

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
CAMPUS SANTA MÔNICA**

GUILHERME AUGUSTO PINHEIRO DE PAULA

**Estudo da estabilidade estrutural em solução aquosa da enzima Acetolactato Sintase
(ALS) utilizando Dinâmica Molecular**

**Uberlândia
2019**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
CAMPUS SANTA MÔNICA

GUILHERME AUGUSTO PINHEIRO DE PAULA

**Estudo da estabilidade estrutural em solução aquosa da enzima Acetolactato Sintase
(ALS) utilizando Dinâmica Molecular**

Dissertação apresentada à Banca avaliadora, para obtenção de créditos na disciplina:
Trabalho de conclusão de curso (GQB056)

Orientação: Prof. Dr. Eduardo de Faria Franca.

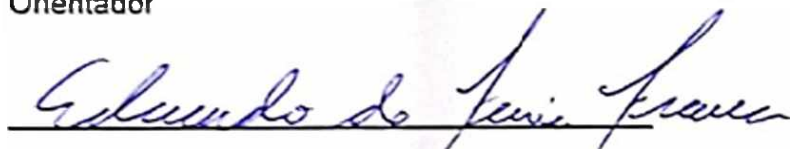
Uberlândia
2019

GUILHERME AUGUSTO PINHEIRO DE PAULA

**Estudo da estabilidade estrutural em solução aquosa da enzima Acetolactato Sintase
(ALS) utilizando Dinâmica Molecular**

Dissertação apresentada à Banca avaliadora, para obtenção de créditos na disciplina: Trabalho de conclusão de curso (GQB056). Área de concentração: Química Teórica. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 27 de Junho de 2019.

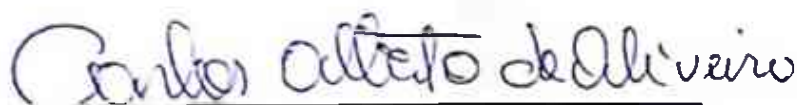
Orientador



Prof. Dr. Eduardo, de Faria Franca

Universidade Federal de Uberlândia, Campus Santa Mônica – Instituto de Química

Examinador



Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira

Universidade Federal de Uberlândia, Campus Santa Mônica – Instituto de Química

Examinador



Prof. Dr. Erick Guimarães França

Instituto Federal de Formosa – Instituto de Química

**Aos meus pais, Márcia e Ademir e minha irmã, Beatriz, por todo amor,
companheirismo e força.**

Agradecimentos

Quero agradecer e dedicar esta página há algumas pessoas que me ajudaram de várias maneiras para que eu concluísse meu curso.

Primeiramente aos meus pais, Ademir e Márcia, que me ensinaram que através da educação e estudo podemos alcançar tudo o que almejamos, por isso sempre me apoiaram nas minhas escolhas.

Agradeço aos meus avós paternos Antônio e Aparecida, e maternos Flávio e Edith, por todo apoio, paciência e carinho que sempre tiveram comigo.

Agradeço aos meus tios Geraldo e Fabíola, pelo carinho, amizade e incentivo durante toda minha jornada na Universidade.

A minha irmã Beatriz, por me apoiar e me ajudar a descontrair em alguns momentos que me senti triste e sozinho por estar longe de casa.

Agradeço aos meus primos Edson e Valéria pela acolhida calorosa na cidade de Uberlândia, pois a experiência de morar longe da família foi inédita na minha vida.

Agradeço aos meus amigos Igor e Phelipe, pela amizade e pelo tempo convivido juntos na República Insana.

Também quero agradecer, não menos importante que minha família, aos meus amigos mestres, doutores:

Prof. Dr. Eduardo de Faria Franca, por toda a dedicação e confiança em mim depositado, pela valiosa orientação e parceria nesta etapa de minha vida, assim como pelas importantes contribuições a minha formação acadêmica e, também a minha construção pessoal.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira, por sua amizade e aulas de bioquímica que me encantaram com todo conhecimento que foi compartilhado.

Ao Prof. Dr. Erick Castanho, pela amizade e companheirismo, fazendo-me questionar sobre tantas ideias.

Ao Grupo do Laboratório de Cristalografia e Química Computacional (LCQC), pelo companheirismo e espírito de equipe.

Ao Dr. Adriano Amarante, pela amizade e oportunidade de trabalhar junto com ele em seu projeto de doutorado.

A Fundação de Amparo à pesquisa de Estado de Minas Gerais pelo apoio financeiro cedido com a concessão da bolsa de iniciação científica e também pelos recursos computacionais utilizados.

Ao Ronaldo, Caio, Samuel, pela amizade oferecida.

A todas as pessoas que tiveram participação em minha caminhada acadêmica.

E enfim, agradeço a Deus, por conduzir-me na direção correta, todas as vezes que tive dificuldades que somente eu e Ele sabemos como foi.

" Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta."

Carl Sagan

Resumo

Esse trabalho tem como objetivo estudar a estrutura enzimática do dímero da enzima Acetolactato Sintase (ALS) e sua conformação estrutural com a presença e ausência de seus cofatores Dinucleótido de flavina e adenina (FAD) e a Tiamina pirofosfato (TPP), que segundo algumas literaturas tem a função de auxiliar na estabilidade da enzima e também como auxílio no processo enzimático realizado pela mesma. Para isso foram realizados simulações atomísticas de Dinâmica Molecular em solução aquosa no *ensemble* NPT, para se obter conhecimento de sua estabilidade na montagem de um nanobiossensor utilizando microscopia de força atômica (AFM). Os resultados mostraram que os cofatores FAD e TPP pouco afetam na conformação da enzima e no padrão do número de ligações de hidrogênio do sistema.

Abstract

This undergraduate thesis aims to study the enzymatic dimer structure of the enzyme Acetolactate Synthase (ALS) and its structural conformation with the presence and absence of its cofactors: Flavin adenine dinucleotide (FAD) and Thiamine pyrophosphate (TPP), whose according to the literature has the function of assist the stability of the enzyme and also a role in the enzymatic process. In order to shed light to these answers, atomistic Molecular Dynamics simulations, in the ensemble NPT, were carried in aqueous solution, to obtain knowledge enough to make a nanobiosensor with atomic microscopy force (AFM). The results showed that the cofactors FAD and TPP do not affect significantly the enzyme conformation on the hydrogen bond pattern of the system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação geral do aminoácidos.	1
Figura 2: Representação dos 20 aminoácidos.	1
Figura 3: Estrutura da enzima ALS.	3
Figura 4: Representação geométrica do ângulo de torção.	8
Figura 5: Condições periódicas de contorno em duas dimensões.	12
Figura 6 : RMSD de toda a estrutura enzimática ao longo da simulação.	14
Figura 7: RMSDist de toda estrutura enzimática ao longo da simulação.	15
Figura 8: RMSD do sítio reativo da enzima ao longo da trajetória.	16
Figura 9: RMSDist do sítio reativo da enzima ao longo da trajetória.	16
Figura 10: Critério geométrico para considerar uma ligação de hidrogênio.	17
Figura 11: Número de ligações de hidrogênio intramolecular.	18
Figura 12: Número de ligações de hidrogênio intermoleculares.	19
Figura 13: Número de ligações de hidrogênio intramolecular da região do sítio reativo da enzima.	20
Figura 14: Número de ligações de hidrogênio intermolecular da região do sítio reativo da enzima.	20
Figura 15: RMSF do sítio reativo da enzima ao longo da trajetória.	21
Figura 16: Raio de giro do sítio reativo da enzima ao longo da trajetória.	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sistema 1, número de átomos da enzima ALS com seus cofatores.	13
Tabela 2: Sistema 2, número de átomos da enzima ALS sem seus cofatores.	13

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM - Microscopia de força atômica

ALS – Acetolactato Sintase

C – Coulomb

CHARMM – *Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics*

FAD – Dinucleotídeo de Flavina e Adenina

fs – femtossegundos (10^{-15} s)

GROMACS - *GRoningen MACHine for Chemical Simulations*

LJ – *Lennard-Jonnes*

ns – nanossegundos (10^{-9} s)

ps – picossegundos (10^{-12} s)

Rg – Raio de Giro

RMSD – Raiz Quadrada do Desvio Quadrático Médio

RMSDist - Raiz Quadrada do Desvio Quadrático Médio da distância entre átomos

RMSF – Raiz Quadrada da Flutuação Quadrática Média

SPC – *Single Point Charge*

T – Temperatura

TPP - Tiamina pirofosfato

UB – *Urey-Bradley*

SUMÁRIO

1 Introdução.	1
2 Objetivos.	5
2.1 Objetivos gerais.	5
2.2 Objetivos específicos.	5
3 Fundamentos teóricos.	6
3.1 Campo de Força.	6
3.2 Dinâmica molecular.	7
3.2.1 Potencial Harmônico Linear.	7
3.2.2 Potencial Harmônico Angular.	8
3.2.3 Potencial de <i>Urey-Bradley</i> .	8
3.2.4 Potencial Diedral Próprio (Torcional).	8
3.2.5 Potencial Diedral Impróprio.	9
3.2.6 Potencial de <i>Lennard-Jones</i> (ou <i>van der Waals</i>).	9
3.2.7 Potencial de Coulomb.	9
3.3 Equações e parâmetros de dinâmica molecular.	9
3.3.1 Algoritmo <i>Leap-Frog</i> .	10
3.3.2 Condições Periódicas de Contorno.	11
3.3.3 Parâmetros Utilizados.	12
3.4 Sistemas simulados.	12
3.5 Passos realizados.	13
4 Resultados.	14
4.1 Raiz Quadrada do Desvio Quadrático Médio (RMSD).	14
4.2 Interações por ligação de hidrogênio.	17
4.3 RMSF: Raiz Quadrada da Flutuação Quadrática Média.	21
4.4 Raio de Giro.	21
5 Conclusões.	23
6 Trabalhos Futuros.	24
7 Referências.	25

1. Introdução

Enzimas são um grupo de substâncias orgânicas de natureza predominantemente proteica, mas existem também enzimas constituídas de RNA, as chamadas ribozimas e de tamanhos variados [25].

Os aminoácidos são as unidades principais que compõem as proteínas. Os aminoácidos contêm um grupo carboxila e um grupo amina ligado ao mesmo carbono (o carbono α) (Figura 1). Eles diferem entre si em suas cadeias laterais, ou grupos R, os quais variam em estrutura, tamanho e carga elétrica [2].

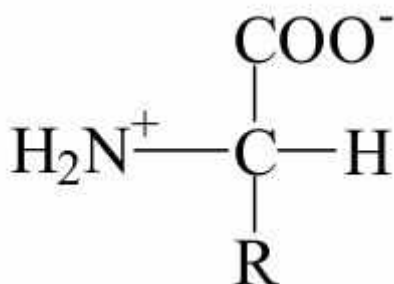


Figura 1: Representação geral do aminoácidos.

Existe um total de 22 aminoácidos diferentes e apenas 20 são usados pelas células na síntese de proteínas (Figura 2). Estes últimos são conhecidos como α -aminoácidos.

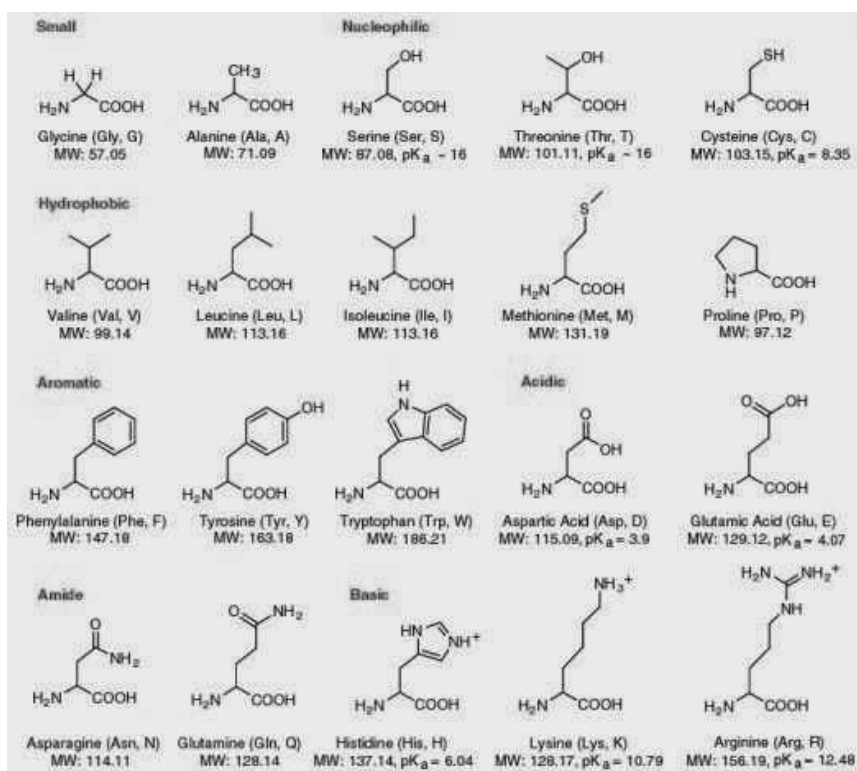


Figura 2: Representação dos 20 aminoácidos.[19]

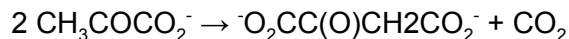
As enzimas têm como função converter uma substância, chamada de substrato, em outra denominada produto, e são extremamente específicas para a reação que catalisam [2].

Isso significa que, em geral, uma enzima catalisa um e só um tipo de reação química. Consequentemente, o tipo de enzimas encontradas numa célula determina o tipo de metabolismo que a célula efetua [26].

A atividade enzimática pode depender da presença de determinadas moléculas, genericamente chamadas cofatores. A natureza química dos cofatores é muito variável, podendo ser, por exemplo, um ou mais íons metálicos (como o magnésio), ou uma molécula orgânica (como o FAD ou TPP). Estes cofatores podem participar ou não diretamente na reação enzimática [26].

Os cofatores presentes na estrutura enzimática são como citados o FAD e o TPP que são moléculas orgânicas que possuem funções distintas na enzima. O TPP ele é o cofator que faz a função de direcionar as moléculas de piruvato para a região do sítio reativo, enquanto o FAD não se tem ao certo sua função definida no processo enzimático. [3]

Para a enzima em estudo a reação catalisada produz uma molécula de acetolactato e uma de gás carbônico pela seguinte reação:



A enzima Acetolactato Sintase (ALS) é uma enzima encontrada em plantas e microorganismos, sua representação estrutural encontra-se na Figura 3. Ela catalisa a primeira etapa da síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada: valina, leucina e isoleucina [27].

Nas plantas a enzima é encontrada em seus cloroplastos, para o auxílio de processos metabólicos [24].

A enzima tem sido estudada devido aos inibidores da enzima que em sua maioria são herbicidas que não são legalizados em alguns países, mas que no Brasil ainda são permitidos.

Atualmente, uma forma eficiente de detecção de herbicidas é a fabricação de nanobiossensores utilizando microscópio de força atômica (AFM). A detecção de herbicidas inibidores enzimáticos, como o imazaquim é realizado funcionalizando a ponta de um AFM com a enzima Acetolactato Sintase (ALS). Pesticidas como o imazaquim possuem grande afinidade com a enzima e podem ser detectados com grande sensibilidade e em baixas concentrações. A interação específica entre a enzima e um pesticida resultará em resposta mecânica detectável pelo detector mecânico do AFM [32].

Buscando ao final possíveis caminhos para retirada desses herbicidas para se calcular o Potencial de Força Média (PMF), que utiliza a igualdade de Jarzynski para estabelecer uma conexão entre o cálculo do trabalho e energia realizado no processo fora do equilíbrio (simulação SMD) com um processo em quase equilíbrio, como o experimento de detecção pelo biossensor de ponteira de AFM [31].

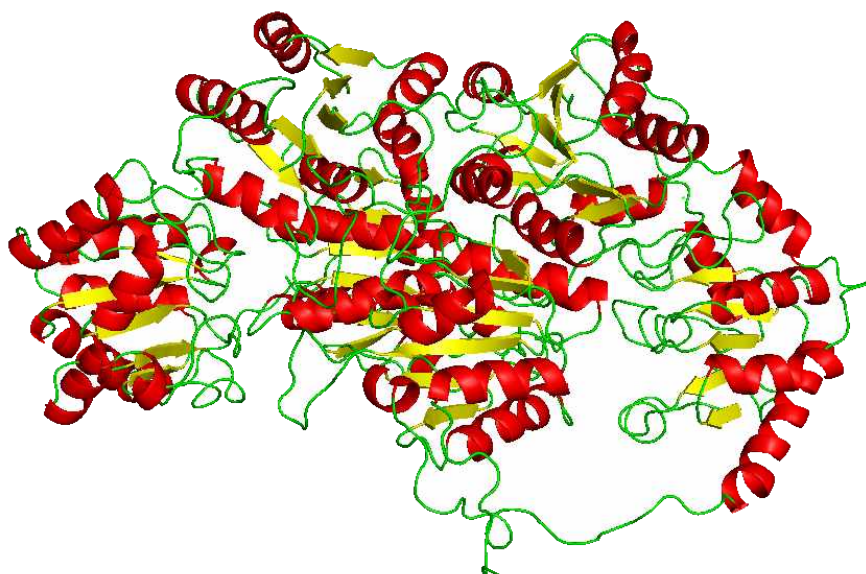


Figura 3: Estrutura da enzima ALS.

Com o objetivo de entender e prever o comportamento de sistemas reais, a modelagem molecular engloba um número de ferramentas e métodos computacionais que são usados para descrever e prever estruturas moleculares, propriedades de reações, propriedades termodinâmicas, entre outras [20, 21]. Sendo assim, a modelagem molecular computacional é aquela que estuda as propriedades atomísticas com o uso da química computacional e de técnicas de visualização gráfica. Este é um ramo no qual se estudam sistemas químicos e biológicos mais complexos, com um número elevado de partículas, da ordem de 10^{23} ; podendo realizar cálculos específicos e criar modelos que seriam impossíveis de serem obtidos de outra maneira [22, 23].

Com o avanço dos recursos computacionais, tratando-se de *software* e *hardware*, a modelagem molecular computacional se desenvolveu de maneira surpreendente nas últimas décadas. No passado, a modelagem molecular computacional era restrita ao grupo de pesquisadores e cientistas responsáveis pelo desenvolvimento dos componentes de *software* utilizados. Nos dias atuais, diversos recursos e programas de modelagem estão disponíveis gratuitamente na rede *web*, sem ter a necessidade de ter uma pessoa em um grupo de pesquisa destinada exclusivamente para o desenvolvimento de tais programas [9].

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Simular computacionalmente, a nível molecular, a enzima ALS em solução aquosa, visando estudar sua estabilidade estrutural com e sem seu cofatores.

2.2. Objetivos específicos

- Estudar os cofatores da enzima;
- Simular a dinâmica estrutural da enzima em solução aquosa na presença e/ou na ausência de seus cofatores;
- Comparar os resultados para determinar a influência dos cofatores na estabilidade geral e do sítio reativo da enzima.

3. Fundamentos teóricos

A modelagem molecular se preocupa em encontrar meios de reproduzir e prever o comportamento de moléculas e sistemas moleculares [1]. Neste contexto a base da Modelagem Molecular está na criação de modelos teóricos, em escala atômica, visando relacionar propriedades moleculares importantes com propriedades macroscópicas de um determinado sistema. Certos modelos teóricos utilizam métodos de Mecânica Quântica para caracterizar propriedades eletrônicas do sistema, e certos modelos utilizam métodos de Mecânica clássica (Mecânica Molecular) para a descrição física de sistemas moleculares complexos em fase condensada [2].

O método da Mecânica Molecular (MM) [4] baseia-se na visão clássica de estrutura molecular como um conjunto de esferas unidas por molas com constantes de força características. O campo de forças neste caso é constituído pelo somatório de termos de energia relacionados às posições de equilíbrio do sistema (distâncias de ligação, ângulos de ligação, ângulos diedros, distâncias de *van de Waals*, ligações hidrogênio, interações eletrostáticas, etc.) às quais podem ser associadas penalidades energéticas para seu afastamento, isto é, as constantes de força das “molas”. Em geral, estas constantes de força são avaliadas por meio de dados espectroscópicos. A principal vantagem da mecânica molecular é a rapidez na avaliação de sistemas complexos [2].

3.1. Campo de força

De acordo com definição da IUPAC, campo de força pode ser descrito como “um conjunto de funções e parametrização usadas em cálculos de mecânica molecular” ao fornecer, em detalhes, informações a respeito dos átomos e suas interações em uma molécula considere-se aqui os termos relacionados às interações entre átomos ligados e não-ligados entre si. Dentre os campos de força mais utilizados atualmente cita-se: AMBER (*Assisted Model Building with Energy Refinement*), GROMOS (*Groningen Molecular Simulation packages*), OPLS (*Optimized Parameters for Liquid Simulation*), CHARMM (*Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics*) e Martini. Apesar de semelhantes, as equações que os definem possuem particularidades que devem ser levadas em conta ao optar por determinado campo de força a ser utilizado no estudo de certo sistema, por isso não se trata de uma escolha trivial. Tal conclusão foi adequadamente resumida [5]: “Não

existe o melhor campo de força. A melhor opção de modelo e campo de força depende do tipo de sistema molecular e o tipo de propriedade na qual se tem interesse” [5] .

O campo de força escolhido para desenvolver esse estudo foi o CHARMM27 [6], considerando que seus parâmetros foram obtidos e otimizados para a descrição adequada de biomoléculas, em especial proteínas. Além disso, a equação de energia potencial total é composta por sete termos sendo, portanto, mais completa que os demais campos de força empíricos [3].

3.2. Dinâmica Molecular

Este campo de força usa como modelo de moléculas a idéia de átomos unidos por ligações químicas. A utilização de parâmetros como potenciais harmônicos linear e angular, aliado à interações entre átomos não ligados, o método constrói uma expressão de energia potencial que depende somente das posições atômicas [1]. Isto implica que toda a dinâmica dos átomos é tratada através da mecânica clássica utilizando as leis de Newton. Com base nessas aproximações, o problema se reduz em descrevermos os diversos tipos de interações presentes na molécula por funções matemáticas clássicas, cujos parâmetros descrevem tais tipos de interações.

O campo de força utilizado na descrição de um sistema molecular possuem basicamente quatro componentes que são capazes de descrever as interações intra e intermoleculares do sistema em questão [1]. Assim, o campo de força pode assumir uma forma funcional descrita pelo potencial total (V_{total}), que inclui as interações ligadas, descritas pelos os potenciais de ligação (V_d), angular (V_θ), potencial Urey-Bradley de ligação (V_{UB}) (distância entre átomos nas posições 1,3), torcional própria ($V_{\phi prop}$), torcional imprópria ($V_{\phi improp}$), as interações não ligadas como o potencial de Lennard-Jones ou de van der Waals (V_{LJ}) e potencial de coulomb (V_c):

$$V_{total} = V_d + V_\theta + V_{UB} + V_{\phi prop} + V_{\phi improp} + V_{LJ} + V_c \quad (1)$$

As expressões explícitas de cada termo de energia potencial que define o campo de força são apresentadas a seguir.

3.2.1. Potencial Harmônico Linear

O estiramento entre dois átomos covalentemente ligados é descrito pelo Potencial Harmônico Linear ou potencial da ligação química, V_d , o qual descreve a energia associada ao desvio da distância de equilíbrio d_0 :

$$V_d = k_d(d - d_0)^2 \quad (2)$$

sendo d o comprimento da ligação entre dois átomos i e j , d_0 é o comprimento de equilíbrio e k_d é a constante elástica da força [3].

A distância d_0 e a constante de força são os parâmetros do campo de força [7].

3.2.2. Potencial Harmônico Angular

O desvio de ângulos de seu valor de referência ou equilíbrio θ_0 formado entre três átomos covalentemente ligados é descrito pelo potencial Harmônico Angular, V_θ , dado por:

$$V_\theta = k_\theta(\theta - \theta_0)^2 \quad (3)$$

sendo θ o ângulo definido pela ligação, θ_0 é o ângulo de equilíbrio e k_θ é a constante elástica da força [8].

3.2.3. Potencial de Urey-Bradley

Diz respeito às interações entre pares de átomos separados por duas ligações covalentes, conhecida como interação 1,3:

$$V_{UB} = k_{UB}(r_{1,3} - r_{1,3,0})^2 \quad (4)$$

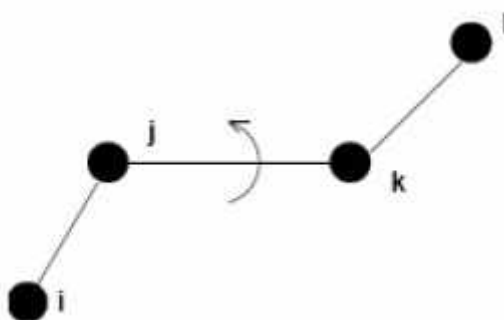
Onde: $r_{1,3}$ é a distância entre os átomos 1-3, $r_{1,3,0}$ é a distância de equilíbrio e k_{UB} é a constante de força da interação Urey-Bradley [8].

3.2.4. Potencial Diedral Próprio(Torsional)

Considera-se um conjunto de quatro átomos ligados (i , j , k e l) Figura 4, onde o ângulo diedro χ é definido como o ângulo entre os planos formados pelos átomos ijk e jkl , em que o valor zero corresponde à conformação cis, na qual os átomos i e j estão do mesmo lado. Dessa forma, V_χ é a representação explícita da barreira energética atribuído à rotação dos átomos i e l ao redor da ligação $j - k$.

$$V_\chi = k_\chi(1 + \cos(n\chi - \delta))^2 \quad (5)$$

Figura 4: Representação geométrica do ângulo de torção.



Onde: k_χ é a constante que define a extensão da barreira energética para torção, n é o número de mínimos na curva de energia potencial versus ângulo de torção, χ é o ângulo diedral da ligação central em relação a quatro átomos e δ é a diferença de fase do ângulo χ podendo o mesmo ser 0° ou 180° correspondendo, respectivamente, a um ponto de máximo ou de mínimo da curva. [3].

3.2.5. Potencial Diedral Impróprio

Está associado com deformações dos ângulos de torção impróprios, ou seja, aqueles associados a átomos de hibridização sp^2 , que geram deformações fora do plano. Termo presente em campos de força mais elaborados assim com o termo de Urey-Bradley.

$$V_{\phi_{improp}} = k_\phi(\phi - \phi_0)^2 \quad (6)$$

Onde: k_ϕ improp é a constante de força do diedro impróprio, ϕ é o ângulo diedral impróprio e ϕ_0 é ângulo diedral de equilíbrio.

3.2.6. Potencial de Lennard-Jones (ou van der Waals)

A interação de van der Waals de átomos não ligados quimicamente é descrito pelo potencial de Lennard-Jones. Este potencial para dois átomos i e j não ligados é dado por:

$$V_{LJ} = 4\epsilon \left[\frac{\sigma^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{\sigma^6}{r_{ij}^6} \right] \quad (7)$$

sendo r_{ij} a distância entre os átomos i e j , ϵ a profundidade do poço de energia potencial e σ o diâmetro de Lennard-Jones, o qual depende dos tipos de pares de átomos. Cabe salientar que este potencial é geralmente utilizado para descrever a interação de átomos separados por três ou mais ligações covalentes, bem como para interações intermoleculares [3].

3.2.7. Potencial de Coulomb

A interação eletrostática entre dois átomos i e j é representada pelo potencial de Coulomb, dado por:

$$V_c = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon r_{ij}} \quad (8)$$

sendo r_{ij} a distância entre os átomos i e j , q_i e q_j são suas cargas parciais, ϵ_0 a permissividade no vácuo e ϵ a constante dielétrica do meio.

Usualmente, os parâmetros empregados na definição de cada termo do potencial são determinados a partir de resultados de cálculos de mecânica quântica e/ou por ajustes a dados experimentais (cristalografia de raios-X, espectroscopia de infravermelho, ressonância magnética nuclear, etc) [3].

3.3. Equações e parâmetros da dinâmica molecular

Na Dinâmica Molecular, configurações sucessivas do sistema são geradas integrando as leis de movimento de Newton. O resultado é uma trajetória que especifica como as posições e as velocidades das partículas do sistema variam com o tempo [1].

A trajetória é obtida resolvendo a equação diferencial, de acordo com a segunda lei de Newton ($F=m.a$)[15]:

$$\frac{d^2 x_i}{dt^2} = \frac{F_{x_i}}{m_i} \quad (9)$$

A equação (9) descreve o movimento da partícula de massa m_i ao longo da coordenada (x_i), sendo F_{x_i} , a força da partícula nesta direção.

Em um sistema contendo N moléculas, a interação entre elas é descrita pelo potencial total: V_{total} . Assim, a força F_{x_i} depende da posição de todos os átomos do sistema através do gradiente de potencial.

$$F_{x_i} = -\frac{dV_x}{dx_i} \text{ ou } F_i = -\frac{dV}{dr_i} \quad (10)$$

O cálculo do gradiente de potencial permite obter a força F_i . Assim, integrando numericamente a equação de Newton para a partícula i em pequenos intervalos de tempo Δt , na ordem de femtosegundos ($1\text{fs} = 10^{-15}$ segundos), pode-se obter um conjunto de trajetórias para as partículas. Após as alterações iniciais, o sistema vai atingir o estado de equilíbrio. Assim, com o conjunto de trajetórias em equilíbrio poderá ser extraído as propriedades macroscópicas do sistema [9].

3.3.1. Algoritmo Leap-Frog

O algoritmo *Leap-Frog* é método simplificado para integrar numericamente as equações de movimento. Este algoritmo calcula as velocidades na metade do intervalo de integração e usa estas velocidades para calcular as novas posições [10]:

$$v(t + \frac{1}{2}\delta t) = v(t - \frac{1}{2}\delta t) + \delta t a(t) \quad (11)$$

$$r(t + \delta t) = r(t) + \delta t v(t + \frac{1}{2}\delta t) \quad (12)$$

Em outras palavras, as velocidades $v(t+1/2 \delta)$ são primeiramente calculadas das velocidades $v(t-1/2 \delta)$ e a aceleração no tempo t. As posições $r(t+ \delta t)$ são deduzidas das velocidades que foram calculadas ao mesmo tempo que as posições no tempo $r(t)$ usando as equações (11 e 12). As velocidades no tempo t podem ser calculadas por meio de uma expressão em série de Taylor:

$$v(t) = \frac{1}{2}[v(t + \frac{1}{2}\delta t) + v(t - \frac{1}{2}\delta t)] \quad (13)$$

O método *leap-frog* inclui explicitamente a velocidade em seus cálculos. Entretanto, uma desvantagem desta metodologia é que as posições e as velocidades não são

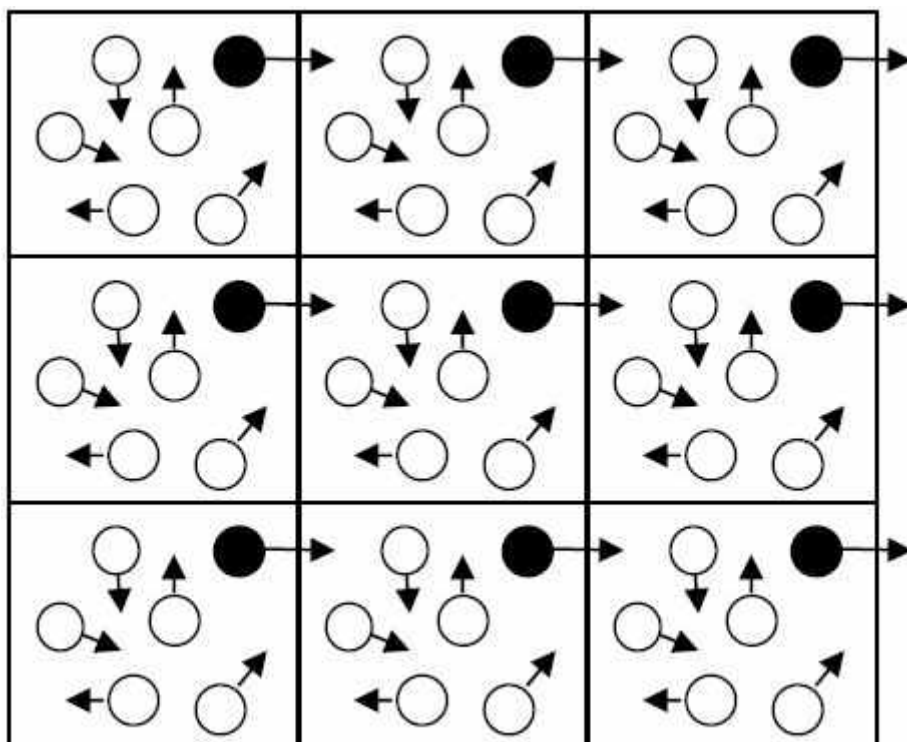
sincronizadas, ou seja, não são calculadas ao mesmo tempo. Isto implica que não é possível calcular a contribuição da energia cinética para a energia total ao mesmo tempo em que as posições são definidas (energia potencial)[16].

3.3.2. Condições Periódicas de Contorno

Na Dinâmica Molecular, a simulação de um sistema molecular é realizada em uma caixa virtual, resultando em dois problemas básicos. O primeiro, deve-se ao fato dos átomos na borda da caixa presenciarem forças diferentes dos átomos no centro da caixa, criando-se efeitos de superfície [11]. Segundo, o número de partículas é relativamente pequeno se comparado com um sistema físico real, que possui átomos da ordem de Avogadro. Assim, para minimizar esses efeitos aplica-se a condição periódica de contorno, permitindo realizar simulações com um número relativamente pequeno de partículas e permitir que as partículas consideradas sofram efeito dessas forças como se estivessem no interior da caixa de simulação [1].

A aplicação das condições periódicas de contorno implica em realizar cópias da caixa de simulação em todas as direções, resultando em um arranjo periódico tridimensional infinito. Um exemplo de condições periódicas de contorno em uma caixa bidimensional é mostrado na Figura 5 onde cada caixa é recoberta por oito vizinhas de forma que em uma situação tridimensional cada caixa é recoberta por 26 vizinhas. As coordenadas das partículas nas caixas replicadas são computadas simplesmente somando e subtraindo o comprimento das caixas nas integrais. Assim, durante a simulação, o movimento dos átomos na caixa original são reproduzidos nas imagens periódicas. Quando um átomo sai da caixa original atravessando uma das faces ao seu redor, uma de suas imagens entra pela face oposta com velocidade idêntica, conservando o número de átomos e mantendo a densidade constante na caixa de simulação [17].

Figura 5: Condições periódicas de contorno em duas dimensões [2].



3.3.3. Parâmetros Utilizados

Para a realização dos cálculos é necessário definir alguns outros parâmetros como ajustar a temperatura e a pressão do sistema. Por trabalhamos com estruturas que foram cristalizadas previamente o sistema requer um prévio tratamento.

Foi então realizada uma termalização em 3 três etapas utilizando um sistema com temperatura escalonável primeiramente até 50K, posteriormente 150K e finalmente 310K, utilizando o termostato *V-rescaling* [12] que ajusta a velocidade dos átomos mil vezes ao longo de cada uma das três etapas.

O sistema também teve sua pressão mantida a 1 bar (*ensemble* NPT) com o barostato de *Parrinello-Rahman* [13 e 14] que a partir dele os vetores da caixa seguem a equação matricial do movimento.

3.4. Sistemas simulados

O estudo realizado utilizou a estrutura obtida a partir de modelagem por homologia e Dinâmica Molecular. [29, 30].

Foram propostos dois sistemas de acordo com as tabelas a seguir, para o estudo por dinâmica molecular, de acordo com as tabelas:

Tabela 1: Sistema 1, número de átomos da enzima ALS com seus cofatores.

Nome	Proteína	Água	Íon Sódio
Quantidade	uma macromolécula com 17591 átomos incluindo os cofatores	93315 moléculas	11 íons

Tabela 2: Sistema 2, número de átomos da enzima ALS sem seus cofatores.

Nome	Proteína	Água	Íon Sódio
Quantidade	uma macromolécula com 17329 átomos	93400 moléculas	3 íons

Para o sistema 2 a remoção de seus cofatores foi realizada na estrutura inicial, para que não houvesse alguma influência no estudo.

A caixa de simulação utilizada em ambos os sistemas tinham 14,45697 nm x 14,45697 nm x 14,45697 nm, totalizando 3021,5643 nm³.

As topologias foram obtidas diretamente do campo de força, inclusive os cofatores que foram parametrizados previamente [3].

Ambos sistemas foram solvatados explicitamente com moléculas de águas do tipo SPC.

3.5. Passos realizados

Na simulação, foi utilizado o *software* GROMACS versão 5.1.5 [18] e com o campo de força CHARMM27 (*Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics*) [6].

Os sistemas S1 e S2 foram minimizados em sua energia com o algoritmo *steepest descent* [28]. E em seguida foi termalizado em 3 etapas de 100000 passos com integração de 1 fs, totalizando 100 ps cada uma das termalizações, e em temperaturas progressivas de 50 K, 150 K e 310 K.

Por fim, foi realizada as simulações computacionais para ambos os sistemas integrando as equações de movimento com 20 milhões de passos, totalizando 20 ns de simulação, no *ensemble* NPT (isotérmico-isobárico) à 298 K e 1 bar. A taxa de compressibilidade foi de $4,5 \cdot 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ e a pressão foi mantida a 1 bar pelo acoplamento do barostato de Parrinello-Rahman [13 e 14]. A temperatura foi mantida a 310 K através do

termostato V-rescale [12]. O integrador utilizado foi o *leap-frog*, com intervalo de de integração de 1 fs.

4. Resultados e Discussões

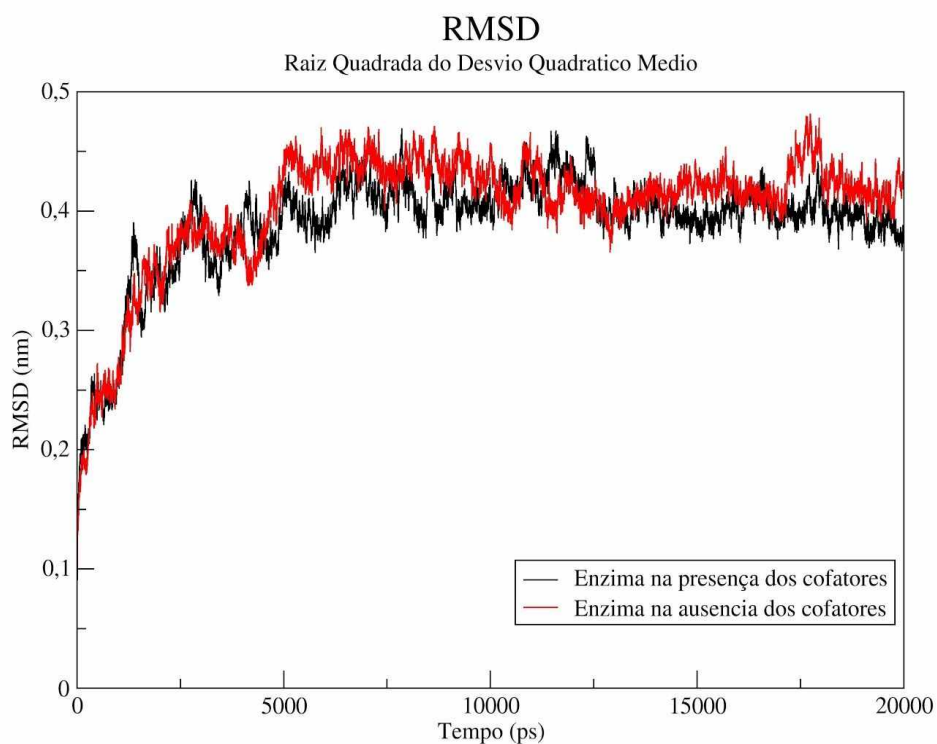
4.1. Raiz Quadrada do Desvio Quadrático Médio (RMSD)

A raiz quadrada do desvio quadrático médio de certos átomos de uma molécula, em relação a uma estrutura de referência, pode ser calculado com o comando `gmx rms` pelo ajuste do quadrado mínimo da estrutura, com relação à estrutura anterior em cada passo da integração [18], de acordo com a equação (15):

$$RMSD(t_1, t_2) = \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \|r_i(t_1) - r_i(t_2)\|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (15)$$

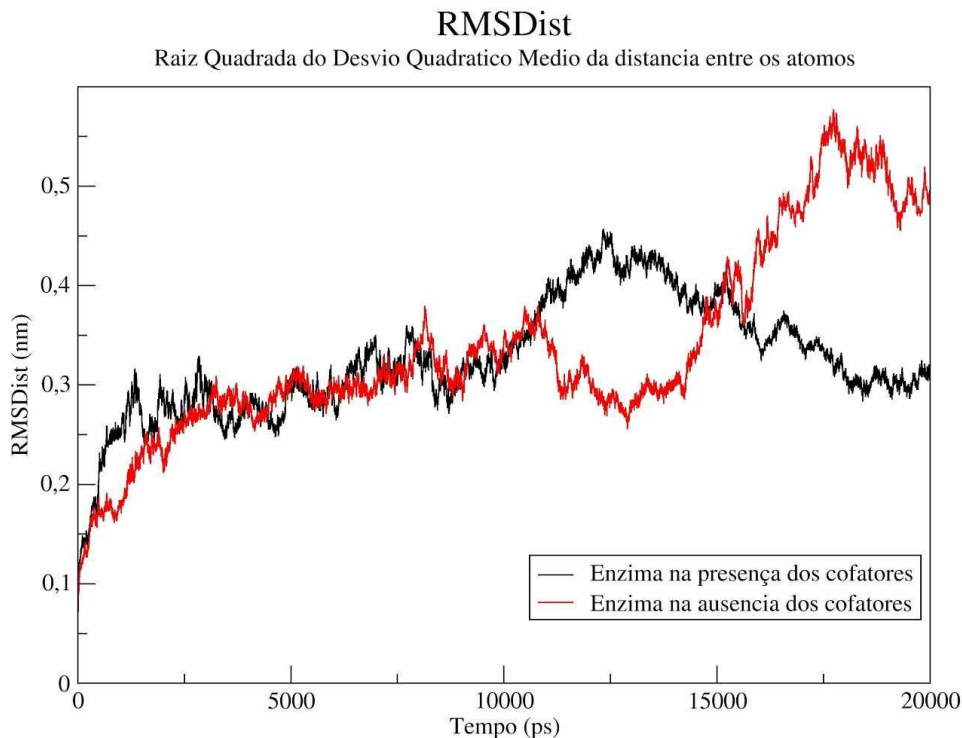
onde $M = \sum_{i=1}^N m_i$ e $r_i(t)$ é a posição do átomo i no tempo t . E $t_2 = t_1 - \tau$ onde τ é o tempo anterior. Na Figura 6 temos o RMSD de ambas estruturas em estudo.

Figura 6: RMSD de toda a estrutura enzimática ao longo da simulação.



Pode-se então observar a menor variação estrutural na enzima com a presença dos cofatores, mas como a variação não é muito significativa, sugerindo um refinamento nas análises. Na Figura 7 temos o gráfico do RMSDist das estruturas.

Figura 7: RMSDist de toda a estrutura enzimática ao longo da simulação.



Por esse motivo foi feito também o cálculo do RMSDist, semelhante ao do RMSD, mas que ao invés de calcular a posição do átomo com relação ao tempo anterior, ele calcula esse desvio sempre com relação a estrutura inicial, de acordo com a equação (16):

$$RMSDist(t) = \left[\frac{1}{N^2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \|r_{ij}(t) - r_{ij}(0)\|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (16)$$

onde r_{ij} é a distância entre os átomos no tempo t em comparação com a distância entre os mesmos átomos no tempo t=0.

É então possível analisar que a enzima na ausência de seus cofatores (em vermelho) tem uma variação estrutural maior que a enzima com seus cofatores. O que nos informa que realmente a presença dos cofatores pode ser de grande importância para a estabilidade estrutural da enzima.

Na tentativa de compreender melhor a contribuição dos cofatores nesta estabilidade estrutural enzimática, o cálculo de RMSD foi refinado para a análise de apenas os aminoácidos da região do sítio reativo da enzima. Estes cálculos culminaram em outros dois gráficos que podem ser observados nas Figuras 8 e 9.

Figura 8: RMSD do sítio reativo da enzima ao longo da trajetória.

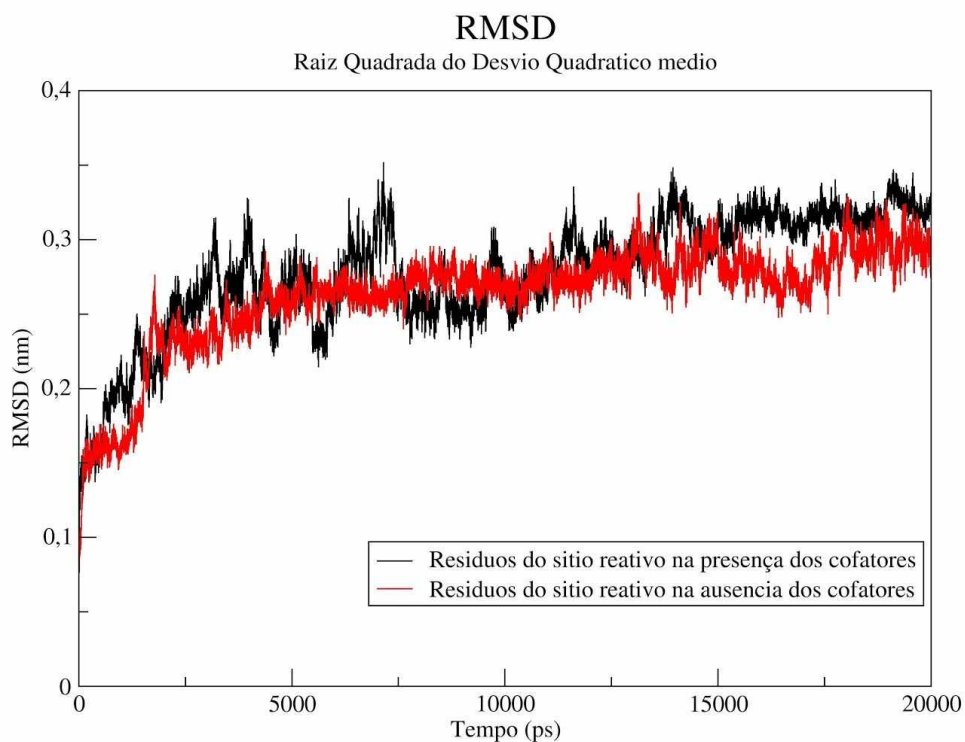
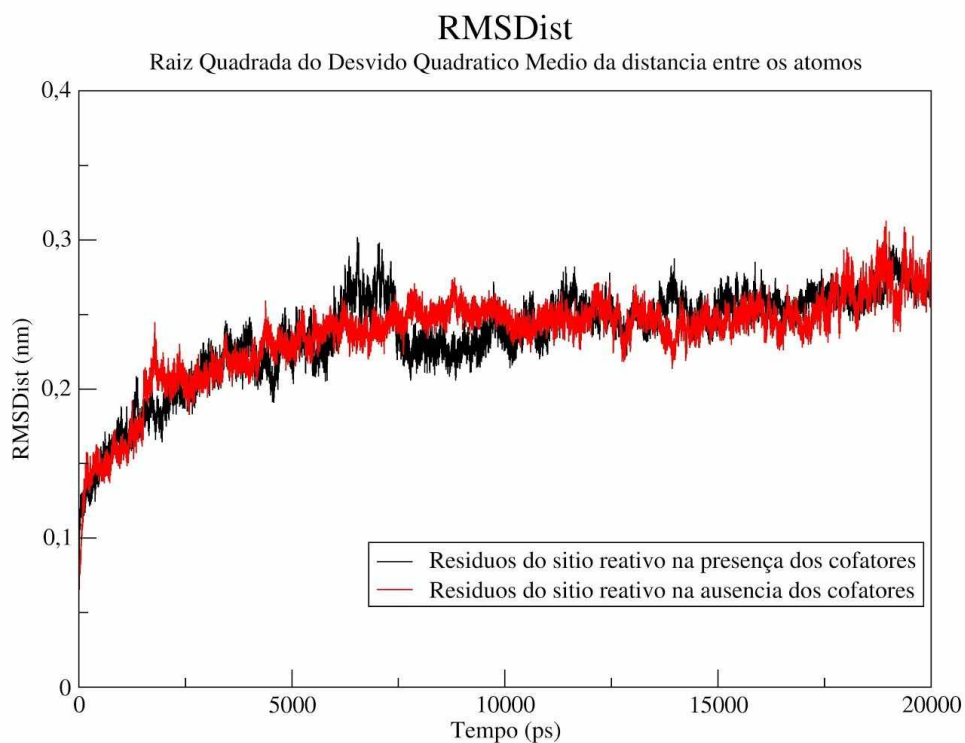


Figura 9: RMSDist do sítio reativo da enzima ao longo da trajetória.



Pela análise do RMSD das simulações dos dois sistemas, um comportamento parecido foi constatado. De acordo com a Figura 6, o sistema 2 foi o que sofreu maior flutuação conformacional. Em ambos os sistemas, o RMSD varia consideravelmente e os sistemas tendem alcançar uma relativa estabilidade próximo a 6 ns de simulação, com uma flutuação em torno de 0,43 nm para o sistema 2, com relação ao sistema 1, a variação foi um pouco menor, de 0,39 nm. Entretanto, a média da flutuação foi em torno de 0,39 nm para o sistema 1 e 0,40 nm para o sistema 2.

Para a análise do RMSDist das simulações, o comportamento observado nos mostra que ambas estruturas após cerca de 10 ns de simulação sofrem variações totalmente diferentes, em que o sistema 1 se estabiliza próximo a 16 ns de simulação, enquanto o sistema 2 não se estabiliza. O motivo dessas desestabilização pode atribuído a ausência do cofator FAD, onde na literatura se suspeita de sua influência como estabilizador da estrutura geral da enzima [3].

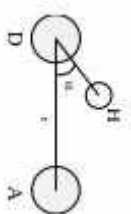
Nas análises dos resíduos de aminoácidos do sítio reativo podemos notar que não existe um flutuação grande em que ambos sistemas se estabilizam de forma a confirmar de que os cofatores não causam influência no sítio reativo da enzima.

4.2. Interações por ligações de hidrogênio

Para estudar o comportamento das estruturas enzimáticas frente ao solvente foi então realizado o cálculo do número de ligações de hidrogênio tanto intra, como inter molecular em que podemos observar o quanto as estruturas interagem entre si e com o solvente.

O programa analisa as ligações de hidrogênio entre todos os possíveis doadores (D) e aceptores (A). Para determinar se a ligação de hidrogênio existe, é utilizado um critério geométrico, de acordo com a Figura 10:

Figura 10: Critério geométrico para considerar uma ligação de hidrogênio [18].

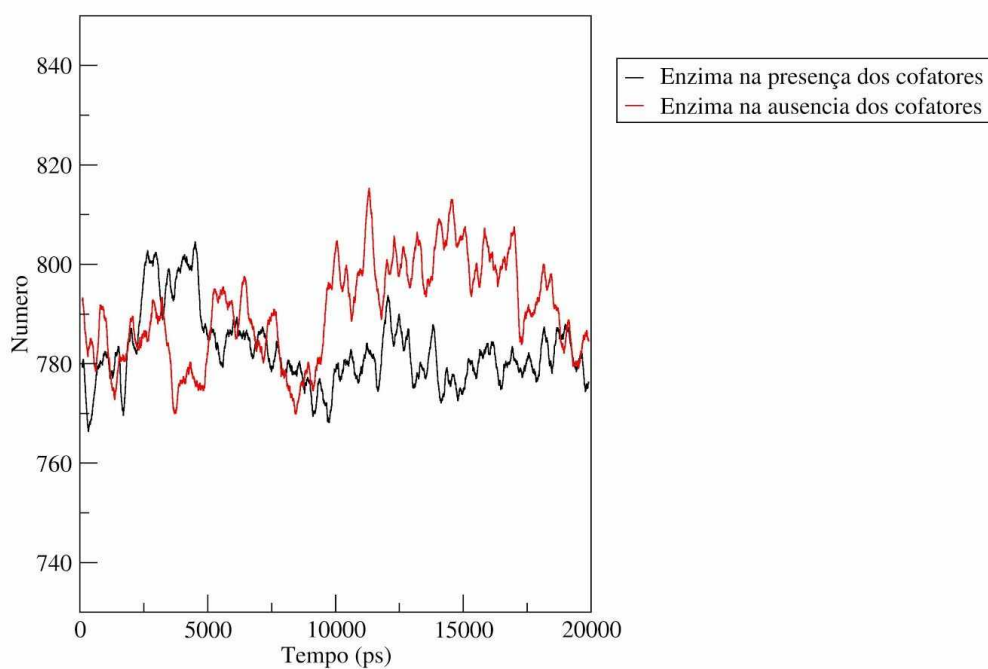


Onde r é a distância entre o doador e aceitador e α é o ângulo da ligação de hidrogênio.

Primeiramente foi analisado o número de interações de hidrogênio intramolecular como mostra a Figura 11:

Figura 11: Número de ligações de hidrogênio intramolecular.

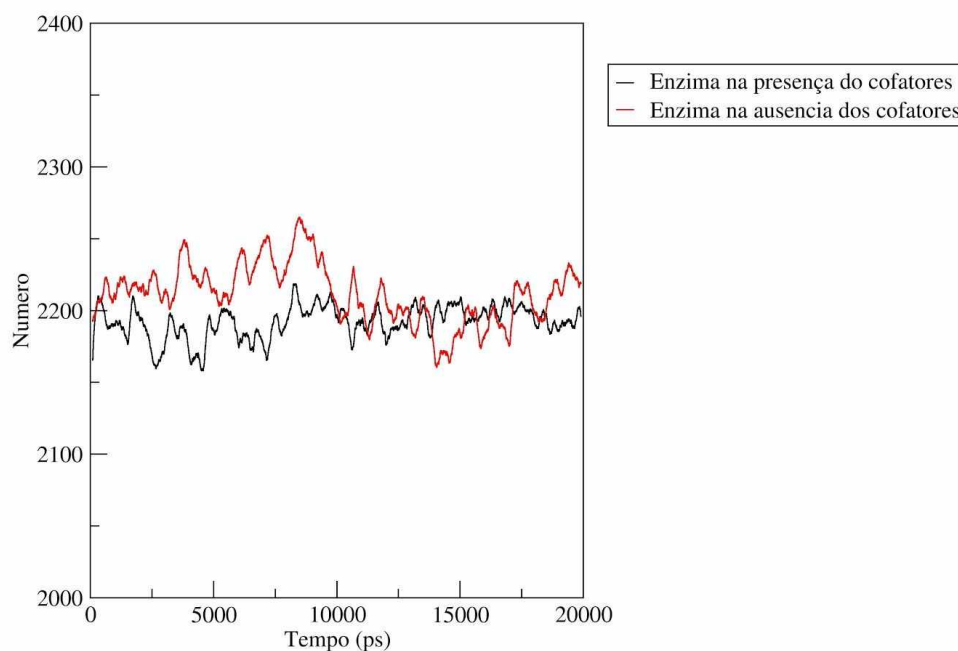
Ligações de hidrogenio intramolecular



A partir dessa imagem, foi feito o cálculo do número de ligações de hidrogênio intermoleculares para verificar o efeito do solvente ao longo do cálculo, como mostrado na Figura 12:

Figura 12: Número de ligações de hidrogênio intermoleculares.

Ligações de hidrogenio intermolecular



Como podemos observar com os gráficos acima a enzima na ausência dos cofatores perde ligações de hidrogênio intermolecular ao longo do tempo e essas interações “perdidas” não são refeitas na forma de ligações intramoleculares, o que nos mostra que sua estrutura tem menos estabilidade em água do que a enzima com os cofatores.

Então, a análise foi refinada para a região do sítio reativo da enzima, para se obter de forma mais precisa essas interações, como mostra as Figuras 13 e 14.

Figura 13: Número de ligações de hidrogênio intramolecular da região do sítio reativo da enzima.

Ligações de hidrogenio intramolecular

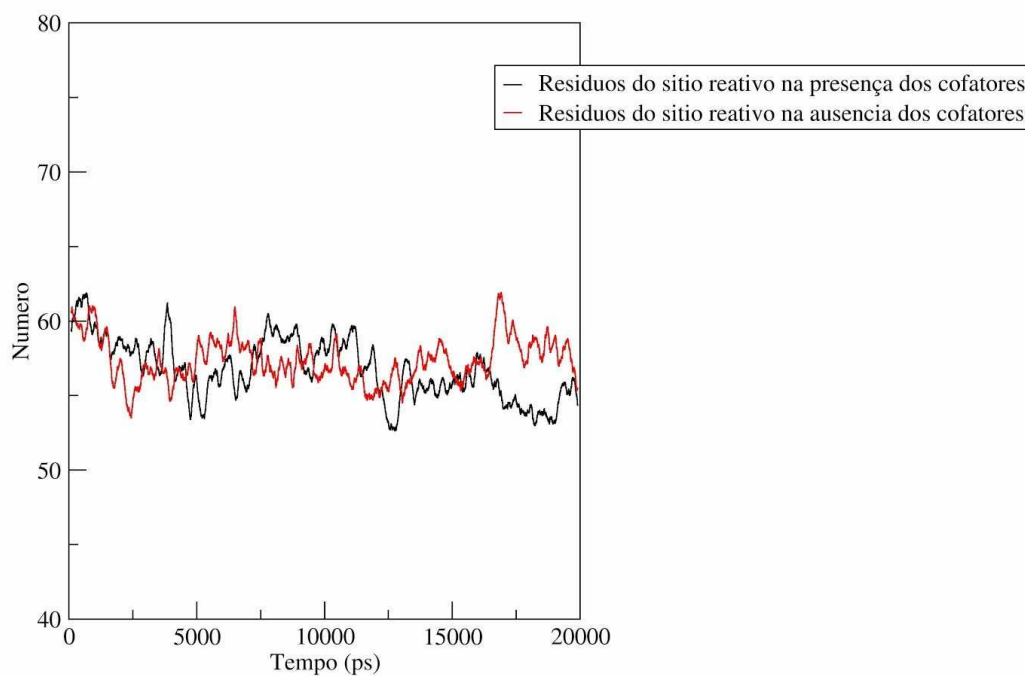
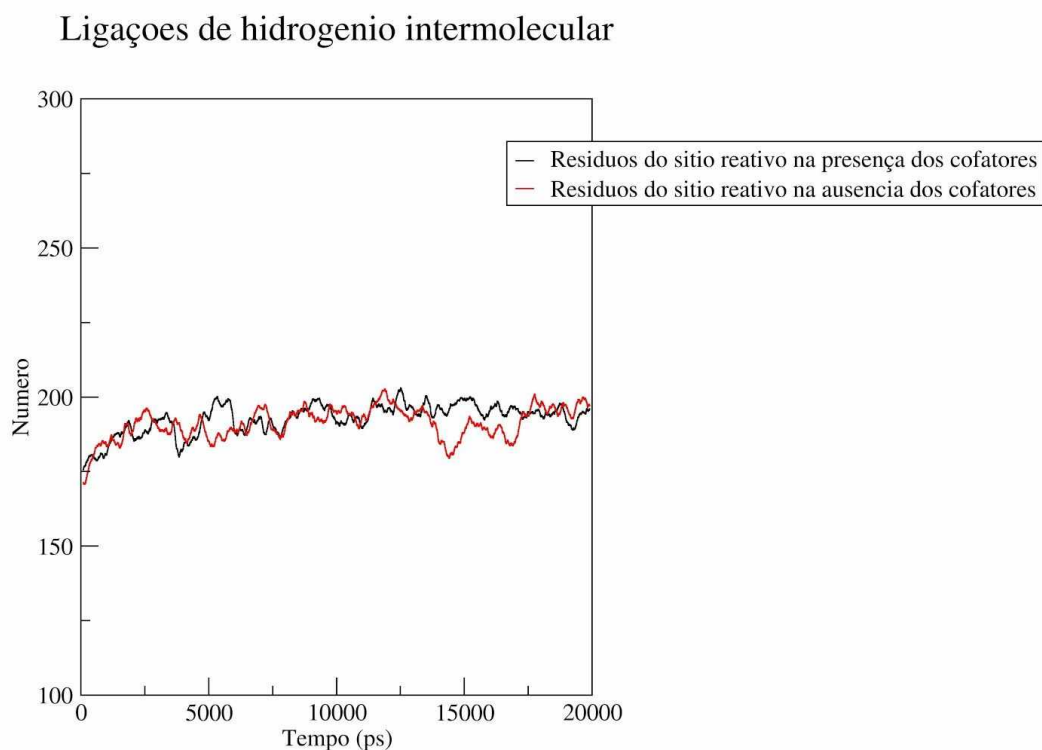


Figura 14: Número de ligações de hidrogênio intermolecular da região do sítio reativo da enzima.

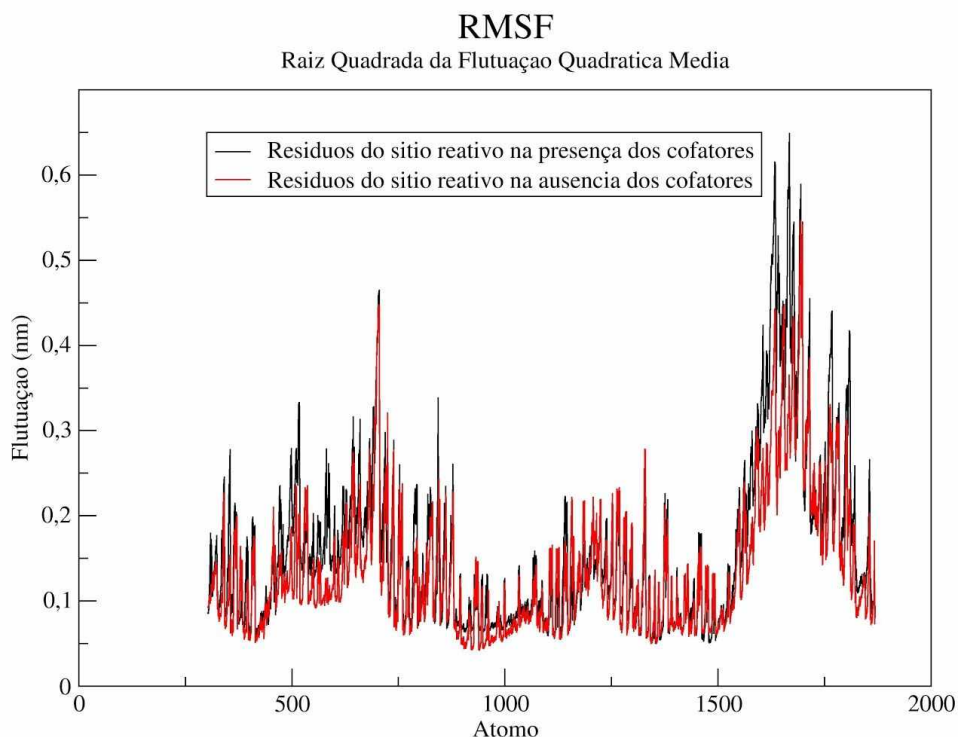


Com esse refinamento podemos notar que a região do sítio reativo da enzima tem praticamente a mesma estabilidade, quando comparado com a estrutura sem os cofatores.

4.3. RMSF: Raiz Quadrada da Flutuação Quadrática Média

Para determinar a flutuação estrutural foi realizado o cálculo de RMSF que foi refinado para se realizar o estudo apenas da região do sítio reativo das estruturas. Esse cálculo tem como principal função mostrar o deslocamento dos resíduos de aminoácidos dos sítio reativos. Seu cálculo é um cumulante do RMSD e sua representação é um histograma dos dados, como mostrado na Figura 15:

Figura 15: RMSF do sítio reativo da enzima ao longo da trajetória.



Como mostrado no gráfico de RMSF ambas estruturas possuem flutuações muito próximas, o que nos permite mais uma vez confirmar que os cofatores não tem influência de estabilidade estrutural no sítio reativo.

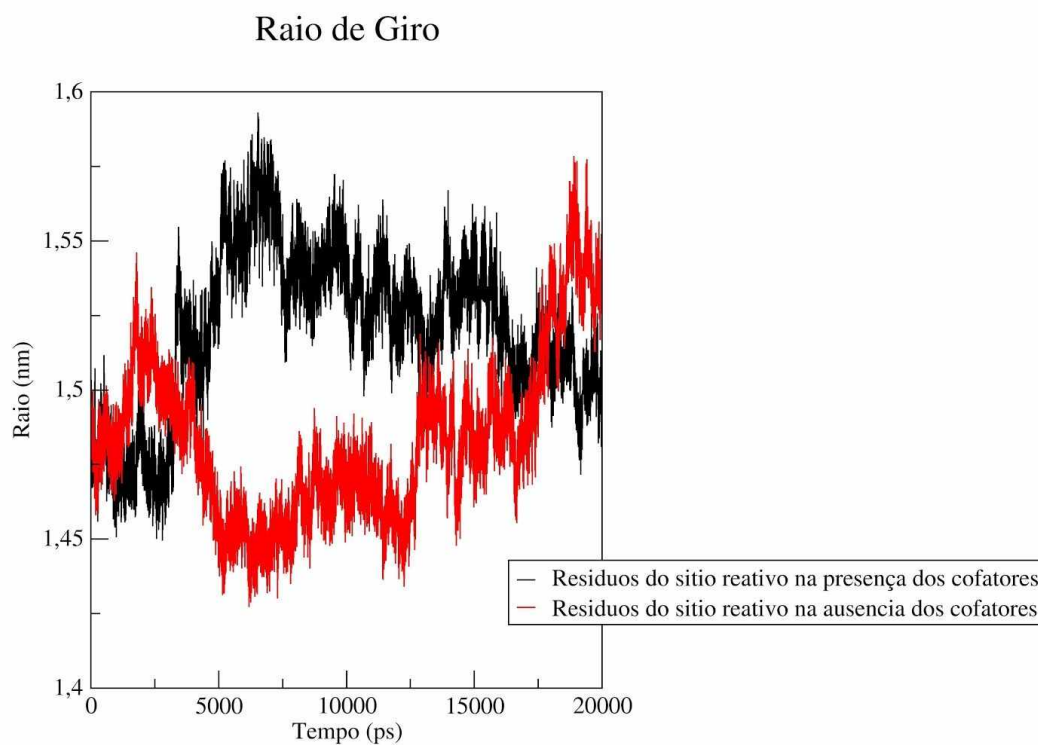
4.4. Raio de Giro

Por fim, foi então feito o cálculo do raio de giro que representa o movimento dos átomos com relação ao centro de massa da estrutura. O cálculo de raio de giro, assim como o do RMSF foi refinado para se obter apenas a região do sítio reativo da estrutura, de acordo com a equação 18:

$$R_g = \left(\frac{\sum_i \|r_i\|^2 m_i}{\sum_i m_i} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (18)$$

onde m_i é a massa do átomo i e r_i sua posição com relação ao centro de massa do sítio reativo, de acordo com a Figura 16:

Figura 16: Raio de giro do sítio reativo da enzima ao longo da trajetória.



Com o cálculo do raio de giro da região do sítio reativo, nos confirma mais uma vez que os cofatores não influenciam na estabilidade estrutural do sítio reativo enzimático.

5. Conclusões

A utilização da metodologia por dinâmica molecular permitiu a comparação das estruturas da enzima em meio aquoso. A simulação também nos mostrou que seu sítio reativo não sofre influência estrutural com relação ao cofatores que foram analisados. Também foi possível observar que as flutuações conformacionais durante a simulação foi observado que o sítio reativo da estrutura com os cofatores variou um pouco mais do que na ausência dos mesmos, de forma a obter estabilidade após 6 ns de simulação . Esta variação pode ser atribuída à ausência do cofatores na simulação.

Os resultados obtidos ainda não elucidam o comportamento real da ALS em água, visto que, principalmente em termos de RMSD, a estrutura enzimática não convergiu totalmente a uma estabilidade conformacional. Com relação ao cofator FAD embora com função ainda não bem esclarecida na literatura este não mostrou grande participação na estabilidade enzimática visto que os resíduos que interagem com o mesmo não apresentaram diferenças notáveis com relação às flutuações conformacionais na presença e ausência de tal cofator.

Por fim, os resultados obtidos indicam a necessidade de realização de simulações de DM mais longas do modelo obtido para uma melhor compreensão do comportamento da ALS em meio aquoso, em especial englobando ao sistema o cofator TPP, que segundo a literatura tem grande influência no processo enzimático.

6. Trabalhos Futuros

- Aumentar o tempo de simulação de dinâmica molecular para 1000 ns;
- Estudar o funcionamento do cofator TPP tanto para reação enzimática quanto para a sua inibição.
- Parametrizar alguns herbicidas no campo de força;
- Realizar um estudo do sítio reativo frente aos herbicidas parametrizados;
- Estudo de possíveis caminhos para retirada desses herbicidas para se calcular o Potencial de Força Média (PMF), que utiliza a igualdade de *Jarzynski* para estabelecer uma conexão entre o cálculo do trabalho e energia realizado no processo fora do equilíbrio (simulação SMD) com um processo em quase equilíbrio, como o experimento de detecção pelo biossensor de ponteira de AFM;
- Estudo mais aprimorado da estrutura da enzima ALS para sua imobilização da ponteira do AFM utilizando o Modelo Rígido proposto por [31] e sugestão das condições ótimas de funcionamento do nanobiossensor;
- Construção e utilização do modelo experimental do nanobiossensor proposto.

7. Referências

- [1] LEACH, A. R. **Molecular Modelling: Principles and Applications**. 2. ed. New York: Pearson Prentice Hall, 2001.
- [2] Franca, E. F.; Caracterização molecular de biopolímeros em solução utilizando simulação computacional. 2009. 181f. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.
- [3] Guerra, R. F.; MODELAGEM MOLECULAR VOLTADA PARA A CONSTRUÇÃO DE UM NANOBIOSSENSOR PARA DETECÇÃO DO HERBICIDA IMAZAQUIN. 2016. 151f. Tese (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.
- [4] BURKET, U. F. & ALLINGER, N. L. *Molecular Mechanics*. Washington, DC, **American Chemical Society**. 1982. 177 p.
- [5] VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Computer Simulation of Molecular Dynamics: Methodology, Applications, and Perspectives in Chemistry. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 29, n. 9, p. 992–1023, 1990. <https://doi.org/10.1002/anie.199009921>
- [6] MACKERELL, A. D. et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 18, p. 3586–3616, 1998.
- [7] RAPPÉ, A. K. & CASEWIT, C. J. *Molecular Mechanics Across Chemistry*. Sausalito, University **Science books**. 1997
- [8] Foloppe, N. and MacKerell, Jr., A.D. "All-Atom Empirical Force Field for Nucleic Acids: 1) Parameter Optimization Based on Small Molecule and Condensed Phase Macromolecular Target Data," **Journal of Computational Chemistry** 21: 86-104, 2000
- [9] VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B.; GROENHOF, G.; MARK, A. E. & BERENDSEN, H. J. C. "GROMACS: Fast, flexible, and free". **Journal of Computational Chemistry**, 26(16):1701, 2005.
- [10] HOCKNEY, R. W. The potential calculation and some applications. In: B. Alder, S. Fernbach, et al (Ed.). *Methods in Computational Physics*. **New York/London: Academic Press**, v.9, 1970. The potential calculation and some applications
- [11] HINCHLIFFE, A. *Molecular Modeling for Beginners*. Chichester, John Wiley & Sons Ltd. 2003

- [12] Bussi, G., Donadio, D., Parrinello, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **J. Chem. Phys.** 126:014101, 2007.
- [13] Parrinello, M., Rahman, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. **J. Appl. Phys.** 52:7182–7190, 1981.
- [14] Nosé, S., Klein, M. L. Constant pressure molecular dynamics for molecular systems. **Mol. Phys.** 50:1055–1076, 1983.
- [15] CUNHA, R. A. Caracterização molecular do mecanismo de interação de quitosana com bicamadas lipídicas compostas de dipalmitoilfosfatidilcolina. 2013. 87f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.
- [16] VERLET, L. Computer “experiments” on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. **Physical Review**, v. 159, n. 1, p. 98–103, 1967.
- [17] VERLI, H. et al. Bioinformática : da Biologia à Flexibilidade Molecular. 1 a . ed. São Paulo: **Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq)**, 2014.
- [18] M.J. Abraham, D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, and the GROMACS development team, GROMACS User Manual version 5.1.5, www.gromacs.org (2017)
- [19] <http://mundodabioquimica.blogspot.com/2014/11/> Acesso: 2019
- [20] Scheer, M. et al. BRENDA, the enzyme information system in 2011. **Nucleic Acids Res, Southampton**, v. 39, n. suppl 1, p. D670–D676, 1 jan. 2011. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1089>
- [21] Schlick, T. Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide: An Interdisciplinary Guide. 2. ed. New York: Springer, 2010. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6351-2>
- [22] Morgon; Coutinho, N. H.; Coutinho, K. Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular. 1. ed. São Paulo: **Livraria da Física**, 2007.
- [23] Sant’Anna, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. **Revista Virtual de Química**, v. 1, p. 49–57, 2009.
- [24] <https://www.ebi.ac.uk/interpro/protein/P17597> Acesso: 2019
- [25] Howard Hugues Media Institute, **The Structural Biology Program**, "RNA, The Enzyme"
- [26] A. Radzicka, R. Wolfenden (1995), "A proficient enzyme.", **Science**, 6(267), p. 90-93. <https://doi.org/10.1126/science.7809611>
- [27] Chipman D, Barak Z, Schloss JV (June 1998). "Biosynthesis of 2-aceto-2-hydroxy acids: acetolactate synthases and acetohydroxyacid synthases". **Biochimica et Biophysica Acta**. 1385 (2): 401–419.

- [28] QIAN, N. On the Momentum Term in Gradient Descent Learning Algorithms. **Neural Networks**. v. 12, n. 1, p. 145-151, 1999.
- [29] Ierich, J. C. M.; Predição da estrutura tridimensional do dímero funcional da enzima Acetohidroxiácido Sintase pela aplicação de técnicas de modelagem molecular computacional. 2014. 121f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Molecular e Celular) Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2014.
- [30] IERICH, Jéssica Cristiane Magalhães et al. A computational protein structure refinement of the yeast Acetohydroxyacid Synthase. **Jornal Of The Brazilian Chemistry Society**. São Paulo, p. 1702-1709. jun. 2015. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150144>
- [31] AMARANTE, A. M. et al. Modeling the coverage of an AFM tip by enzymes and its application in nanobiosensors. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 53, p. 100–104, 2014.
- [32] Franca E. F.; Leite F. L. e Cunha R. A.. **Phys, Chem.** Chem. Phys., 13, 8894-8899.