo de ureases, as seguintes perspectivas podem ser traçadas:

- Caracterização da dinâmica de ureases com diferentes organizações estruturais, buscando estabelecer relações entre os comportamentos conformacionais das enzimas oriundas de diferentes organismos:
 - ureases bacterianas com organização $\alpha\beta\gamma$ em sua forma fundamental e $(\alpha\beta\gamma)_3$ em sua forma oligomerizada;
 - ureases bacterianas com organização $\alpha\beta$ em sua forma fundamental e $((\alpha\beta)_3)_4$ em sua formas oligomerizada;
 - ureases vegetais e fúngicas, com organização monomérica em sua forma fundamental e organizações variáveis em suas formas oligomerizadas;
- Caracterização da interação de ureases com biomembranas, com especial interesse na possível inserção da proteína em bicamadas lipídicas e formação de poros ou canais;
- Caracterização da interação da enzima com componentes específicos de biomembranas, como fosfo- e glicolipídeos, potencialmente envolvidos em sua ação não ureolítica quando administrada em modelos animais.

8 Referências Bibliográficas

- Ansari, F. L.; Wadood, A.; Ullah, A.; Iftikhar, F.; Ul-Haq, Z. In silico studies of urease inhibitors to explore ligand-enzyme interactions. *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.*, **2009**, *24*, 151-156.
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **1997**, *25*, 3389-3402.
- Balasubramanian, A.; Ponnuraj, K.: Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of urease from pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Acta Cryst.*, **2008**, *F64*, 662–664.
- Balasubramanian, A.; Ponnuraj, K.: Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of urease from jack bean (*Canavalia ensiformis*). *Acta Cryst.*, **2009**, *F65*, 949–951
- Balasubramanian, A.; Ponnuraj, K.: Crystal structure of the first plant urease from Jack bean: 83 years of journey from its first crystal to molecular structure. *J. Mol. Biol.*, **2010**, *in press*. DOI 10.1016/j.jmb.2010.05.009 (disponível online desde maio 2010).
- Banci, L.: Molecular dynamics simulations of metalloproteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2003**, *7*, 143-149.
- Becker-Ritt, A. B.; Martinelli, A. H.; Mitidieri, S.; Feder, V.; Wassermann, G. E.; Santi, L.; Vainstein, M. H.; Oliveira, J. T.; Fiuza, L. M.; Pasquali, G.; Carlini, C. R.: Antifungal activity of plant and bacterial ureases. *Toxicon*, **2007**, *50*, 971-983.
- Benini, S.; Rypniewski, W. R.; Wilson, K. S.; Miletto, S.; Ciurli, S.; Mangani, S.: A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels. *Structure*, **1999**, *7*, 205-216.

- Benini, S.; Rypniewski, W. R.; Wilson, K. S.; Ciurli, S.; Mangani S.: Structure-based rationalization of urease inhibition by phosphate: novel insights into the enzyme mechanism. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2001**, *6*, 778-790.
- Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; Hermans, J. In Pullman, B (ed.). *Intermolecular forces*; Dordrecht:Reidel, **1981**, p. 331-342.
- Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; DiNola, A.; Haak, J. R.: Molecular-dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.*, **1984**, *81*, 3684-3690.
- Berendsen, H. J. C.; Grigera, J. R.; Straatsma, T. P.: The missing term in effective pair potentials. *J. Phys. Chem.*, **1987**, *91*, 6269-6271.
- Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E.: The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.*, **2000**, *28*, 235-242.
- Braun, R. L. *Ureases: uma análise comparativa*. Porto Alegre: UFRGS, 2008. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **2008**.
- Bremner, J. M.; Krogmeier, M. J.: Evidence that the adverse effect of urea fertilizer on seed germination in soil is due to ammonia formed through hydrolysis of urea by soil urease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1989**, *86*, 8185-8188.
- Burne, R. A.; Chen, Y. Y.: Bacterial ureases in infectious diseases. *Microbes Infect.*, **2000**, *2*, 533-42.
- Carlini, C. R.; Guimarães, J. A.: Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon*, **1981**, *19*, 667-676.
- Carlini, C. R.; Oliveira, A. E.; Azambuja, P.; Xavier-Filho, J.; Wells, M. A.: Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsin-like enzymes. *J. Econ. Entomol.*, **1997**, *90*, 340-348.
- Carlini, C. R.; Grossi-de-Sá, M. F.: Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, **2002**, *40*, 1515-1539.

- Carlini, C. R.; Polacco, J. C.: Toxic properties of ureases. *Crop Science*, **2008**, *48*, 1665-1672.
- Case, D. A.; Cheatham, T. E. 3rd; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M. Jr.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J.: The Amber Biomolecular Simulation Programs. *J. Comput. Chem.*, **2005**, *26*, 1668-1688.
- Castanier, S.; Métayer-Levrel, G. L.; Perthuisot, J. P.: Ca-carbonates precipitation and limestone genesis — the microbiogeologist point of view. *Sediment. Geol.*, **1999**, *126*, 9-23.
- Cheng, F.; Shen, J.; Luo, X.; Zhu, W.; Gu, J.; Ji, R.; Jiang, H.; Chen, K. Molecular docking and 3-D-QSAR studies on the possible antimalarial mechanism of artemisinin analogues. *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, *10*, 2883-2891.
- Clark, M.; Cramer, R. D.; van Opdenbosch, N.: Validation of the general-purpose Tripos 5.2 force-field. *J. Comput. Chem.*, **1989**, *10*, 982-1012.
- Clementi, C.: Coarse-grained models of protein folding: toy models or predictive tools? *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2008**, *18*, 10-15.
- Cox, G. M.; Mukherjee, J.; Cole, G. T.; Casadevall, A.; Perfect, J. R. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect. Immun.*, **2000**, *68*, 443-448.
- Csiki, C.; Zimmer, M. A molecular mechanical analysis of the active site of urease with a special emphasis on determining the binding conformations available to oxygen-bound urea. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1999**, *17*, 121-131.
- Darden, T.; York, D.; Pedersen, L.: Particle Mesh Ewald – an N.log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.*, **1993**, *98*, 10089-10092.
- de Groot, B. L.; Grubmüller, H. Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science*, **2001**, *294*, 2353-2357.
- de Sant'Anna, C. M. R.: Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações IUPAC 1997). *Quim. Nova*, **2002**, *25*, 505-512.
- DeLano, W. L.: *The PyMOL Molecular Graphics System*, DeLano Scientific, South San Francisco, CA, USA, **2002**.

- Dixon, N. E.; Gazzola, C.; Blakeley, R. L.; Zerner B.: Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, *97*, 4131–4133.
- Das, N.; Kayastha, A. M.; Srivastava, P. K.: Purification and characterization of urease from dehusked pigeonpea (*Cajanus cajan* L) seeds. *Phytochemistry*. **2002**, *61*, 513-521.
- Eaton, K. A.; Brooks C. L.; Morgan, D. R.; Krakowka, S.: Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.*, **1991**, *59*, 2470–2475.
- Emekli, U.; Schneidman-Duhovny, D.; Wolfson, H. J.; Nussinov, R.; Haliloglu, T.: HingeProt: automated prediction of hinges in protein structures. *Proteins*, **2008**, *70*, 1219-1227.
- Ermler, U.; Grabarse, W.; Shima, S.; Goubeaud, M.; Thauer, R. K.: Active sites of transition-metal enzymes with focus on nickel. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1998**, *8*, 749-758.
- Estiu, G.; Merz, K. M. Jr. The hydrolysis of urea and the proficiency of urease. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 6932-6944.
- Estiu, G.; Merz, K. M. Jr. Enzymatic catalysis of urea decomposition: elimination or hydrolysis? *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 11832-11842.
- Estiu, G.; Suárez, D.; Merz Jr, K.M.: Quantum mechanical and molecular dynamics simulations of ureases and Zn β -Lactamases. *J. Comput. Chem.*, **2006**, *27*, 1240–1262.
- Estiu, G., Merz, K. M. Jr. Catalyzed decomposition of urea. Molecular dynamics simulations of the binding of urea to urease. *Biochemistry*, **2006**, *45*, 4429-4443.
- Estiu, G.; Merz, K. M. Jr.: Competitive hydrolytic and elimination mechanisms in the urease catalyzed decomposition of urea. *J. Phys. Chem. B.*, **2007**, *111*, 10263-10274.
- Eswar, N.; Martí-Renom, M. A.; Webb, B.; Madhusudhan, M. S.; Eramian, D.; Shen, M.; Pieper, U.; Šali, A.: Comparative protein structure modeling with

- MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics*, John Wiley & Sons, **2000**, Suppl. 15, p. 5.6.1-5.6.30.
- Fan, H.; Mark, A. E.; Refinement of homology-based protein structures by molecular dynamics simulation techniques. *Protein Sci.*, **2004**, 13, 211-20.
- Fearon, W. R.: XII. Urease. Part I. The chemical changes involved in the zymolysis of urea. *Biochem. J.*, **1923**, 17, 84-93.
- Fernandes, C. L. *Predição da estrutura tridimensional da EPSP sintase de Mycobacterium tuberculosis utilizando modelagem molecular comparativa por homologia*. Porto Alegre: UFRGS, 2002. Monografia (Graduação em Farmácia), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **2002**.
- Ferreira-DaSilva, C. T.; Gombarovits, M. E.; Masuda, H.; Oliveira, C. M.; Carlini, C. R.: Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **2000**, 44, 162-171.
- Follmer, C.; Barcellos, G. B.; Zingali, R. B.; Machado, O. L.; Alves, E. W.; Barja-Fidalgo, C.; Guimarães, J. A.; Carlini, C. R.: Canatoxin, a toxic protein from Jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochem. J.*, **2001**, 360, 217-224.
- Follmer, C.; Carlini, C. R.; Yoneama, M. -L; Dias, J. F.: PIXE analysis of urease isoenzymes isolated from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds. *Nucl. Instr. and Meth. In Phys. Res. B.*, **2002**, 189, 482-486.
- Follmer, C.; Real-Guerra, R.; Wasserman, G.E.; Olivera-Severo, D.; Carlini, C. R.: Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. *Eur. J. Biochem.*, **2004**, 271, 1357-1363.
- Follmer, C.: Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry*. **2008**, 69, 18-28
- Follmer, C.: Ureases as a target for the treatment of gastric and urinary infections. *J. Clin. Pathol.*, **2010**, 63, 424-30.
- Forster, M. K.: Molecular modelling in structural biology. *Micron*, **2001**, 33, 365-384.

- Gianfreda, L.; Cristofaro, A.; Rao, M. A.; Violante, A.: Kinetic Behavior of Synthetic Organo- and Organo-Mineral-Urease Complexes. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **1995**, *59*, 811–815
- Guex, N.; Peitsch, M. C.: SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis*, **1997**, *18*, 2714-2723.
- Ha, N.-C.; Oh, S.-T.; Sung, J. Y.; Cha, K. A.; Lee, M. H.; Oh, B.-H.: Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nature Struct. Biol.*, **2001**, *8*, 505–509.
- Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J. G. E. M.: LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.*, **1997**, *18*, 1463-1472.
- Hirai, M.; Kawai-Hirai, R.; Hirai, T.; Ueki, T.: Structural change of jack bean urease induced by addition of surfactants studied with synchrotron-radiation small-angle X-ray scattering. *Eur. J. Biochem.*, **1993**, *215*, 55–61.
- Hirayama, C.; Sugimura, M.; Saito, H.; Nakamura, M.: Host plant urease in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, **2000a**, *46*, 1415–1421.
- Hirayama, C.; Sugimura, M.; Saito, H.; Nakamura, M.: Purification and properties of urease from the leaf of mulberry, *Morus alba*. *Phytochemistry*. **2000b**, *53*, 325–330.
- Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K.: VMD – Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.*, **1996**, *14*, 33-38.
- Jabri, E.; Lee, M. H.; Hausinger, R. P.; Karplus, P. A.: Preliminary crystallographic studies of urease from jack bean and from *Klebsiella aerogenes*. *J. Mol. Biol.*, **1992**, *227*, 934–937.
- Jabri, E.; Carr, M. B.; Hausinger, R. P.; Karplus, P. A.: The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. *Science*, **1995**, *268*, 998–1004.
- Jeffery, C. J.: Moonlighting proteins. *Trends Biochem. Sci.*, **1999**, *24*, 8-11.
- Jeffery, C. J.: Moonlighting proteins – an update. *Mol. Biosyst.*, **2009**, *5*, 345-350.

- Jin, M.; Rosario, W.; Watler, E; Calhoun, D. H.: Development of a large-scale HPLC-based purification for the urease from *Staphylococcus leei* and determination of subunit structure. *Protein Expr. Purif.*, **2004**, *34*, 111-117.
- Jorgensen, W. L.; Tirado-Rives, J.: The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 1657-1666.
- Karmali, A.; Domingos, A.: Monoclonal antibodies against urease from *Canavalia ensiformis*. *Biochimie*, **1993**, *75*, 1001–1006.
- Karplus, P. A.; Pearson, M. A.; Hausinger, R. P.: 70 Years of Crystalline Urease: What Have We Learned?. *Acc. Chem. Res.*, **1997**, *30*, 330–337.
- Kitson, D. H.; Hagler, A. T.: Theoretical-studies of the structure and molecular-dynamics of a peptide crystal. *Biochemistry*, **1988**, *27*, 5246-5257.
- Krajewska, B.: Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2009**, *59*, 9-21.
- Kurowski, M. A.; Bujnicki, J. M.: GeneSilico protein structure prediction meta-server. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 3305-3307
- Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Higgins, D. G.: ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics*, **2007**, *23*, 2947-2948.
- Laskowski, R. A.; McArthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M.: PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, **1993**, *26*, 283-291.
- Leach, A. R.: *Molecular Modelling: Principles and Applications*, 2.ed. Cingapura: Longman, **2001**.
- López, C. A.; Rzepiela, A.; de Vries, A. H.; Dijkhuizen, L.; Hüenenberger, P. H.; Marrink, S. J.: The Martini coarse grained force field: extension to carbohydrates. *J. Chem. Theory Comput.*, **2009**, *5*, 3195-3210.

- Lubbers, M. W.; Rodriguez, S.B.; Honey, N.K.; Thornton, R.J.: Purification and characterization of urease from *Schizosaccharomyces pombe*. *Can. J. Microbiol.* **1996**, *42*,132-140.
- Lüthy, R.; Bowie, J.; Eisenberg, D.: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, **1992**, *356*, 83-85.
- MacKerell, A. D. Jr.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack, R. L. Jr.; Evanseck, J. D.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F. T. K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D. T.; Prodhom, B.; Reiher, W. E. ^{3rd}; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J. C.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiórkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M.: All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins *J. Phys. Chem. B*, **1998**, *102*, 3586-3616.
- Maggin, E. J.; Elliott, J. R.: Historical perspective and current outlook for Molecular Dynamics as a chemical engineering tool. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2010**, *49*, 3059–3078.
- Mamiya, G.; Takishima, K.; Masakuni, M.; Kayumi, T.; Ogawa, K.; Sekita, T.: Complete amino acid sequence of jack bean urease. *Proc. Japan. Acad.*, **1985**, *61*, 395-398.
- Marrink, S. J.; Risselada, H. J.; Yefimov, S.; Tieleman, D. P.; de Vries, A. H.; The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations. *J Phys. Chem. B.*, **2007**, *111*, 7812-24.
- Marrink, S. J.; Fuhrmans, M.; Risselada, H. J.; Periole, J.: The MARTINI force field. In Voth, G. (ed.). *Coarse graining of condensed phase and biomolecular systems*, Boca Raton: CRC Press, **2008**.
- Martí-Renom, M. A.; Stuart, A. C.; Fiser, A.; Sánchez, R.; Melo, F.; Šali A.: Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **2000**, *29*, 291-325.
- McCammon, J. A.; Gelin, B. R.; Karplus, M.: Dynamics of folded proteins. *Nature*, **1977**, *267*, 585-590.
- Menegassi, A.; Wassermann, G. E.; Olivera-Severo, D.; Becker-Ritt, A. B.; Martinelli, A. H.; Feder, V.; Carlini, C. R.: Urease from cotton (*Gossypium hirsutum*)

- seeds: isolation, physicochemical characterization, and antifungal properties of the protein. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, *56*, 4399-4405.
- Messer, B.M.; Roca, M.; Chu, Z. T.; Vicatos, S.; Kilshtain, A. V.; Warshel, A.: Multiscale simulations of protein landscapes: using coarse-grained models as reference potentials to full explicit models. *Proteins*, **2010**, *78*, 1212-1227.
- Métayer-Levrel, G. L.; Castanier, S.; Oriol, G.; Loubière, J. F.; Perthuisot, J. P.: Applications of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic patrimony. *Sediment. Geol.*, **1999**, *126*, 25-34.
- Meyer-Bothling, L. E.; Polacco, J. C.: Mutational analysis of the embryo-specific urease locus of soybean. *Mol. Gen. Genet.*, **1987**, *209*, 439-444.
- Mirbod, F.; Schaller, R. A.; Cole, G. T.: Purification and characterization of urease isolated from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Med. Mycol.*, **2002**, *40*, 35-44.
- Mobley, H. L.; Island, M. D.; Hausinger, R. P.: Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.*, **1995**, *59*, 451-480.
- Monticelli, L.; Kandasamy, S. K.; Periolo, X.; Larson, R. G.; Tieleman, D. P.; Marrink, S. J.: The MARTINI coarse grained forcefield: extension to proteins. *J. Chem. Theory Comput.*, **2008**, *4*, 819-834.
- Mulinari, F.; Stanisçuaski, F.; Bertholdo-Vargas, L. R.; Postal, M.; Oliveira-Neto, O. B.; Rigden, D. J.; Grossi-de-Sá, M. F.; Carlini, C. R. Jaburetox-2Ec: An insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. *Peptides*, **2007**, *28*, 2042-2050.
- Mulinari F. *Ureases de Canavalia ensiformis e peptídeo inseticida derivado*. Porto Alegre: UFRGS, 2008. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular), Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **2008**.
- Musiani, F.; Arnofi, E.; Casadio, R.; Ciurli, S. Structure-based computational study of the catalytic and inhibition mechanisms of urease. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2001**, *6*, 300-314.

- Nagano, N.; Orengo, C. A.; Thornton, J. M.: One fold with many functions: the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. *J. Mol. Biol.*, **2002**, *321*, 741-765.
- Olivera-Severo, D.; Wassermann, G.; Carlini, C. R.: Ureases display biological effects independent of enzymatic activity. Is there a connection to diseases caused by urease-producing bacteria? *Braz. J. Med. Bio. Res.*, **2006**, *39*, 851-861.
- Pedrozo, H. A.; Schwartz, Z.; Dean, D. D.; Wiederhold, M. L.; Boyan, B. D.: Regulation of statoconia mineralization in *Aplysia californica* in vitro. *Connect. Tissue Res.*, **1996a**, *35*, 317-323.
- Pedrozo, H. A.; Schwartz, Z.; Luther, M.; Dean, D. D.; Boyan, B.D.; Wiederhold, M. L.: A mechanism of adaptation to hypergravity in the statocyst of *Aplysia californica*. *Hear Res.*, **1996b**, *102*, 51-62.
- Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E.: UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, **2004**, *25*, 1605-1612.
- Piovesan, A. R. *Urease de Canavalia ensiformis: processamento diferencial por ninfas e adultos de Dysdercus peruvianus e formação de canal in vitro*. Porto Alegre: UFRGS, 2009. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **2009**.
- Pires-Alves, M.; Grossi-de-Sá, M. F.; Barcellos, G. B.; Carlini, C. R.; Moraes, M. G.: Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene family from jackbean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC]. *Plant Cell Physiol.*, **2003**, *44*: 139-145.
- Pol-Fachin, L. *Descrição conformacional de carboidratos e glicoproteínas: validação de protocolo baseado em dinâmica molecular e implicações funcionais*. Porto Alegre: UFRGS, 2009. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **2009**.

- Pol-Fachin, L.; Fernandes, C. L.; Verli, H.: GROMOS96 43a1 performance on the characterization of glycoprotein conformational ensembles through molecular dynamics simulations. *Carbohydr. Res.*, **2009**, *344*, 491-500.
- Polacco, J. C.; Havir, E. A.: Comparisons of soybean urease isolated from seed and tissue culture. *J. Biol. Chem.*, **1979**, *254*, 1707-1715.
- Polacco, J. C.; Holland, M. A.: Roles of urease in plant cells. In Jeon K. W. & Jarvik J. (eds.). *International Review of Cytology*, vol. *145*. San Diego: Academic Press, **1993**.
- Polacco, J.C.; Holland, M. A.: Genetic control of plant ureases. In Setlow J.K. (ed.). *Genetic Engineering*, vol. *16*. New York: Plenum Press, **1994**.
- Ponder, J. W.; Case, D. A.: Force fields for protein simulations. In Richards, F. M.; Eisenberg, D. S.; Kuriyan, J. (eds.). *Advances in protein chemistry*, vol. *66*., San Diego: Elsevier Academic Press, **2003**.
- Poon, G. M.: Enhancement of oligomeric stability by covalent linkage and its application to the human p53tet domain: thermodynamics and biological implications. *Biochem. Soc. Trans.*, **2007**, *35*, 1574-1578.
- Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V.: Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.*, **1963**, *7*, 95-99.
- Riddles, P. W.; Whan, V.; Blakeley, R. L.; Zerner, B.: Cloning and sequencing of a jack bean urease-encoding cDNA. *Gene*, **1991**, *108*, 265-267.
- Sacristán, M.; Millanes, A. M.; Legaz, M. E.; Vicente, C.: A lichen lectin specifically binds to the α -1,4-polygalactoside moiety of urease located in the cell wall of homologous algae. *Plant Signal. Behav.*, **2006**, *1*, 23-27.
- Šali, A.: Modeller: a program for protein structure modeling - release 9v4 (manual). 2008. Salilab. Disponível em «<http://salilab.org/modeller/9v4/manual>»
- Sanbonmatsu, K. Y.; Joseph, S.; Tung, C. S.: Simulating movement of tRNA into the ribosome during decoding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2005**, *102*, 15854-15859.
- Sánchez, R; Šali, A.: Comparative protein structure modeling. Introduction and practical examples with Modeller. *Methods Mol. Biol.*, **2000**, *143*, 97-129.

- Schäfer, U. K.; Kaltwasser, H.: Urease from *Staphylococcus saprophyticus*: purification, characterization and comparison to *Staphylococcus xyloso* urease. *Arch. Microbiol.*, **1994**, *161*, 393-399.
- Schlick, T.: *Molecular Modeling and Simulation: an Interdisciplinary Guide*, 1.ed. New York: Springer, **2006**.
- Scott, W. R. P.; Hünenberger, P. H.; Tironi, I. G.; Mark, A. E.; Billeter, S. R.; Fennen, J.; Torda, A. E.; Huber, T.; Krüger, P.; van Gunsteren, W. F.: The GROMOS biomolecular simulation program package. *J. Phys. Chem. A*, **1999**, *103*, 3596-3607
- Sheridan, L.; Wilmot, C. M.; Cromie, K. D.; van der Logt, P.; Phillips, S. E. V.: Crystallization and preliminary X-ray structure determination of jack bean urease with a bound antibody fragment. *Acta Cryst.*, **2002**, *D58*, 374–376.
- Sherwood, P.; Brooks, B. R.; Sansom, M. S.: Multiscale methods for macromolecular simulations. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2008**, *18*, 630-640.
- Shukla, K. L.; Gund, T. M.; Meshnick, S. R. Molecular modeling studies of the artemisinin (qinghaosu)-hemin interaction: docking between the antimalarial agent and its putative receptor. *J. Mol. Graph.*, **1995**, *13*, 215-222.
- Sirko, A.; Brodzik, R.: Plant ureases: roles and regulation. *Acta Bioch. Pol.*, **2000**, *4*, 1189-1195.
- Stanisçuaski, F.; Ferreira-DaSilva, C. T.; Mulinari, F.; Pires-Alves, M.; Carlini, C. R.: Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon*, **2005**, *45*, 753-760.
- Stanisçuaski, F.; Te Brugge, V.; Carlini, C.R.; Orchard, I.: In vitro effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec in *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules. *J. Insect Physiol.*, **2009**, *55*, 255-263.
- Suárez, D; Díaz, N; Merz, K. M. Jr. Ureases: quantum chemical calculations on cluster models. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 15324-15337.
- Sumner J.B.: The isolation and cristallization of the enzyme urease. *J. Biol. Chem.*, **1926**, *69*, 435–441.
- Sumner, J. B.: The story of urease. *J. Chem. Educ.*, **1937**, *14*, 255-259.

- Takishima, K.; Suga, T.; Mamiya, G.: The structure of jack bean urease. The complete amino acid sequence, limited proteolysis and reactive cysteine residues. *Eur. J. Biochem.*, **1988**, *175*, 151–165.
- Tange, Y.; Niwa, O.: Identification of the ure1+ gene encoding urease in fission yeast. *Curr. Genet.*, **1997**, *32*, 244–246.
- Thauer, R. K.: Nickel to the fore. *Science*, **2001**, *293*, 1264-1265.
- Tozzini, V.: Multiscale modeling of proteins. *Acc. Chem. Res.*, **2010**, *43*, 220-230.
- van Gunsteren, W. F.; Billeter, S. R.; Eising, A. A.; Hünenberger, P. H.; Krueger, P.; Mark, A. E.; Scott, W. R. P.; Tironi, I. G.: *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide*. Zurich: Vdf Hochschulverlag AG, **1996**.
- van Gunsteren, W. F.; Bakowies, D.; Baron, R.; Chandrasekhar, I.; Christen, M.; Daura, X.; Gee, P.; Geerke, D. P.; Glättli, A.; Hünenberger, P. H.; Kastenholz, M. A.; Oostenbrink, C.; Schenk, M.; Trzesniak, D.; van der Vegt, N. F.; Yu, H. B.: Biomolecular modeling: Goals, problems, perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2006**, *45*, 4064-4092.
- Verli, H.: *Interação heparina-antitrombina: reconhecimento molecular caracterizado por ferramentas de modelagem molecular*. Porto Alegre: UFRGS, 2005. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular), Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **2005**.
- Wassermann, G. E.; Olivera-Severo, D.; Uberti, A. F.; Carlini, C.R.: *Helicobacter pylori* urease activates blood platelets through a lipoxygenase-mediated pathway. *J. Cell. Mol. Med.*, **2009**, *in press*. DOI 10.1111/j.1582-4934.2009.00901.x (disponível *online* desde setembro 2009).
- Wheeler, D. L.; Barrett, T.; Benson, D. A.; Bryant, S. H.; Canese, K.; Chetvernin, V.; Church, D. M.; Dicuccio, M.; Edgar, R.; Federhen, S. Feolo, M.; Geer, L. Y.; Helmberg, W.; Kapustin, Y.; Khovayko, O.; Landsman, D.; Lipman, D. J.; Madden, T. L.; Maglott, D. R.; Miller, V.; Ostell, J.; Pruitt, K. D.; Schuler, G. D.; Shumway, M.; Sequeira, E.; Sherry, S. T.; Sirotkin, K.; Souvorov, A.; Starchenko, G.; Tatusov, R. L.; Tatusova, T. A.; Wagner, L.; Yaschenko, E.:

- Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.*, **2008**, *36 (D)*, 13-21.
- Yu, J. J.; Smithson, S. L.; Thomas, P. W.; Kirkland, T. N.; Cole, G. T.: Isolation and characterization of the urease gene (URE) from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Gene*, **1997**, *198*, 387–391.
- Zerner B.: Recent advances in the chemistry on an old enzyme, urease. *Bioorg. Chem.*, **1991**, *19*, 116-131.
- Zimmer, M. Molecular mechanics evaluation of the proposed mechanisms for the degradation of urea by urease. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **2000**, *17*, 787-797.
- Zonia, L. E.; Stebbins, N. E.; Polacco, J. C.: Essential role of urease in germination of nitrogen- limited *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Physiol.*, **1995**, *107*, 1097–1103.

9 Apêndices

9.1 Apêndice A

Tabela A: Estruturas 3D de ureases depositadas no Protein Data Bank

| PDB ID | Organismo-fonte | Comentário | Resolução (Å) |
|--------|-----------------------------------|--|---------------|
| 1FWJ | <i>Klebsiella aerogenes</i> | Nativa | 2,20 |
| 1EJR | <i>Klebsiella aerogenes</i> | Mutante D221A | 2,00 |
| 1EJS | <i>Klebsiella aerogenes</i> | Mutante H219N | 2,00 |
| 1EJT | <i>Klebsiella aerogenes</i> | Mutante H219Q | 2,00 |
| 1EJU | <i>Klebsiella aerogenes</i> | Mutante H320N | 2,00 |
| 1EJV | <i>Klebsiella aerogenes</i> | Mutante H320Q | 2,40 |
| 1EJW | <i>Klebsiella aerogenes</i> | Wild-type a 298K | 1,90 |
| 1EJX | <i>Klebsiella aerogenes</i> | Wild-type a 100K | 1,60 |
| 1EF2 | <i>Klebsiella aerogenes</i> | Substituição por manganês | 2,50 |
| 1A5K | <i>Klebsiella aerogenes</i> | Mutante K217E | 2,20 |
| 1A5L | <i>Klebsiella aerogenes</i> | Mutante K217C | 2,20 |
| 1A5M | <i>Klebsiella aerogenes</i> | Mutante K217A | 2,00 |
| 1A5N | <i>Klebsiella aerogenes</i> | Mutante K217A, quimicamente resgatado por formato e níquel | 2,40 |
| 1A5O | <i>Klebsiella aerogenes</i> | Mutante K217C, quimicamente resgatado por formato e níquel | 2,50 |
| 1FWA | <i>Klebsiella aerogenes</i> | Mutante C319A em pH 7,5 | 2,00 |
| 1FWB | <i>Klebsiella aerogenes</i> | Mutante C319A em pH 6,5 | 2,00 |
| 1FWC | <i>Klebsiella aerogenes</i> | Mutante C319A em pH 8,5 | 2,00 |
| 1FWD | <i>Klebsiella aerogenes</i> | Mutante C319A em PH 9,4 | 2,00 |
| 1FWE | <i>Klebsiella aerogenes</i> | Mutante C319A, com ácido acetohidroxâmico ligado | 2,00 |
| 1FWF | <i>Klebsiella aerogenes</i> | Mutante C319D | 2,00 |
| 1FWG | <i>Klebsiella aerogenes</i> | Mutante C319S | 2,00 |
| 1FWH | <i>Klebsiella aerogenes</i> | Mutante C319Y | 2,00 |
| 1FWI | <i>Klebsiella aerogenes</i> | Mutante H134A | 2,00 |
| 1KRA | <i>Klebsiella aerogenes</i> | Apoenzima | 2,30 |
| 1KRB | <i>Klebsiella aerogenes</i> | Mutante H219A | 2,50 |
| 1KRC | <i>Klebsiella aerogenes</i> | Mutante H320A | 2,50 |
| 2UBP | <i>Bacillus pasteurii</i> | Nativa | 2,00 |
| 1UBP | <i>Bacillus pasteurii</i> | Inibida por beta-mercaptoetanol | 1,65 |
| 3UBP | <i>Bacillus pasteurii</i> | Inibida por diamidofosfato | 2,00 |
| 4UBP | <i>Bacillus pasteurii</i> | Inibida por ácido acetohidroxâmico | 1,55 |
| 1S3T | <i>Bacillus pasteurii</i> | Inibida por borato | 2,10 |
| 1IE7 | <i>Bacillus pasteurii</i> | Inibida por fosfato | 1,85 |
| 1E9Z | <i>Helicobacter pylori</i> | Nativa | 3,00 |
| 1E9Y | <i>Helicobacter pylori</i> | Complexada com ácido acetohidroxâmico | 3,00 |
| 2FVH | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | Subunidade Gamma | 1,80 |

B2: aquivo *alinha.ali*

```
>P1;2UBP
structureX:2UBP:1 :A:570 :C: : : :
MHLNPAEKEKQLQIFLASELLLRKARGLKLNYPEAVAIITSFIMEGARDG
-KTVAMLMEEGKHVLRDDVMEGVPEMIDDIQAEATFPDGTKLVTVHNPI
SN-----YIVPGEYRVAEAGEIEINAGR
EKT TIRVSNTGDRPIQVGSIH FVEVNKELLFDRAEGIGRRLNIPSGTAA
RFEPGEEMEEVELTELGGNREVFGISDLTNGSVDNK----ELILQRAKELG
YKG-----VEMKINRQQYAESYGP TVGDEVRLADTDLWI
EVEKD YTTYGDEVNFGGGKVLREGMGENGTYTRTENVDLLL TNALILDY
TGIYKADIGVKDGYIVGIGKGNPDIMDGVTNMI VGTATEVIAAEGKIV
TAGGIDTHVHFINPDQVDVALANGITTLFGGGTGPAEGSKATTVTPGPWN
IEKMLKSTEGLPINVGILGKGHGSSIAPIMEQIDAGAAGLKI HEDWGATP
ASIDRSLTVADEADVQVAIHS DTLNEAGFLEDTLRAINGRVIHSFHVEGA
GGGHAPDIMAMAGHPNVLPSSTNPTRPFTVNTIDEHLDMLMVCHHLKQNI
PEDVAFADSRIRPETIAAEDILHDLGII SMMSTDALAMGRAGEMVLR TWQ
TADKMKKQ RGPLAEKNGSDNFRLKRYVSKYTINPAIAQGIAHEVGSIEE
GKFADLV LWEPKFFGVKADRVIKGGIIAYA QIGDPSASIP TPQPVMGRRM
YGTVGD LIHDTNITFMSKSSIQQGVPAKLGLKRRIGTVKNCRNIGKKDMK
WNDVTTDIDINPETYE VKVDGEVLTCEPVKELPMAQRYFLF
*
```

```
>P1;jbureiib
sequence:jbureiib:1 :A:840 :A: : : :
MKLSPREVEKISLHNAGFLAQKRLARGVRLNYSVALIASQILEHARDG
EKTVAQLMSIGKHL LGRRQVLPVPHLLNIIQVEATLPNGTKLVTVHDP I
ANENGDLEEALYGSFLPVPSLDKFAESKEEHKIPGEI ICADGRLTLNPGR
KAVFLKVVNHGDRPIQVGSYHFIEVNPYLTFDRRKAYGMRLNIAAGDSV
RFEPGDHKT VNLVSI GGNKIIRGGNAIADGPVNEANCKAAMEIVCRREFG
HKEEEDASEGVTTGDPDCPFTKAI PREEYANKYGPTIGDKIRLGDTDLIA
EIEKDFALYGD ESVFGGGKVIRDGMGQSSGHP-PAMSLDTVITS AVIIDY
TGI IKADIGIKDGLIASIGKAGNPDIMNGVFPNMIIGVNTEVICGGLIV
TAGGIDCHVHYICPQSLDEA ISSGITT VVGGGTGPTDGSRATTCTPAPTQ
MKLMLQSTDDIPLNFGFTGKGS GSHPELHEI IKAGAMGLKLHEDWGCTP
AAIDNCLAVAEQHDIQVNIHTDTVNESGFVEHTIAAFNGRTIHTYHSEGA
GGGHAPDI IKVCSMKNVLPSSNTTTRPLTSNTVDEHLDMLMVCHKL NREI
PEDLAFASSRVREQTIAAEDILHDIGGISIISSDAQAVGRIGEVISCTWQ
TADKMKKAERG PLQPDGSDNDFRIKRYIAKYTINPAIVNGISQYVGSVEV
GKLADLVIWKPSFFGAKPDI VIKGGSIAWADMGPNGSIPTPEPVLMRPM
YGTLGKAGSALSIAFVSKAALDLGVKVLYGLNKRVEAVSNVRKLT KLDLK
LNNSLPEITVCPETFTVTVDGQALSSEAVTTLPLSQNYFIF
*
```

9.3 Apêndice C

Em geral, espera-se que um modelo de qualidade tenha 90% de seus resíduos nas regiões mais favoráveis (Laskowski *et al.*, 1993). O modelo construído no presente trabalho apresenta 87,3% dos resíduos nas regiões favoráveis e 11,0% nas regiões adicionalmente favoráveis, enquanto o molde utilizado (2UBP) apresenta 89,6% dos resíduos em regiões favoráveis e 9,4% nas regiões adicionalmente favoráveis. Considerando o tamanho maior da seqüência do modelo (842 aminoácidos) em relação à seqüência do molde (790 aminoácidos) e a natureza das regiões envolvidas nesse aumento de seqüência (trechos ligadores semelhantes a alças, aparentemente mais flexíveis), considerou-se o valor obtido no mapa de Ramachandran adequado para validação deste modelo. Os mapas de Ramachandran do modelo apresentado neste trabalho e do molde utilizado são apresentados na Figura C1.

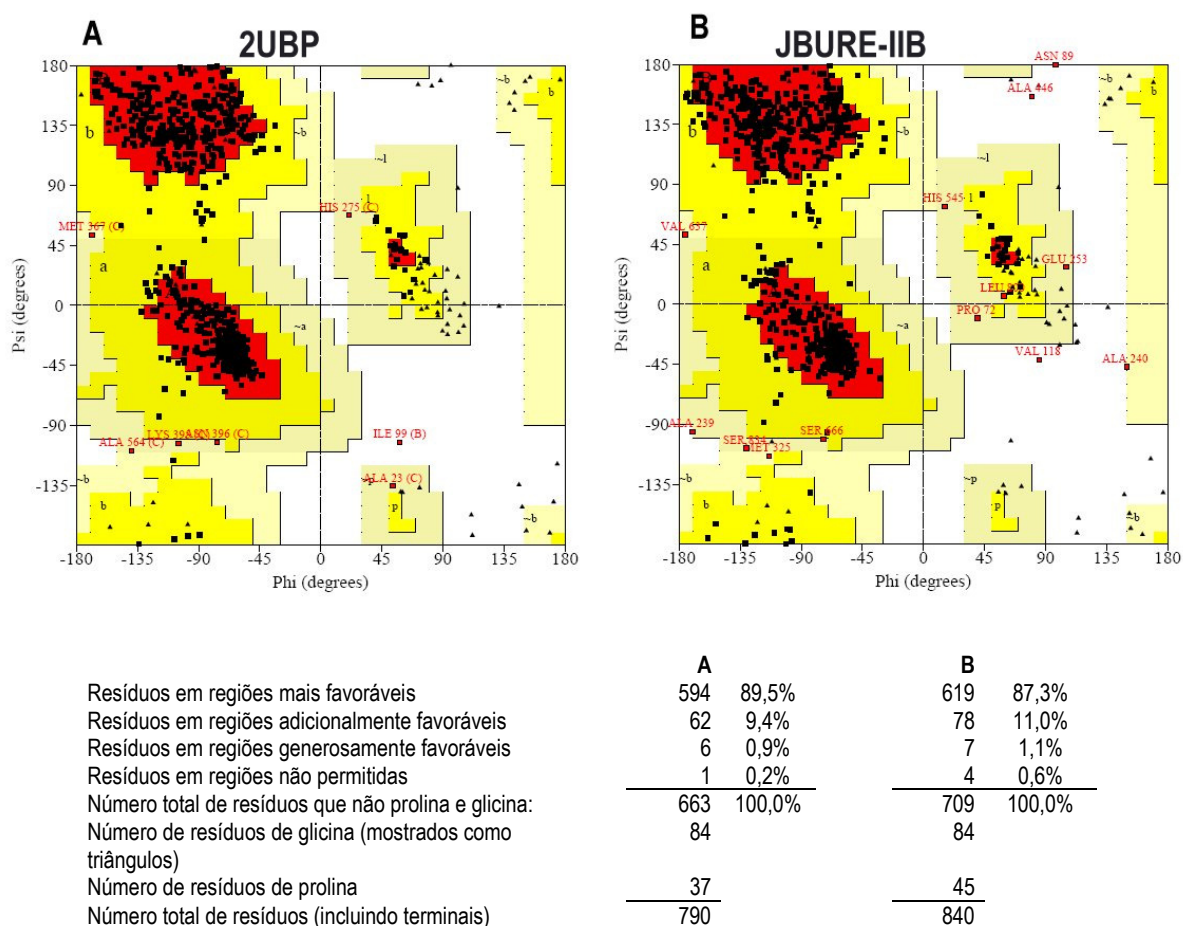


Figura C1: Mapa de Ramachandran para as estruturas do (A) molde e do (B) modelo. Vermelho: regiões mais favoráveis, amarelo: regiões adicionalmente favoráveis, amarelo claro: regiões generosamente favoráveis, branco: regiões não permitidas.

Os resultados do Verify 3D são geralmente apresentados na forma de um gráfico, com os aminoácidos no eixo x e seus escores no eixo y. Neste trabalho, preferiu-se representar os escores visualmente, nas próprias estruturas tridimensionais do molde e do modelo. Esta opção é justificada pela dificuldade em comparar os gráficos obtidos para o molde e o modelo (devido às estruturas apresentarem tamanhos e organização diferentes), além de facilitar a visualização das regiões que necessitam de maior cuidado. Nos resultados obtidos pelo Verify 3D para o modelo construído neste trabalho em comparação com seu molde ([Figura C2](#)), nota-se que as áreas com maior desvio em relação ao esperado (representado pela cor vermelha) são, principalmente, os segmentos de ligação entre os domínios (ausentes no molde). Isso é esperado, por tratarem-se de regiões sem molde maiores que vinte aminoácidos, o que é considerado o limite máximo para modelagem de alças sem molde em proteínas (Fiser *et al.*, 2000).

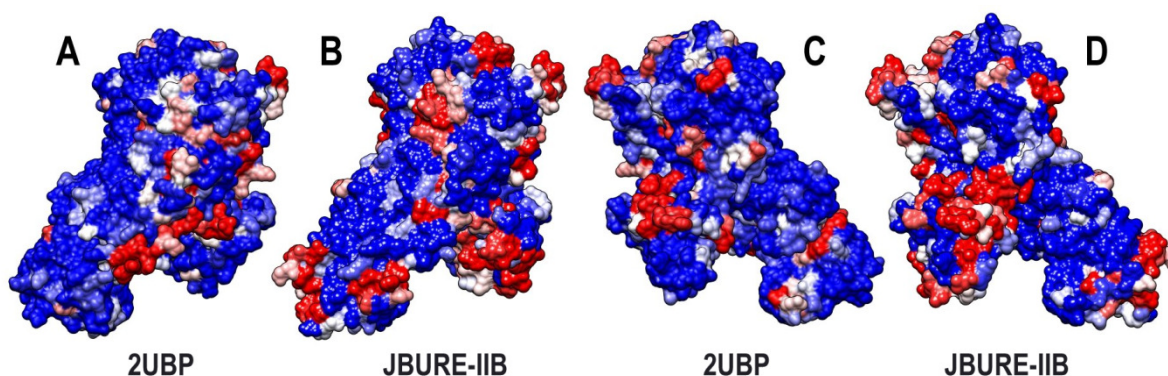


Figura C2: Resultados do Verify3D transpostos às estruturas tridimensionais do molde e do modelo. A cor azul representa áreas com conformação adequada (conforme o esperado), a cor vermelha representa áreas em não conformidade com o esperado, a cor branca representa valores intermediários entre as duas situações. **(A)** e **(C)** visualização de duas faces complementares (rotadas de 180° sobre o eixo y) da estrutura tridimensional do molde 2UBP. **(B)** e **(D)** visualização de duas faces complementares (rotadas de 180° sobre o eixo y) da estrutura tridimensional do modelo construído para a JBURE-IIB. Estruturas representadas por suas superfícies moleculares.

9.4 Apêndice D

Os arquivos “.mdp” definem parâmetros para as simulações de dinâmica molecular. A seguir são apresentados, à maneira de exemplos, arquivos “.mdp” empregados em uma das simulações atomísticas da JBURE-IIB.

➤ Etapa de minimização de energia empregando o algoritmo Steepest Descent:

```
;      Input file
;
title           = Yo
cpp             = /lib/cpp
define          = -DFLEX_SPC
constraints     = none
integrator      = steep
nsteps         = 10000
emtol          = 100
emstep         = 0.01
nstcomm        = 1
nstxout        = 250
nstvout        = 1000
nstfout        = 0
nstlog         = 100
nstenergy      = 100
nstlist        = 10
ns_type        = grid
coulombtype    = PME
rlist          = 0.9
rcoulomb       = 0.9
rvdw          = 0.9
fourierspacing = 0.12
optimize_fft   = yes
pme_order      = 4
ewald_rtol     = 1e-5
Tcoupl        = No
Pcoupl        = No
compressibility = 4.5e-5
ref_p         = 1.0
gen_vel       = no
```

➤ Etapa 1 da termalização:

```
;      Input file
;
title           = Yo
cpp             = /lib/cpp
define          = -DPOSRES
constraints     = all-bonds
integrator      = md
tinit          = 0.0
dt              = 0.002 ; ps !
nsteps         = 500    ; total 1 ps.
nstcomm        = 1
nstxout        = 250
nstvout        = 1000
nstfout        = 0
nstlog         = 100
nstenergy      = 100
nstlist        = 10
ns_type        = grid
coulombtype    = PME
rlist          = 0.9
rcoulomb       = 0.9
rvdw           = 0.9
fourierspacing = 0.12
optimize_fft   = yes
pme_order      = 4
ewald_rtol     = 1e-5
Tcoupl         = berendsen
tc-grps        = Protein SOL NA+ ZN KCX
tau_t          = 0.1 0.1 0.1 0.1 0.1
ref_t          = 50 50 50 50 50
energygrps     = Protein SOL NA+ ZN KCX
Pcoupl         = berendsen
Pcoupltype    = isotropic
tau_p          = 0.5
compressibility = 4.5e-5
ref_p          = 1.0
gen_vel        = yes
gen_temp       = 50.0
gen_seed       = 173529
```

➤ Etapa 2 da termalização:

```
;      Input file
;
title           = Yo
cpp             = /lib/cpp
define          = -DFLEX_SPC
constraints     = all-bonds
integrator      = md
tinit          = 1.0
dt              = 0.002 ; ps !
nsteps         = 4500 ; total 9 ps.
nstcomm        = 1
nstxout        = 250
nstvout        = 1000
nstfout        = 0
nstlog         = 100
nstenergy      = 100
nstlist        = 10
ns_type        = grid
coulombtype    = PME
rlist          = 0.9
rcoulomb       = 0.9
rvdw           = 0.9
fourierspacing = 0.12
optimize_fft   = yes
pme_order      = 4
ewald_rtol     = 1e-5
Tcoupl         = berendsen
tc-grps        = Protein SOL NA+ ZN KCX
tau_t          = 0.1 0.1 0.1 0.1 0.1
ref_t          = 50 50 50 50 50
energygrps     = Protein SOL NA+ ZN KCX
Pcoupl         = berendsen
Pcoupltype     = isotropic
tau_p          = 0.5
compressibility = 4.5e-5
ref_p          = 1.0
gen_vel        = no
gen_temp       = 50.0
gen_seed       = 173529
```

➤ Etapa 3 da termalização:

```
;      Input file
;
title           =  Yo
cpp             =  /lib/cpp
define         =  -DFLEX_SPC
constraints    =  all-bonds
integrator     =  md
tinit         =  10.0
dt            =  0.002 ; ps !
nsteps        =  2500 ; total 5 ps.
nstcomm       =  1
nstxout       =  250
nstvout       =  1000
nstfout       =  0
nstlog        =  100
nstenergy     =  100
nstlist       =  10
ns_type       =  grid
coulombtype   =  PME
rlist         =  0.9
rcoulomb      =  0.9
rvdw         =  0.9
fourierspacing =  0.12
optimize_fft  =  yes
pme_order     =  4
ewald_rtol    =  1e-5
Tcoupl       =  berendsen
tc-grps      =  Protein SOL NA+ ZN KCX
tau_t        =  0.1 0.1 0.1 0.1 0.1
ref_t        =  100 100 100 100 100
energygrps   =  Protein SOL NA+ ZN KCX
Pcoupl       =  berendsen
Pcoupltype   =  isotropic
tau_p        =  0.5
compressibility =  4.5e-5
ref_p        =  1.0
gen_vel      =  no
gen_temp     =  100.0
gen_seed     =  173529
```

➤ Etapa 4 da termalização:

```
;      Input file
;
title           = Yo
cpp             = /lib/cpp
define          = -DFLEX_SPC
constraints     = all-bonds
integrator      = md
tinit          = 15.0
dt              = 0.002 ; ps !
nsteps         = 2500 ; total 5 ps.
nstcomm        = 1
nstxout        = 250
nstvout        = 1000
nstfout        = 0
nstlog         = 100
nstenergy      = 100
nstlist        = 10
ns_type        = grid
coulombtype    = PME
rlist          = 0.9
rcoulomb       = 0.9
rvdw           = 0.9
fourierspacing = 0.12
optimize_fft   = yes
pme_order      = 4
ewald_rtol     = 1e-5
Tcoupl         = berendsen
tc-grps        = Protein SOL NA+ ZN KCX
tau_t          = 0.1 0.1 0.1 0.1 0.1
ref_t          = 150 150 150 150 150
energygrps     = Protein SOL NA+ ZN KCX
Pcoupl         = berendsen
Pcoupltype    = isotropic
tau_p          = 0.5
compressibility = 4.5e-5
ref_p          = 1.0
gen_vel        = no
gen_temp       = 150.0
gen_seed       = 173529
```


➤ Etapa 5 da termalização:

```
;      Input file
;
title           = Yo
cpp             = /lib/cpp
define          = -DFLEX_SPC
constraints     = all-bonds
integrator      = md
tinit          = 20.0
dt              = 0.002 ; ps !
nsteps         = 2500 ; total 5 ps.
nstcomm        = 1
nstxout        = 250
nstvout        = 1000
nstfout        = 0
nstlog         = 100
nstenergy      = 100
nstlist        = 10
ns_type        = grid
coulombtype    = PME
rlist          = 0.9
rcoulomb       = 0.9
rvdw           = 0.9
fourierspacing = 0.12
optimize_fft   = yes
pme_order      = 4
ewald_rtol     = 1e-5
Tcoupl         = berendsen
tc-grps        = Protein SOL NA+ ZN KCX
tau_t          = 0.1 0.1 0.1 0.1 0.1
ref_t          = 200 200 200 200 200
energygrps     = Protein SOL NA+ ZN KCX
Pcoupl         = berendsen
Pcoupltype    = isotropic
tau_p          = 0.5
compressibility = 4.5e-5
ref_p          = 1.0
gen_vel        = no
gen_temp       = 200.0
gen_seed       = 173529
```

➤ Etapa 6 da termalização:

```
;      Input file
;
title           = Yo
cpp             = /lib/cpp
define         = -DFLEX_SPC
constraints    = all-bonds
integrator     = md
tinit         = 25.0
dt             = 0.002 ; ps !
nsteps        = 2500 ; total 5 ps.
nstcomm       = 1
nstxout       = 250
nstvout       = 1000
nstfout       = 0
nstlog        = 100
nstenergy     = 100
nstlist       = 10
ns_type       = grid
coulombtype   = PME
rlist         = 0.9
rcoulomb      = 0.9
rvdw         = 0.9
fourierspacing = 0.12
optimize_fft  = yes
pme_order     = 4
ewald_rtol    = 1e-5
Tcoupl        = berendsen
tc-grps      = Protein SOL NA+ ZN KCX
tau_t        = 0.1 0.1 0.1 0.1 0.1
ref_t        = 250 250 250 250 250
energygrps   = Protein SOL NA+ ZN KCX
Pcoupl       = berendsen
Pcoupltype   = isotropic
tau_p        = 0.5
compressibility = 4.5e-5
ref_p        = 1.0
gen_vel      = no
gen_temp     = 250.0
gen_seed     = 173529
```

➤ Etapa 7 da termalização:

```
;      Input file
;
title           = Yo
cpp             = /lib/cpp
define          = -DFLEX_SPC
constraints     = all-bonds
integrator      = md
tinit          = 30.0
dt              = 0.002 ; ps !
nsteps         = 2500 ; total 5 ps.
nstcomm        = 1
nstxout        = 250
nstvout        = 1000
nstfout        = 0
nstlog         = 100
nstenergy      = 100
nstlist        = 10
ns_type        = grid
coulombtype     = PME
rlist          = 0.9
rcoulomb       = 0.9
rvdw           = 0.9
fourierspacing = 0.12
optimize_fft   = yes
pme_order      = 4
ewald_rtol     = 1e-5
Tcoupl         = berendsen
tc-grps        = Protein SOL NA+ ZN KCX
tau_t          = 0.1 0.1 0.1 0.1 0.1
ref_t          = 300 300 300 300 300
energygrps     = Protein SOL NA+ ZN KCX
Pcoupl         = berendsen
Pcoupltype     = isotropic
tau_p          = 0.5
compressibility = 4.5e-5
ref_p          = 1.0
gen_vel        = no
gen_temp       = 300.0
gen_seed       = 173529
```

➤ Exemplo de etapa de dinâmica sob temperatura constante:

```
;      Input file
;
title           = Yo
cpp             = /lib/cpp
define          = -DFLEX_SPC
constraints     = all-bonds
integrator      = md
tinit          = 1000.0
dt              = 0.002 ; ps !
nsteps         = 500000 ; total 01000-02000 ps.
nstcomm        = 1
nstxout        = 250
nstvout        = 1000
nstfout        = 0
nstlog         = 100
nstenergy      = 100
nstlist        = 10
ns_type        = grid
coulombtype     = PME
rlist          = 0.9
rcoulomb       = 0.9
rvdw           = 0.9
fourierspacing = 0.12
optimize_fft   = yes
pme_order      = 4
ewald_rtol     = 1e-5
Tcoupl         = berendsen
tc-grps        = Protein SOL NA+ ZN KCX
tau_t          = 0.1 0.1 0.1 0.1 0.1
ref_t          = 300 300 300 300 300
energygrps     = Protein SOL NA+ ZN KCX
Pcoupl         = berendsen
Pcoupltype     = isotropic
tau_p          = 0.5
compressibility = 4.5e-5
ref_p          = 1.0
gen_vel        = no
gen_temp       = 300.0
gen_seed       = 173529
```

9.5 Apêndice E

Topologia da lisina carbamilada (KCX) adicionada ao arquivo ffG43a1.rtp do campo de força e topologias da lisina (LYS) e do ácido glutâmico (GLU) utilizados como referência para a sua construção.

```
[ KCX ]
[ atoms ]
  N      N      -0.28000    0
  H      H      0.28000    0
  CA     CH1    0.00000    1
  CB     CH2    0.00000    1
  CG     CH2    0.00000    2
  CD     CH2    0.00000    2
  CE     CH2    0.00000    3
  NZ     NT     -0.28000    3
  HZ1    H      0.28000    3
  CX     C      0.27000    4
  OX1    OM     -0.63500    4
  OX2    OM     -0.63500    4
  C      C      0.380     5
  O      O     -0.380     5

[ bonds ]
  N      H      gb_2
  N      CA     gb_20
  CA     C      gb_26
  C      O      gb_4
  C      +N     gb_9
  CA     CB     gb_26
  CB     CG     gb_26
  CG     CD     gb_26
  CD     CE     gb_26
  CE     NZ     gb_20
  NZ     HZ1    gb_2
  NZ     CX     gb_9
  CX     OX1    gb_5
  CX     OX2    gb_5

[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
-C   N   H   ga_31
  H   N   CA  ga_17
-C   N   CA  ga_30
  N   CA   C  ga_12
  CA   C  +N  ga_18
  CA   C   O  ga_29
  O   C  +N  ga_32
  N   CA  CB  ga_12
  C   CA  CB  ga_12
  CA  CB  CG  ga_14
  CB  CG  CD  ga_14
  CG  CD  CE  ga_14
  CD  CE  NZ  ga_14
  CE  NZ  HZ1 ga_10
  CE  NZ  CX  ga_30
  HZ1 NZ  CX  ga_31
  NZ  CX  OX1 ga_21
  NZ  CX  OX2 ga_21
  OX1 CX  OX2 ga_37

[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  N   -C  CA   H   gi_1
  C   CA  +N   O   gi_1
  CA   N   C   CB   gi_2
  CX  OX1 OX2  NZ   gi_1

[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
-C   -C   N   CA   gd_4
  -C   N   CA   C   gd_19
  N   CA   C   +N   gd_20
  N   CA  CB   CG   gd_17
  CA  CB  CG   CD   gd_17
  CB  CG  CD   CE   gd_17
  CG  CD  CE   NZ   gd_17
  CD  CE  NZ  HZ1  gd_14
  CD  CE  NZ   CX   gd_20
  CE  NZ  CX  OX1  gd_4

[ GLU ]
[ atoms ]
  N      N      -0.28000    0
  H      H      0.28000    0
  CA     CH1    0.00000    1
  CB     CH2    0.00000    1
  CG     CH2    0.00000    1
  CD     C      0.27000    2
  OE1    OM     -0.63500    2
  OE2    OM     -0.63500    2
  C      C      0.380     3
  O      O     -0.380     3

[ bonds ]
  N      H      gb_2
  N      CA     gb_20
  CA     C      gb_26
  C      O      gb_4
  C      +N     gb_9
  CA     CB     gb_26
  CB     CG     gb_26
  CG     CD     gb_26
  CD     OE1    gb_5
  CD     OE2    gb_5

[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
-C   N   H   ga_31
  H   N   CA  ga_17
-C   N   CA  ga_30
  N   CA   C  ga_12
  CA   C  +N  ga_18
  CA   C   O  ga_29
  O   C  +N  ga_32
  N   CA  CB  ga_12
  C   CA  CB  ga_12
  CA  CB  CG  ga_14
  CB  CG  CD  ga_14
  CG  CD  CE  ga_14
  CD  CE  NZ  ga_14
  CE  NZ  HZ1 ga_10
  CE  NZ  CX  ga_30
  HZ1 NZ  CX  ga_31
  NZ  CX  OX1 ga_21
  NZ  CX  OX2 ga_21
  OX1 CX  OX2 ga_37

[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  N   -C  CA   H   gi_1
  C   CA  +N   O   gi_1
  CA   N   C   CB   gi_2
  CX  OX1 OX2  NZ   gi_1

[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  N   -C  CA   H   gi_1
  C   CA  +N   O   gi_1
  CA   N   C   CB   gi_2
  CD  OE1 OE2  CG   gi_1
```

```

[ dihedrals ]
; ai aj ak al gromos type
-C -C N CA gd_4
-C N CA C gd_19
N CA C +N gd_20
N CA CB CG gd_17
CA CB CG CD gd_17
CB CG CD OE2 gd_20

CE NZ HZ2 ga_10
HZ1 NZ HZ2 ga_9
[ impropers ]
; ai aj ak al gromos type
N -C CA H gi_1
C CA +N O gi_1
CA N C CB gi_2
[ dihedrals ]
; ai aj ak al gromos type
-C -C N CA gd_4
-C N CA C gd_19
N CA C +N gd_20
N CA CB CG gd_17
CA CB CG CD gd_17
CB CG CD CE gd_17
CG CD CE NZ gd_17
CD CE NZ HZ1 gd_14

[ LYS ]
[ atoms ]
N N -0.28000 0
H H 0.28000 0
CA CH1 0.00000 1
CB CH2 0.00000 1
CG CH2 0.00000 2
CD CH2 0.00000 2
CE CH2 0.00000 3
NZ NT -0.83000 3
HZ1 H 0.41500 3
HZ2 H 0.41500 3
C C 0.380 4
O O -0.380 4
[ bonds ]
N H gb_2
N CA gb_20
CA C gb_26
C O gb_4
C +N gb_9
CA CB gb_26
CB CG gb_26
CG CD gb_26
CD CE gb_26
CE NZ gb_20
NZ HZ1 gb_2
NZ HZ2 gb_2
[ angles ]
; ai aj ak gromos type
-C N H ga_31
H N CA ga_17
-C N CA ga_30
N CA C ga_12
CA C +N ga_18
CA C O ga_29
O C +N ga_32
N CA CB ga_12
C CA CB ga_12
CA CB CG ga_14
CB CG CD ga_14
CG CD CE ga_14
CD CE NZ ga_14
CE NZ HZ1 ga_10

```

9.6 Apêndice F

Os arquivos “.mdp” definem parâmetros para as simulações de dinâmica molecular. A seguir são apresentados, à maneira de exemplos, arquivos “.mdp” empregados em uma das simulações *coarse-grained* da JBURE-IIB.

➤ Etapa de minimização de energia empregando o algoritmo Steepest Descent:

```

;
; STANDARD MD INPUT OPTIONS FOR MARTINI 2.0
;
; for use with GROMACS 3.3
;
; VARIOUS PREPROCESSING OPTIONS =
title                = Martini
cpp                  = /usr/bin/cpp
define               = -DFLEX_SPC
integrator           = steep
nsteps               = 50000
emtol                = 100
emstep               = 0.02
nstcomm              = 1
comm-grps            =
nstxout               = 250
nstvout              = 1000
nstfout              = 0
nstlog               = 100
nstenergy            = 100
nstlist              = 10
ns_type              = grid
pbc                  = xyz
rlist                 = 1.3
coulombtype          = Shift
rcoulomb_switch      = 0.0
rcoulomb             = 1.2
epsilon_r            = 15
vdw_type             = Shift
rvdw_switch          = 0.9
rvdw                 = 1.2
DispCorr             = No
tcoupl               = No
Pcoupl               = No
compressibility      = 4.5e-5
ref_p                = 1.0
gen_vel              = no
constraints           = none

```

➤ Exemplo de etapa de dinâmica sob temperatura constante:

```

;
; STANDARD MD INPUT OPTIONS FOR MARTINI 2.0
;
; for use with GROMACS 3.3
;

; VARIOUS PREPROCESSING OPTIONS =
title                = Martini
cpp                  = /usr/bin/cpp
integrator           = md
tinit                = 0.0
dt                   = 0.02
nsteps               = 15000000
nstcomm              = 1
comm-grps            =
nstxout               = 5000
nstvout               = 5000
nstfout              = 0
nstlog               = 1000
nstenergy            = 100
nstxtcout            = 1000
xtc_precision        = 100
xtc-grps              =
energygrps           = Protein W ION
nstlist              = 10
ns_type              = grid
pbc                   = xyz
rlist                 = 1.3
coulombtype          = Shift
rcoulomb_switch      = 0.0
rcoulomb              = 1.2
epsilon_r             = 15
vdw_type              = Shift
rvdw_switch          = 0.9
rvdw                  = 1.2
DispCorr             = No
tcoupl               = Berendsen
tc-grps              = Protein W ION
tau_t                = 0.1 0.1 0.1
ref_t                = 300 300 300
Pcoupl               = berendsen
Pcoupltype           = semiisotropic
tau_p                = 0.5 0.5 0.5
compressibility       = 4.5e-5 4.5e-5 4.5e-5
ref_p                = 1.0 1.0 1.0
gen_vel              = no
gen_temp              = 310
gen_seed              = 473529
constraints           = none
constraint_algorithm = Lincs
unconstrained_start  = no
lincs_order           = 4
lincs_warnangle       = 30

```


Curriculum Vitæ

Os itens II, III e IV restringem-se a atividades realizadas durante o período abrangido pela presente dissertação.

I. Formação acadêmica:

Graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado com Ênfase Molecular, Celular e Funcional - pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, de 2005/1 a 2008/2. *Ureases: uma análise comparativa*. Orientadora: Prof. Célia Regina Carlini. Co-orientadora: Dra. Evelyn Koeche Schroeder.

II. Trabalhos científicos apresentados em congressos

a. Nacionais:

Braun, R. L.; Schroeder, E. K.; Carlini, C. R. **2009** Modeled structures and molecular dynamics of plant ureases. *Programas e Resumos da XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, N-38. XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 16 a 19 de maio de 2009, Águas de Lindóia, SP, Brasil.

Braun, R. L.; Carlini, C. R.; Schroeder, E. K. **2009** *Canavalia ensiformis* urease: modeled structure and molecular dynamics study. *II Escola Brasileira de Bioinformática*. Brazilian Symposium on Bioinformatics and Second Brazilian School on Bioinformatics, 27 a 29 de julho de 2009, Porto Alegre, RS, Brasil.

Braun, R. L.; Schroeder, E. K.; Borba, M. P.; Carlini, C. R. **2009** Estruturas modeladas e dinâmica molecular de ureases vegetais. XVIII Feira de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, categoria UFRGSweb (<http://ufrgsweb.ufrgs.br/>). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, XXI Salão de Iniciação Científica e XVIII Feira de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e IV Salão UFRGS Jovem, 19 a 23 de outubro de 2009, Porto Alegre, RS, Brasil.

Braun, R. L.; Schroeder, E. K.; Carlini, C. R., Verli, H. **2010** Molecular dynamics of Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. *Programas e Resumos da XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, N-84. XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 18 a 21 de maio de 2010, Foz do Iguaçu, PR, Brasil.

Mendes, T. F. L.; Feder, V., Olivera-Severo, D.; Becker-Ritt, A. B.; Pinto, P. M; **Braun, R. L.**; Vainstein, M. H.; Carlini, C. R. **2010** Characterization and structural aspects from purified urease of *Cryptococcus gattii* – R265. *Programas e Resumos da XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, L-74. XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 18 a 21 de maio de 2010, Foz do Iguaçu, PR, Brasil.

b. Internacionais:

Schroeder, E. K.; **Braun, R. L.**; Carlini, C. R. 2009 'In silico' comparative studies of *Canavalia ensiformis* and *Glycine max* ureases. *XVI World Congress of the International Society on Toxinology and X Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia CD-ROM*. XVI World Congress of the International Society on Toxinology and X Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia, 15 a 20 de março de 2009, Recife, PE, Brasil.

III. Prêmios recebidos:

Destaque, categoria vídeo. **Braun, R. L.**; Schroeder, E. K.; Borba, M. P.; Carlini, C. R. **2009** Estruturas modeladas e dinâmica molecular de ureases vegetais. UFRGSweb (<http://ufrgsweb.ufrgs.br/>). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, XXI Salão de Iniciação Científica e XVIII Feira de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e IV Salão UFRGS Jovem, 19 a 23 de outubro de 2009, Porto Alegre, RS, Brasil.

IV. Bolsa recebida:

Bolsista CAPES do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular pelo Centro de Biotecnologia da UFRGS, a partir de março de 2009.