

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

**CARACTERIZAÇÃO DA DINÂMICA DE MODULAÇÃO DA
TROMBINA POR INIBIDORES COVALENTES E ALOSTÉRICOS**

Guilherme Menegon Giesel

Porto Alegre – Brasil
Outubro de 2009

**CARACTERIZAÇÃO DA DINÂMICA DE MODULAÇÃO DA TROMBINA POR INIBIDORES
COVALENTES E ALOSTÉRICOS**

Guilherme Menegon Giesel

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

Hugo Verli

Porto Alegre – Brasil
Outubro de 2009

**CARACTERIZAÇÃO DA DINÂMICA DE MODULAÇÃO DA TROMBINA POR INIBIDORES
COVALENTES E ALOSTÉRICOS**

Guilherme Menegon Giesel

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)

João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa
(Laboratório Nacional de Luz Síncrotron - LNLS)

Paulo Augusto Netz (Instituto de Química - UFRGS)

Rogério Margis (Centro de Biotecnologia - UFRGS)

Carlos Termignoni (Centro de Biotecnologia - UFRGS) (Suplente)

Esta dissertação foi realizada sob a orientação do professor doutor Hugo Verli, 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

Giesel, Guilherme Menegon.

**Caracterização da dinâmica de modulação da trombina por inibidores
covalentes e alostéricos**

Rio Grande do Sul, UFRGS, Centro de Biotecnologia, 2009.

Dissertação: Mestre em Ciências (Biologia Celular e Molecular)

- | | |
|-----------------------|---------------|
| 1. Dinâmica Molecular | 2. Trombina |
| 3. Inibidores | 4. Coagulação |

I. Hugo Verli

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

III. Títulos

AGRADECIMENTOS

Minha imensa gratidão ao Prof. Hugo Verli, que logo no início de sua carreira científica me acolheu como um de seus pupilos, depositando sempre muita confiança em meu trabalho. Seu exemplo de conduta e empenho pessoal em minha formação, levou não apenas à formação de uma sólida relação aluno/orientador, mas também uma relação de amizade verdadeira da qual muito me orgulho.

Ao professor Jeverson Frazzon e em especial à professora Evelyn Schröder, membros da comissão de acompanhamento, pela enorme prestatividade durante a realização dos trabalhos.

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

Aos professores, alunos e colegas de outros laboratórios, pelo prazer na realização dos trabalhos em colaboração.

Ao Laércio Pol-Fachin, meu grande amigo e colega da graduação até hoje. Seu exemplo de empenho profissional sempre foi um dos grandes motivadores para seguir em frente.

À Cláudia Lemelle Fernandes, pela grande amizade, competência e pelos momentos de descontração que com certeza fazem a realização dos trabalhos serem muito mais prazerosos.

Aos demais alunos do Grupo de Bioinformática Estrutural, pela convivência sempre muito harmoniosa unidos em torno do mesmo objetivo na produção de ciência de valor.

Aos amigos e pessoas queridas, mesmo aquelas que estão distantes.

Ao Luciano e Sílvia que, pela competência e agilidade, tornaram estes anos muito mais agradáveis e simples.

Desde já a todos os membros da banca, por terem aceitado o convite.

Ao total apoio sempre oferecido pelo meu pai e minha mãe, que mesmo distantes, apostaram em meus sonhos e na minha capacidade de superar os obstáculos para sempre ir além.

Ao meu irmão Josias pela companhia, com o qual partilho meus objetivos e ambições, sempre estando ao meu lado nos momentos de incerteza e insegurança.

Obrigado por tudo!

Dedico esta dissertação ao esforço de muito poucos, que encontram no caminho científico a força motriz necessária para desempenhar o verdadeiro papel de construtores e modificadores de nossa sociedade, fazendo cumprir com o real objetivo da Universidade brasileira.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
ÍNDICE DE TABELAS	xvii
1 Introdução.....	1
1.1 A hemostasia e a cascata de coagulação	1
1.1.1 Fase de iniciação.....	2
1.1.2 Fase de amplificação.....	3
1.1.3 Fase de propagação.....	3
1.2 Estrutura das serino proteases.....	4
1.3 Inibidores de trombina e seu uso na terapêutica	8
1.3.1 Suramina	12
1.4 D-Phe-Pro-Arg clorometilcetona (PPACK)	13
1.5 A dinâmica molecular (DM) como ferramenta para o estudo de biomoléculas.....	15
2 Objetivos.....	19
3 Metodologia	20
3.1 Programas utilizados	20
3.2 Cálculos utilizando métodos ab initio.....	20
3.3 Simulações de DM.....	21
3.3.1 Protocolo de simulação	21
3.3.2 Construção de topologias	22
3.3.3 Validação das simulações de DM.....	24
4 Resultados.....	25

4.1	Preâmbulo	25
4.2	Trabalho I	27
4.3	Trabalho II	37
4.4	Trabalho III	50
5	Discussão Geral	68
5.1	Validação de simulações de DM	68
5.2	Estudo por DM do complexo trombina/suramina	69
5.3	Estudo por DM do complexo trombina/PPACK	71
5.4	Implicações para o desenvolvimento racional de novos agentes anticoagulantes, baseados na inibição direta de trombina	72
6	Conclusões.....	75
7	Perspectivas.....	76
8	Glossário	77
9	Referências Bibliográficas	80
10	Anexos	88
10.1	Anexo I	89
10.2	Anexo II	89
10.3	Anexo III	90
10.4	Arquivos .mdp.....	91
10.5	Topologias utilizadas no sistema trombina/PPACK.....	99
11	Curriculum Vitae	103

LISTA DE ABREVIATURAS

DM – dinâmica molecular

fs: femtosegundo (10^{-15} segundos)

FT – fator tecidual

GAGs – glicosaminoglicanos

GLA: ácido γ -carboxiglutâmico

MD – molecular dynamics

MM – mecânica molecular

nm: nanômetro (10^{-9} metros)

ns: nanosegundo (10^{-9} segundos)

PDB – Protein Data Bank

PME – Particle-Mesh Ewald

PPACK: D-Phe-Pro-Arg clorometilcetona

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMSD: root mean square deviation

RMSF: root mean square fluctuation

TP: tempo de protrombina

TTPa: tempo de tromboplastina parcial ativada

RESUMO

A trombina é uma serino protease da família das quimotripsinas envolvida na digestão e processos degradativos que possui um importante papel na ativação dos fatores da coagulação e nas vias fibrinolíticas apresentando-se, portanto, como um potencial alvo para o desenvolvimento de novos agentes anticoagulantes. Uma estratégia moderna empregada na busca por tais compostos envolve a elucidação dos aspectos estruturais e dinâmicos associados ao reconhecimento molecular entre enzima e seus moduladores sejam por estratégias ditas experimentais quanto computacionais. Sendo assim, este trabalho apresenta a caracterização de sistemas envolvendo inibidores de trombina, tanto covalentes (PPACK) quanto alostéricos (suramina), através de simulações de dinâmica molecular como meio de estudar a dinâmica e, assim, entender o processo de inativação da trombina para o desenvolvimento de novos agentes antitrombóticos.

Os resultados obtidos possibilitaram a caracterização da dinâmica de interação dos referidos inibidores com a trombina, permitindo-nos identificar: 1) o papel do solvente no reconhecimento enzima-inibidores; 2) a modulação conformacional da enzima-alvo na presença de seus moduladores; e 3) o efeito de forças associadas ao empacotamento cristalino sobre a formação de complexos enzima-inibidor. A partir da validação dos protocolos e resultados obtidos, da interação direta com outras metodologias experimentais e da extrapolação de observações funcionais, espera-se, portanto, que os resultados obtidos venham a contribuir no desenvolvimento de uma linha de pesquisas visando o planejamento, a síntese e a obtenção de novos candidatos a protótipos de agentes antitrombóticos.

ABSTRACT

Thrombin is a serine protease of the chymotrypsin family, involved in digestion and degradative processes playing an important role in the both coagulation factors activation and fibrinolytic pathways. These aspects turn this enzyme a potential target to development of new anticoagulants agents. A modern approach employed in the search of such compounds involves the elucidation of structural and dynamics aspects associated to molecular recognition between enzyme and modulators through experimental and computational strategies. In this sense, this work presents the characterization of systems concerning thrombin inhibitors, both covalent (PPACK) and allosteric (suramin), through molecular dynamics simulations in order to elucidate and understand the dynamics of thrombin inactivation aiming the development of new antithrombotic agents.

The results obtained enabled the characterization of interaction dynamics with these inhibitors to thrombin, allowing us to identify: 1) the role of solvent in enzyme-inhibitors recognition; 2) the conformational modulation of target-enzyme with modulators presence; and 3) the effect of forces associated to crystal packing in the generation of enzyme-inhibitor complexes. From the protocols validation and results obtained, associated to direct interaction with others experimental methodologies and extrapolation of functional observations, it is expected that the results obtained contribute in the promotion of a research line aiming the development, synthesis and the achievement of new candidates to prototypes of antithrombotic agents.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do Modelo da Cascata de Coagulação Baseado em Células constituído por iniciação, amplificação e propagação. FT, Fator Tecidual. A letra “a” indica formas ativas dos fatores. Adaptado de Vine, 2009.....	2
Figura 2: Estrutura tridimensional da trombina. A) “Frente” da enzima, mostrando no detalhe a sua tríade catalítica ao centro, e B) a cadeia leve presa à cadeia pesada por meio de uma ponte dissulfeto representada em bastões. Cadeia leve representada com α -hélices em azul claro e alças na cor magenta. Cadeia pesada com α -hélices na cor vermelha, fitas β em amarelo e alças em verde.	6
Figura 3: Localização dos exossítios e sítio de ligação ao íon Na^+ , envolvidos na interação com substratos e compostos capazes de modular alostéricamente a atividade da enzima. Cadeia leve representada com α -hélices em azul claro e alças na cor magenta. Cadeia pesada com α -hélices na cor vermelha, fitas β em amarelo e alças em verde.	7
Figura 4: Esquema de interação entre trombina e hirudina, envolvendo a interação dos resíduos iniciais na porção N-terminal da hirudina (azul) interagindo diretamente com a tríade catalítica, enquanto que sua porção C-terminal se encaixa nas alças pertencentes ao exosíto I. PDB 2PW8 (Liu <i>et. al.</i> , 2007). Cadeia leve representada com α -hélices em azul claro e alças na cor magenta. Cadeia pesada com α -hélices na cor vermelha, fitas- β em amarelo e alças em verde.	11
Figura 5: Estrutura da suramina. Adaptado de Monteiro <i>et. al.</i> , 2004.	12
Figura 6: Detalhe da estrutura planar do composto PPACK.	13
Figura 7: Detalhe estrutural da interação trombina/PPACK. A) PPACK inserido na fenda catalítica. B) Detalhe da posição do PPACK em relação aos resíduos da tríade	

e as ligações covalentes entre o carbono carbonílico da arginina do PPACK com as cadeias laterais da serina e histidina catalíticas. Representação com α -hélices na cor vermelha, fitas- β em amarelo e alças em verde. 14

Figura 8: Representação do efeito de diferentes tempos de integração nas simulações de dinâmica molecular. A) pequena descrição das propriedades do sistema em função de tempo de integração muito reduzido; B) instabilidades na simulação como fruto de tempos de integração muito elevados que causam choques entre os átomos do sistema; C) descrição adequada e estável das propriedades moleculares de interesse a partir de valores corretos para o tempo de integração. Adaptado de Leach, 2001. 16

Figura 9: Funções de energia que compõe campos de força. De cima para baixo estão representadas as equações que descrevem o estiramento de ligações químicas, ângulos de ligação, diedros e interações intermoleculares (van der Waals e eletrostáticas/Coulômbicas). (Verli, Tese de doutorado, 2005) 17

Figura 10: Exemplificação do esquema das etapas que compõe as simulações de DM a 310 K. De 0 ps a 30 ps, uma série de etapas, de 5 ps cada, aquece lentamente o sistema em incrementos de 50 K. Após 30 ps, o sistema está a 310 K e se mantém nesta temperatura pelo resto da simulação. No sistema simulado a 343 K, houve a inclusão de uma etapa a mais de termalização até atingir a temperatura desejada (Verli, Tese de doutorado, 2005). 22

Figura 11: Esquema da topologia das ligações covalentes utilizada durante a simulação do sistema trombina/PPACK. Esse é o arranjo das ligações que ocorrem após a ação enzimática da trombina sobre o PPACK, onde o átomo de cloro desse composto é eliminado no meio de reação originando as ligações covalentes com as

cadeias laterais da His57 e Ser195 catalíticas e o carbono carbonílico da Arg3 do PPACK. 24

Figura 12: Representação da mudança conformacional da suramina sobre a superfície do exsítio II da trombina vista em ambiente fisiológico durante a DM. Conforme ocorre a reorientação de sua estrutura, a suramina migra de sua conformação cristalográfica (marrom) para a conformação vista no final do tempo de simulação (azul). 70

Figura 13: Esquema representando um processo de desenvolvimento de novos compostos bioativos, envolvendo a participação de métodos de modelagem molecular, em especial a DM. 74

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Características de um anticoagulante ideal. Adaptado de Bates <i>et. al.</i> 2006.	10
Tabela 2: Raio de giro e superfície acessível ao solvente (SAS) para ambos os estados da trombina	72

1 Introdução

1.1 A hemostasia e a cascata de coagulação

A hemostasia é um processo fisiológico responsável pelo controle da permeabilidade vascular ao sangue. A partir do surgimento de danos no endotélio, tal controle envolve, principalmente, a formação de uma massa rica em plaquetas presas numa rede de fibrina na região danificada do vaso, juntamente a uma redução no calibre vascular, resultando assim na contenção do extravasamento de sangue nessa região (Vine, 2009). Em indivíduos saudáveis, a hemostasia é cuidadosamente controlada por vários mecanismos anticoagulantes que regulam as forças pró-coagulantes e, assim, previnem a formação de trombos dentro dos vasos sanguíneos (Segers *et. al.*, 2007). Este equilíbrio dinâmico entre fatores pró e anticoagulantes pode ser rapidamente alterado em favor da coagulação no caso de haver uma necessidade fisiológica para a interrupção do fluxo sanguíneo (Vine, 2009).

O modelo clássico da cascata de coagulação foi primeiramente introduzido em 1964 por dois grupos independentes (Davie *et. al.*, 1964; Macfarlane, 1964). Neste modelo, a ativação de cada fator leva à ativação de outro, culminando com a produção de trombina. A elaboração desse modelo representou um grande avanço no que diz respeito ao entendimento de como ocorre o processo de coagulação, mas possuía várias falhas na aplicação clínica para predição de algumas observações, porque não conseguia explicar como a deficiência de fatores na via intrínseca levam a um prolongado tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), e como a deficiência de fatores na via extrínseca levam a um estado patológico de tempo de protrombina (TP), ambos *in vivo* (Veldman *et. al.*, 2003). Como alternativa, foi proposto um novo modelo chamado de Modelo da Cascata de Coagulação Baseado em Células (Hoffman *et. al.*, 2001), onde o processo de coagulação é composto por três fases distintas que se sobrepõem: iniciação, amplificação e propagação (Fig. 1).

Modelo da Cascata de Coagulação Baseado em Células

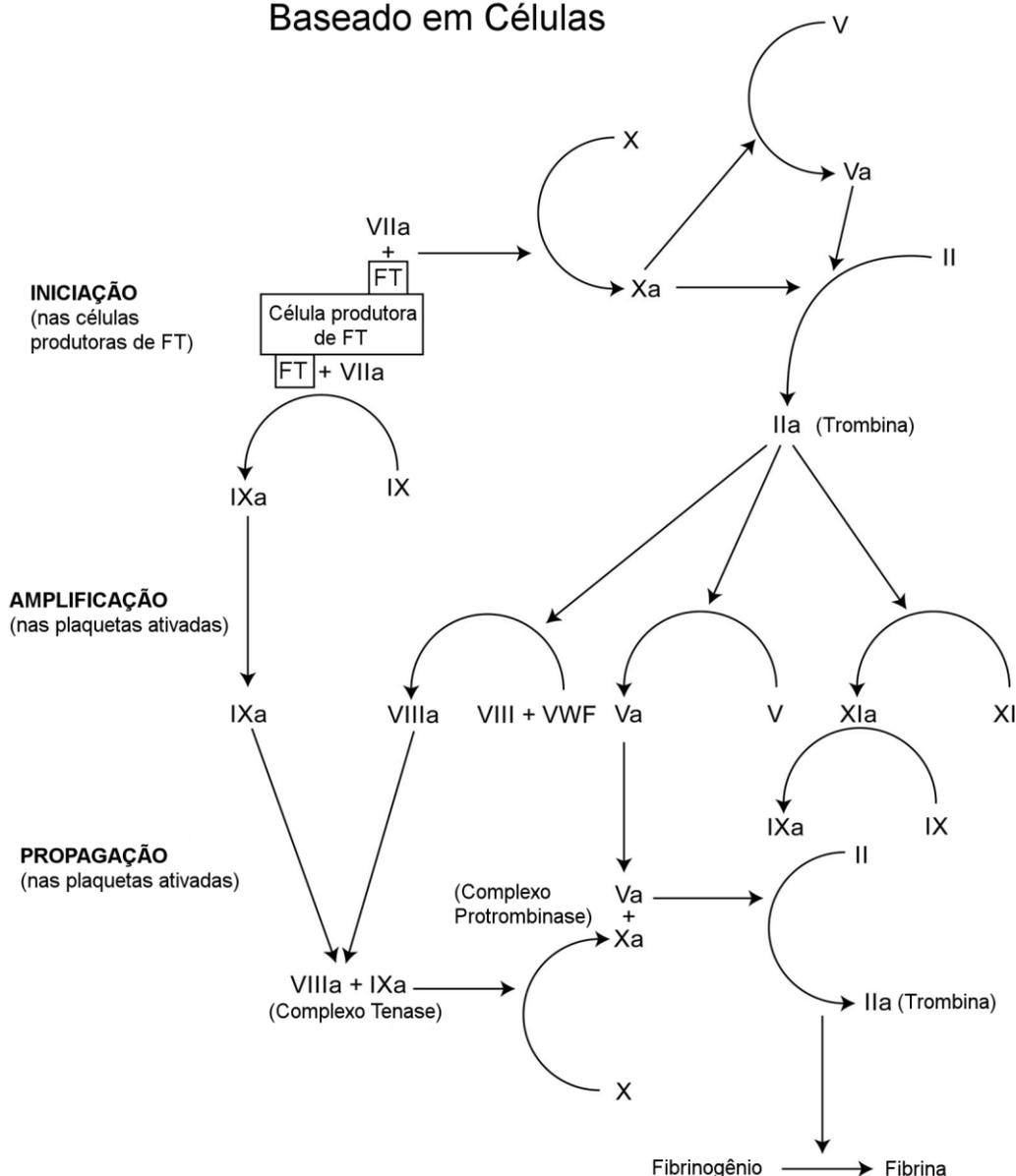


Figura 1: Representação esquemática do Modelo da Cascata de Coagulação Baseado em Células constituído por iniciação, amplificação e propagação. FT, Fator Tecidual. A letra “a” indica formas ativas dos fatores. Adaptado de Vine, 2009.

1.1.1 Fase de iniciação

O processo de coagulação sanguínea começa com a exposição do sangue a células que expressam o fator tecidual (FT), tais como fibroblastos, células do músculo liso e outros tipos celulares encontrados fora do ambiente vascular (Vine, 2009; Hoffman *et. al.*, 2001). Uma vez combinado ao FT, o fator VII é ativado e, ao formar o complexo FT/VIIa, promove a ativação dos fatores X e IX.

Por sua vez o fator Xa, juntamente com o fator V em superfícies celulares, converte uma pequena quantidade de protrombina (fator II) em trombina (fator IIa), a qual possui um importante papel na próxima fase, a fase de amplificação (Vine, 2009).

1.1.2 Fase de amplificação

Na fase de amplificação, há uma subsequente produção em larga escala de trombina. A principal função dessa etapa é a ativação das plaquetas, expondo receptores e sítios de ligação para fatores de coagulação ativados. A adesão das plaquetas no colágeno subendotelial é mediado por receptores específicos (complexo formado pelas glicoproteínas Ia/IIa) e pelo fator von Willebrand, responsáveis pela formação de interações entre as plaquetas e as fibras de colágeno responsáveis por sua ativação (Vine, 2009; Hoffman *et. al.*, 2001).

A pequena quantidade de trombina gerada durante a fase de iniciação amplifica o processo de ativação plaquetária, aumentando o grau de adesão e a ativação dos fatores V, VIII e XI. Nesse estágio, as plaquetas produzem formas parcialmente ativadas de fator V em suas superfícies, o qual é ativado completamente pela trombina e fator Xa (Veldman *et. al.*, 2003). Por fim, o fator de von Willebrand que está ligado ao fator VIII, é clivado pela trombina para que ocorra a liberação do fator VIIIa, terminando a fase de amplificação com as plaquetas tendo em suas superfícies os fatores Va, VIIIa e XIa (Sakariassen *et. al.*, 1979).

1.1.3 Fase de propagação

A fase de propagação é caracterizada pela formação dos complexos tenase e protrombinase, os quais são montados na superfície das plaquetas ativadas (Vine, 2009; Hoffman *et. al.*, 2001). A formação do complexo tenase ocorre quando o fator IXa é deslocado das células que produzem o FT para se ligar ao fator VIIIa presente nas superfícies das plaquetas ativadas. O complexo formado pelos fatores VIIIa e IXa ativa o fator X quando ele está complexado ao fator Va, formando o complexo protrombinase. Este último complexo promove um incremento significativo na produção de trombina que irá converter o fibrinogênio

solúvel no sangue em fibrina, ativando também um fator responsável pela estabilização dessa rede (fator XIII), culminando assim na formação de um tampão hemostático de fibrina e plaquetas impedindo a hemorragia (Vine, 2009; Hoffman *et. al.*, 2001).

Durante o desencadeamento da cascata de coagulação, a concentração de trombina presente no plasma sofre um grande aumento, indo de aproximadamente 1 nM (fase de iniciação) até mais de 500 nM (fase de propagação) (Wolberg *et. al.*, 2008). Além disso, ela é capaz de interagir com vários fatores da cascata (Fig. 1), dando origem a uma série de vias de retroalimentação positiva em todo o sistema com o objetivo de reforçar o coágulo (Jenny *et. al.*, 1998).

A trombina faz parte da família das serino proteases, uma família de enzimas que apresenta um resíduo de serina em seu sítio ativo. Este resíduo é responsável por realizar um ataque nucleofílico na carbonila da ligação peptídica do substrato, formando um intermediário ligado covalentemente à enzima de forma temporária até que ocorra a clivagem (Page *et. al.*, 2008; Hedstrom, 2002). Uma vez que essa proteína é um ponto chave no desencadeamento dos vários eventos componentes da cascata de coagulação, ela é um dos alvos a ser abordado na presente dissertação e, portanto, será descrita em maiores detalhes a seguir.

1.2 Estrutura das serino proteases

As serino proteases constituem-se numa super família de enzimas proteolíticas encontradas em vários tecidos e fluidos biológicos (Netzel-Arnett *et. al.*, 2003; Page *et. al.*, 2008). Elas estão envolvidas na regulação de várias funções normais das células, seja atuando na catálise não específica na degradação de proteínas ou agindo sobre substratos específicos em eventos biológicos desempenhando papéis na digestão de proteínas, proteólise, reprodução, ativação do sistema complemento, fribrinólise e nos mecanismos de ativação da cascata de coagulação (Barrett, 1977; Neurath, 1976; Reich *et. al.*, 1975).

Estruturalmente, essa classe de enzimas é composta por dois grupos de seis fitas- β enoveladas de forma assimétrica (Blow, 1971) contendo uma fenda

que dá acesso ao sítio catalítico, um domínio zimogênio que quando clivado libera a enzima ativa e uma região que reconhece e liga o substrato (Kraut, 1977). Outra característica importante dessa classe é a presença conservada dos resíduos serina, histidina e aspartato que são responsáveis pela catálise, constituindo a tríade catalítica dessas enzimas (Stone *et. al.*, 1992; Hedstrom, 2002).

A enzima trombina (EC 3.4.21.5) (Fig. 2) é um exemplo típico da classe das serino proteases, possuindo o mesmo enovelamento, mas com sua tríade catalítica nas posições histidina 57 (His57), aspartato 102 (Asp102) e serina 195 (Ser195). Dois resíduos dessa tríade (His57 e Asp102) estão localizados na porção N-terminal desse conjunto de fitas- β , enquanto o resíduo Ser195 que realiza o ataque nucleofílico está localizado na porção C-terminal. Esses detalhes estruturais foram obtidos após a resolução do primeiro cristal dessa enzima em 1992 por Bode e colaboradores (Bode *et. al.*, 1992), onde a numeração da sequência de aminoácidos foi feita segundo numeração empregada previamente para o quimotripsinogênio, introduzida também pelo mesmo grupo de pesquisa em 1989 (Bode *et. al.*, 1989b).

A trombina é composta estruturalmente de duas cadeias polipeptídicas: cadeia leve com 36 aminoácidos (Cadeia A) e cadeia pesada com 259 aminoácidos (Cadeia B) detentora da arquitetura típica das serino proteases, possuindo as regiões onde se ligam os substratos e onde também se encontra o sítio ativo dessa enzima. A cadeia leve tem pouca atenção nos estudos sobre a ação enzimática da trombina e é considerado um apêndice residual do processo de ativação da protrombina (zimogênio) sendo sugerido, inclusive, que o processo enzimático não é dependente de sua presença (Hageman *et. al.*, 1975; DiBella *et. al.*, 1995). Essas duas cadeias são unidas entre si por meio de uma ponte dissulfeto entre os resíduos cisteína 1 (Cys1) da cadeia leve e cisteína 122 (Cys122) da cadeia pesada (Bode *et. al.*, 1992; Bode, 2006) (Fig. 2).

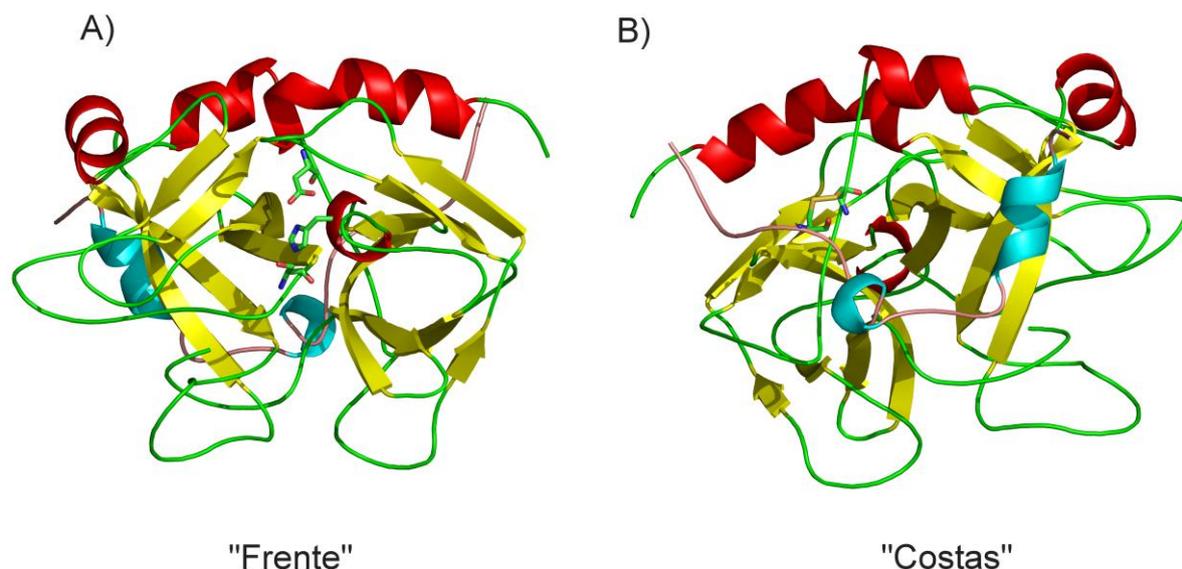


Figura 2: Estrutura tridimensional da trombina. A) "Frente" da enzima, mostrando no detalhe a sua tríade catalítica ao centro, e B) a cadeia leve presa à cadeia pesada por meio de uma ponte dissulfeto representada em bastões. Cadeia leve representada com α -hélices em azul claro e alças na cor magenta. Cadeia pesada com α -hélices na cor vermelha, fitas β em amarelo e alças em verde.

Além da tríade catalítica, a trombina possui dois exossítios que possuem importante papel no desempenho de suas funções biológicas (Fig. 3):

➤ EXOSSÍTIO I: a alça centralizada no resíduo Lys70, contendo a sequência Arg67 até Glu80 da cadeia pesada possui vários resíduos positivamente carregados (Di Cera, 2008). Além disso, essa alça é cercada pelos resíduos positivos Arg35, Lys149E, Lys81, Lys110, Lys109 e Lys36 criando um ambiente propício para a correta pré-orientação da enzima permitindo que ela atue sobre os seus substratos (Bode *et. al.*, 1992): fibrinogênio (Tsiang *et. al.*, 1995), fibrina (Ayala *et. al.*, 2001), trombomodulina (Xu *et. al.*, 2005) além de permitir a complexação com o inibidor natural da trombina, a hirudina (Rydell *et. al.*, 1991).

➤ EXOSSÍTIO II: esse exossítio está localizado do outro lado da enzima, oposto à localização do exossítio I, também na cadeia pesada, com uma α -hélice na porção C-terminal com suas vizinhanças abrigando uma série de resíduos carregados positivamente nas posições Arg126, Lys236, Lys240, e Arg93, cercados pelos resíduos positivos nas posições Arg101, Arg233, Arg165, Lys169, Lys235, Arg175, Arg173, Arg97 (Bode *et. al.*, 1992). Porém, esses resíduos estão dispostos de tal maneira que interagem com ligantes polianiónicos como heparina

e glicosaminoglicanos (GAGs) (Carter *et. al.*, 2001; Sheehan *et. al.*, 1994). Neste caso, a heparina aumenta a inibição da trombina por sua inibidora fisiológica antitrombina, onde um complexo de alta afinidade entre essas duas proteínas é mediado por esse composto (Li *et. al.*, 2004).

Outra importante característica estrutural dessa enzima é a presença de um sítio ligador de íons monovalentes Na^+ ancorado pelos resíduos Asp121, Tyr184A, Asp189, Asp221, Arg221A, Gly223 e Lys224 (Di Cera, 2008) (Fig. 3), sendo esse íon essencial para a atividade ótima da enzima na clivagem do fibrinogênio (Dang *et. al.*, 1995) e ativação dos fatores V (Myles *et. al.*, 2001b), VIII (Nogami *et. al.*, 2005) e XI (Yun *et. al.*, 2003), necessários para o incremento final da produção de trombina na fase de propagação (Mann *et. al.*, 2003).

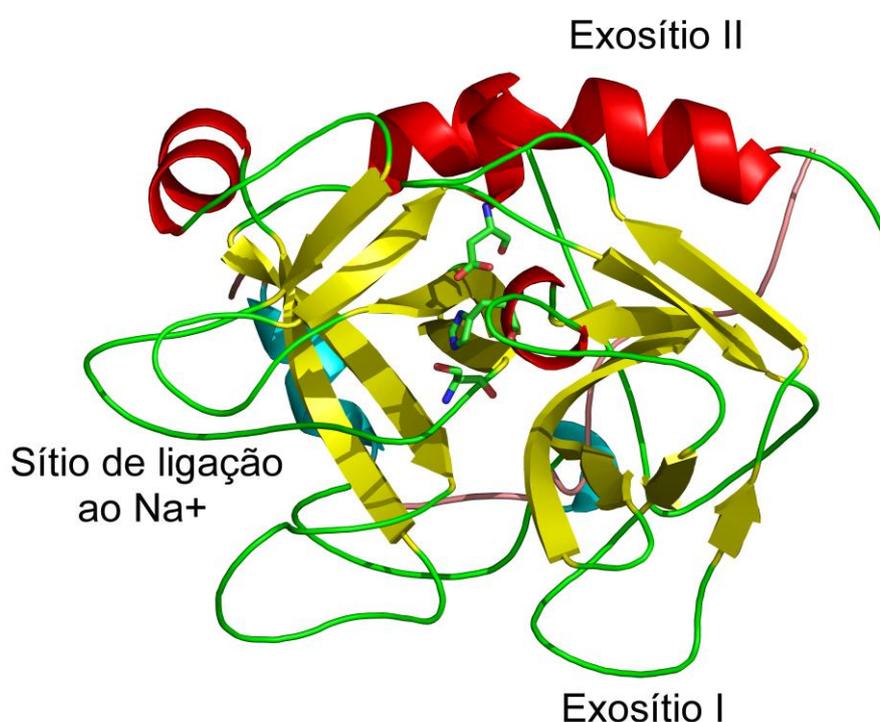


Figura 3: Localização dos exosítios e sítio de ligação ao íon Na^+ , envolvidos na interação com substratos e compostos capazes de modular alostéricamente a atividade da enzima. Cadeia leve representada com α -hélices em azul claro e alças na cor magenta. Cadeia pesada com α -hélices na cor vermelha, fitas β em amarelo e alças em verde.

A estrutura cristalográfica dessa enzima revelou importantes informações sobre seu enovelamento, especialmente sobre o arranjo das alças envolvidas no reconhecimento macromolecular dos seus substratos (Bode *et. al.*, 1992), e como

a trombina utiliza seu sítio ativo e os exossítios para interação com os seus substratos, inibidores e efetores (Di Cera, 2008). Dessa maneira é atribuído a ela o papel de enzima mestre em todo o processo de coagulação sendo a efetora da formação, propagação e estabilização do coágulo de fibrina nos eventos trombóticos (Nutescu *et. al.*, 2008).

1.3 Inibidores de trombina e seu uso na terapêutica

A terapia anticoagulante entrou em cena com o uso clínico da heparina, um glicosaminoglicano sulfatado originalmente obtido a partir de fígado de cães em 1923 (Howell, 1923), sendo empregado no tratamento do tromboembolismo em 1939 (Murray, 1939). Com o aumento da ocorrência clínica das doenças trombóticas, houve um incremento significativo na necessidade pelo desenvolvimento de novos agentes com o potencial de interferir efetivamente na trombogênese. Virtualmente, qualquer reação da cascata de coagulação é um alvo em potencial para o desenvolvimento de novos agentes (Frenkel *et. al.*, 2005).

Devido ao fato da trombina apresentar um papel chave em todo o processo de coagulação, essa enzima apresenta-se como um potencial alvo para o desenvolvimento de novos compostos antitrombóticos. Inibidores de trombina podem prevenir a formação do coágulo de fibrina, bloquear a ativação dos fatores V, VIII e XI impedindo a retroalimentação positiva da cascata, além de atenuar a agregação plaquetária mediada por essa enzima (Bates *et. al.*, 2006). Tal inibição pode ocorrer diretamente através da ocupação de seu sítio catalítico e/ou através da modulação alostérica de seus exossítios I e II, indiretamente pela ação da antitrombina ou cofator II da heparina, ou ainda pela alteração da biogênese da própria enzima. Inibidores indiretos de trombina, como a heparina, dermatan sulfato e outros GAGs, atuam catalizando a reação natural entre os inibidores fisiológicos desta enzima, ou seja, antitrombina e/ou cofator II da heparina, por meio da interação com o exossítio II (Hirsh, 1991b; Tollefsen, 1995; Weitz, 1997). Inibidores diretos, como a hirudina que atua sobre o exossítio I, impedem que a enzima se acople com seus substratos de maneira a impedir que o sítio ativo tenha acesso aos precursores (Skrzypczak-Jankun *et. al.*, 1991; Priestle *et. al.*, 1993).

Um desafio importante com relação a estes inibidores diz respeito a seu acesso aos sítios modulatórios da atividade catalítica da trombina. Durante a formação do coágulo, a trombina apresenta-se ligada à fibrina, um estado que a mantém enzimaticamente ativa e protegida da inativação por inibidores presentes na circulação, destacadamente os de elevada massa molecular, tais como a heparina. Sendo assim, o trombo atua como um reservatório de trombina ativa que estimula o crescimento do coágulo por meio da ativação local de plaquetas (Kumar *et. al.*, 1994; Kumar *et. al.*, 1995; Weitz *et. al.*, 2002), convertendo o fibrinogênio próximo em fibrina (Broze, 1995) além de dar continuidade a ativação dos fatores V e XI (Kumar *et. al.*, 1994; Weitz *et. al.*, 2002).

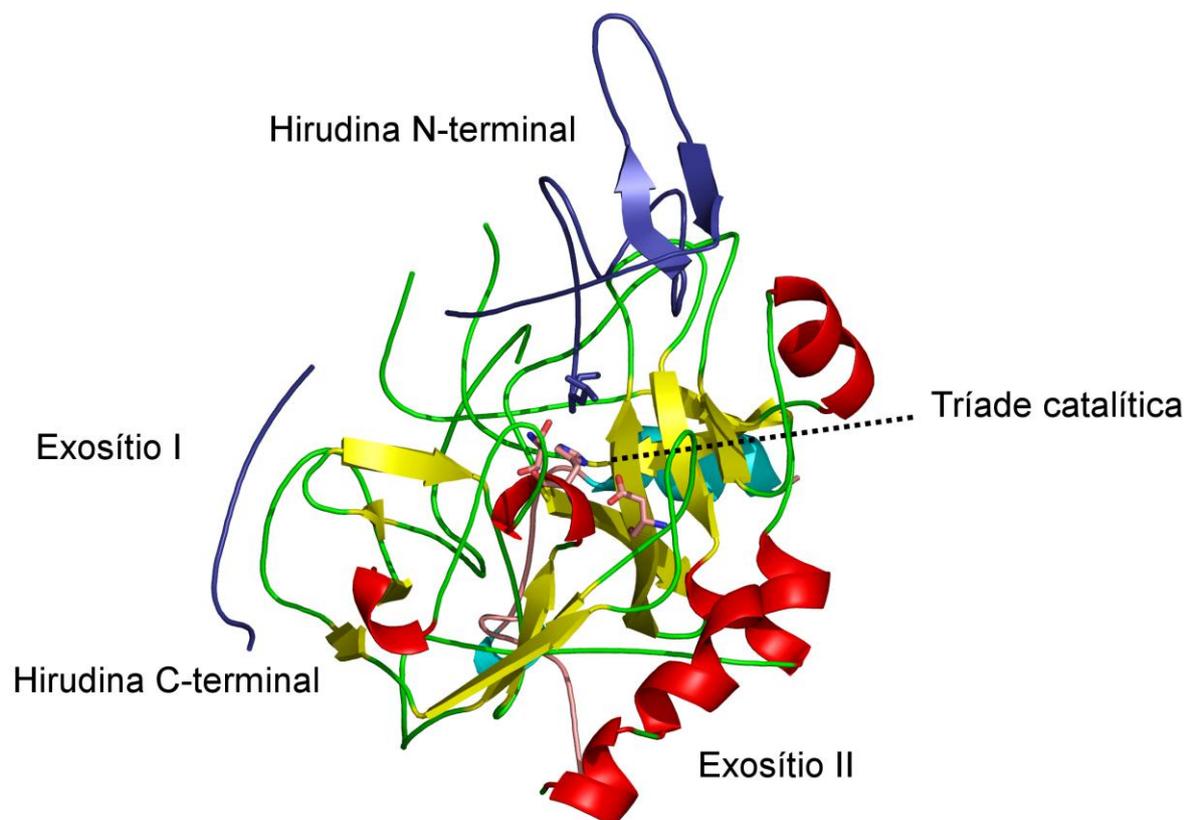
Os anticoagulantes tradicionais utilizados na clínica são classificados como inibidores indiretos de trombina, dentre os quais se destacam a heparina, cujo mecanismo de ação foi explicado acima, e os antagonistas de vitamina K, que impedem a formação do domínio contendo resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico (GLA) nos zimogênios dos fatores IX, X, VII e protrombina comprometendo, assim, a ativação desses fatores (Esmon *et. al.*, 1975). Inibidores indiretos tem sido os mais frequentemente usados na prática clínica nas últimas cinco décadas. Embora eles sejam efetivos quando utilizados adequadamente, também possuem várias limitações, como respostas anticoagulantes imprevisíveis que exigem uma rotina constante de ajuste de dosagem e monitoramento de sua ação farmacológica. Além disso, seus efeitos biológicos envolvem a ligação inespecífica a várias outras proteínas e outros tipos celulares, podendo ser modulados por variações genéticas individuais (Bates *et. al.*, 2000). Sendo assim, a busca por novos e mais efetivos agentes antitrombóticos levou a formulação de um conjunto de características consideradas como ideais (Tab. 1).

Tabela 1: Características de um anticoagulante ideal. Adaptado de Bates *et. al.* 2006.

Característica	Consequência
Rápido início de ação quando administrado via oral.	Sem necessidade de administração conjunta de anticoagulantes parenterais.
Farmacocinética previsível.	Regime simplificado de dosagem.
Resposta anticoagulante previsível.	Sem necessidade de administração continuada nem algum tipo de associação farmacológica.
Rápido término de ação na necessidade de intervenção	Manejo simplificado no caso de ocorrência de algum evento hemorrágico ou administração de um antídoto ao fármaco.
Disponibilidade de um antídoto seguro.	Fornecer um mecanismo de reversibilidade rápido na ocorrência de um evento hemorrágico.
Sem efeitos colaterais, como hepatotoxicidade.	Sem necessidade de monitoramento.
Custo razoável.	Facilidade de compra e acesso.

Uma tendência no desenvolvimento de novos agentes antitrombóticos envolve a busca por inibidores diretos de trombina, ou seja, de compostos que não necessitem da ação de cofatores como antitrombina e cofator II da heparina, bem como a busca por outras classes de antitrombóticos com mecanismos de ação mais seletivos sobre proteínas alvo específicas. Soma-se também a busca por otimização da efetividade de ação de fármacos conhecidos que possam oferecer benefícios além daqueles que os tratamentos tradicionais utilizando inibidores indiretos de trombina oferecem (Nutescu, *et. al.*, 2008). O protótipo para essa nova classe de inibidores, baseados nos mecanismos de inibição direta, é a hirudina (Fig. 4). Esse composto é um polipeptídeo de 65 resíduos cuja porção N-terminal interage com o sítio catalítico enquanto sua porção C-terminal interage com o exossítio I da trombina.

Complexação trombina/hirudina



Sequência hirudina

LTYTDCTESGQNLCLCEGSNVCGQGKNCILGSDGEKNQCVTGEGTPKPKQSHNDGDFEEIPEEYLQ

Figura 4: Esquema de interação entre trombina e hirudina, envolvendo a interação dos resíduos iniciais na porção N-terminal da hirudina (azul) interagindo diretamente com a tríade catalítica, enquanto que sua porção C-terminal se encaixa nas alças pertencentes ao exosítio I. PDB 2PW8 (Liu *et. al.*, 2007). Cadeia leve representada com α -hélices em azul claro e alças na cor magenta. Cadeia pesada com α -hélices na cor vermelha, fitas- β em amarelo e alças em verde.

Dessa maneira, a hirudina mimetiza importantes substratos fisiológicos e suas interações, uma vez que se liga ao exosítio I da mesma maneira que o fibrinogênio, além de ligar-se ao sítio ativo impedindo a ação catalítica da trombina anulando as ações procoagulantes e protrombóticas da enzima ativa, além de possuir alta especificidade nesse processo (Merry, 2007; Mengwasser, *et. al.*, 2005).

1.3.1 Suramina

A suramina é um composto da classe das naftilaminas, polisulfatado e simétrico. Foi originalmente empregada no tratamento da tripanossomíase africana (*Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense*), em 1922 (Wang, 1995), é solúvel em água e apresenta seis cargas negativas em pH fisiológico (Docampo *et. al.*, 2003; Bouteille *et. al.*, 2003).

Os efeitos biológicos da suramina estão associados com sua interação a uma ampla gama de proteínas, incluindo enzimas da via glicolítica em tripanosoma (Voogd *et. al.*, 1993) e DNA polimerases humanas (Ono *et. al.*, 1988). Recentemente, esse composto demonstrou uma promissora ação no tratamento de alguns tipos de câncer (Allolio *et. al.*, 1989; La Rocca *et. al.*, 1991; Newton, 2000; Small, 1997), embora seu mecanismo de ação antitumoral ainda não esteja bem compreendido. Um importante efeito colateral observado em pacientes sob tratamento com suramina é um estado de “anticoagulação” atribuído, em parte, a sua ação inibitória direta sobre várias enzimas da cascata de coagulação (Horne *et. al.*, 1988).

De fato, já foi demonstrado que a suramina (Fig. 5) é capaz de inibir várias proteínas da cascata de coagulação sanguínea incluindo os fatores V, VIII, IX, X, XI e XII (Horne *et. al.*, 1992). Adicionalmente, a suramina é capaz de interagir com trombina inativando-a na ausência de outros cofatores sem interferir com o sítio ativo, ao mesmo tempo em que permite a interação com substratos sintéticos e com o fibrinogênio. Isso sugere que a suramina interage com um ou ambos os exossítios, embora se desconheça de que maneira ocorre essa interação e como isso leva à diminuição da atividade da trombina (Monteiro *et. al.*, 2004).

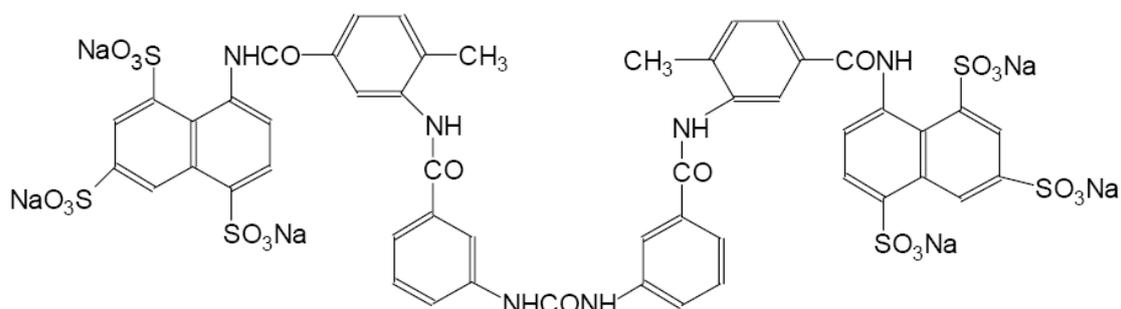


Figura 5: Estrutura da suramina. Adaptado de Monteiro *et. al.*, 2004.

1.4 D-Phe-Pro-Arg clorometilcetona (PPACK)

O composto D-Phe-Pro-Arg clorometilcetona (Fig. 6), mais comumente chamado de PPACK, foi originalmente identificado como um potente inibidor de trombina (Kettner *et. al.*, 1979), sendo usado a partir de então em ensaios de inibição da coagulação *in vitro* e no manejo de amostras de sangue (Mohler *et. al.*, 1986).

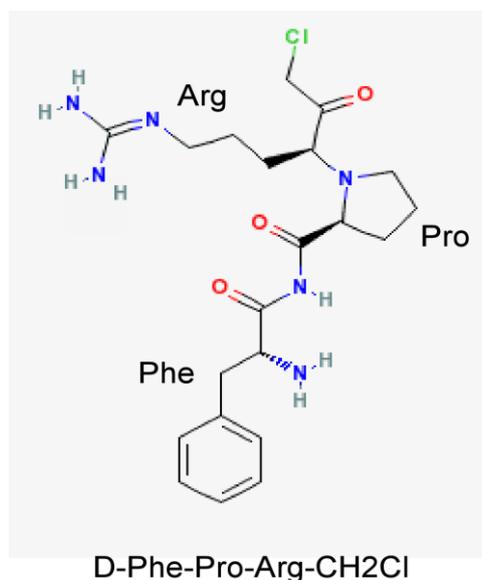


Figura 6: Detalhe da estrutura planar do composto PPACK.

Com a resolução do primeiro cristal de trombina, os detalhes moleculares da interação desse composto com a enzima causando a sua inibição foram finalmente elucidados (Bode *et. al.*, 1992). Observou-se que a porção peptídica desse composto se acomoda próxima ao segmento Ser214-Glu217 da cadeia pesada da trombina, possibilitando ao grupo carbonila do resíduo de arginina sofrer um ataque nucleofílico da cadeia lateral do resíduo Ser195. Ao mesmo tempo, o mesmo grupo carbonila da arginina liga-se ao grupo imidazol da His57 por meio de um grupo metileno, sendo que o átomo de cloro do PPACK apresenta-se como grupo de saída na reação. Por fim, essas duas ligações covalentes formam uma estrutura hemicetal tetraédrica que acabam por inativar irreversivelmente a enzima (Fig. 7).

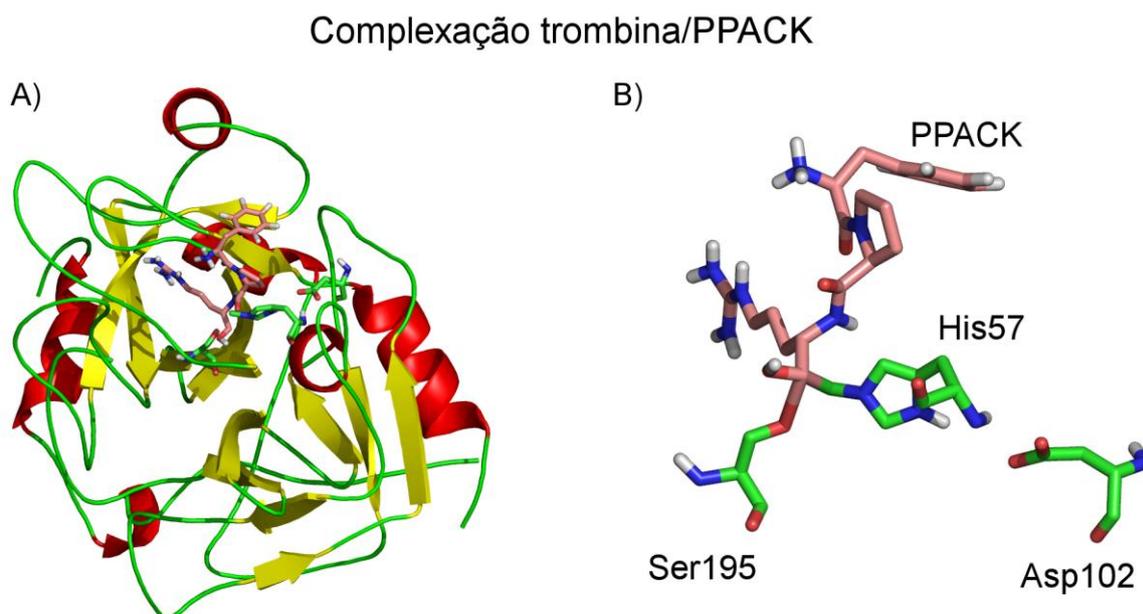


Figura 7: Detalhe estrutural da interação trombina/PPACK. A) PPACK inserido na fenda catalítica. B) Detalhe da posição do PPACK em relação aos resíduos da tríade e as ligações covalentes entre o carbono carbonílico da arginina do PPACK com as cadeias laterais da serina e histidina catalíticas. Representação com α -hélices na cor vermelha, fitas- β em amarelo e alças em verde.

Por ser um composto pequeno e de fácil obtenção, ele é muito frequentemente usado em estudos que envolvem a comparação com grupos controle para a inativação total de trombina em ensaios experimentais (Mohler *et al.*, 1986). Além disso, por causar a inativação irreversível da enzima por meio de ligações covalentes com dois dos três resíduos da tríade catalítica, considera-se que sua complexação com a trombina induz poucas alterações conformacionais, de maneira que seu uso é muito comum em estudos estruturais a respeito dessa enzima em seu estado praticamente nativo. Apesar de não possuir aplicabilidade clínica devido à baixa disponibilidade biológica, o PPACK apresenta uma grande reatividade e especificidade pela trombina, atribuído ao fato de seus três resíduos se encaixarem no sítio catalítico de maneira conformacional e energeticamente favorável. Sendo assim, apresenta-se como um excelente modelo para o desenvolvimento de agentes capazes de inibir a trombina de forma direta e irreversível (Kettner *et al.*, 1979; Bode *et al.*, 1992).

1.5 A dinâmica molecular (DM) como ferramenta para o estudo de biomoléculas

Embora o avanço continuado de técnicas experimentais como difração de raios X tenha permitido o acesso detalhado a estruturas biológicas em nível atômico e, no caso da ressonância magnética nuclear (RMN) sendo capaz de detalhar inclusive a flexibilidade dessas estruturas (Sali, 1998; Wuthrich, 2000), os aspectos relacionados à dinâmica destes sistemas moleculares constitui-se em um importante e ainda presente desafio, uma vez que tais metodologias não descrevem os movimentos moleculares ao longo do tempo em solução.

Uma estratégia complementar a estes métodos experimentais clássicos, empregada com o objetivo de acessar o comportamento dinâmico de moléculas, constitui-se nas simulações por dinâmica molecular (DM) (van Gunsteren *et. al.*, 1992). Fundamentada nos princípios da mecânica clássica, a DM caracteriza-se pela integração da equação do movimento de Newton (1), sendo $d^2r_i(t)/dt^2$ a aceleração, m_i a massa e F_i a força sobre o átomo i (Leach, 2001). Esta integração será realizada sobre todos os átomos do sistema, de forma que a força F_i acarretará numa aceleração sobre o átomo i e, em consequência, na mudança de sua posição num intervalo de tempo Δt relativo à aceleração.

$$\frac{d^2r_i(t)}{dt^2} = m_i^{-1} \cdot F_i \quad (1)$$

Desta forma, se uma sucessão de intervalos Δt for avaliada em sucessão, ter-se-á como resultado de um cálculo de dinâmica molecular uma sucessão de coordenadas tridimensionais para um dado conjunto de átomos, as quais podem representar tanto a difusão de gases quanto as mudanças na conformação de biomoléculas em solução aquosa. Estes intervalos de tempo Δt são denominados de *tempo de integração*, e geralmente correspondem a pequenos passos que podem variar de 1 a 10 femtosegundos (fs) (Leach, 2001). O papel do tempo de integração pode ser ilustrado na Figura 8, onde três simulações de um mesmo sistema são representadas, modificando-se somente o tempo de integração (Δt). Valores de Δt muito pequenos (Fig. 8A) produzem uma reduzida descrição conformacional do sistema, enquanto que valores muito grandes para Δt produzem instabilidades na

simulação (Fig. 8B). Valores intermediários, geralmente de 1 a 2 fs, permitem uma descrição eficiente do sistema em estudo (Fig. 8C).

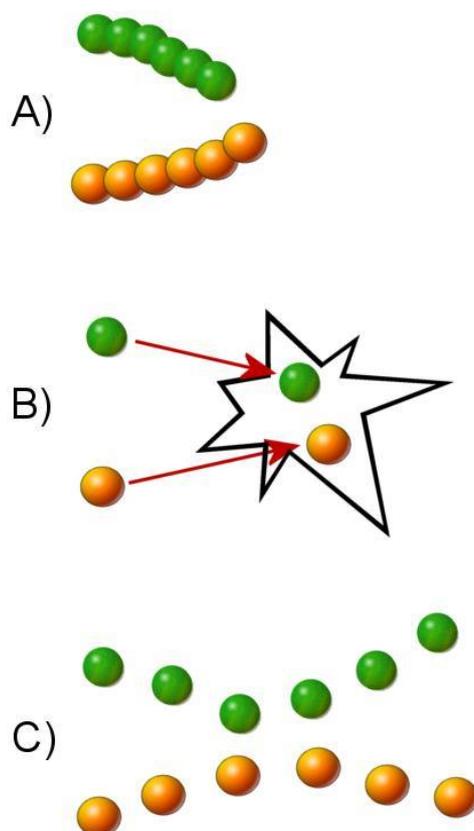


Figura 8: Representação do efeito de diferentes tempos de integração nas simulações de dinâmica molecular. A) pequena descrição das propriedades do sistema em função de tempo de integração muito reduzido; B) instabilidades na simulação como fruto de tempos de integração muito elevados que causam choques entre os átomos do sistema; C) descrição adequada e estável das propriedades moleculares de interesse a partir de valores corretos para o tempo de integração. Adaptado de Leach, 2001.

A partir da equação 1, contudo, não é possível a determinação da intensidade e direção da força F_i sobre os átomos do sistema e da sua dependência nas características químicas de cada molécula em estudo. Desta forma, a solução da equação 2 faz parte do cálculo de dinâmica molecular, representando a força F_i como uma função da energia potencial do sistema V e das coordenadas atômicas r_i (Leach, 2001). Esta superfície de energia potencial representa a energia de cada molécula, sendo descrita pelo denominado *Campo de Força*.

$$F_i = \frac{-\partial V(r_i, \dots, r_n)}{\partial r_i} \quad (2)$$

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 (exemplificadas na Fig. 9) 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 tencionada (aquela caracterizada pelos valores-padrão de comprimentos e de ângulos de ligação). Alguns campos de força podem conter termos de interação entre átomos não ligados, de efeitos eletrostáticos, de ligação de hidrogênio e de outros efeitos estruturais (van Gunsteren *et. al.*, 1990). Baseada nessas características, a DM permite o entendimento do comportamento dinâmico microscópico dos átomos que compõem um sistema, além de poder ser empregada como forma de representar e determinar propriedades de equilíbrio como: grandezas termodinâmicas (pressão, temperatura, volume, etc), estrutura e energia livre (Leach, 2001).

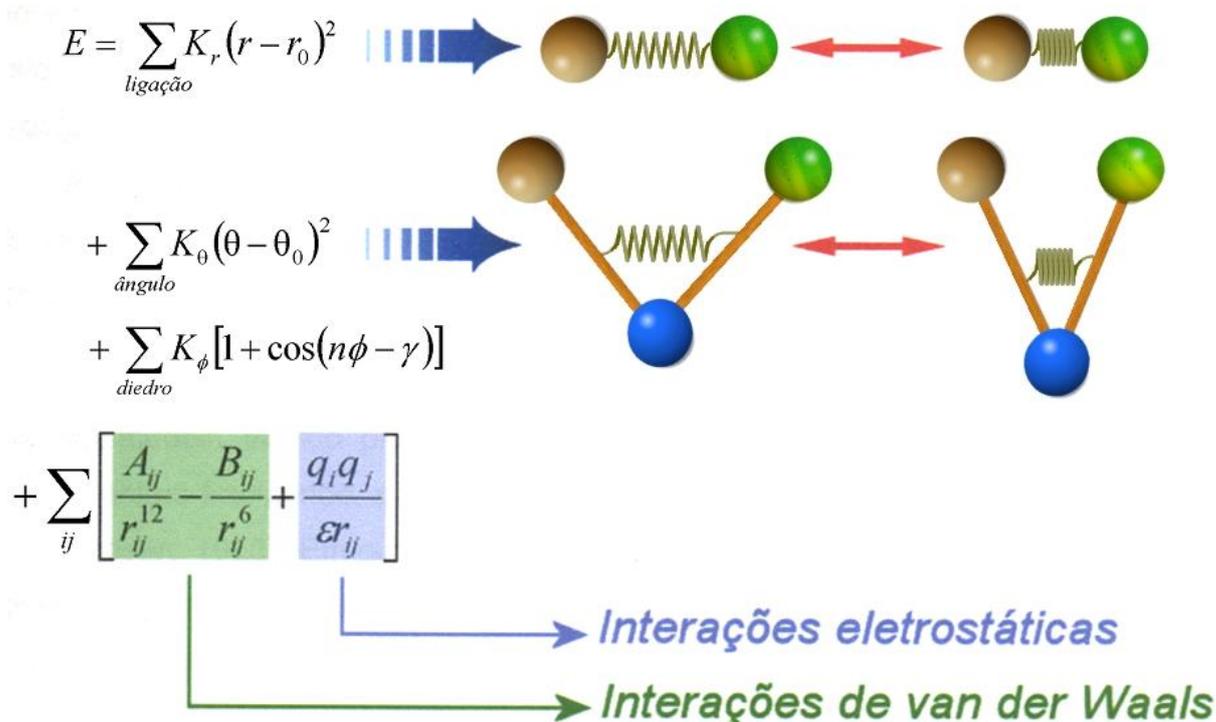


Figura 9: Funções de energia que compõe campos de força. De cima para baixo estão representadas as equações que descrevem o estiramento de ligações

químicas, ângulos de ligação, diedros e interações intermoleculares (van der Waals e eletrostáticas/Coulômbicas). (Verli, Tese de doutorado, 2005)

A obtenção de modelos capazes de contribuir no entendimento de processos biológicos dependerá, principalmente, de dois fatores: a precisão do campo de força utilizado, adequado a reprodução das propriedades do sistema molecular em estudo, e o tamanho da busca do espaço conformacional realizado durante a simulação, suficientemente ampla para descrever as conformações do sistema (Smith *et. al.*, 1998). De modo geral, o teste final do modelo teórico produzido reside na sua comparação com propriedades experimentais (van Gunsteren & Berendsen, 1990). Em outras palavras, a adequação do método é julgada a partir da observação ou constatação, nas simulações realizadas, de quão precisas são reproduzidas quantidades previamente conhecidas (Karplus *et. al.*, 1990). Nesse contexto, os trabalhos desenvolvidos nesta área de pesquisas têm demonstrado um aumento significativo na habilidade das abordagens computacionais, especialmente a DM, em contribuir no entendimento da estrutura e função dos mais variados e complexos sistemas de biomoléculas, uma vez que há uma constante implementação e aprimoramento dessas metodologias (Hansson *et. al.*, 2002; Sherwood *et. al.*, 2008).

2 Objetivos

O presente trabalho se insere no contexto do estudo do processo de inativação da trombina por inibidores covalentes e alostéricos, tendo por objetivo caracterizar as razões moleculares para a influência do PPACK e da suramina no comportamento em solução da trombina por meio de simulações de dinâmica molecular e em paralelo ao desenvolvimento de colaborações com grupos de pesquisa envolvendo modelos experimentais não computacionais. A partir desta orientação geral, as seguintes metas foram estabelecidas:

- Análise do comportamento conformacional dos complexos;
 - ❖ Trombina/PPACK
 - ❖ Trombina/suramina
- Avaliar o papel do solvente nas conformações dos inibidores e da proteína durante a complexação;
- Identificação e quantificação das interações-chave no complexo trombina/inibidores;
- Análise, em nível atômico, do processo de inibição da trombina pelos inibidores.

A partir dos resultados obtidos espera-se contribuir na identificação dos eventos conformacionais que ocorrem concomitantemente ao processo de inativação, ajudando a identificar propriedades úteis no processo de desenvolvimento de compostos bioativos, candidatos a agentes anticoagulantes e antitrombóticos.

3 Metodologia

3.1 Programas utilizados

Algumas metodologias de modelagem molecular foram utilizadas no presente trabalho, incluindo mecânica molecular (MM), dinâmica molecular (DM) e métodos *ab initio*. Os protocolos referentes a cada um destes métodos serão descritos em detalhes adiante. Para tal, os seguintes programas foram empregados:

- Ferramentas de visualização de moléculas: VMD (Humphrey *et. al.*, 1996), Molden (Schaffenaar, 1997; Schaffenaar *et. al.*, 2000) e PyMOL (DeLano Scientific, USA)
- Programa para cálculo *ab initio*: GAMESS (Schmidt *et. al.*, 1993);
- Programa para simulações de dinâmica molecular: GROMACS¹ (Berendsen *et. al.*, 1995; Lindahl *et. al.*, 2001);
- Programa para geração de topologias: PRODRG (Schuettelkopf *et. al.*, 2004);
- Programa para manipulação das seqüências polipeptídicas: Swiss-PDB Viewer (Guex *et. al.*, 1997).

3.2 Cálculos utilizando métodos *ab initio*

Métodos *ab initio* foram empregados para descrever as propriedades eletrônicas de compostos contendo grupamentos hipervalentes (*e.g.* sulfato e fosfato) devido à participação, em tais grupos, do orbital *d* (hibridização sp^3d^2). Isto se justifica pela ausência de parâmetros para descrever as propriedades associadas a tais orbitais por parte de outras metodologias convencionais utilizando métodos semi-empíricos (Clare *et. al.*, 1998). Considerando-se, neste caso, que a suramina é um composto polissulfatado, tornou-se necessário o uso dos métodos *ab initio* para descrever suas propriedades.

Tendo-se em vista o elevado custo computacional associado aos cálculos *ab initio*, houve a necessidade de construirmos a estrutura da suramina por partes, cada uma sendo representativa do total. Nesse tipo de abordagem, a molécula é

¹ <http://www.gromacs.org/>

construída um pedaço por vez, em ordem crescente de complexidade, até atingir a sua estrutura completa utilizando o programa Molden (Schaftenaar, 1997; Schaftenaar *et. al.*, 2000). Cada novo pedaço construído era submetido à minimização de energia utilizando a base HF 3-21G do programa GAMESS (Schmidt *et. al.*, 1993) até chegarmos à molécula inteira. Nesse estágio, a conformação de mínimo de energia obtida foi então utilizada para cálculos *single point* na base HF 6-31G^{**}, de forma a gerar cargas atômicas pelas abordagens de Löwdin (Verli *et. al.*, 2004; Becker *et. al.*, 2007).

3.3 Simulações de DM

3.3.1 Protocolo de simulação

O protocolo geral de simulação foi baseado em trabalhos prévios (de Groot, *et. al.*, 2001). As simulações envolvendo o sistema trombina/PPACK foram realizadas na temperatura de 343 K (70 °C) tendo em vista resultados prévios obtidos no contexto do trabalho, enquanto as simulações do sistema trombina/suramina foram realizadas à temperatura fisiológica (310 K, ou 37 °C). As simulações tiveram duração variável de acordo com o sistema em estudo (de 10 a 50 ns). Cada sistema foi solvatado numa caixa triclínica utilizando condições periódicas de contorno e o modelo de água SPC (Berendsen *et. al.*, 1981). Contra-íons (cloreto ou sódio) foram adicionados de forma a neutralizar as cargas dos sistemas. Cada conjunto de soluto (proteína, ligantes ou ambos), água e íons foi então submetido à minimização de energia por aproximadamente 10.000 passos utilizando o algoritmo Steepest Descents. A estrutura minimizada obtida foi então utilizada como ponto de partida para simulações de DM. 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)^{2,3}. A temperatura e a pressão do sistema foram mantidas constantes através do acoplamento da proteína, ligante, íons e solvente a

² Métodos alternativos para o cálculo das interações não-ligadas tais como o *Reaction Field* (Campo de reação), foram também testados. Contudo, foi identificada uma elevada sensibilidade deste método às propriedades eletrostáticas do sistema: a presença de número elevado de cargas induzia o aparecimento de artefatos e instabilidades nas simulações realizadas. Tendo em vista que a suramina é um composto polissulfatado, mantivemos o método PME em todas as simulações realizadas.

³ rlist = rcoulomb = rvdw = 0,9 Å

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 $\epsilon = 1$.

A primeira etapa de uma simulação de dinâmica molecular envolve o aquecimento gradativo do sistema, sendo por isso denominada *termalização*. Esta etapa tem por objetivo uniformizar as energias contidas na estrutura cristalográfica e, desta forma, evitar deformação na proteína. Cada sistema foi então aquecido lentamente de 50 K a 310 K, em passos durando 5 ps. Cada passo aumenta a temperatura em 50 K, totalizando 6 passos em 30 ps (Fig. 10). Após a termalização do sistema, a simulação prossegue na temperatura de equilíbrio desejada, *i.e.* 310 K ou 343 K, pelo tempo estipulado (de 10 ns a 50 ns).

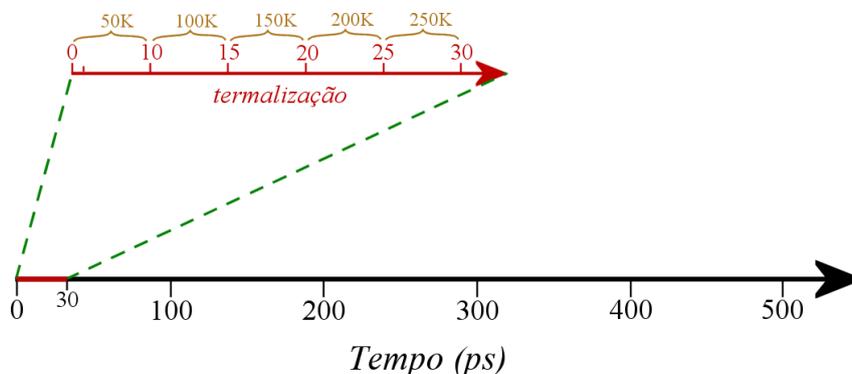


Figura 10: Exemplificação do esquema das etapas que compõe as simulações de DM a 310 K. De 0 ps a 30 ps, uma série de etapas, de 5 ps cada, aquece lentamente o sistema em incrementos de 50 K. Após 30 ps, o sistema está a 310 K e se mantém nesta temperatura pelo resto da simulação. Nos sistema simulado a 343 K, houve a inclusão de uma etapa a mais de termalização até atingir a temperatura desejada (Verli, Tese de doutorado, 2005).

3.3.2 Construção de topologias

Os campos de força incluídos no pacote GROMACS, dentre os quais destacaremos os GROMOS96 43a1 (Berendsen *et al.*, 1995), apresentam conjuntos de parâmetros para um número limitado de compostos, principalmente aminoácidos, íons, água e alguns lipídeos. Isto limita a aplicação deste pacote, conhecido como um dos mais rápidos disponíveis no mundo, no estudo de sistemas moleculares com composições diversas, como aqueles incluindo ligantes sintéticos, aminoácidos modificados, grupos prostéticos e carboidratos. Desta forma, no sentido de viabilizar

a simulação da suramina, foi utilizada uma ferramenta de construção de topologias denominada PRODRG (Schuettelkopf *et. al.*, 2004). A topologia é um arquivo contendo os parâmetros que descrevem as propriedades estruturais de uma determinada molécula, tais como conectividades, ligações químicas, ângulos de ligação e de diedro, assim como os parâmetros de van der Waals e cargas atômicas. É, portanto, um arquivo com características específicas para cada campo de força e topologia de um dado composto obtida para um campo de força que não pode ser transposta diretamente para outro campo de força.

O PRODRG é um servidor que funciona na *World Wide Web*⁴, exigindo somente o arquivo PDB com a estrutura da molécula de interesse. Gera como saída, dentre outros arquivos, um arquivo com a estrutura do composto no formato GROMACS, assim como o arquivo denominado de topologia, incluindo os parâmetros moleculares não-inclusos no campo de força supracitados. Trabalha com parâmetros oriundos do campo de força GROMOS96 43a1 e, por conseguinte, este foi escolhido como o campo de força para os cálculos realizados.

No que diz respeito ao PPACK, sendo ele um derivado peptídico, utilizamos os parâmetros próprios para cargas, ligações, ângulos e diedros do GROMOS96 43a1 para descrever sua topologia, bem como para descrever os parâmetros de sua ligação com os resíduos Ser195 e His57 da tríade catalítica (Fig. 11), conforme dados experimentais prévios (Bode *et. al.*, 1992).

⁴ http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrgr_beta

Esquema da inativação enzimática

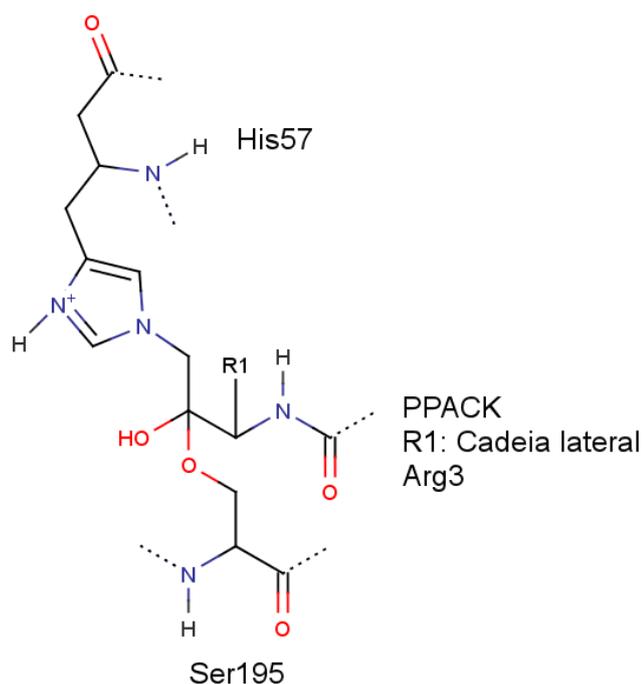


Figura 11: Esquema da topologia das ligações covalentes utilizada durante a simulação do sistema trombina/PPACK. Esse é o arranjo das ligações que ocorrem após a ação enzimática da trombina sobre o PPACK, onde o átomo de cloro desse composto é eliminado no meio de reação originando as ligações covalentes com as cadeias laterais da His57 e Ser195 catalíticas e o carbono carbonílico da Arg3 do PPACK.

3.3.3 Validação das simulações de DM

A validação dos resultados obtidos das simulações de DM foi realizada através da comparação com resultados experimentais prévios, incluindo-se dados cristalográficos, bioquímicos e de dicroísmo circular, assim como da observação da estabilidade dos sistemas estudados, seja pela manutenção da estrutura secundária, energia, densidade e volume.

4 Resultados

4.1 *Preâmbulo*

Os resultados obtidos serão apresentados a seguir na forma dos trabalhos publicados ou manuscritos elaborados durante a realização da presente dissertação. Estes trabalhos estão citados abaixo, assim como uma breve descrição sobre cada um.

- Luis Maurício T.R. Lima, Camila Franco Becker, **Guilherme Menegon Giesel**, Adriana Fonseca Marques, Maria Thereza Cargnelutti, Mario de Oliveira Neto, Robson Queiroz Monteiro, Hugo Verli, Igor Polikarpov: Structural and thermodynamic analysis of thrombin:suramin interaction in solution and crystal phases. *Biochim. Biophys. Acta – Protein and Proteomics*, **2009**, (1794), 873–881.

Este trabalho apresenta as bases moleculares da interação da suramina com a trombina e a aplicação de ferramentas de dinâmica molecular no estudo conformacional dessa interação, com destaque para a caracterização da formação do complexo ligante-receptor nos ambientes cristalino e em solução.

- Vivian de Almeida Silva, Robson Q. Monteiro, **Guilherme Menegon Giesel**, Hugo Verli, Luis Maurício T.R. Lima: Análise comparativa da estrutura e termodinâmica da trombina no estado livre e complexado. *In preparation*, **2009**

Este trabalho apresenta a descrição do comportamento termodinâmico da inibição da trombina pelo inibidor irreversível PPACK e a descrição da alteração dessas propriedades frente à ligação com esse composto.

- **Guilherme Menegon Giesel**, Hugo Verli: tRMSF - a protein flexibility analysis in molecular dynamics as a function of both time and residue. *In preparation*, **2009**.

Este trabalho apresenta uma nova metodologia para avaliação da flexibilidade da estrutura de proteínas por meio da construção de gráficos dedicados a

caracterização da flexibilidade de cada resíduo de aminoácido como função do tempo.

A seguir, serão apresentados o resumo e a íntegra de cada artigo ou manuscrito.

4.2 Trabalho I

Este trabalho descreve a determinação da primeira estrutura tridimensional do complexo trombina/suramina por meio de técnicas de cristalografia de raios-X. Adicionalmente, buscando complementar os dados cristalográficos, oferecendo um refinamento dos mesmos em solução aquosa, foram realizadas simulações de dinâmica molecular do complexo trombina/suramina nas proporções 1:1 e 3:1. Este último sistema foi criado com o objetivo de mimetizar a matrix cristalográfica e, assim, contribuir no entendimento das razões moleculares para possíveis diferenças conformacionais nos dois meios.

Os resultados obtidos por DM demonstraram um significativo rearranjo da suramina no sistema 1:1 durante as simulações. Tal mudança na orientação do ligante foi observada em grau muito inferior no sistema 3:1, em que os principais contatos entre a suramina e outras moléculas de trombina estariam mimetizados. Aparentemente, tais contatos representam forças cristalográficas capazes de influenciarem na orientação da suramina complexada e assim, na descrição de sua interação com o exsítio II da trombina. Conseqüentemente, o complexo obtido por DM em um sistema 1:1, observado no plasma, é provavelmente mais adequado como um modelo de estudo para a ação da suramina. Adicionalmente, os resultados indicam o potencial em combinar metodologias de cristalografia de raios-X e DM na tentativa de caracterizar macromoléculas biológicas e suas respectivas funções em nível atômico.

Structural and thermodynamic analysis of thrombin:suramin interaction in solution and crystal phases

Luis Maurício T.R. Lima, Camila Franco Becker, **Guilherme Menegon Giesel**,
Adriana Fonseca Marques, Maria Thereza Cargnelutti, Mario de Oliveira Neto,
Robson Queiroz Monteiro, Hugo Verli, Igor Polikarpov

Biochimica et Biophysica Acta – Protein and Proteomics, **2009**, 1794; 873–881.



Structural and thermodynamic analysis of thrombin:suramin interaction in solution and crystal phases

Luis Maurício T.R. Lima^{a,*}, Camila Franco Becker^{b,c}, Guilherme Menegon Giesel^b,
Adriana Fonseca Marques^{a,d,1}, Maria Thereza Cargnelutti^{a,d,1}, Mario de Oliveira Neto^e,
Robson Queiroz Monteiro^d, Hugo Verli^{b,c}, Igor Polikarpov^{e,*}

^a Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, Box 34, Ilha do Fundão, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av Bento Gonçalves 9500, CEP 15005, Porto Alegre 91500-970, RS, Brazil

^c Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av Ipiranga 2752, Porto Alegre, 90610-000, RS, Brazil

^d Instituto de Química Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^e Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador Socarlesense, 400, São Carlos, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 June 2008

Received in revised form 24 February 2009

Accepted 9 March 2009

Available online 28 March 2009

Keywords:

Thrombin

Suramin

Crystallography

Molecular dynamic simulation

Small-angle X-ray scattering

ABSTRACT

Suramin is a hexasulfonated naphthylurea which has been recently characterized as a non-competitive inhibitor of human alpha-thrombin activity over fibrinogen, although its binding site and mode of interaction with the enzyme remain elusive. Here, we determined two X-ray structure of the thrombin:suramin complex, refined at 2.4 Å resolution. While a single thrombin:suramin complex was found in the asymmetric unit cell of the crystal, some of the crystallographic contacts with symmetrically related molecules are mediated by both the enzyme and the ligand. Molecular dynamics simulations with the 1:1 complex demonstrate a large rearrangement of suramin in the complex, but with the protein scaffold and the more extensive protein-ligand regions keep unchanged. Small-angle X-ray scattering measurements at high micromolar concentration demonstrate a suramin-induced dimerization of the enzyme. These data indicating a dissimilar binding mode in the monomeric and oligomeric states, with a monomeric, 1:1 complex to be more likely to exist at the thrombin physiological, nanomolar concentration range. Collectively, close understanding on the structural basis for interaction is given which might establish a basis for design of suramin analogues targeting thrombin.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Thrombin is a serine protease that plays key roles in coagulation, anticoagulation, and fibrinolytic pathways and thus represents an important target for novel antithrombotic compounds. Although resembling trypsin, thrombin is a specific enzyme that acts upon only a small range of physiological substrates due to residues surrounding the active site as well as other surface domains involved

in the recognition of cofactors, substrate, and inhibitors [1]. The coagulant form of thrombin, alpha-thrombin (α Th), is composed of two disulfide-linked chains (light, L, with 36 amino acids, and heavy, H, with 259 amino acids), with the catalytic site located in chain H, which contains three additional disulfide bonds as well as nine tryptophan residues distributed throughout the molecule.

Many efforts have been devoted to the development of more specific, direct, and indirect thrombin inhibitors [2–3], with some of these compounds entering clinical trials. Suramin (SVR) is a hexasulfonate compound that has been frequently used in the treatment of African trypanosomiasis and filariasis, and has served as a lead compound in the development of derivatives designed for the treatment of malaria, cancer, and haemostatic effects of snake venom, among others [4–8] (Fig. 1).

Recently, SVR was found to inhibit α Th [9]. This interaction was suggested to occur through the anion binding site (exosite) 2, and with inhibition constant in the low micromolar range. Further improvements in affinity and specificity of SVR by thrombin require the knowledge of any structural evidence for this interaction. In this work, we report the crystal structure of this complex, which allows

Abbreviations: TBS, tris-buffered saline (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5); FPRCK, D-Phe-Pro-Arg-cinnamylketone- α -thrombin; Suramin, 8, 8'-[carbonylbis[imino-3,1-phenylene]necarbonylimino(4-methyl-3,1-phenylene)]bis[1,3,5-naphthalenesulfonic acid]

* Corresponding authors. L.M.T.R. Lima is to be contacted at Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, Box 34, Ilha do Fundão, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Tel./fax: +55 21 2562 6639. I. Polikarpov, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador Socarlesense, 400, São Carlos, SP, Brazil.

E-mail addresses: mauricio@pharma.ufrj.br (L.M.T.R. Lima), ipolikarpov@fsc.usp.br (I. Polikarpov).

¹ Tel./fax: +55 21 2562 6639.

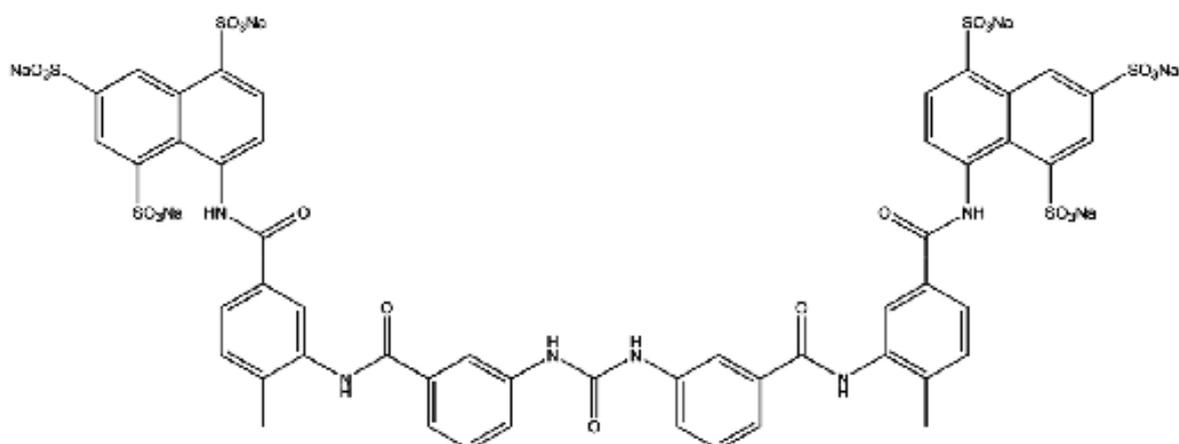


Fig. 1. Planar structure of saramin.

the observation of this interaction in details. Moreover, the complementary use of small-angle X-ray scattering and molecular dynamics simulation gave insights on the consequences of the α Th interaction with SVR in solution, including conformational rearrangement of the protein and the ligand, and the SVR-induced α Th dimerization.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Distilled water was deionized to less than 1.0 μ S and filtered through a 0.22 μ m pore-size membrane in a water purification system prior to use. Egg hen lysozyme (Lys) was purchased from Sigma and used without further purification. S-2238 was obtained from Chromogenix (Mölnådal, Sweden); FPRCK, D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketone- α -thrombin was purchased from Calbiochem. Human α Th was purified as previously described [10]. Protein concentration was determined using an extinction coefficient at 280 nm [11–12]. All other reagents were of analytical grade.

2.2. Protein crystallization and data collection

To avoid self-proteolysis before crystallization, α Th was inhibited with 1.2 molar excess of PPACK. Crystals of human α Th in complex with SVR were obtained by the vapor diffusion hanging drop method at 18 °C, by mixing 1 μ l of 160 μ M α Th:SVR in 400 mM NaCl, 20 mM MES pH 6.0 with 1 μ l well solution and equilibrating against 500 μ l 25% tert-butanol, 100 mM Tris pH 8.5, identified after screening using sparse matrix approach with Hampton crystallographic screening solution kits (Hampton Research, San Diego, CA). Further increase in SVR concentration (higher SVR/ α Th ratios) induces a visible, immediate and irreversible, aggregation of high density material, which is not detectable at low micromolar or nanomolar concentration ranges (not shown).

Crystals of about 200 \times 50 \times 50 μ m³ grew in about 4 weeks. The crystals were quickly soaked in mother solution containing 18% v/v glycerol (replacing water) and then flash-frozen in liquid nitrogen. X-ray diffraction data were collected with 1° oscillation per image from a single crystal kept on a nitrogen stream at 100 K at two instrumental setups: a) the DOB-MX1 beamline from LNLS (National Synchrotron Light Laboratory, LNLS, Campinas, Brazil; [13–14], with wavelength set at 1.427 Å and the diffraction intensities were measured using a MARCCD detector (MAR Research); b) CuK α radiation (1.5418 Å) generated by a Rigaku UltraX 18 rotating anode operated at 50 kV and 90 mA and equipped with Osmic corfoal

Max-Flux optics and recorded on a MAR 345dtb image plate. The main objective in collecting and refining two diffraction datasets from two different crystals was to ensure, beyond refinement statistics, that different models converged on a representative structure and to eliminate the uncertainty and bias from a single data set [15]. Distinct crystals were used in data collection in each of the instruments. The images were indexed and processed with Mosflm [16] and scaled with Scala [17].

2.3. Structure solution, refinement and quality of the structure

The complex was solved by molecular replacement using MolRep [18] and human α Th inhibited with FPRCK (PDB entry: 1PPB.pdb) [19–20] as a search model, resulting in a clear solution for one monomer in the asymmetric unit. The structure was further refined using Refmac

Table 1
Summary of data collection and refinement.

PDB ID	2HBT	3BFG
Data collection		
X-ray source	Synchrotron	Rotating anode
Detector	MarCCD	Mar345dtb
		Image plate
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit cell dimension, Å	a = 43.97, b = 76.20	a = 44.38, b = 73.47
	c = 113.85	d = 114.71
Monomers/asymmetric unit	1	1
Multiplicity	4.9 (4.3)	76 (7.1)
Completeness, %	100 (99.2)	95.3 (95.3)
I/ σ (I)	21.9 (3.1)	11.6 (3.5)
Rmerge	0.065 (0.549)	0.191 (0.597)
Structure refinement		
Resolution range, Å	41.03–2.40 (2.53–2.40)	34.99–2.50 (2.64–2.50)
Reflection in working/free, %	15,579/1,073	12,198/645
Rwork/R _{free}	18.0/26.6	22.8/28.2
Overall Bfactor, Å ²	28.66	14.93
Precision of atomic location, Å ³	0.26	0.33
Ramachandran outliers		
RMSD bond length, Å	0.019	0.006
RMSD bond angles, °	2.060	1.051

Number in parentheses indicates the highest resolution shell.

R_{free} calculated for \geq 5% randomly chosen reflections that were excluded from the refinements.

^a Upper limit of error in atomic coordinates as obtained by the method of Luzzati [23].

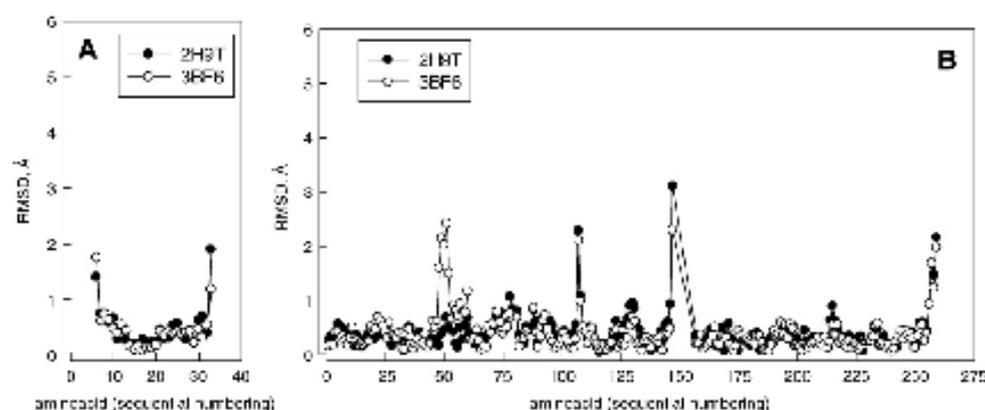


Fig. 2. Comparative analysis between apo and α Th:SVR structures. FPRCK-thrombin (PDB entry 1FPP) and α Th:SVR complexes were superposed (with program LSQKAB from the CCP4 suite) and the RMSDs of Co α are displayed for the 2H9T.pdb (closed circles) and 3BF6 (open circles) and for (A) light chain and (B) heavy chain.

[21]. Real space refinement was conducted by visual inspection of both the map and model with Coor [22], which was also used for the addition of water molecules. A summary of crystal parameters and data collection and refinement statistics are presented in Table 1. Atomic coordinates have been deposited with the Protein Data Bank and have been assigned the code 2H9T.pdb (collected at LNLS) and 3BF6.pdb (collected at home source X-ray generator). We present here the classic numbering of α Th based on the topological similarities with chymotrypsinogen [19].

The precision in atomic location of both structures is better than 0.35 Å (Table 1) [23]. Structural validation of the model performed with PROCHECK [24] showed that all main-chain dihedral angles were in the allowed regions. All residues were found in favorable Ramachandran regions. A detailed report of structure statistics can be found in Table 1. Omit maps were generated with the Omit program [25–26] from CCP4 suite [27]. All figures were generated with PyMol [28].

Coordinates and structure factors were deposited in the Protein Data Bank under ID codes 2H9T and 3BF6, and may also be found in external sites such as the Electron Density Server (<http://eds.bmc.uu.se/eds/>).

2.4. Small-angle X-ray scattering

Small-angle X-ray scattering (SAXS) experiments were carried out at two α Th concentrations – 50 μ M and 100 μ M – inhibited by 1.2 molar excess of FPRCK in the presence or absence of equimolar amounts of SVR. All samples were prepared in 400 mM NaCl, 20 mM MES pH 6.0, centrifuged for 15 min at 15,000 g at 4 °C and maintained in ice until data collection.

SAXS data were collected at 25 °C using a one-dimensional position-sensitive detector (PSD 1D) with two instrumental setups:

- the D11-SAS1 beam line [29] on the LNLS (National Synchrotron Light Laboratory, Campinas, SP, Brazil) with wavelength 1.488 Å with a sample-detector distance providing a q -range from 0.02 Å⁻¹ to 0.25 Å⁻¹, and
- a rotating anode (CuK α , λ = 1.5418 Å; Rigaku) with line focus, and sample-detector distance providing a q -range from 0.02 Å⁻¹ to 0.25 Å⁻¹,

where q is the modulus of the scattering vector (calculated according to $q = (4\pi/\lambda)\sin\theta$, where λ is the wavelength used and 2θ is the scattering angle). The scattering curves of the protein solutions and buffers were collected in several successive frames of 900 s each to monitor for radiation-induced protein oxidation. The data reduction

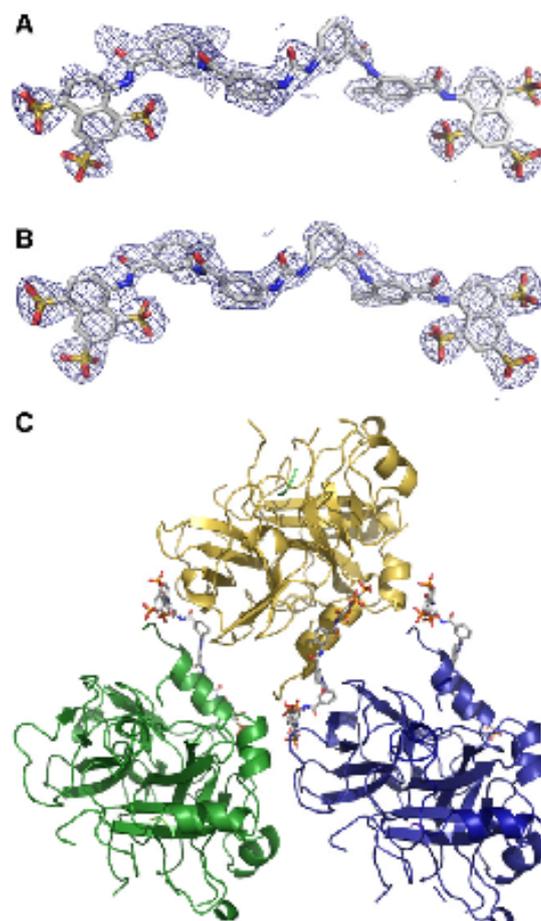


Fig. 3. Mapping SVR contacts with α Th. Electron density map of SVR in (A) 2H9T.pdb and (B) 3BF6.pdb. Grids correspond to the Omit 2F_o–F_c map contoured at 1 σ . (C) α Th:SVR complex (PDB entry 2H9T) crystallized to a 1:1 complex in the asymmetric unit (yellow, SVR#1), but symmetry-related structures (green, SVR#2, and blue, SVR#3) reveal other SVR-binding sites in α Th. Figures generated with PyMol.

routine included normalization of the one-dimensional scattered data to the intensity of the transmitted incident beam, correction for the detector response, incident beam intensity, sample absorption, sample concentration and blank subtraction. Measurements were performed using at least three different protein batches.

Guinier analysis [30] was applied to evaluate the monodispersity of the specimen and to determine the radius of gyration (R_g) of α Th and α Th:SVR in solution. The R_g and the scattered intensity, $I_0(q)$, were inferred, respectively, from the slope and the intercept of the linear fit of $\ln[I(q)]$ versus q^2 in the q -range $q \cdot R_g < 1.3$ [30]. The same parameter was also obtained from the data fit of the merged curve by the indirect Fourier transform program GNOM [31], also evaluating the distance-distribution function, $p(r)$, of α Th. The maximum dimension, D_{max} , was estimated from the $p(r)$, with the limiting distance r where $p(r)$ first converges down to zero. The oligomeric states of α Th and α Th:SVR in SAXS measurements were confirmed from the extrapolated values of scattering intensity at zero scattering angle (I_0) and normalized by sample concentration C according to I_0/C using bovine serum albumin and egg hen lysozyme as reference standards [32–33].

2.5. Molecular dynamic simulation

The MD simulation was performed with the α Th:SVR complex in the asymmetric unit of PDB entry 2H9T. The GROMACS simulation suite [34] and GROMOS96 force field were used, employing an MD protocol based on previous studies [35]. This complex was solvated in a triclinic box using periodic boundary conditions and an SPC water model [36]. Counter ions were added to neutralize the system. The Lincs method was applied to constrain covalent bond lengths, allowing an integration step of 2fs after an initial energy minimization step using the Steepest Descents algorithm. Electrostatic interactions were calculated with Particle-Mesh Ewald [37]. Temperature and pressure were kept constant by separately coupling protein, ligand, ions, and solvent to external temperature and pressure baths [38] with coupling constants of $\tau = 0.1$ and 0.5 ps, respectively. The reference

temperature was adjusted to 310 K. The system was slowly heated from 50 to 310 K in steps of 5 ps, each one increasing the reference temperature by 50 K. SVR topology was built using the ProdrG server [39] and Löwdin atomic charges, as previously described [40–41]. Interaction energies represent the sum of Coulomb and Lennard-Jones components over the MD trajectory.

3. Results

We have solved independently two crystal structures of the complex from two distinct crystals grown under same crystallization conditions. This strategy allows one to attain better clarity of our crystal structure of the α Th:SVR complex and to minimize the uncertainty caused by interpretation of a single model [15].

Distinct data collection strategies were used for each data set: one of them collected in a home source and the other at a synchrotron facility, resulting in data with final resolutions of 2.5 Å and 2.4 Å, respectively. Both structures were solved by molecular replacement with a reference thrombin structure (PDB entry 1PPB). Overall data collection, processing and refinement statistics are given in Table 1. Both structures consist of one α Th monomer and one SVR molecule per asymmetric unit.

The overall conformation of light and heavy chains of the α Th:SVR complex is similar to the reference thrombin structure used in molecular replacement (Fig. 2). Both complexes (2H9T.pdb and 3BF6.pdb) are similar, differing by less than 0.5 Å in their respective C α positions (chain L: RMSD = 0.32 ± 0.23 Å; chain H: RMSD = 0.32 ± 0.28 Å), except for a distal loop that is not in contact with SVR. The largest deviation between the two structures is 2 Å RMSD (Fig. 2).

A strong electron density for SVR was found, as shown in Fig. 3. As previously suggested by functional studies (9), SVR was supposed to be bound to the anion binding site (exosite) 2. Therefore, SVR recognition by α Th involves some aminoacids residues known to mediate the complex with heparin [42].

Although only one α Th:SVR complex is present in the asymmetric unit, SVR mediate interactions with the symmetry-related molecules

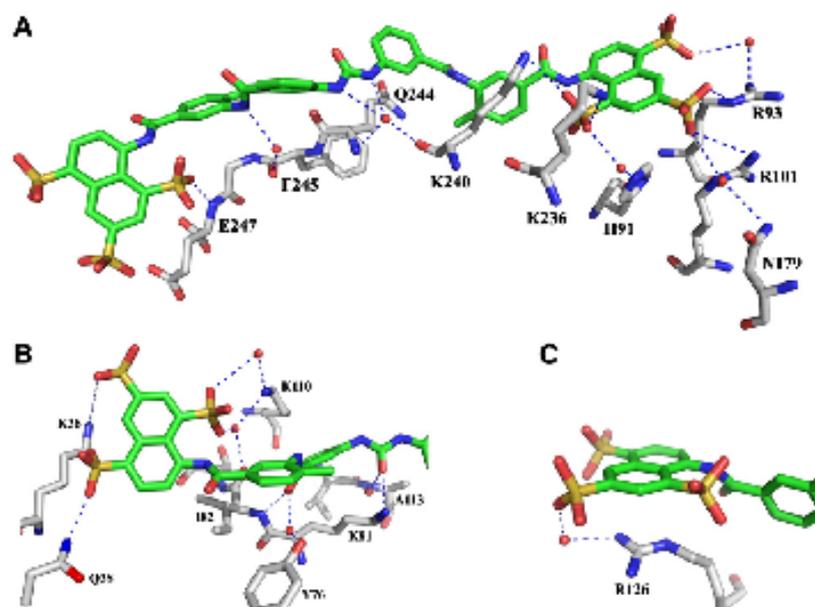


Fig. 4. SVR contacts with α Th. Details of the three possible SVR interaction with α Th according to crystal packing are shown here for (A) SVR#1, (B) SVR#2 and (C) SVR#3. Carbon atoms are represented in green for SVR and in gray for α Th. Water molecule is depicted as a red sphere. Dashed lines indicate contacts with distances between 2.2 and 3.2 Å. Figure generated with PyMol using the 2H9T.pdb entry.

of α Th contacting the enzyme in three different regions as a result of crystal packing (Fig. 3C). A closer analysis of these contacts immediately unravels a clear hierarchy of α Th:SVR interaction, numbered according to the extension of interaction between SVR and α Th: SVR#1, SVR#2 and SVR#3 (Fig. 3C), all of them with the heavy chain (chain H).

Two main features can be observed from the crystal structure for SVR#1 interaction with α Th (Fig. 4A). First, several basic amino acid side chains (e.g., Arg, Lys, His) are involved in contacts with the naphthalene sulfonates, among others direct and water-mediated interactions with additional amino acid side chains and amide groups. Second, although ionic contacts contribute extensively in binding, as corroborated by the high dependence of binding on the ionic strength [9], hydrophobic interactions and hydrogen bonding between the α Th amide and SVR also play roles in the maintenance of the complex.

Another important insight coming from this structure is the presence of a shallow cavity close to one of the SVR#1 methyl groups (Fig. 5). This cavity is occupied by a water molecule bridged within interactions with Gln244 side chain, the phenolic hydroxyl from Tyr89 and the amidic carbonyl from Val241. These features create a polar environment in this cavity, providing a repulsive interaction with the SVR methyl group. Maintenance of stable interaction between SVR and α Th at these regions is likely to be possible due to thermodynamic compensation by other interactions of SVR with α Th. We believe that functionalization at this position in SVR molecule would diminish the repulsive component, providing further favorable contacts between SVR and α Th and thus increasing the affinity constant for the complex.

SVR#2 interacts with α Th, through a large diversity of direct and water-mediated contacts (Fig. 4B), both from amino acids side chains of Lys36, Gln38, Tyr76, Lys81 and Lys 110, the amide nitrogen from Ile 82 and Ala113, and the carbonyl from Ile82.

In opposition, SVR#3 interacts with α Th solely between Arg126 side chain and naphthalene sulfonates from SVR (Fig. 4C). This limited interaction seems to be a consequence of crystal packing, providing none or only minor contribution for interaction in solution.

3.1. Molecular dynamics simulations

Crystal environments can influence protein conformations, particularly at the regions of crystal contacts [43], and, consequently, they can bias the assignment of biological functions of a given macromolecule based on its X-ray structure. To gain better insights into the dynamic and crystal lattice-free conformation of the α Th:SVR complex, we decided to use molecular dynamics (MD) simulations.

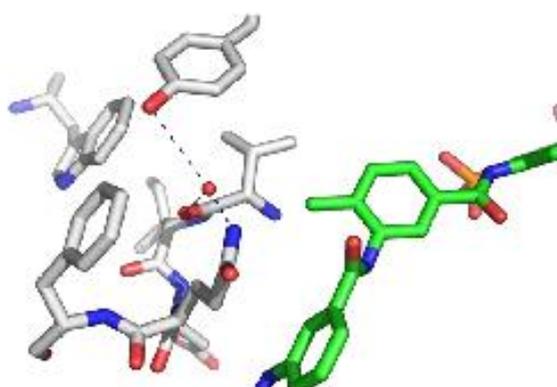


Fig. 5. Details of SVR methylene group interaction with α Th. Carbon atoms are represented in green for SVR and in gray for α Th. Water molecule is depicted as a red sphere. Dashed lines indicate contacts with distances between 2.2 and 3.2 Å. Figure generated with PyMol using the 2HSF.pdb entry.

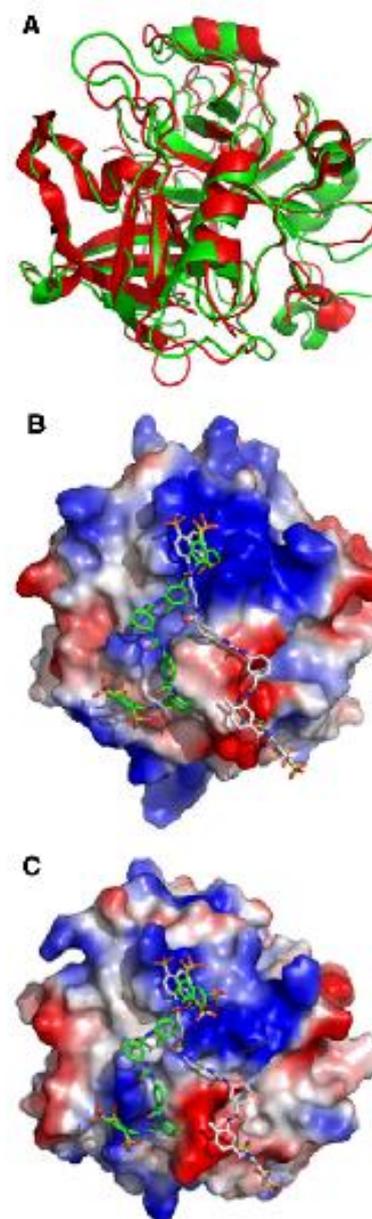


Fig. 6. Comparison of the crystal and MD conformations of the α Th:SVR complex. (A) Alignment of the crystal (red) and MD simulation (green) (final frame after 10 ns) conformations; crystallographic orientation of SVR. Surface electrostatic potential for crystal structure (B) and in solution after 10 ns simulation (C), showing SVR molecule both before (in crystal; carbons in gray) and after (carbons in green) 10 ns MD simulation. All structures are in the same orientation. Figure generated with PyMol.

Indeed, by separating the α Th:SVR complex from its crystallographic environment and replacing the crystal contacts by water molecules, we were able to evaluate the extent of conformational modifications induced by non-biological contacts [41; 44–45].

A 10 ns MD simulation was performed with the α Th:SVR complex. The simulation was stable during the performed time scale, with an

Table 2
Average interaction energy between SVR and α Th.

Thrombin residues	Average interaction energy (kJ/mol) ^a
Lys87	-28.2 ± 22.6
Pro92	-15.7 ± 3.3
Arg98	-19.4 ± 12.9
Arg101	-26.7 ± 11.2
Lys107	-5.9 ± 8.0
Lys236	-46.8 ± 18.2
Trp237	-60.9 ± 13.4
Lys240	-56.4 ± 24.4
Asp248	-2.7 ± 4.0
Gln244	-52.8 ± 6.6
Phe245	-45.5 ± 10.4
Glu247	-14.6 ± 11.9
Total	-492.0 ± 51.7

^a Average values from the sum of Coulomb and Lennard-Jones components sampled over entire 10 ns MD simulation.

average RMSD for the protein moiety of about 3 Å. Increased flexibilities were observed for the α Th light chain (average value = 3.4 ± 0.5 Å) and for SVR (average value = 4.3 ± 0.6 Å). Such deviations are due to a large modification of SVR orientation at the binding site (Fig. 6). Through this process, a series of contacts are formed, including those with residues Lys87, Lys107, Lys236, Trp237, and Phe245, and others are lost, including those with Arg93, Asp243, and Glu247, resulting in an increase of about -300 kJ/mol in SVR interaction with α Th (Table 2). In addition, the comparison between the final MD simulation model and the X-ray data suggests that the origin for the SVR behavior in the performed simulations lies in crystal contacts. In fact, in the MD model, one part of SVR occupies the same region as in the crystal, while the opposite part modifies its orientation. The fixed part of SVR is held in the crystal by a series of contacts with the Glu14C-Ser14I helix and is tightly packed against Asp186A-Glu186B of the neighboring α Th molecule in the crystal cell, which induces conformational restrictions in the orientation of SVR in the crystallographic structure. Upon removal of these contacts and inclusion of water molecules, the L chain accommodates in solution, originating the increased RMSD value observed in the simulations (Fig. 7). In opposition, a 10 ns simulation of a [α Th:SVR]₂ system as shown in Fig. 3C, generated by symmetry operation according to crystal space group, shows a lower mobility of suramin molecule, with RMSD of 4.2 ± 0.8 Å for [α Th:SVR]₁ versus 2.5 ± 0.4 Å for [α Th:SVR]₂ (not shown). This data confirm the role of crystallographic forces on SVR orientation at the α Th binding site.

3.2. Small-angle X-ray scattering

X-ray crystallography is capable of providing detailed tertiary structure information at atomic levels, but it frequently fails to correctly identify the quaternary organization of macromolecules. For example, both yeast hexokinase and bovine beta-lactoglobulin, were observed as monomers in crystal in spite of being capable to form dimers in solution [46–51]. Although a single α Th:SVR complex was found in the asymmetric unit cell, the interaction of SVR with α Th occurs as a combination of at least two separate events. The shape of the binding isotherms obtained from isothermal titration calorimetry (ITC) experiments indicates that the binding is complex, possibly involving two distinct binding sites [9]. ITC results, however, leave unclear whether the binding sites are independent or interacting. In the present X-ray structures, several crystallographic contacts with symmetrically related molecules are mediated by both α Th and SVR (Fig. 3) and, thus, might support a ligand-induced oligomerization [9].

To address this issue, we performed small-angle X-ray scattering (SAXS) measurements to gain insight into the oligomeric state of α Th upon SVR binding. SAXS data allow for estimation of structural parameters and studies of overall particle measures, distribution, and dynamics in solution as well as insights through a comparative analysis of scattering data against crystal structures and molecular models [52].

SAXS measurements demonstrate that free α Th is a globular particle with a radius of gyration of 23 Å and a maximum size (D_{max}) of 75 Å (Fig. 8; Table 3), as obtained by the Guinier approximation and by the pair-distribution function $p(r)$. The radii of gyration (R_g) and maximum distance (D_{max}) obtained from scattering profile of free α Th is equivalent to those calculated from monomeric α Th as seen in crystal structures (such as 1PPB, and those solved in this article), suggesting a close identity between α Th in solution during SAXS measurements and crystallographic models. In fact, SAXS data from free α Th can be adjusted with crystal structures of monomeric α Th (Fig. 8A, closed symbols), revealing discrepancy value of 15 (Table 3).

Upon binding to SVR, α Th oligomerization occurs, as demonstrated by the increase in R_g to 32 Å (Fig. 8A, inset; Table 3) and D_{max} to 140 Å (Fig. 8B; Table 3), adopting an elongated form, as evidenced by the $p(r)$ function. The Kratky plot of scattering functions indicates that α Th is well folded with a typical pattern for a globular particle, both in free and SVR-bound forms (Fig. 8C). Additionally, $I(0)/C$, the extrapolated scattering intensity at zero angle also doubles up, as calculated from real (pair-distribution function $p(r)$) and reciprocal space ($I(q)$). Such behavior is a direct indication of a dimerization event in solution,

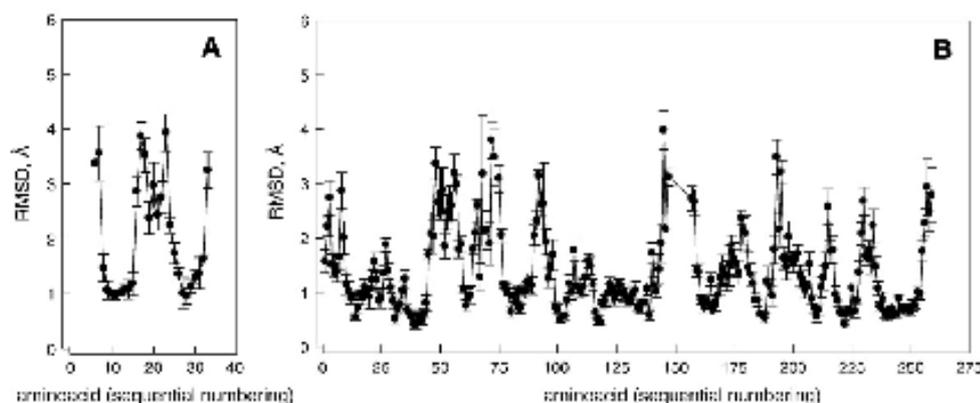


Fig. 7. Structural analysis of crystallographic and MD α Th:SVR models. Crystallographic α Th in complex with SVR (2HBT.pdb) and 10 MD simulation snapshots models, 1 ns intervals each, were superposed, and the mean RMSD and standard error of C α distances are calculated for the (A) light chain and (B) heavy chain. Alignment was performed by secondary-structure matching [61].

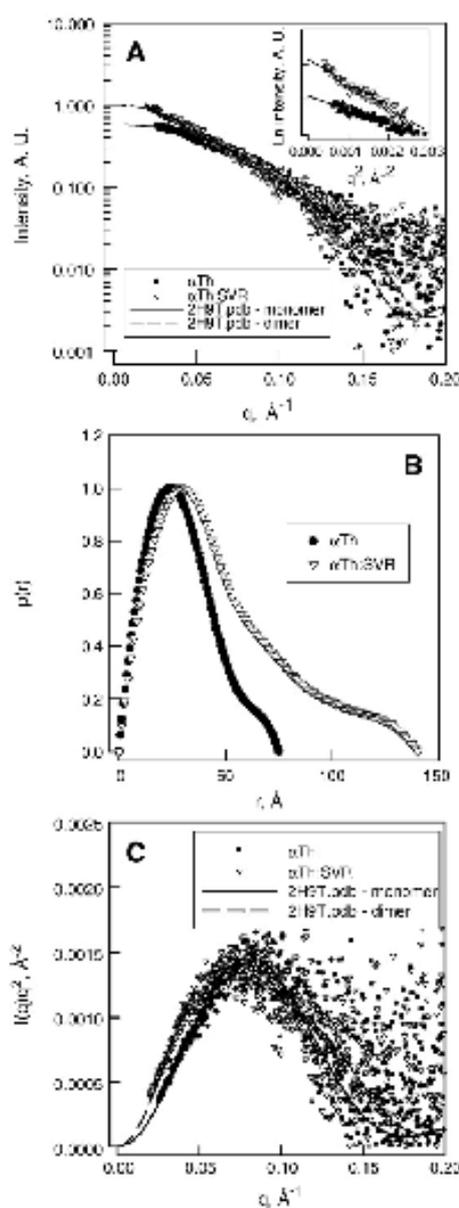


Fig. 8. Small-angle X-ray scattering of α Th. SAXS measurements of $100 \mu\text{M}$ α Th (closed circles) and $100 \mu\text{M}$ α Th in the presence of $100 \mu\text{M}$ SVR (open triangles) indicate a SVR-induced dimerization of α Th in solution. (A) Normalized scattering curves of α Th and α Th:SVR (absolute scattering intensity at angle zero, I_0 , obtained by Guin [\[31\]](#) and Guinier [\[30\]](#) analysis can be found in Table 3); lines are the theoretical scattering intensities computed using Crysol [\[62\]](#) and α Th crystal structure (PDB code 2H8T) in the monomeric (solid, lower curve) and dimeric (dashed, upper curve) forms. Inset: Guinier plot of the scattering function; lines correspond to first order linear regression of data. The linearity of the Guinier plot indicates that both samples are monodisperse. (B) Distance pair distribution functions $p(r)$ of α Th alone (closed circles) and α Th in the presence of SVR (open triangles); (C) Kratky plot of α Th alone (closed circles) and α Th in the presence of SVR (open triangles). Solid lines correspond to theoretical curves obtained with Crysol as in panel A. Same results were obtained for measurements performed with $50 \mu\text{M}$ α Th (1.8 mg/mL) both in absence and presence of equimolar amount of SVR (not shown).

Table 3
Structural parameters derived from SAXS data.

Parameter	α Th	α Th:SVR
I_0 :		
$I(q)$	$5.21e^{-4}$	$9.806e^{-4}$
$p(r)$	$5.21e^{-4}$	$9.806e^{-4}$
R_g , \AA :		
$I(q)$	23.3	39.4
$p(r)$	23.4	39.8
D_{max} , \AA	75 ± 2	140 ± 2
Discrepancy: χ^2		
Monomer	15	3.4
Dimer	2.6	1.5
Trimer	4.6	2.7

^a Calculated using Crysol [\[62\]](#) and α Th crystal structure PDB ID 2H8T and oligomers generated by crystallographic symmetry-operations (as in Fig. 3). Details in Materials and methods and in Fig. 8.

since the scattering intensity at zero angles doubles upon SVR binding [\[32–33\]](#), SAXS data of α Th in the presence of SVR can be well adjusted with a dimeric model of α Th (Fig. 8A, open symbols) comprising any two α Th monomers out of the three in Fig. 3C (joint by two SVR), with discrepancy value of 1.5 (Table 3). Attempt to adjust this SAXS curve with α Th monomer or trimer is not satisfactory, resulting in higher discrepancy values of 3.4 and 2.7, respectively (Table 3).

Same results were obtained for measurements performed either at $50 \mu\text{M}$ (1.8 mg/mL) or $100 \mu\text{M}$ (3.7 mg/mL) of α Th both in absence and presence of equimolar amount of SVR. The lack of protein concentration dependence on structural parameters obtained by SAXS indicates a monodisperse system and thus ruling out the existence of multiple oligomeric states in solution. Taken together, these data demonstrate a protein dimerization event induced by SVR binding in solution.

The complexation of α Th with SVR is a calorimetric biphasic event that takes place before a 1:1 stoichiometric coefficient in the low micromolar concentration range [\[9\]](#). In this context, it is not reasonable to affirm that α Th would directly transition from a free, monomeric species to a SVR-bound dimeric structure. We believe that dimerization would take place preferably at a high concentration of one or both molecules (α Th and SVR) and that, at even higher SVR concentrations, an aggregation process would occur. Moreover, at the low nanomolar α Th concentration range found in plasma [\[53\]](#), the formation of a 1:1 α Th:SVR complex is more likely to occur.

4. Discussion

For many decades, a search for better antithrombotic drugs has been pursued by several research groups, and, due to the limited options and considerable side-effects associated with the currently available drug therapeutic approaches, continuous development in this area is still needed.

SVR has been investigated due to its interaction with a diversity of targets [\[6; 54–58\]](#), and crystallographic characterization has accounted for SVR in complex with two enzymes [\[6; 59–60\]](#). SVR recognition by the vaccinia complement protein, for example, is due to several electrostatic interactions and minor contributions from hydrophobic and van-der-Waals contacts. Although SVR can bind to a number of proteins, it does not seem to have sufficient molecular, chemical, and structural complementarities, and thus has very limited binding specificity.

Inhibition of α Th-induced fibrinogen clotting by SVR occurs with an K_{50} of $20 \mu\text{M}$ [\[9\]](#), a relatively low-affinity character. SVR interaction with α Th is highly ionic, but it is also extensive in hydrophobic and van-der-Waals interactions. Comparatively, most features of the α Th:SVR interaction are comparable with those between α Th and heparin, which are also non-specific and involve α Th oligomerization. The α Th:heparin interaction has a slightly higher affinity than α Th:SVR.

with a mean apparent K_d of 7 μM [47], a consequence of increased sulfonation involved in binding to exosite 2.

The MD simulations of the $\alpha\text{Th}:\text{SVR}$ complex were employed to rectify the consequences of crystal packing effects capable of distorting the protein and/or ligand conformations. After 10 ns of MD simulations, which is usually long enough to monitor conformational changes in macromolecules [40–41, 44–45], a significant re-orientation of SVR was observed (Fig. 6). Such modification in ligand orientation is probably caused by non-biological interactions in the crystal structure and non-physiological conditions used for crystallization (Fig. 3C). The final structure converged after MD simulation is more likely to represent the model of a more relaxed $\alpha\text{Th}:\text{SVR}$ complex (Figs. 6–7).

In a previous work, a calorimetric assay of the $\alpha\text{Th}:\text{SVR}$ interaction revealed a biphasic behavior, which is a typical indicator of at least two binding and/or events occurring. In this assay, the first transition occurs at submicromolar concentration range, indicating that binding at this concentration range might occur though with low inhibitory effect.

Our SAXS measurements corroborate the biphasic calorimetric behavior, clearly demonstrating a dimerization phenomenon induced by SVR as seen by the two-fold increase in scattering intensity. Additionally, the high resolution structure reported here reveals that SVR is involved in mediation of crystalline contacts through other αTh molecules, supporting the mechanism of αTh dimerization upon SVR binding. This is most likely an attribute of the 2-fold symmetry in the SVR molecule, assuming the predominance of more contacts between SVR and αTh in this region. Based on the evidences collected to date, we propose an interaction equilibrium through the following species that αTh might experience:

Oligomeric state	αTh	\rightleftharpoons	$\alpha\text{Th}:\text{SVR}$	\rightleftharpoons	$[\alpha\text{Th}:\text{SVR}]_2$
αTh activity	High	–	–	–	low
SVR concentration range	nM	–	–	–	μM

Further investigation describing the detailed mechanism of noncompetitive modulation of thrombin activity by each of the possible oligomeric states, and whether the exact stoichiometric species at the biological matrix (i.e., serum) is $[(\alpha\text{Th})_2:(\text{SVR})_1]$ or $[(\alpha\text{Th})_2:(\text{SVR})_2]$ is of great interest. Moreover, we do not rule out that binding within the biological matrix (i.e., serum) might recruit other macromolecular partners.

SVR cannot be immediately used as an αTh inhibitor in therapeutic practice without improvements in its pharmacologic and biopharmaceutical properties. However, it represents an interesting scaffold for future rational drug development. The structural and thermodynamic evidence provided through the $\alpha\text{Th}:\text{SVR}$ X-ray structure is capable of modifying the SVR conformation and/or orientation from those expected from solution studies. Furthermore, the content of the asymmetric unit cell does not reflect all the possible oligomeric forms for the complex existing in solution. Additionally, our results indicate that MD simulations can provide important structural insights and that they represent an important tool for systematic analysis and refinement of crystallographic structures as well as accounting for solvent effects and the influence of other molecules in the biological environment of interest.

Acknowledgements

We would like to thank Hemotherapy Unit (HUCFF-UFRJ) for providing the human plasma used for αTh purification, Mr. José Geraldo Catarino and Mr. José Augusto Lopes da Rocha from IFSC (USP) and Dr. Tomas S. Plivelic, Fernando Q. Reis and Dr. Lucas Sanfelici for excellent technical assistance in LNS beamlines (SAS1 and MX1). This research was supported by Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, IMBEBB, INCTBEB); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro Carlos Chagas Filho (FAPERJ), PRONEX, Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNS) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

References

- [1] M.T. Stubbs, W. Bode, A player of many parts: the spotlight falls on thrombin's structure, *Thromb. Res.* 69 (1998) 1–58.
- [2] M. de Kort, R.C. Buijsman, C.A. van Boeckel, Synthetic heparin derivatives as new anticoagulant drugs, *Drug Discov. Today* 10 (2005) 769–779.
- [3] S. Srivastava, L.N. Goswami, D.K. Dikshit, Progress in the design of low molecular weight thrombin inhibitors, *Med. Res. Rev.* 25 (2005) 66–92.
- [4] S.L. Fitch, B. Bindsall, J. Babon, A.R. Dikzweid, S.R. Martin, W.D. Morgan, E. Angov, C.A. Kottihorrough, J. Feeney, M.J. Blackman, A.A. Holder, Suramin and suramin analogues inhibit merozoite surface protein-1 secondary processing and erythrocyte invasion by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 40670–40677.
- [5] S. Dhari, J. Gulbe, K. Csoka, E. Eriksson, K. Nilsson, P. Nickel, R. Larsson, P. Nygren, Antitumour activity of suramin analogues in human tumour cell lines and primary cultures of tumour cells from patients, *Eur. J. Cancer* 36 (2000) 803–809.
- [6] M.T. Musakami, E.Z. Arruda, P.A. Melo, A.B. Martinez, S. Cali-Eiras, M.A. Tomaz, B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, R.K. Ami, Inhibition of myostatin activity of *Burkholderia* sp. by the anti-trypanosomal drug suramin, *J. Mol. Biol.* 350 (2005) 406–426.
- [7] H. Ullmann, S. Meis, D. Hongwiser, C. Marzian, M. Wleis, P. Nickel, D. Comman, J.M. Boeynaems, C. Witt, R. Hausmann, G. Schmalzing, M.L. Kassack, Synthesis and structure-activity relationships of suramin-derived P2Y₁₁ receptor antagonists with nanomolar potency, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 7040–7048.
- [8] R.S. Fernandes, M. Assafim, E.Z. Arruda, P.A. Melo, R.B. Zingali, R. Q. Monteiro, Suramin counteracts the haemostatic disturbances produced by *Burkholderia jairuana* snake venom, *Toxicon* 49 (2007) 931–938.
- [9] R.Q. Monteiro, P.T. Campana, P.A. Melo, M.L. Bianconi, Suramin interaction with human alpha-thrombin: inhibitory effects and binding studies, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36 (2004) 2077–2085.
- [10] P.K. Ngai, J.Y. Chang, A novel one-step purification of human α -thrombin after direct activation of crude prothrombin enriched from plasma, *Biochem. J.* 280 (1991) 805–808.
- [11] J.W. Fenton II, M.J. Fasco, A.B. Stackrow, D.L. Aronson, A.M. Young, J.S. Filayson, Human thrombin: Production, evaluation, and properties of alpha-thrombin, *J. Biol. Chem.* 252, 3587–3598.
- [12] C.N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, T. Guy, How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, *Protein Sci.* 4 (1997) 2411–2423 1996.
- [13] I. Polikarpov, G. Oliva, E.E. Castellano, R.C. Garratt, P. Arruda, A. Leite, A. Craievich, The protein crystallography beamline at LNS, the Brazilian National Synchrotron Light Source, *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res.* A 405 (1998) 159–164.
- [14] I. Polikarpov, I.A. Pefes, R.T. de Oliveira, G. Oliva, E.E. Castellano, R.C. Garratt, A. Craievich, Set-up and experimental parameters of the protein crystallography beamline at the Brazilian National Synchrotron Laboratory, *J. Synchr. Rad.* 5 (1998) 72–76.
- [15] N. Furnham, T.L. Bhandell, M.A. DePisto, T.C. Terwilliger, Is one solution good enough? *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13 (2006) 184–185.
- [16] A. G. W. Leslie, Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography, 26 (1992).
- [17] P. R. Evans, Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography, 33 (1997) 22–24.
- [18] A. Vagin, A. Teplyaev, MOLREP: an automated program for molecular replacement, *J. Appl. Cryst.* 30 (1997) 1022–1025.
- [19] W. Bode, I. Mayr, U. Baumann, R. Huber, S.R. Stone, J. Hofsteenge, *EMBO J.* 8 (1989) 3467–3475.
- [20] W. Bode, D. Turk, A. Karshikov, The refined 1.9 Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Tip insertion segment, *Protein Sci.* 1 (1992) 426–471.
- [21] G.N. Murshudov, A.A. Vagin, E.J. Dodson, Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method, *Acta Crystallogr., D: Biol. Crystallogr.* 53 (Pt 3) (1997) 240–255.
- [22] P. Einsley, K. Cowtan, Goo: model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallogr.* D60 (2004) 2126–2132.
- [23] V. Luzzati, Traitement statistique des erreurs dans la détermination des structures cristallines, *Acta Crystallogr.* 5 (1952) 802–810.
- [24] R. Lastowski, M. MacArthur, D. Moss, J. Thornton, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Cryst.* 26 (1993) 283–291.
- [25] B.W. Bhat, Calculation of an omit map, *J. Appl. Crystallogr.* 21 (1988) 279–281.
- [26] F.M.D. Vellieux, B.W. Dijkstra, Computation of Bhat's OMIT maps with different coefficients, *J. Appl. Crystallogr.* 30 (1997) 396–399.
- [27] Collaborative Computational Project, Number 4, The CCP4 suite: programs for protein crystallography, *Acta Crystallogr.* D50 (1994) 760–763.
- [28] W. L. Delano, The PyMOL Molecular Graphics System, Delano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA (<http://www.pymol.org>), 2002.
- [29] G. Kellermann, F. Vicentin, E. Tamuz, M. Rocha, H. Tolentino, A. Barbosa, A. Craievich, I. Torricelli, The small-angle X-ray scattering beamline of the Brazilian synchrotron light laboratory, *J. Appl. Crystallogr.* 30 (1997) 880–883.

- [30] A. Guinier, G. Fournet, *Small-angle scattering of X-rays*, Small-angle Scattering of X-rays, John Wiley and Sons, NY, 1995.
- [31] D.I. Svergun, Determination of the regularization parameter in indirect transform methods using perceptual criteria, *J. Appl. Crystallogr.* 25 (1992) 495–503.
- [32] M. Grailh, M.M. Borelho, C.L. de Oliveira, L. Tomiani, S.T. Ferreira, Solution studies and structural model of the extracellular domain of the human amyloid precursor protein, *Biophys. J.* 83 (2002) 3513–3524.
- [33] E. Mylonas, D.I. Svergun, Accuracy of molecular mass determination of proteins in solution by small-angle X-ray scattering, *J. Appl. Crystallogr.* 40 (Supplement) (2007) s245–s249.
- [34] D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A.E. Mark, H.J.C. Berendsen, GROMACS: fast, flexible and free, *J. Comp. Chem.* 26 (2005) 1701–1718.
- [35] B.L. de Groot, H. Grubmüller, Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF, *Science* 294 (2001) 2353–2357.
- [36] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W. van Gunsteren, J. Hermans, Interaction models for water in relation to protein hydration, *Intermolecular Forces*, Reidel, Dordrecht, The Netherlands, 1981, pp. 331–342.
- [37] T. Darden, D. York, L. Pedersen, Particle mesh Ewald – an $N \log(N)$ method for Ewald sums in large systems, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 10089–10092.
- [38] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, A. Dinola, J.R. Haak, Molecular dynamics with coupling to an external bath, *J. Chem. Phys.* 81 (1984) 3684–3690.
- [39] D.M.F. van Aalten, B. Bywater, J.B.C. Findlay, M. Hendlich, R.W.W. Hoof, G. Vriend, PRODRG, a program for generating molecular topologies and unique molecular descriptors from coordinates of small molecules, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 10 (1996) 255–262.
- [40] H. Veril, J.A. Guimarães, Molecular dynamics simulation of a decasaccharide fragment of heparin in aqueous solution, *Carbohydr. Res.* 339 (2004) 281–290.
- [41] H. Veril, J.A. Guimarães, Insights into the induced fit mechanism in antithrombin-heparin interaction using molecular dynamics simulation, *J. Mol. Graph. Model.* 24 (2005) 203–212.
- [42] W.J. Carter, E. Gama, J.A. Huntington, Crystal structure of thrombin bound to heparin, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 2745–2749.
- [43] E. Byal, S. Gezon, V. Potapov, M. Efdelman, V. Sobolev, The limit of accuracy of protein modelling: influence of crystal packing on protein structure, *J. Mol. Biol.* 351 (2005) 431–442.
- [44] H. Veril, A. Calzans, R. Brindeiro, A. Tanari, J.A. Guimarães, Molecular dynamics analysis of HIV-1 matrix protein: clarifying differences between crystallographic and solution structures, *J. Mol. Graph. Model.* 26 (2007) 62–68.
- [45] R.M.S. Terra, J.A. Guimarães, H. Veril, Structural and functional behavior of biologically active monomeric melittin, *J. Mol. Graph. Model.* 25 (2007) 767–772.
- [46] L.T. Schulte, S.P. Colowick, The modification of yeast hexokinases by proteases and its relationship to the dissociation of the kinase into subunits, *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 2306–2316.
- [47] J.G. Hoggett, G.L. Kellert, Kinetics of the monomer-dimer reaction of yeast hexokinase P, *Biochem. J.* 287 (1992) 567–572.
- [48] G. Konnopidis, C. Holt, I. Sawyer, Invited review: beta-lactoglobulin: binding properties, structure, and function, *J. Dairy Sci.* 87 (2004) 785–796.
- [49] W.S. Bennett Jr, T.A. Steitz, Structure of a complex between yeast hexokinase A and glucose. I. Structure determination and refinement at 3.5 Å resolution, *J. Mol. Biol.* 140 (1980) 183.
- [50] P.R. Kusser, S. Krauchenco, O.A. Aizuaes, I. Polikarpov, The high resolution crystal structure of yeast hexokinase PII with the correct primary sequence provides new insights into its mechanism of action, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 20814–20821.
- [51] K.M. Oliveira, V.L. Valente-Mesquita, M.M. Borelho, L. Sawyer, S.T. Ferreira, I. Polikarpov, Crystal structures of bovine beta-lactoglobulin in the orthorhombic space group C222(1). Structural differences between genetic variants A and B and features of the Tanford transition, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 477–483.
- [52] M.V. Petoukhov, D.I. Svergun, Analysis of X-ray and neutron scattering from biomacromolecular solutions, *Curr. Op. Str. Biol.* 17 (2007) 562–571.
- [53] R. Machovich, *The thrombins*, P. 166, CRC Press, Boca Raton, FL, 1984.
- [54] F. Manetti, V. Cappello, M. Botta, F. Corbelli, N. Mongelli, N. Biasoli, A.L. Borgia, M. Ciomei, Synthesis and binding mode of heterocyclic analogues of suramin inhibiting the human basic fibroblast growth factor, *Bioorg. Med. Chem.* 6 (1998) 947–958.
- [55] M.O. Meyers, A.R. Gagliardi, G.J. Flammann, J.L. Su, Y.Z. Wang, E.A. Weltering, Suramin analogs inhibit human angiogenesis *in vitro*, *J. Surg. Res.* 91 (2000) 130–134.
- [56] M.U. Kassack, P. Högger, D.A. Gächwend, K. Kameyama, T. Haga, R.C. Graul, W. Sadle, Molecular modeling of G-protein coupled receptor kinase 2: docking and biochemical evaluation of inhibitors, *MAAPS PharmSci* 2 (2000) E2.
- [57] H. Ullmann, S. Meis, D. Hongwiser, C. Marzian, M. Wiese, P. Nickel, D. Communi, J.M. Boeyens, C. Wolf, R. Hausmann, G. Schmalzing, M.U. Kassack, Synthesis and structure-activity relationships of suramin-derived F2911 receptor antagonists with nanomolar potency, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 7040–7048.
- [58] I. Wölner, M.U. Kassack, H. Ullmann, A. Karel, M. Hohenegger, Use-dependent inhibition of the skeletal muscle ryanodine receptor by the suramin analogue NF676, *Br. J. Pharmacol.* 146 (2005) 525–533.
- [59] M.T. Murakami, L.M. Gava, S.P. Zeb, E.Z. Aranda, P.A. Melo, J.M. Gutierrez, R.K. Arni, Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of suramin, a highly charged polysulfonated naphthylsulfonamide, complexed with a myotoxic PLA2 from *Bolitoglossa ocellata* venom, *Biochim. Biophys. Acta* 1703 (2004) 83–85.
- [60] V.K. Ganesh, S.K. Mathur, S.A. Smith, G.J. Korwal, K.H.M. Murthy, Structure I bank for antagonism by suramin of heparin binding to vaccinia complement protein, *Biochemistry* 44 (2005) 10757–10765.
- [61] E. Kristiansen, K. Henrick, Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions, *Acta Crystallogr., D-Biol. Crystallogr.* 60 (2004) 2256–2268 Part 12 Sp. Iss. 1.
- [62] D. Svergun, C. Barberato, M.H.J. Koch, CRYSOLE – a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates, *J. Appl. Cryst.* (1995) 768–773.

4.3 Trabalho II

Até o presente momento, apesar da grande quantidade de estruturas 3D de trombina depositadas no PDB, nenhuma informação está disponível sobre seu estado livre. Assim, o entendimento do mecanismo envolvendo transições conformacionais quando da ligação de moléculas em seu sítio ativo ainda está em aberto. Neste contexto, e em colaboração com os professores Robson Q. Monteiro e Luis Mauricio T. Lima, ambos da UFRJ, realizamos análises comparativas da estrutura e termodinâmica do estado livre e complexado da trombina ao peptídeo D-Phe-Pro-Arg clorometilcetona (PPACK) incluindo técnicas experimentais como a avaliação do equilíbrio e perturbação da cinética química, dicróísmo circular, espalhamento de luz raios-X de baixo ângulo (SAXS – *Small Angle X Ray Scattering*) e desnaturação protéica.

Em paralelo, simulações de dinâmica molecular (DM) foram realizadas com o objetivo de caracterizar a influência do PPACK sobre a termoresistência da trombina. Os dados obtidos sugerem que a complexação ao PPACK aumenta a estabilidade estrutural da enzima quando comparado com o seu estado livre, em um processo aparentemente relacionado a alterações conformacionais nas alças ao redor do sítio catalítico, promovidas pela complexação, acarretando por sua vez em um aumento das ligações de hidrogênio intramoleculares em toda a extensão da enzima.

Análise comparativa da estrutura e termodinâmica da trombina no estado livre e complexado

Vivian de Almeida Silva, Robson Q. Monteiro, **Guilherme Menegon Giesel**, Hugo Verli, Luis Maurício T.R. Lima

In preparation, 2009

Análise comparativa da estrutura e termodinâmica da trombina no estado livre e
complexado

Vivian de Almeida Silva^{1,2,3}, Robson Q. Monteiro³, **Guilherme Menegon Giesel**⁴,
Hugo Verli^{4,5}, e Luis Mauricio T. R. Lima^{1*}

¹ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, Bss34, Ilha do Fundão, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

² Centro Federal de Educação Tecnológica em Química, Centro, 26530-060, Nilópolis, RJ, Brasil

³ Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

⁴ Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Agronomia, CP 15005, 91500-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁵ Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Santana, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

* Autor para correspondência: Luís Maurício T. R. Lima, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, Bss-34, Ilha do Fundão, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Fone/Fax: (+55 21) 2564-7380. LMauricio@ufrj.br

Resumo

Até o momento, nenhuma estrutura de trombina foi resolvida sem a presença de inibidores. Dentre os compostos capazes de inibir a trombina, o peptídeo inibidor PPACK (D-Phe-Pro-Arg clorometilcetona) é utilizado com mais frequência nos estudos a respeito da trombina, servindo também de modelo para o desenho de novos agentes capazes de inibi-la diretamente. No presente trabalho, é mostrada uma análise comparativa da estrutura e termodinâmica da trombina nos estado livre e complexado ao PPACK utilizando técnicas experimentais associadas com análises utilizando simulações de dinâmica molecular (DM). Os dados demonstram que, apesar das similaridades entre as formas livre (apo) e complexada (holo) da estrutura protéica, a presença do inibidor promove um aumento na estabilidade observada nos experimentos de desnaturação térmica sem mudanças significativas na estrutura secundária, conforme os dados de dicroísmo circular. Os dados de DM corroboram os dados experimentais, além de indicar motivos estruturais que possam levar a esse aumento da termoresistência estrutural induzida pelo PPACK. Essas informações têm implicações no entendimento das propriedades enzimáticas e na compreensão do mecanismo de inativação da trombina.

1. Introdução

A trombina é uma serino protease multifuncional que tem papel central na regulação da cascata de coagulação [1]. Sendo assim, ela tem sido foco de estudos desde a sua descoberta no século XIX [2] e continua a ter a atenção de pesquisas biomédicas na área. O entendimento de como ela desempenha o seu papel biológico deu um grande salto com a resolução do primeiro cristal de trombina [3], o qual permitiu, pela primeira vez, compreender a arquitetura de seu sítio catalítico e como ele interage com seus substratos por meio do uso de um inibidor irreversível. Desde então, cristais dessa enzima têm sido resolvidos [4,5] com o objetivo de elucidar seu mecanismo proteolítico.

A grande dificuldade encontrada no estudo estrutural dessa enzima reside no fato de que, por ser uma protease, ela acaba por envolver-se em eventos de autoclivagem, impedindo que consigamos obter informações a respeito de sua arquitetura no estado nativo. Sendo assim, os dados disponíveis a respeito de sua conformação e dinâmica estrutural estão disponíveis somente para seu estado inibido, onde não há uma avaliação sobre a influência do ligante no comportamento da arquitetura protéica. Sabe-se somente que sob ligação com o PPACK, duas alças próximas ao sítio catalítico diminuem sua exposição ao solvente voltando-se para o interior da proteína [1] quando comparada com seu estado livre em experimentos de conversão entre hidrogênio/deutério ($H/{}^2H$) amídicos (*amide hydrogen/deuterium ($H/{}^2H$) exchange*). Esses dados nos levam a crer que as propriedades estruturais obtidas para a trombina no estado inibido possam divergir das mesmas para seu estado livre em solução.

Assim, o presente trabalho apresenta uma abordagem mista, utilizando técnicas experimentais associadas a simulações de dinâmica molecular objetivando caracterizar os aspectos conformacionais da trombina, particularmente no âmbito do processo de inativação da enzima por substratos suicidas, detalhando os eventos conformacionais deste processo.

2. Metodologia

2.1. Software

As estruturas foram manipuladas utilizando os programas VMD [6] e PyMol [7]. Todas as simulações de dinâmica molecular e análises foram feitas utilizando o pacote GROMACS [8] e o campo de força GROMOS96 [9].

2.2. Refinamento estrutural e dinâmica molecular

A estrutura da trombina complexada com o PPACK foi obtida do *Protein Data Bank* sob código 1PPB [2]. Baseado nessa estrutura, dois sistemas foram simulados por 50 ns: 1) a enzima livre em solução; e 2) a trombina ligada covalentemente ao inibidor PPACK. Essas estruturas foram solvatadas em uma caixa triclínica usando o modelo de água SPC [10] cobrindo uma área até 9 Å de distância dos átomos do soluto. Contra íons (Cl^-) foram adicionados para neutralizar as cargas do sistema.

O protocolo de dinâmica empregado foi baseado em estudos prévios de DM [11]. O método Lincs [12] foi utilizado para restringir as ligações covalentes, permitindo um tempo de integração de 2 fs após uma minimização de energia utilizando o o algoritmo *steepest descents* sob condições periódicas de contorno. Os sistemas obtidos são compostos por trombina/solvente/íons e trombina/PPACK/solvente/íons e foram aquecidos lentamente da temperatura de 10 K para 343 K (70 °C) em passos de 5 ps (termalização), com cada passo tendo um aumento de 50 K de temperatura.

Temperatura e pressão foram mantidas constantes pelo acoplamento da proteína, PPACK, íons e solvente à temperatura e pressão com constantes de acoplamento de $\tau = 0.1$ e 0.5 [13]. Nenhuma restrição foi aplicada após a fase de termalização e as interações eletrostáticas foram avaliadas pelo método PME (Particle Mesh Ewald) [14] com um grid de carga com espaçamento de 1,2 Å, enquanto as interações eletrostáticas e de Lennard-Jones foram avaliadas utilizando um raio de corte de 9,0 Å para cada átomo [15]. As análises foram feitas em todo o período de trajetória, com os valores médios das energias de interação calculados para os últimos 20 ns de simulação. O programa PROCHECK [16] foi utilizado para avaliação da estrutura secundária da proteína nos sistemas estudados.

3. Resultados e discussão

3.1. Dados experimentais prévios obtidos para o sistema trombina-PPACK no âmbito do projeto

Diversas técnicas experimentais foram aplicadas sob coordenação dos professores Luis Mauricio T. R. Lima e Robson Q. Monteiro, na UFRJ, para o estudo do sistema trombina-PPACK, incluindo espalhamento de luz raio-X de baixo ângulo (SAXS – *Small Angle X ray Scattering*) [17] e experimentos de desnaturação térmica.

Embora os experimentos de SAXS não tenham identificado nenhuma alteração significativa nas propriedades estruturais globais da trombina, como raio de giro (R_g) e dimensão máxima (D_{max}) (Tab. 1), esses dados reforçam a percepção usualmente aceita de que o PPACK não induz alterações significativas na estrutura tridimensional da trombina.

Tabela 1: Parâmetros globais analisados para a estrutura da trombina utilizando a metodologia SAXS

Parâmetros estruturais	α Th	α Th -PPACK
R_g (Å)	$24,2 \pm 0,5$	$22,0 \pm 0,7$
D_{max} (Å)	75 ± 4	75 ± 4

Por outro lado, os experimentos de desnaturação térmica sugerem uma influência direta do inibidor covalente sobre o comportamento termodinâmico da enzima em solução (Fig. 1). Apesar da similaridade tridimensional, a ligação da trombina ao PPACK parece ser capaz de promover uma estabilização adicional na estrutura protéica, tornando-a menos suscetível à ação de agentes desnaturantes.

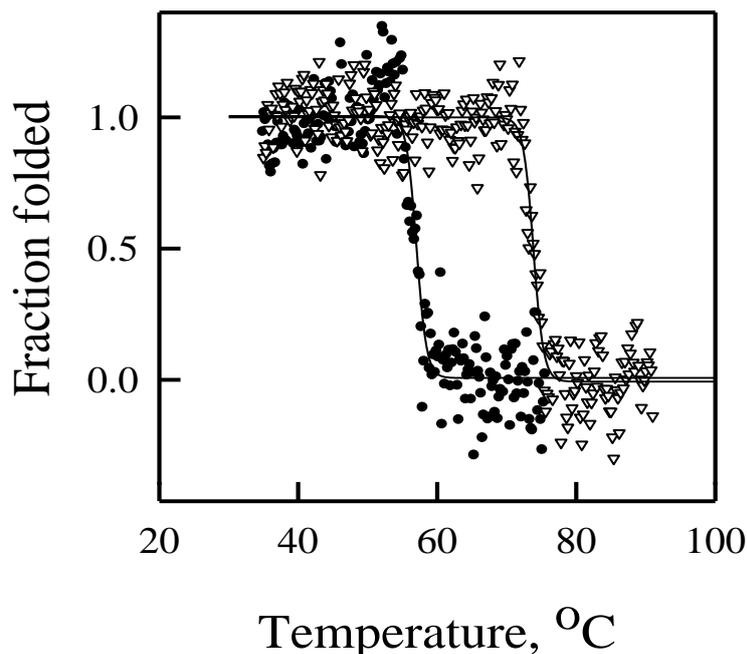


Figura 1: Curvas normalizadas de desnaturação térmica para a trombina livre em solução (círculos pretos) e para a trombina complexada ao PPACK (triângulos brancos), monitorados pelo decréscimo da elipticidade (que avalia o conteúdo da estrutura de α -hélice) em função do aumento da temperatura.

A partir destes dados empregamos simulações de DM na tentativa de elucidar as razões moleculares para o feito do PPACK sobre a dinâmica conformacional da trombina, no âmbito da presente dissertação, o que será descrito a seguir.

3.2. Estabilidade dos sistemas simulados

Em linhas gerais, a estratégia empregada neste trabalho envolveu a simulação das formas α Th e α Th-PPACK na temperatura que maximizou os efeitos termoestabilizadores do PPACK sobre o arcabouço protéico, isto é, em torno de 70 °C (vide Figura 1). Neste sentido, a complexação do PPACK acarreta em um aumento na rigidez da α Th sem grandes modificações na estrutura secundária ou no enovelamento global da proteína.

No que dizem respeito à cadeia leve, as análises de RMSD (Fig. 2A) indicam que no estado complexado a ligação com o PPACK induz a perda de sua α -hélice. Por outro lado, esse mesmo efeito parece não ocorrer quando a

trombina está livre em solução, de maneira que o PPACK pode estar induzindo um aumento da flexibilidade dessa cadeia. Fizemos as mesmas análises agora para a cadeia pesada (Fig. 2B) demonstrando que sob complexação, o RMSD de toda a cadeia diminui revelando o caráter estabilizador desse composto. Da mesma maneira, a análise para o conteúdo de estrutura secundária demonstrou que não há diferença na flexibilidade dessas estruturas para ambos os estados. Sendo assim, o PPACK parece estar conferindo um caráter mais rígido ao conteúdo de alça nessa cadeia.

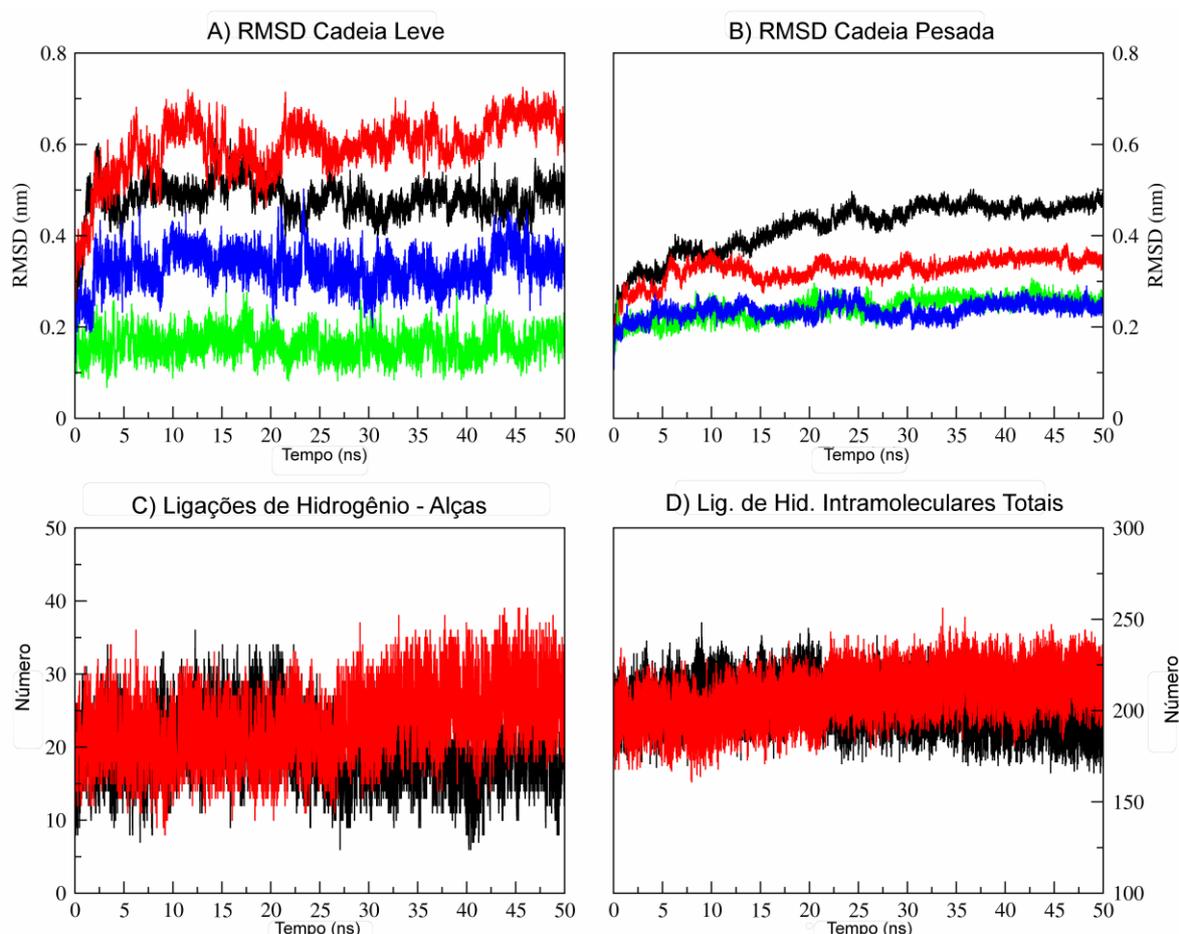


Figura 2: Propriedades estruturais globais caracterizadas pela DM. A) Valores de RMSD para a cadeia L da trombina livre em solução (curva preta), com a enzima complexada (curva vermelha) detalhando a sua estrutura secundária no estado livre (curva verde) e complexada (curva azul); B) Da mesma maneira para a cadeia H da trombina livre (preto) e complexada ao PPACK (vermelho) detalhando as análises para a estrutura secundária em solução (verde) e ligada (azul); C) Ligações de hidrogênio entre as alças nos arredores do PPACK nas condições da trombina livre (preto) e quando ligada a esse composto (vermelho);

D) Avaliação das ligações de hidrogênio intramoleculares totais para a enzima em solução (preto) e ligada ao PPACK (vermelho).

Embora as duas cadeias da α Th tenham suas flexibilidades influenciadas diferentemente pelo PPACK, a cadeia pesada parece não apresentar nenhuma modificação significativa em seu padrão de enovelamento como consequência da inibição, como verificado tanto pelo programa PROCHECK (Fig. 3) quanto pela estabilidade no raio de giro, estando essas informações de acordo com dados experimentais obtidos previamente (ver adiante na discussão geral).

PROCHECK

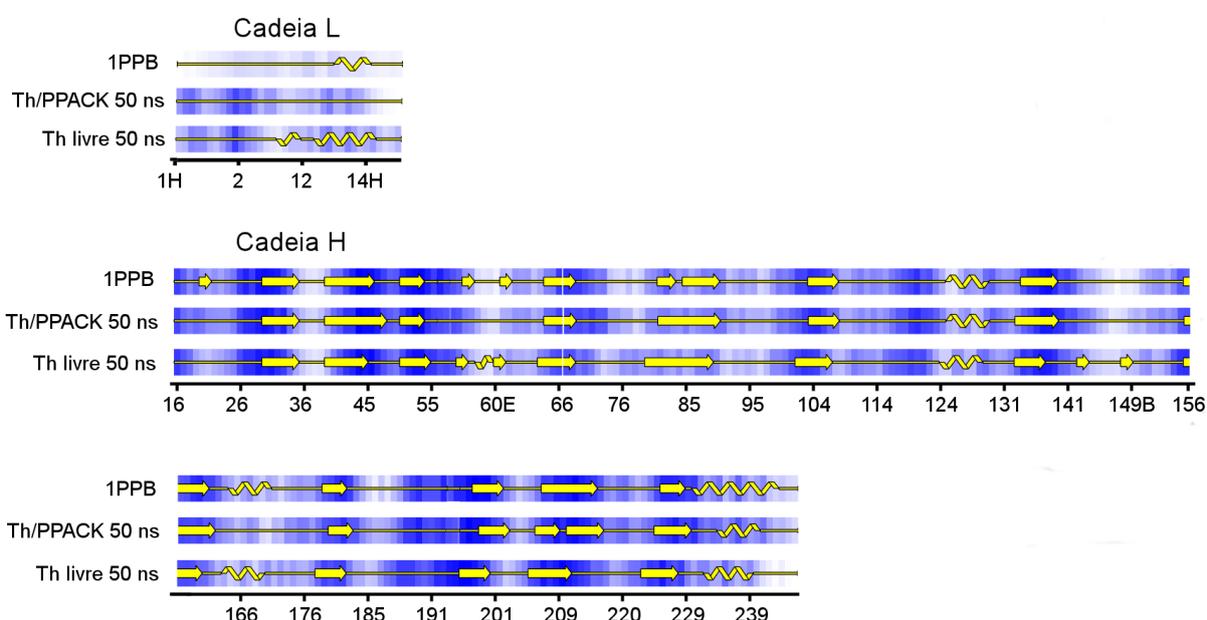


Figura 3: Análise de PROCHECK avaliando o padrão de estrutura secundária para os estados livre e complexado da trombina ao final dos 50 ns de simulação em relação à estrutura cristalográfica (1PPB).

A estrutura do PPACK parece induzir o deslocamento das alças compreendendo as sequências Gly142 a Ser153, Gly184 a Ala190 e Glu217 a Tyr225 em direção ao centro da proteína, próximos a cadeia lateral da Arg3 do PPACK (Fig. 4). Ao mesmo tempo em que essas alças se voltam em direção à proteína, essa condição parece contribuir para o aumento das ligações de hidrogênio intramoleculares (Fig 2C e 2D) no estado inibido. Essas observações

se correlacionam com o aumento da termoresistência vista quando ocorre a ligação com o PPACK, o qual mantém a estrutura similar da proteína quando comparada com a do início da simulação conforme os dados de PROCHECK.

Comparação entre os estados livre e complexado da trombina

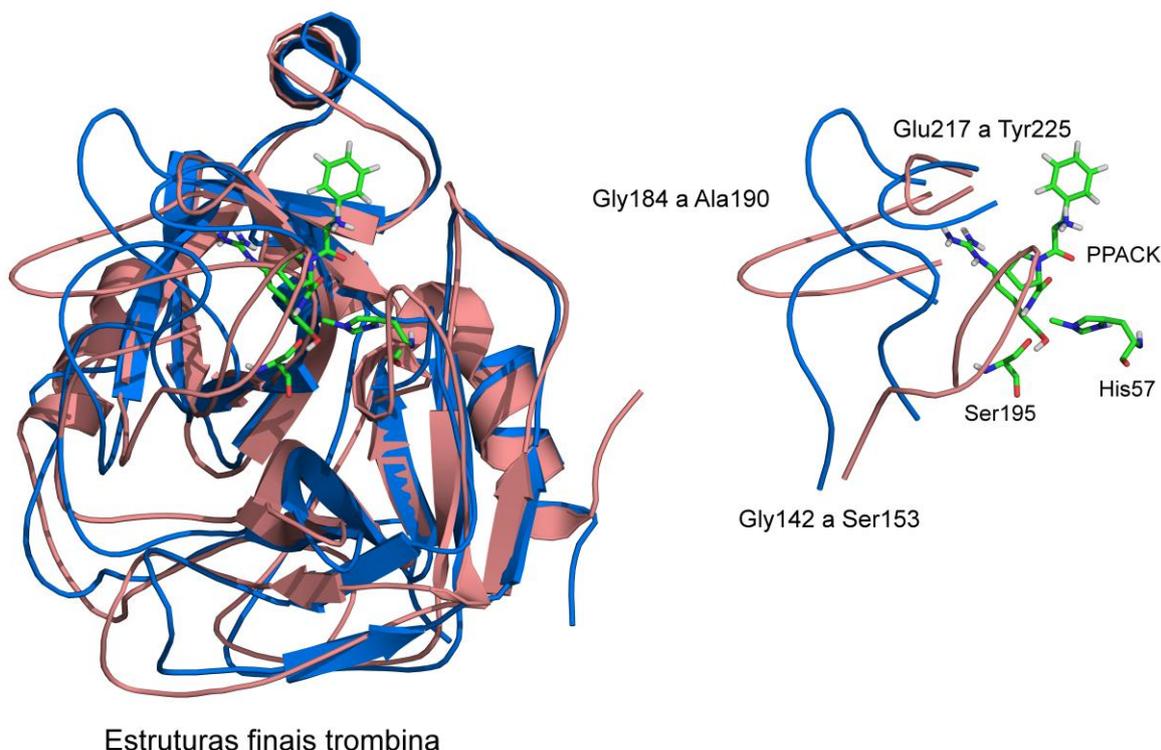


Figura 4: Comparação estrutural para ambos os estados da trombina no fim dos 50 ns de simulação para o estado livre (salmão) e complexado ao PPACK (azul). No detalhe, as alças que mudam a sua orientação em função da presença do PPACK contribuindo no aumento das ligações de hidrogênio intramoleculares.

3.3. Forças participantes na estabilização da trombina

Durante todo esse processo dinâmico de inibição, a quantificação da contribuição de forças específicas no processo de inativação enzimática pelo PPACK pode ser realizada, como a interação intramolecular dos resíduos de aminoácidos constituintes da estrutura da trombina entre si e a interação entre esses mesmos resíduos e o solvente. Nesse sentido, calculamos a energia de interação como sendo a média \pm desvio padrão dos últimos 20 ns de simulação, uma vez que os primeiros 30 ns são levados em consideração no contexto de uma fase de equilíbrio dessas forças (Tab. 2).

Tabela 2: Energias de Interação obtidas para ambos os estados da trombina (kJ/mol)

	Intramolecular	Solvente
Trombina livre	13.522 ± 230	-17.809 ± 431
Trombina/PPACK	12.995 ± 210	-16.678 ± 374

Como pode ser observado, o estado inibido da trombina mostra um perfil de diminuição do valor da energia de interação entre os aminoácidos constituintes de sua estrutura, caracterizando um estado fisiológico de maior rigidez. Ao mesmo tempo fica demonstrado um perfil de aumento do valor da interação com o solvente, caracterizando um estado fisiológico onde o água interage menos com a proteína. Esses eventos estão intimamente associados ao aumento do número de pontes de hidrogênio intramoleculares complementando e corroborando os dados que descrevem o processo de enrijecimento da proteína quando complexada ao PPACK, causando a elevação de sua termoresistência.

4. Conclusões

Mesmo que a formação de complexos ligante-receptores seja capaz de promover consideráveis rearranjos conformacionais nas estruturas protéicas [18], isso não parece valer para a trombina. Em acréscimo aos dados cristalográficos obtidos até o momento, as informações obtidas no presente trabalho para a enzima em solução sugerem estruturas globalmente similares nas formas livre e complexada. Dados obtidos por SAXS para propriedades como raio de giro e o caráter globular da proteína não se alteram com a presença do ligante, em um perfil reproduzido nas simulações de DM realizadas. De fato, vários cristais de trombina contendo PPACK como inibidor [3,5,19] ou cristais de trombina mutantes para inativação de sua atividade catalítica sem a presença de ligantes [4,5] compartilham uma grande semelhança entre suas estruturas (RMSD C α < 0,8 Å).

Apesar da semelhança entre as estruturas tridimensionais, a presença do PPACK promove algumas alterações de ordem termodinâmica conforme os dados de desnaturação térmica quando está ligado à enzima conforme demonstrado na Figura 1. Este processo foi explorado em nível atômico

empregando as simulações de DM, confirmando a manutenção da estrutura globular da α Th na presença do ligante concomitante a uma reorientação local das alças próximas ao sítio catalítico. Tal mudança na dinâmica de alças parece ser capaz de promover um aumento das ligações de hidrogênio intramoleculares na α Th e a diminuição da energia de interação com o solvente. Essas informações lançam luz sobre os eventos observados experimentalmente, onde a trombina adquire uma maior resistência a processos desnaturantes como consequência de sua inibição.

5. Referências

- [1] – Croy, C.H., Koeppe, J.R., Bergqvist, S. and Komives, E.A. (2004) Allosteric changes in solvent accessibility observed in thrombin upon active site occupation. *Biochem.* 43, 5246-5255
- [2] – Ratnoff, O.D., Ratnoff, O.D. and Forbes, C.D., eds. The evolution of knowledge about hemostasis. *Disorders of Hemostasis*. 3rd edn. Philadelphia: WB Saunders Company, 1996
- [3] - Bode, W., Turk, D. and Karshikov, A. (1992) The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe–Pro–Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure–function relationships. *Protein Sci.* 1, 426–471
- [4] - Pineda, A.O., Carrell, C.J., Bush, L.A., Prasad, S., Caccia, S., Chen, Z.W., Mathews, F.S. and Di Cera, E. (2004) Molecular dissection of Na⁺ binding to thrombin. *J.Biol.Chem.* 279, 31842-31853.
- [5] - Pineda, A.O., Chen, Z.W., Bah, A., Garvey, L.C., Mathews, F.S. and Di Cera, E. (2006) Crystal structure of thrombin in a self-inhibited conformation. *J. Biol. Chem.* 261, 32922-32938.
- [6] Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K. (1996) VMD – visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14, 33–38 <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>.
- [7] DeLano, W.L. (2002) *The PyMOL Molecular Graphics System*, DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA, <http://www.delanoscientific.com>.
- [8] van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., van Buuren, A.R., Apol, E., Meulenhoff, P.J., Tieleman, D.P., Sijbers, A.L.T.M., Freenstra, K.A., van Drunen, R. and Berendsen, H.J.C. (2005) *GROMACS user manual 3.3*. <http://www.gromacs.org>.

- [9] van Gunsteren, W. F., Billeter, S.R., Eising, A. A., Hünenberger, P.H., Krüger, P., Mark, A.E., Scott, W.R.P. and Tironi, I.G. (1996) Biomolecular Simulation: The GROMOS96 manual and user guide.
- [10] Berweger, C.D., van Gunsteren, W.F., Müller-Plathe, F. (1995) Force field parametrization by weak coupling. Re-engineering SPC water. *Chem. Phys. Lett.* 232, 429-436.
- [11] de Groot, B.L. and Grubmüller, H. (2001) Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science* 294, 2353–2357.
- [12] Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H.J.C. and Fraaije, J.G.E.M. (1997) LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* 18, 1463–1472.
- [13] Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., DiNola, A. and Haak, J.R. (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* 81, 3684–3690.
- [14] Darden, T., York, D. and Pedersen, L. (1992) Particle Mesh Ewald –an $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* 98, 10089–10092.
- [15] Norberto de Souza, O. and Ornstein, R.L. (1999) Molecular dynamics simulations of a protein–protein dimer: particle–mesh Ewald electrostatic model yields far superior results to standard cutoff model. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 16, 1205–1218.
- [16] Laskowski, R., MacArthur, M., Moss, D., Thornton, J. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.* 26, 283–291.
- [17] - Kellermann, G., Vicentin, F., Tamura, E., Rocha, M., Tolentino, H., Barbosa, A., Craievich, A. and Torriani, I. (1997) The small-angle X-ray scattering beamline of the Brazilian synchrotron light laboratory. *J. Appl. Crystallog.* 30, 880-883
- [18] Banner, D.W. (2003) Principles of enzyme-inhibitor design in “Methods and Principles in Medicinal Chemistry Volume 19: Protein-ligand interactions – From molecular recognition to drug design” Edited by H.-J. Böhm and G. Schneider. Wiley-VCH, pg 163-185
- [19] Bode, W., Mayr, I., Baumann, U., Huber, R., Stone, S.R. and Hofsteenge, J. (1989) The refined 1.9 Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment. *EMBO J.* 8, 3467-3475.

4.4 Trabalho III

A mudança na conformação e flexibilidade de uma cadeia polipeptídica durante uma simulação de DM é usualmente caracterizada por análises de RMSD e RMSF. Contudo, enquanto a primeira estratégia apresenta uma perspectiva da variação da estrutura protéica, a partir do referencial cristalográfico, como uma função do tempo, a segunda oferece uma análise da variabilidade da posição dos aminoácidos durante toda a simulação. Assim, enquanto no RMSD em geral não se observa o comportamento de aminoácidos específicos, no RMSF não se observa a dependência da flexibilidade de cada resíduo no tempo da simulação.

Neste contexto, apresentamos uma estratégia que busca combinar características das duas abordagens, conferindo à análise de RMSF uma resolução temporal, denominada tRMSF (*temporal RMSF*). Este procedimento vem sendo aplicado em diversos trabalhos do grupo, nos quais se apresentou como um procedimento simples e capaz de oferecer informações importantes sobre a flexibilidade e equilíbrio em diferentes sistemas moleculares. Merece destaque a facilidade com que permite observar a equilíbrio em diferentes regiões do esqueleto peptídico e, assim, a evolução da flexibilidade nestas regiões. Estes casos são discutidos, assim como a contribuição advinda do emprego da análise de tRMSF.

tRMSF - a protein flexibility analysis in molecular dynamics as a function of both time and residue

Guilherme Menegon Giesel, Hugo Verli

In preparation, 2009

tRMSF: a protein flexibility analysis in molecular dynamics as a function of both time
and residue

Giesel, G. M.¹, Verli, H.^{1,2*}

¹Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av, Bento
Gonçalves 9500, CP 15005, Porto Alegre 91500-970, RS, Brazil.

²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av,
Ipiranga 2752, Porto Alegre 90610-000, RS, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +55-51-3308-7770; fax: +55-51-3308-7309; e-mail
address: hverli@cbiot.ufrgs.br (Hugo Verli)

Abstract

Determination of protein structures and motions is one of the principal goals in bioinformatics. Despite several methodologies used to this objective, these models cannot describe with sufficient accuracy its conformational movements and flexibility. The computational approaches, especially, molecular dynamics simulation (MD) provide insights about structural characteristics at atomic resolution, but even so, lacking resolution at least one level, or time or residue. To overcome this limitation and provide full access even to slight structural movements, we developed tRMSF methodology, able to access conformational feature information, residue and time values simultaneously, and performed such analysis in a set of proteins and glycoproteins systems showing that a full trajectory average analysis can hide movements identified in tRMSF plot helping explain motion events upon tight conformational alterations.

Key words: RMSF, molecular dynamics, protein flexibility, GROMACS analysis.

1- Introduction

A detailed understanding of protein functions is a goal of bioinformatics in the post-genomic era. The protein function is closely related to the structure and conformational mechanics in its physiological environment. To understand this process, several methodologies have been developed in order to elucidate the 3D structure of biological entities. Traditionally, X-ray diffraction crystallography has been used to determine atomic structures, but nowadays, methodologies like nuclear magnetic resonance (NMR) and electron microscopy (EM), improved the capacity of generating structural information of biological molecules [1]. Although these techniques primarily access the protein core structure, numerous events are still not explained, such as enzymatic activity, folding, binding and molecular recognition. These events are strongly related to protein motions and fluctuations, and implicate on its biological function [2].

For a long period, the protein movement characterizations at atomic level were not possible. Recently, we have experienced a significant improvement of the computational tools that lead us to a better understanding of structure and function of complex biological systems, in terms of conformational description through time and at atomic resolution. Among these computational tools, molecular dynamics simulations (MD) have been considered one important technique to investigate protein behavior at atomic resolution technique and low cost [3-5]. This methodology comes to supplement structural biology appliances, lightening biological events that undergo to conformational changes.

However, even at atomic resolution, common protein analyses lack resolution at least at some level. Several strategies may be employed to infer the behavior of a given protein in MD, being the root mean square deviation (RMSD) the most frequent analysis used. RMSD provides a description of the protein flexibility and conformational change as an average over all amino acid residues, at each snapshot simulation. As a global analysis, it lacks residue resolution. Other analysis, as the root mean square fluctuation (RMSF), which supplies a global perspective of the protein flexibility, at a residue level, has an average characteristic over the entire simulation, therefore lacking time resolution.

In this sense, the use of a tool capable to describe the protein structure profile, assembly into a simple analysis instrument unifying and correlating time, residue and conformational feature may be useful to elucidate alterations and conformational

events as masked by an initial full trajectory average analysis. In this context, our group had developed a combined strategy, named temporal RMSF (tRMSF), adequate to describe, in a single contour plot, the protein dynamics at time and residue details. Here we present tRMSF application to some proteins and glycoproteins, showing its useful capability to data mining approach, not only allowing the achievement of a picture of each system dynamics, equilibration and periodicity of movements within MD trajectories, but also supporting the identification of possible regions involved in sensible biological events.

2- Methodology

2.1- RMSF and tRMSF

In order to describe the protein dynamic behavior in a MD, we performed RMSF analysis, component of GROMACS simulation suite [6]. The common RMSF analysis shows, in a single plot, the RMSF average value by residue over the whole dynamics. In tRMSF, the fluctuation measurements are performed to each time predetermined intervals, composing the resolution. In tRMSF context, resolution comprises short dynamics periods where RMSF test is performed divided total dynamics time to several parts.

2.2- Constructing the tRMSF plot

This protocol creates large text files content, comprising RMSF value for each amino-acid in the specified trajectory time intervals (resolution). Subsequently, it concatenates all files in a single text file containing all information to construct a table with three columns: time, residue and RMSF value. These columns will constitute X, Y and Z coordinates in tRMSF graphic. We used the SigmaPlot program [7] to import and plot this data, creating a tRMSF contour plot that allow an simultaneous access to the time, residue number and RMSF value at any MD snapshot.

3- tRMSF applications

The examples below show the tRMSF protocol application in some protein systems studied by our group in last four years. The antithrombin/heparin interaction [8] study work that employed methodology revealing its ability to describe the relative

mobility of different regions of antithrombin (AT). In this study we demonstrated the conformational requirements to increase AT activity induced by glycan.

The study of water-soluble toxic peptide melittin [9], investigating the conformation of the peptide on both monomeric and oligomeric forms under different solvents, peptide concentrations, ionic strength and pH conditions showed the differences between physiologic and crystallographic conformations elucidating the oligomeric organization of melittin in biological solutions.

Characterization of HIV-1 matrix protein p17 [10] elucidating the molecular basis for the differences between X-ray and NMR structures and, in the context of the molecular assembly of HIV-1 Gag proteins, mapping conformational features responsible for its virulence activity may have relevant implications in the determinants of virion behavior during cellular infection at the atomic level.

The description of glycoproteins and glycopeptides conformational ensembles [11] to understand the three-dimensional structure and the dynamical properties of both protein and carbohydrate moieties. This data, allow us a better understanding of the molecular basis of their interaction with each other, with the surrounding environment, and with their molecular targets evaluating the effects of glycosylation upon the protein moiety of the glycoproteins.

As the last example, we present the study of SufU [Fe-S] protein clusters [12]. These proteins are ubiquitous and precursor of inorganic prosthetic groups involved in the maturation of cellular Fe-S proteins. In this context, tRMSF helped explain the structural and conformational requirements of *Enterococcus faecalis* SufU protein in interacting with other factors and/or regulators in maturation of cellular Fe-S proteins serving as template of SufU clusters studies in Gram-positive bacteria.

3.1- Antithrombin

The anticoagulant activity of heparin and other negatively charged glycosaminoglycans is due to the activation of a plasma protein called antithrombin (AT). This protein belongs to the serpin (serine proteinase inhibitors) protein family and is responsible for the inhibition of physiologically active plasma serine proteinases like factor IIa and factor Xa [13,14]. The reactive bond that interacts with the active site of target proteinases lies on a loop denoted as reactive center loop (RCL), which corresponding to residues Asn376 to Arg393 in the AT structure.

In the native conformation, the RCL lies outside the tertiary core of the serpin main structure, i.e. in a solvent-exposed environment. However, in crystallographic structures this region is often involved in protein–protein contacts [15–17], already reported as essential for a good resolution in three-dimensional structure [18].

In order to access the relative mobility of different regions of AT induced by heparin mimetic compounds, tRMSF methodology was employed considering the AT macromolecule free in solution and complexed to synthetic pentasaccharide [8] (Fig. 1).

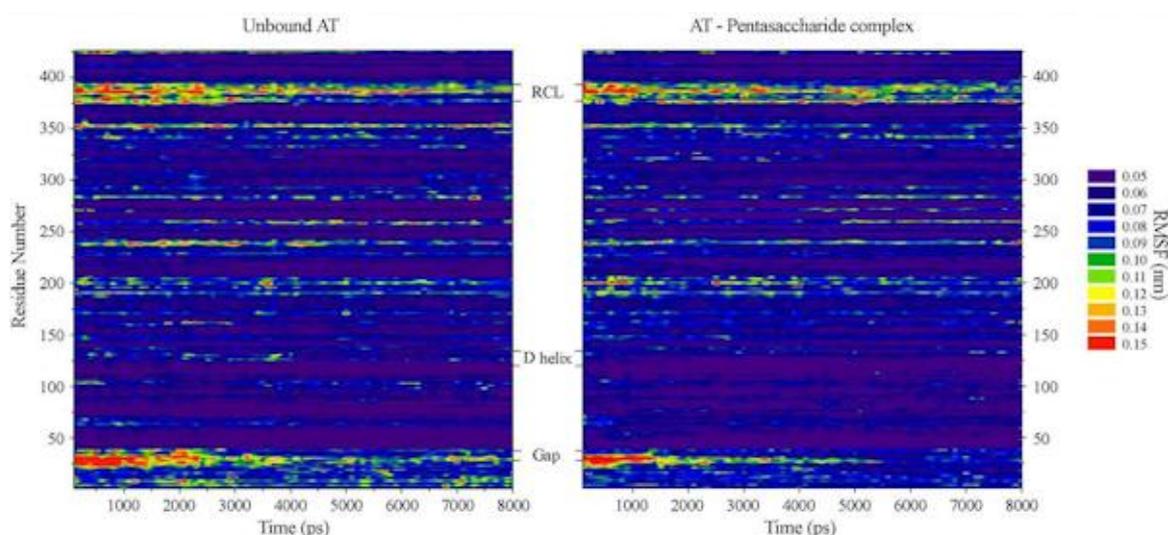


Figure 1: RMSF as a function of both residue number and time for unbound AT and AT–pentasaccharide complex. The regions corresponding to the loop-comprising residues Lys28–Glu37 (Gap), D-helix and the reactive center loop (RCL) are also presented [8].

As can be seen, tRMSF shows a detailed profile about equilibration of the simulated systems with remarkable distinct fluctuations over different regions of AT. The regions defined by the RCL and by the N-terminal loop (residues Lys28 to Glu37), present the longest equilibration time of the entire protein. While the RCL keeps a high flexibility over the entire trajectory, the loop 28–37 accommodates in solution after 2-3 ns, depending on the AT complexation state.

Therefore, this equilibration period of 2-3 ns represents the loop rearrangement to its solution conformation. However, it is interesting to observe that the loop 28–37 presents lower flexibility in the complexed AT when compared to the unbound AT. At the same time, the RCL flexibility is greater in the complexed form of AT than in the free protein. In this context, we consider the possibility that the

mentioned RMSF profile is due to pentasaccharide effects over AT: (1) stabilizing the sequence comprised between Lys28 and Glu37; and (2) increasing the flexibility of the RCL. In other words, the conformational modifications expected to be induced in AT by pentasaccharide, which results in the potentiating effect of its inhibitory activity, could be observed and predicted by MD simulations through tRMSF profile.

3.2- Melittin

Melittin is a well-known water-soluble toxic peptide present in bee venom of *Apis mellifera*, comprising about 50% of its dry weight. This peptide is able to disrupt membranes, producing many effects on living cells [19,20]. Like other amphiphilic α -helical peptides, melittin has an antibacterial activity. It induces voltage-gated channel formation and can also produce micellization of phospholipids bilayers due to its membrane-interacting effect [19,21,22].

The molecular mechanism underlying melittin interaction with biological membranes and lipid bilayers is not well understood. Moreover, it seems that different molecular mechanisms could generate different actions of the peptide [21]. Despite several structural informations about melittin, there are contradictions between structural and biochemical data that has not been explained or correlated to conformational and functional data by any molecular model so far.

To investigate the conformation of the peptide on both monomeric and oligomeric forms and under different solvents, peptide concentrations, ionic strength and pH conditions, we performed molecular dynamics simulation of melittin using its crystallographic structure [23] as starting point. In this way, three simulations were performed: (1) 23.5 mM melittin, 120 mM chloride ions, pH 7.0; (2) 54.6 mM melittin, 273 mM chloride ions, pH 7.0; (3) 23.5 mM melittin, 120 mM chloride ions, pH 11.0.

The structural data from MD runs lead us to the suggestion that, in plasma, melittin should not be in a tetrameric or a dimeric oligomerization state, but is probably present as a monomeric peptide [9]. Considering the lack of stability of the peptide oligomeric states under physiological-like conditions (condition 1) and aiming to correlate these data to the peptide's helical content, we investigated the behavior of monomeric melittin under a number of different conditions showing that pH has a critical effect on the stabilization of the helical structure of melittin. To better understand this behavior, we used the tRMSF idea, to perform the analysis of the ellipticity parameter [24], using same rules to construct plot.

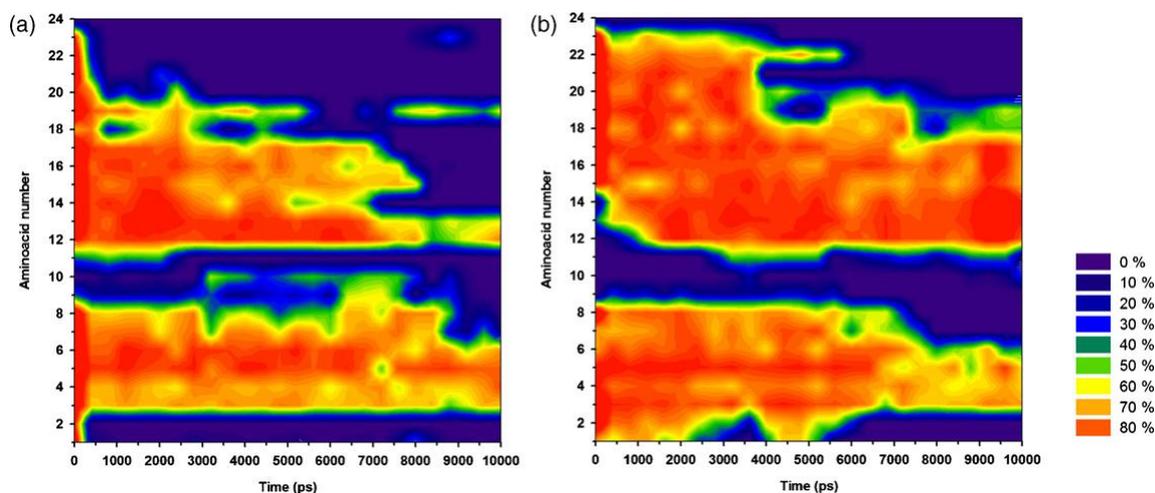


Figure 2: Ellipticity maps of monomeric melittin as a function of time and amino acid number. (a) 26.5 mM melittin, 50 mM Cl⁻, pH 7.0. (b) 26.5 mM melittin, 120 mM Cl⁻, pH 7.0 [9].

As can be seen, molecular dynamics simulations correctly reproduce experimental data: loss of the helical character is observed when the peptide is exposed to pH 7.0, being the secondary structure almost completely recovered upon increasing ionic strength (Fig. 2). As shown there, the conformation of melittin can be highly influenced by physical–chemical conditions, inducing the peptide to adopt a diversity of forms under different environments.

As a consequence, the helical structure observed in crystallographic and NMR data for this peptide should be interpreted as a consequence of both high salt and melittin concentrations. In this context, the ellipticity plot suggests that in physiological medium such as human plasma, melittin should assume a monomeric form, mostly unfolded. Such data show that the tetrameric organization of melittin is not possible in plasma, but only in extreme physical–chemical conditions observing that the peptide is not a perfect helix, but a random structure at pH 7.0 in physiological ionic strength [9].

3.3- p17

The structural features of the mature HIV-1 virion include a lipid bilayer envelope, surface glycoproteins (gp120) anchored to the virus through interactions with a transmembrane protein (gp41), a matrix shell (p17), and a conical capsid core (p24). The HIV-1 matrix protein (p17) is a structural molecule, partially globular, composed by five α -helices. The helices H1, H2 and H3 are organized around the

central and buried H4, while H5 is projected from the packed helical bundle, making the C-terminal region of the protein distinct from its globular N-terminal [25-27]. Additional elements on the secondary structure of this protein include the 310-helix H2' and the mixed α /310-helix H3' [28].

Previous studies had reported a 0.6 nm displacement of the short helix H3' when comparing X-ray and NMR structures and such displacement was interpreted as a physiologically relevant conformational change that occurs during virion assembly and disassembly [29].

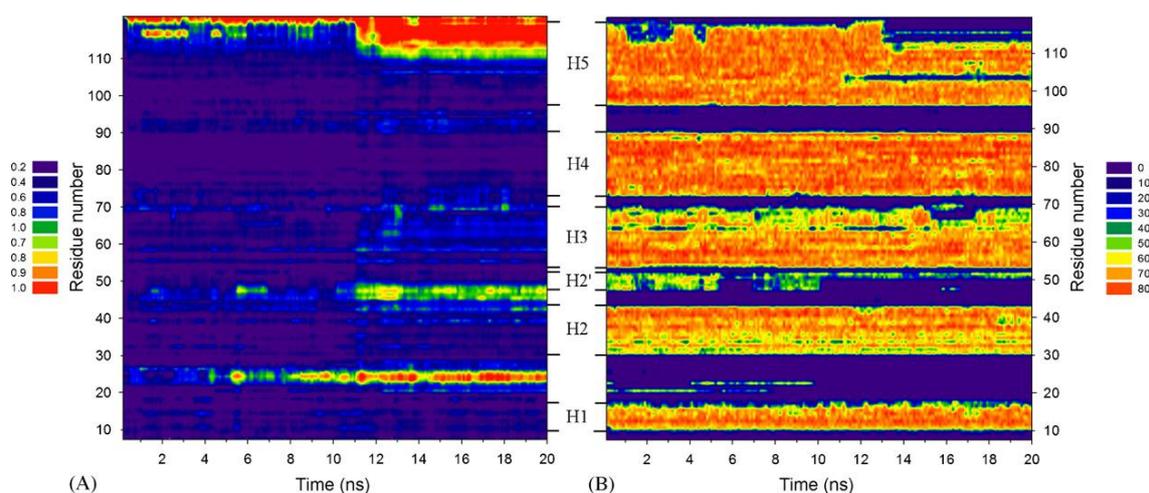


Figure 3: (A) All-atom RMSF (in nm) from crystal structure, as a function of both residue number and time; (B) ellipticity at 222 nm (in %, the percent of time in which the residue present a helical character), as a function of both residue number and time [10].

Preliminary analysis shows a significant increase in deviation from crystal structure about 0.5 nm in the H5 helix [10]. Such deviations are originated in the helical content of p17, as can be observed from the ellipticity fluctuation [24] (Fig. 3B). After the first 10 ns, an increase in the flexibility at H5 from the C-terminal portion can be clearly observed and, consequently, a lost of its helical character. At the end of simulation, H5 is two turns shorter and changed its conformation from X-ray towards the NMR described conformation [10]. As shown in Fig. 3B, H2' appears to be quite unstable, being completely lost after 10 ns of MD simulation. Conversely, H3' appears to refold into a α -helix and to merge with H3 (Fig. 3B) indicating that, while possibly involved in conformational changes during viral assembly, such structure is highly flexible (Fig. 3A) and could co-exist in multiple conformational

states in solution. These observations corroborate to move from the X-ray structure to the NMR determined conformation of p17 [10].

These data clearly indicate that the origin of the high deviation from crystal structure is due to conformational changes in H5, but not to distortions in the globular part of the matrix protein. Applying the tRMSF procedure to complement previous data, demonstrate that, in fact, the main region of the protein distorted during MD is the C-terminal portion of H5, where a sequence of at least eight amino acids residues is responsible for a deviation of about 0.9 nm from the crystal structure (Fig. 3A). Such deviations are originated in the helical content of p17, as can be observed from the ellipticity fluctuation (Fig. 3B). The increase in the flexibility at H5 C-terminal portion can be clearly observed and, consequently, a lost of its helical character [10].

3.4- EGF-like domain, CD59, hsCD2105 and α -hCG

Glycoproteins and glycopeptides are known to play important roles in many biological events, such as cell adhesion, cell–cell communication, immune response, intracellular targeting, and protease resistance [30,31]. Considering the difficulties associated with the experimental determination of glycoproteins structure and conformation, MD simulations have been used to clarify the dynamic aspects of macromolecules. Although the biological functions of glycosylation are still not completely understood, it is known that the glycan moieties of glycoproteins are fundamental to many biological processes, and are also involved in protein folding and/or stabilization [30,31]. In this sense, we intended to adequately represent the conformational ensemble of glycoproteins EGF-like domain, CD59, hsCD2105 and α -hCG through MD simulations in aqueous solutions analyzing the effects of glycosylation upon these protein moieties [11].

In this context, we performed an analysis of the influence of glycosylation on the dynamics and conformation of the protein moiety displaying its influence in these protein structures through tRMSF plot (Fig. 4). As can see, EGF-like domain present a difference in flexibility between glycosylated and non-glycosylated proteins observed around residues 56–59 (Fig. 4A and B), suggesting that the recognition of EGF-like domains by the O-fucosyltransferase, responsible by glycosylation, may be associated with an entropic driven process.

Like observed for the EGF-like domain, CD59 show no major influence induced by glycan binding, with tRMSF analyses of the simulated proteins supporting

a decreased flexibility in the region of the N-glycan attachment, around Asn18 (Fig. 4C and D).

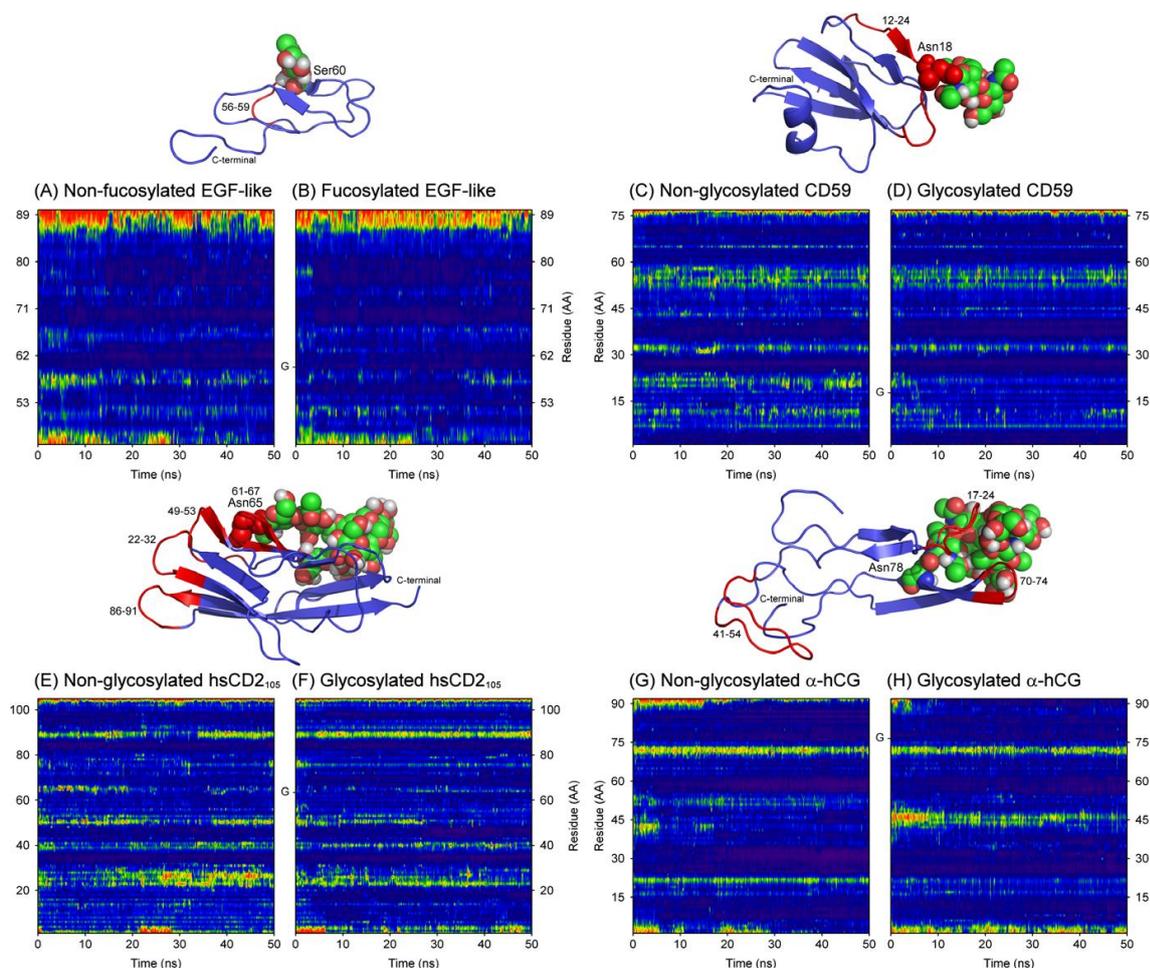


Figure 4: Root mean square fluctuation (RMSF) for the studied proteins, as a function of both residue number and time: EGF-like, in its non-fucosylated (A) and fucosylated (B) forms (from 0.04 to 0.24 nm); CD59, in its non-glycosylated (C) and glycosylated (D) forms (from 0.03 to 0.18 nm); hsCD2105, in its non-glycosylated (E) and glycosylated (F) forms (from 0.04 to 0.16 nm); and the α -hCG, in its non-glycosylated (G) and glycosylated (H) forms (from 0.05 to 0.35 nm) [11].

In hsCD2105, the NMR data suggest that the N-linked glycan at Asn65 is required for adhesion functions, because it stabilizes protein folding by counterbalancing an unfavorable clustering of five positive charges centered on Lys61. Such an effect appears to be observed in MD simulations, because the region around these residues presents decreased flexibility upon glycosylation, as well as near regions comprising residues 22–32, 49–53, 61–67, and the N-terminal (Fig. 4E and F) domain. However, they have shown neither antibody- nor ligand-binding

activity, suggesting that the N-linked glycan on hsCD2105 plays an important role in the function of this protein. In addition, the NMR studies suggested that protein–carbohydrate interactions may be involved in mediating the CD2 interaction with CD58 which should mainly involve the amino acids 32–34, 43–51 and 86–91 of hsCD2105. Accordingly, the residues around these regions concentrate the main differences in protein flexibility upon glycosylation (Fig. 4E and F) [11].

In α -hCG, the glycosylation influence is evident in the loop between residues 33–58. This loop is known to exist in free α -hCG, based on NMR studies, and seems to adopt a increased flexibility in the glycosylated protein (Fig. 4G and H). As a general feature, glycosylation of the hCG α -subunit at Asn78 seems to play an important role in the stabilization of the protein by exerting a protective function through shielding the protein surface from the environment, including residues around 23–26 and 68–70. Therefore, from the MD simulations, we could observe a stabilization of such regions, especially 23–26, as observed in tRMSF analysis (Fig. 6G and H) [11].

These approaches supplement previous obtained and reinforce that the glycosylation have different influences in protein flexibility participating in its biological events or guiding this process [11].

3.5- SufU [Fe-S] cluster protein

Iron-sulfur [Fe-S] clusters are simple inorganic prosthetic groups that are widely distributed in nature and play essential roles in diverse biological processes such as electron transfer, redox and nonredox catalysis, gene regulation and as sensors within all living organisms [32-35]. The functions of the [Fe-S] cluster assembly machineries include the mobilization of $\text{Fe}^{2+/3+}$ and S^{2-} elements from apoproteins storage sources, their association into an [Fe-S] bound form and its transport and transfer to the final molecular destinations. The machinery of [Fe-S] biogenesis and maturation is represented by at least three distinct, yet structurally and functionally related systems, designated NIF, ISC, and SUF being the SUF system important to sulfur assimilation.

The SUF system has been linked to virulence in several microorganisms [36] however, no structural information has been available related to proteins present in microorganisms belonging to the *Firmicutes* phyla. Here we present an *in silico*

conformational study of *E. faecalis* SufU cluster structure constructed by homology using *S. pyogenes* SufU structure as template [12].

Both, model and template were submitted to 50 ns MD showing that their conformation in dynamics differs from initial structure. Such increase in protein flexibility appears to be related to the N-(residues 1 to 38) and C-terminal, as called GPR (Gram-positive region), (residues 95 to 136) portions. Looking through the tRMSF analysis perspective (Fig. 5) we can confirm the role of both N-terminal and GPR in SufU flexibility. *E. faecalis* SufU showed alterations in the GPR, but in a lesser degree than in *S. pyogenes* SufU. Areas related to the active sites of SufU showed higher flexibility too, especially the ones related to residues Cys35, Asp37 and Cys60, and areas between residues 20 to 25, and 40 to 45.

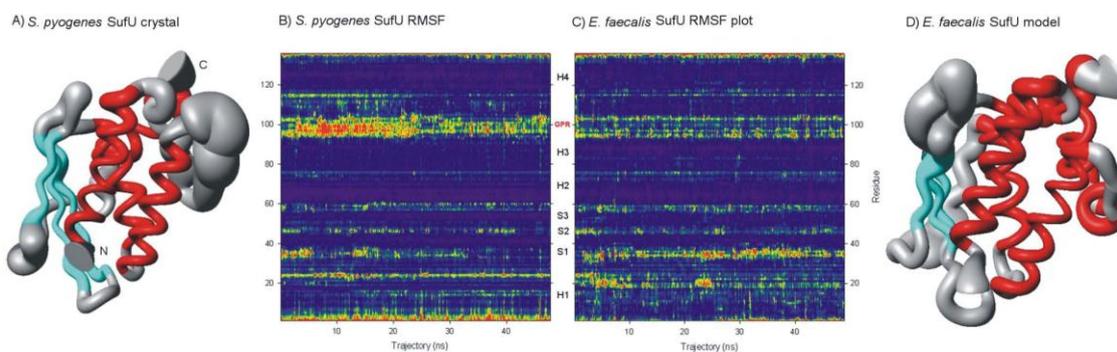


Figure 5: Sausage plot for (A) template *S. pyogenes* SufU and (D) model *E. faecalis* SufU proteins. The thickness presented is directly related to the flexibility in the area. Loops are presented in gray, α -helices in red and β -strands in blue. Root Mean Square Fluctuation (RMSF) analysis, as a function of both residue number and time for (B) template *S. pyogenes* and (C) *E. faecalis* SufU proteins, presenting the four α -helices (H), the three β -strands (S), and the GPR region [12].

Additionally, we can notice that those residues are circumventing the active site residues, explaining that flexibility required for cluster formation is related to the active site of the protein, and modifications established in these regions are essential for enzyme activity [12].

4- Conclusion

A few years ago, analysis focused in protein and other biological compounds aiming to clarify their structures and conformations, were limited to some techniques restricted to static models. The advent of computational approach in biological

systems gave atomic resolution about them and also was capable to improve the accuracy on describing conformational ensemble in physiologic environment along temporal dimension.

Computational analysis employed, provide a large amount of physical and structural data. Analysis about them was generally calculated for the entire data set, leading to an evaluation of an average behavior. Nevertheless, some slight structural events occurring within trajectory were not detected.

With this purpose, here we demonstrated the use of new tool employed to describe flexibilities and motions with time and residue resolution called tRMSF. This approach can explain, with accuracy, movements not shown by common full trajectory analysis, contributing to understand and interpret a global data obtained by another methodology. Furthermore, we can use the tRMSF methodology to represent the system in terms of their atoms, residues or selections to better demonstrate their properties.

However, not only in RMSF we can apply 3D plot. Others analysis, can be explained by constructing tridimensional graphics as ellipticity, previously showed. In this sense, all tools describing conformational feature, time, residue and/or atom can be used to construct 3D plot like tRMSF. Together, such analysis may provide, more details in conformational behavior explaining panoramic structural motions details with residue or atom resolution.

5- Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq #472174/2007-0), MCT, and by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), MEC, Brasília, DF, Brazil.

6- References

- [1] – Cowieson, N.P., Kobe, B. and Martin, J.L. (2008) United we stand: combining structural methods. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18(5), 617-622.
- [2] – Liu, X. and Karimi, H.A. (2007) High-throughput modeling and analysis of protein structural dynamics. *Brief. Bioinform.* 8(6), 432-445.
- [3] – Sherwood, P., Brooks, B.R. and Sansom M.S.P. (2008) Multiscale methods for macromolecular simulations. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18(5), 630-640.

- [4] – Sanbonmatsu, K.Y. and Tung, C.-S. (2007) High performance computing in biology: multimillion atom simulations of nanoscale systems. *J. Struct. Biol.* 157(3), 470-480.
- [5] - Henzler-Wildman, K. and Kern, D. (2007) Dynamic personalities of proteins. *Nature.* 450, 964-972.
- [6] - Berendsen, H.J.C., van der Spoel, D. and van Drunen, R. (1995) GROMACS - a message-passing parallel molecular-dynamics implementation. *Comput. Phys. Commun.* 91, 43–56.
- [7] - SigmaPlot version 11.0, from Systat Software, Inc., San Jose California USA, www.sigmaplot.com.
- [8] – Verli, H. and Guimarães, J.A. (2005) Insights into the induced fit mechanism in antithrombin–heparin interaction using molecular dynamics simulations. *J. Mol. Graph. Model.* 24, 203–212.
- [9] – Terra, R.M.S., Guimarães, J.A. and Verli, H. (2007) Structural and functional behavior of biologically active monomeric melittin. *J. Mol. Graph. Model.* 25, 767–772.
- [10] – Verli, H., Calazans, A., Brindeiro, R., Tanuri, A. and Guimarães, J.A. (2007) Molecular dynamics analysis of HIV-1 matrix protein: Clarifying differences between crystallographic and solution structures. *J. Mol. Graph. Model.* 26, 62–68.
- [11] – Pol-Fachin, L., Fernandes, C.L. and Verli, H. (2009) GROMOS96 43a1 performance on the characterization of glycoprotein conformational ensembles through molecular dynamics simulations. *Carbohydr. Res.* 344, 491-500.
- [12] – Riboldi, G.P., Verli, H., and Frazzon, L. (2009) Structural studies of the *Enterococcus faecalis* SufU [Fe-S] cluster Protein. *BMC Biochem.* 10(3), 1-10.
- [13] – Nader, H.B., Pinhal, M.A.S., Baú, E.C., Castro, R.A.B., Medeiros, G.F., Chavante, S.F., Leite, E.L., Trindade, E.S., Shinjo, S.K., Rocha, H.A.O., Tersariol, I.L.S., Mendes, A. and Dietrich, C.P. (2001) Development of new heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interaction with vascular endothelial cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34, 699–709.
- [14] – Gettins, P.G.W. (2001) Serpin structure, mechanism, and function. *Chem. Rev.* 102, 4751–4803.
- [15] – Kim, S.-J., Woo, J.-R., Seo, E.J., Yu, M.-H. and Ryu, S.-E. (2001) A 2.1 Å resolution structure of an uncleaved α 1-antitrypsin shows variability of the reactive center and other loops. *J. Mol. Biol.* 306, 109–119.

- [16] – Simonovic, M., Gettins, P.G.W. and Volz, K. (2001) Crystal structure of human PEDF, a potent anti-angiogenic and neurite growth-promoting factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 11131–11135.
- [17] – Stein, P.E., Leslie, A.G.W., Finch, J.T., Turnell, W.G., McLaughlin, P.J. and Carrel, R.W. (1990) Crystal structure of ovalbumin as a model for the reactive centre of serpins. *Nature* 347, 99–102.
- [18] – Harrop, S.J., Jankova, L., Coles, M., Jardine, D., Whittaker, J.S., Gould, A.R., Meister, A., King, G.C., Mabbutt, B.C. and Curmi, P.M.G. (1999) The crystal structure of plasminogen activator inhibitor at 2.0 Å resolution: implications for serpin function. *Structure* 7, 43–54.
- [19] – Haberman, E. (1972) Bee wasp venoms. *Science*. 177, 314–322
- [20] – Gauldie, J., Hanson, J.M., Rumjanek, F.D., Shipolini, R.A. and Vernon, C.A. (1976) Peptide components of bee venom. *Eur. J. Biochem.* 61, 369–376.
- [21] - Dempsey, C.E. (1990) The actions of melittin on membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1031, 143–161.
- [22] – Bechinger, B. (1997) Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin. *J. Membr. Biol.* 156, 197–211.
- [23] – Terwillinger, T.C. and Eisenberg, D. (1982) The structure of melittin. Structure determination and partial refinement. *J. Biol. Chem.* 257, 6010–6015.
- [24] – Hirst, J.D. and Brooks III, C.L. (1994) Helicity, circular dichroism and molecular dynamics of proteins. *J. Mol. Biol.* 243, 173–178.
- [25] – Turner, B.G. and Summers, M.F. (1999) Structural biology of HIV. *J. Mol. Biol.* 285, 1–32.
- [26] – Massiah, M.A., Starich, M.R., Paschall, C., Summers, M.F., Christensen, A.M. and Sundquist, W.I. (1994) Three-dimensional structure of the Human Immunodeficiency Virus type 1 matrix protein. *J. Mol. Biol.* 244, 198– 223.
- [27] – Matthews, S., Barlow, P., Clark, N., Kingsman, S., Kingsman, A. and Campbell, I. (1995) Refined solution structure of p17, the HIV matrix protein. *Biochem. Soc. Trans.* 23, 725–729.
- [28] – Hill, C.P., Worthylake, D., Bancroft, D.P., Christensen, A.M. and Sundquist, W.I. (1996) Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 3099–3104

- [29] – Massiah, M.A., Worthylake, D., Christensen, A.M., Sundquist, W.I., Hill, C.P. and Summers, M.F. (1996) Comparison of the NMR and X-ray structures of the HIV-1 matrix protein: evidence for conformational changes during viral assembly. *Prot. Sci.* 5, 2391–2398.
- [30] - Varki, A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 3, 97–130.
- [31] - Dwek, R. A. (1996) Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. *Chem. Rev.* 96, 683–720.
- [32] – Frazzon, J., Fick, J.R. and Dean, D.R. (2002) Biosynthesis of iron-sulphur clusters is a complex and highly conserved process. *Biochem. Soc. Trans.* 30(4), 680-685.
- [33] – Frazzon, J. and Dean, D.R. (2003) Formation of iron-sulfur clusters in bacteria: an emerging field in bioinorganic chemistry. *Curr. Opinion. Cheml. Biol.* 7, 166-173.
- [34] – Johnson, D.C., Dean, D.R., Smith, A.D. and Johnson, M.K. (2005) Structure, Function and Formation of Biological Iron-Sulfur Clusters. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 247-81.
- [35] – Lill, R. and Mühlenhoff, U. (2008) Maturation of Iron-Sulfur Proteins in Eukaryotes: Mechanisms, Connected Processes, and Diseases. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 669-700.
- [36] – Huet, G., Daffé, M. and Saves, I. (2005) Identification of the *Mycobacterium tuberculosis* SUF machinery as the exclusive mycobacterial system of [Fe-S] cluster assembly: evidence for its implication in the pathogen's survival. *J. Bacteriol.* 187(17), 6137-6146.

5 Discussão Geral

5.1 Validação de simulações de DM

A modelagem molecular vem se mostrando através dos anos como uma importante ferramenta no estudo do comportamento molecular em vários sistemas biológicos (Hansson *et. al.*, 2002). A determinação de estruturas 3D de biomoléculas por RMN e o refinamento de estruturas cristalográficas obtidas por raios-X são, também, áreas que se beneficiam diretamente da modelagem molecular, particularmente das simulações de DM (Karplus *et. al.*, 1990).

Em geral, a validação das predições obtidas por simulações de DM reside, principalmente, na comparação dos resultados gerados a propriedades experimentais conhecidas (van Gunsteren *et. al.*, 1990). Para tal, a confiabilidade das predições em dinâmica molecular depende, basicamente, de dois fatores: da adequação do campo de força utilizado para o sistema em estudo e que a busca do espaço conformacional realizada durante a simulação seja suficientemente ampla para descrever as conformações relacionadas ao processo em estudo (van Gunsteren *et. al.*, 1992). Em outras palavras, a precisão do método é julgada a partir da observação ou constatação, nas simulações realizadas, de quão precisas são reproduzidas quantidades previamente conhecidas (Karplus *et. al.*, 1990).

Particularmente no caso dos estudos sobre a interação da trombina com inibidores covalentes e alostéricos, as simulações realizadas foram capazes de reproduzir dados experimentais disponíveis como: 1) no caso do sistema de inibição da trombina pelo composto suramina, ficou demonstrado que esse composto de fato mantém sua posição e interação no exossítio II, mesmo em face do rearranjo da orientação do ligante em seu sítio de ligação; 2) ainda neste sistema, simulações mimetizando o ambiente cristalino permitiram controlar este processo de reorientação, sugerindo as bases para as diferenças estruturais da suramina observadas entre os ambientes cristalino e aquoso; 3) no caso do sistema envolvendo a interação trombina/PPACK, pôde-se identificar que não houve alteração no raio de giro da proteína e no enovelamento global da enzima induzida pelo ligante e que 4) o aumento das ligações de hidrogênio intramoleculares associado ao rearranjo das alças próximas aos sítio catalítico em direção ao centro

da proteína, contribuíram no entendimento dos motivos moleculares para o aumento da termoresistência da trombina frente a ligação com o PPACK.

5.2 Estudo por DM do complexo trombina/suramina

Embora as propriedades inibitórias da suramina já fossem conhecidas (Horne *et. al.*, 1988; Horne *et. al.*, 1992), informações estruturais sobre como este processo ocorre estavam ausentes até o presente trabalho. Vale destacar que o mesmo constitui-se em um dos poucos trabalhos empregando uma combinação de metodologias de cristalografia de raios-X e dinâmica molecular com o objetivo de obter informações adicionais sobre o processo de reconhecimento ligante-receptor em meio biológico.

A estratégia empregada envolveu o isolamento do complexo 1:1 entre trombina e suramina do cristal, unidade essa que se espera que ocorra no plasma, como ponto de partida para simulações de DM. Considerava-se, então, que a simulação apresentaria uma manutenção global do complexo, com pequenas acomodações do ligante e cadeias laterais da proteína ao solvente adicionado, além da descrição da flexibilidade no sistema em meio aquoso. Contudo, em alguns nanosegundos a suramina apresentou um processo de re-orientação. Dada a interação da suramina, na unidade cristalina, com três moléculas de trombina, justamente na região onde ocorria a re-orientação, postulou-se que a ausência de tais forças cristalográficas nas simulações seria responsável pela mudança na interação da suramina com a trombina. Isto foi avaliado através da construção de um sistema contendo as três moléculas de trombina que interagem com uma molécula de suramina na unidade cristalina, em uma proporção de 3:1.

No rearranjo 1:1 a estrutura da suramina apresenta um pequeno grau de compactação, perdendo a sua conformação “linear” vista no cristal enquanto acomoda-se na fenda formada entre a α -hélice C-terminal (Arg233 a Glu247) e as duas fitas- β opostas a ela (Leu85 a Arg93 e Arg101 a Lys110) na estrutura da cadeia pesada da trombina. Neste processo, são perdidas interações com os resíduos Arg93, Asp243 e Glu247 enquanto novas interações se formam com os resíduos Lys87, Lys107, Lys236, Trp237 e Phe245 do exosíto II. Esse comportamento induz um aumento na intensidade da energia de interação da

suramina com a trombina em cerca de 300 kJ/mol, justificando a reorientação do ligante durante as simulações realizadas (Fig. 12).

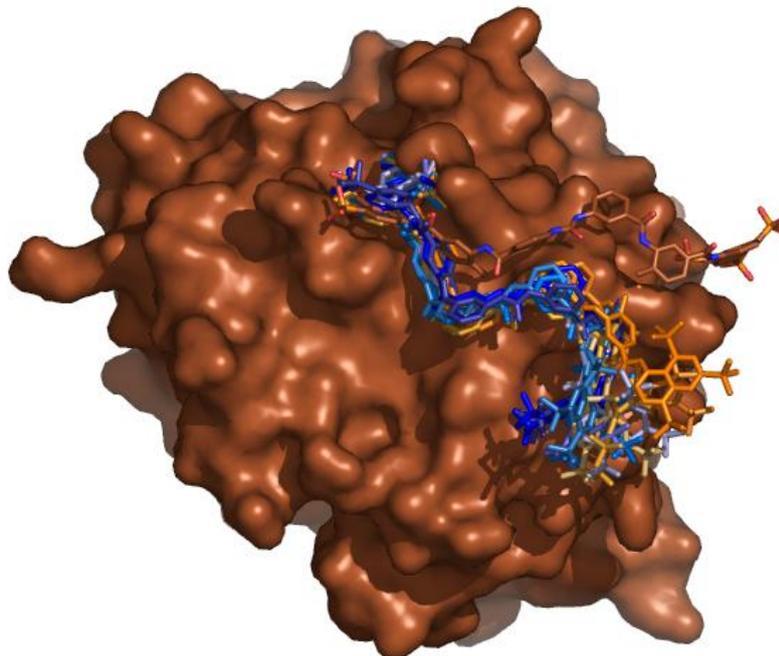


Figura 12: Representação da mudança conformacional da suramina sobre a superfície do exosítio II da trombina vista em ambiente fisiológico durante a DM. Conforme ocorre a reorientação de sua estrutura, a suramina migra de sua conformação cristalográfica (marrom) para a conformação vista no final do tempo de simulação (azul).

A observação desse comportamento demonstra que a parte da suramina que interage com uma maior parte da superfície protéica permanece com sua conformação quase idêntica ao cristal, enquanto que a outra extremidade mais exposta ao solvente durante a simulação sofre esse processo de compactação sobre o exosítio II. Esse processo induz um aumento da interação da suramina com a enzima, de maneira que seu perfil conformacional em meio fisiológico sofre alteração quando comparado à sua conformação cristalográfica.

Ao contrário do processo de reorientação visto logo no início da simulação no sistema 1:1 indicado pelo elevado RMSD da suramina ($4,3 \pm 0,6 \text{ \AA}$) com relação à sua posição inicial, sua conformação apresentou um incremento da estabilidade em relação ao seu início em todo o tempo de dinâmica na proporção 3:1 (RMSD $2,5 \pm 0,4 \text{ \AA}$). De fato, durante a simulação desse último sistema pudemos evidenciar que a suramina apresenta, nessas condições, interações com alças próximas ao exosítio I

e também com regiões próximas ao sítio ligador de Na^+ que, devido ao empacotamento cristalino, apresentam-se próximas à suramina favorecendo a sua estabilização em tal orientação.

5.3 Estudo por DM do complexo trombina/PPACK

O uso do PPACK para promover a inibição irreversível da trombina é uma prática comum em estudos estruturais desta enzima, de maneira que esse composto é encontrado em todos os cristais de αTh a fim de evitar eventos de autólise durante a cristalização. Embora esta interação aparentemente não promova alterações maiores na estrutura e conformação protéica, não estavam disponíveis dados das formas livre e não complexada da enzima para confirmar tal hipótese. Adicionalmente, uma vez que o desenvolvimento de inibidores diretos de trombina utiliza o PPACK como modelo estrutural de inibição da enzima (Srivastava *et al.*, 2005; Banner, 2003), a obtenção de informações adicionais sobre a dinâmica de inibição da trombina pode contribuir no desenvolvimento de novos candidatos a protótipos de agentes antitrombóticos, via modulação da trombina.

Em solução, dados obtidos em colaboração com os professores Luis Maurício T. R. Lima e Robson Q. Monteiro da UFRJ, incluindo experimentos de dicroísmo circular e SAXS, reforçam a ausência de influência conformacional do PPACK sobre a trombina quando em solução aquosa. Contudo, experimentos de desnaturação como função da temperatura indicaram um efeito do PPACK sobre propriedades termodinâmicas da enzima-alvo, principalmente um aumento na termoresistência da proteína. Dada a ausência de dados estruturais para a trombina livre, a DM apresentou-se como um método promissor na obtenção de informações adicionais sobre este processo, em nível atômico. Isto foi explorado através de simulações das formas de trombina ligada e não ligada ao PPACK, na temperatura de 343K (70 °C), faixa de temperatura representativa do efeito termo-estabilizador do PPACK sobre a trombina.

Em acordo com os dados experimentais obtidos, as simulações realizadas demonstram uma manutenção da estrutura global da enzima. Contudo, algumas diferenças foram observadas quanto à mobilidade de alças, principalmente as próximas ao sítio catalítico. Enquanto na forma livre as alças apresentam-se mais flexíveis, a inibição da enzima pelo PPACK acarreta em um enrijecimento destas

estruturas. Merece destaque as alças Gly142 a Ser153, Gly184 a Ala190 e Glu217 a Tyr225, próximas ao sítio catalítico, as quais demonstram as maiores diferenças de flexibilidade como consequência da ligação ao PPACK, voltando-se e fechando-se para o centro da estrutura protéica e, assim, reduzindo suas exposições ao solvente.

Adicionalmente, as ligações de hidrogênio intramoleculares na trombina aumentaram como consequência da complexação ao PPACK, tanto nas regiões envolvendo as alças supracitadas quanto por toda a estrutura da enzima. Este processo ocorre juntamente a uma diminuição da energia de interação da proteína com o solvente, embora a sua superfície acessível ao ambiente fisiológico e raio de giro não tenham sofrido maiores alterações (Tab. 2).

Tabela 2: Raio de giro e superfície acessível ao solvente (SAS) para ambos os estados da trombina

	Raio de Giro	SAS
Trombina Livre	$1,8 \pm 0,014$ nm	$78,2 \pm 2,33$ nm ²
Trombina/PPACK	$1,79 \pm 0,008$ nm	$77,8 \pm 2,23$ nm ²

Tomados em conjunto, esses dados ajudam a explicar os motivos moleculares para a termoresistência atribuída à trombina por meio da ligação com o PPACK, elucidando os eventos moleculares que levam à inibição enzimática por meio da ligação irreversível ao sítio catalítico.

5.4 Implicações para o desenvolvimento racional de novos agentes anticoagulantes, baseados na inibição direta de trombina

A partir dos resultados obtidos, pode-se contextualizar a participação de ferramentas de modelagem molecular, marcadamente a DM, no planejamento racional de novos agentes anticoagulantes baseados na inibição direta de trombina. Nesse sentido, através das análises feitas pelas ferramentas de DM, conseguimos obter informações adicionais sobre as forças que governam a dinâmica de inibição da trombina pelo PPACK, bem como as bases estruturais que permitem a suramina adotar a conformação inibitória sobre o exosítio II da trombina. Reunindo esses conhecimentos na lógica do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos,

representada na Figura 13, podemos inserir essas propriedades inibitórias no seguinte contexto:

1) Seleção de compostos estruturalmente promissores, tais como produtos naturais análogos ou substratos naturais modificados;

2) Uma vez confirmada a trombina como provável alvo molecular dos compostos selecionados, segue-se ao estudo computacional dos compostos, tanto em suas formas isoladas, quanto em complexo com a enzima. Esta etapa possibilitará tanto a identificação das interações intermoleculares envolvidas no complexo, quanto à avaliação da capacidade de cada composto em induzir modificações conformacionais ou na dinâmica estrutural, à luz dos dados previamente obtidos para o complexo trombina/suramina e trombina/PPACK, além de inferir contribuintes entrópicos para o processo e da pré-existência, em solução, da conformação potencialmente bioativa;

3) Planejamento racional de novos derivados sintéticos, baseado na estrutura do complexo com compostos protótipos, de forma a potencializar as interações dos mesmos com a trombina;

4) Síntese dos derivados propostos;

5) Avaliação das propriedades anticoagulantes e antitrombóticas dos derivados propostos. Neste momento, o ciclo pode ser reiniciado inúmeras vezes, até que seja obtido um ou mais compostos/padrões moleculares com propriedades anticoagulantes satisfatórias.

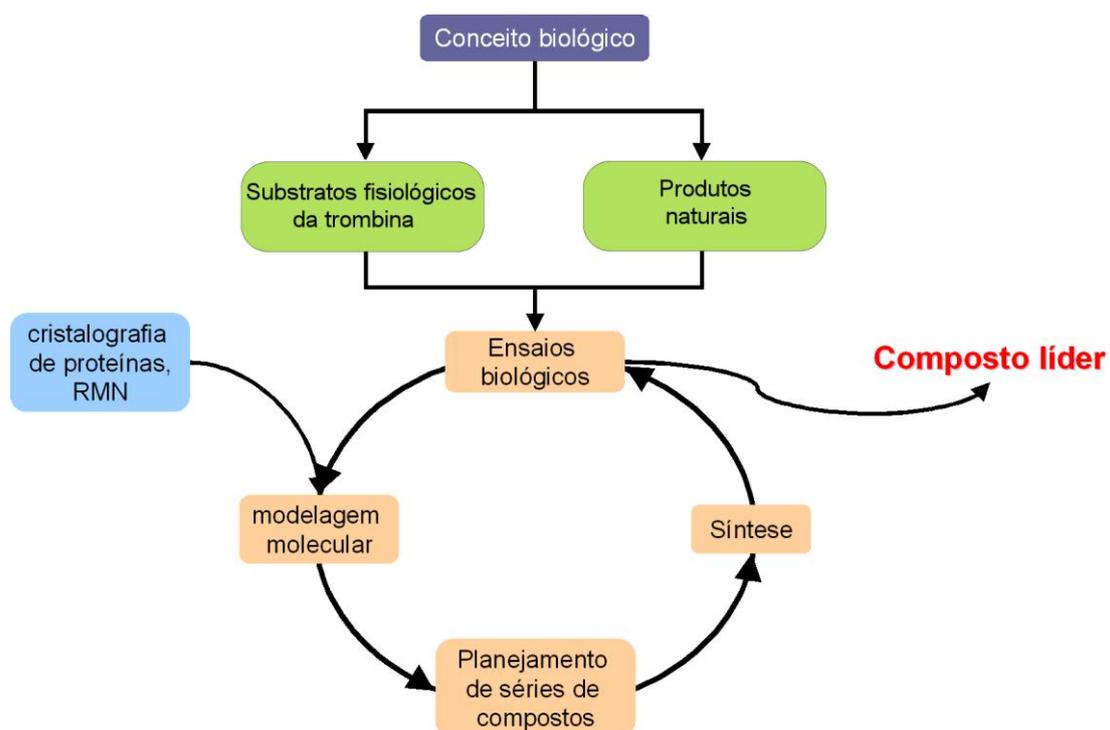


Figura 13: Esquema representando um processo de desenvolvimento de novos compostos bioativos, envolvendo a participação de métodos de modelagem molecular, em especial a DM.

6 Conclusões

A partir dos objetivos traçados, o presente trabalho permitiu:

- Re-interpretação da orientação cristalográfica da suramina, reduzindo sua exposição ao solvente, conforme orientação cristalográfica, e aumentando sua interação com a enzima-alvo;
- Análise quantitativa da contribuição dos resíduos de aminoácidos mais importantes para a energia de interação trombina/suramina;
- Elucidação dos determinantes estruturais para a termoresistência da trombina induzida pelo PPACK;
- Construção de uma metodologia aplicável ao estudo de flexibilidade de proteínas capaz de mapear eventos conformacionais como função do tempo e dos resíduos de aminoácidos.

Globalmente, os resultados obtidos confirmam o potencial de ferramentas de modelagem molecular no estudo de sistemas biológicos, conectando e expandindo, ao nível atômico, informações previamente obtidas por métodos experimentais.

7 Perspectivas

Considerando-se os procedimentos de simulação propostos e validados no presente trabalho, assim como as informações obtidas acerca da trombina e de sua estrutura, as seguintes perspectivas podem ser traçadas:

- Início de um projeto de planejamento racional de novos agentes anticoagulantes sintéticos, relacionados ou não com os substratos naturais da trombina, mas capazes de inibi-la;
- Considerando-se que a trombina é uma glicoproteína, avaliar o efeito da glicosilação na dinâmica da proteína e na formação de complexos trombina/moduladores.

8 Glossário⁵

Arquivo PDB: um arquivo PDB (do inglês *Protein Data Bank*, Banco de Dados de Proteínas) é um arquivo ASCII (do inglês American Symbolic Code for Information Interexchange = text, Código Simbólico Americano para Troca de Informação) usado para armazenar as coordenadas atômicas de uma molécula, geralmente uma proteína ou ácido nucléico (*veja PDB*).

Cálculos *ab initio*: Cálculos *ab initio* são cálculos mecânico-quânticos que usam equações exatas, sem aproximações, que envolvem a população eletrônica total da molécula.

Métodos mecânico-quânticos *ab initio* (sinônimo com métodos mecânico-quânticos não empíricos): métodos de cálculos mecânico-quânticos independentes de qualquer experimento que não seja a determinação de constantes fundamentais. Os métodos são baseados no uso da equação de Schrödinger completa para tratar todos os elétrons de um sistema químico. Na prática, aproximações são necessárias para restringir a complexidade da função de onda eletrônica e tornar seu cálculo possível.

Cálculos Mecânico-quânticos: Cálculos mecânico-quânticos são cálculos de propriedades moleculares baseados na equação de Schrödinger que levam em conta as interações entre os elétrons em uma molécula.

Campo de Força: é um conjunto de funções e parametrizações usadas em cálculos de mecânica molecular. Estas funções definem as energias de estiramento de ligação e de distorção de ângulo de ligação (tanto de valência quanto diedro) de uma molécula, quando comparadas com a sua conformação não tensionada (aquela caracterizada pelos valores padrões de comprimentos e de ângulos de ligação). Alguns campos de força podem conter termos de interação entre átomos não ligados, de efeitos eletrostáticos, de ligação de hidrogênio e de outros efeitos estruturais.

Campo e Potencial Eletrostáticos: O campo e o potencial eletrostáticos são propriedades de uma molécula que surgem da interação entre uma sonda carregada, tal como uma carga pontual unitária positiva representando um próton, e a molécula alvo. Este campo e o potencial são usados em estudos de relações quantitativas estrutura-atividade tridimensionais (3D-QSAR) e para comparar ou estimar a semelhança de um conjunto de moléculas.

⁵ Definições obtidas: de Sant'Anna, 2002 e van der Spoel *et. al.*, 2005.

Dinâmica Molecular: é um procedimento de simulação que consiste na computação do movimento dos átomos em uma molécula ou de átomos individuais ou moléculas em sólidos, líquidos e gases, de acordo com as leis de movimento de Newton. As forças que agem nos átomos, necessárias para simular seus movimentos, são calculadas usando campos de força de mecânica molecular.

Mecânica Molecular: é o cálculo das características geométricas e de energia de entidades moleculares baseado em funções de potencial empíricas, cuja forma é tomada da mecânica clássica. O método pressupõe que as funções de potencial possam ser transferidas dentro de um conjunto de moléculas semelhantes. Uma suposição é feita sobre os comprimentos e ângulos “naturais” de ligação, cujos desvios resultam em tensão de ligação e tensão angular, respectivamente. As forças de Van der Waals e eletrostáticas também são levadas em conta.

Minimização de Energia: é um procedimento matemático para localizar as conformações estáveis (mínimos de energia) de uma molécula, determinadas por cálculos de mecânica molecular ou mecânico-quânticos.

Modelagem Molecular: é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares usando a química computacional e as técnicas de visualização gráfica visando fornecer uma representação tridimensional, sob um conjunto de circunstâncias.

Protein Data Bank (PDB): é um banco de dados de proteínas mantido no Laboratório Nacional Brookhaven, Upton, New York, que contém estruturas de raios-X de dezenas de milhares de proteínas.

Planejamento de Fármacos: inclui não somente o planejamento do ligante, mas também a farmacocinética e a toxidez, que estão na maior parte das vezes além das possibilidades do planejamento auxiliado pela estrutura ou por computador. O termo planejamento de fármacos é mais freqüentemente usado do que o termo correto “Planejamento de Ligantes”.

Planejamento de Ligantes: é o planejamento de ligantes que usa informações estruturais sobre o alvo ao qual os ligantes devem se ligar, freqüentemente tentando maximizar a energia de interação.

Planejamento Baseado em Estrutura (Structure-Based Design): é uma estratégia para novas entidades químicas baseadas na estrutura tridimensional (3D) de um alvo obtido de estudos de raios-X ou de ressonância magnética nuclear ou de modelos de homologia de proteínas.

Química Computacional: é uma disciplina que usa métodos matemáticos para o cálculo de propriedades moleculares e para a simulação do comportamento molecular. Também inclui, por exemplo, o planejamento de sínteses, a pesquisa de bancos de dados e a manipulação de bibliotecas combinatoriais.

Receptor: é uma proteína ou um complexo de proteínas localizado no interior ou na superfície de uma célula, que reconhece especificamente e interage com um composto que atua como um mensageiro molecular (neurotransmissor, hormônio, fármaco, etc). Em um sentido mais amplo, o termo receptor é freqüentemente usado como sinônimo para qualquer sítio específico de ligação de fármacos (em oposição a não específico, como a ligação às proteínas do plasma), também incluindo ácidos nucleicos, tais como o DNA.

Termos de Energia Não-Ligados: são funções de energia potencial que descrevem interações de Van der Waals, eletrostáticas e de ligação hidrogênio em um campo de força.

Topologia Molecular: topologia molecular é a descrição do modo pelo qual os átomos estão ligados em uma molécula. Em diversos programas de dinâmica molecular constitui-se em um arquivo que descreve em quais átomos ou combinações de átomos as diversas contribuições de um campo de força irão atuar. Apresenta atributos constantes para cada átomo, como quais átomos existem em uma molécula, as características destes átomos (e.g. um oxigênio carbonílico é diferente de um oxigênio em um grupamento éter ou hidroxila), como cargas atômicas, termos ligados e não-ligados.

Arquivo .mdp: contém todas as informações e parâmetros necessários para a realização de uma DM no pacote GROMACS. Nesse arquivo são definidos os parâmetros de temperatura, acoplamento de pressão, passos de integração, tratamento eletrostático, grupos de energia e uma série de outras informações que ditam como o sistema se comportará durante a simulação.

9 Referências Bibliográficas

Referências citadas no texto

- Allolio, B., Reincke, M., Arlt, W., Deuss, U., Winkelmann, W., Siekmann, L.: Suramin for treatment of adrenocortical carcinoma (1989). *Lancet*. (2), 277.
- Ayala, Y.M., Cantwell, A.M., Rose, T., Bush, L.A., Arosio, D., Di Cera, E.: Molecular mapping of thrombin–receptor interactions (2001). *Proteins* (45), 107–116.
- Banner, D.W.: Principles of enzyme-inhibitor design in “Methods and Principles in Medicinal Chemistry” (2003). Protein-ligand interactions – From molecular recognition to drug design. Editado por H.-J. Böhm e G. Schneider. Wiley-VCH. Volume 19, pp 163-185.
- Barrett A.J.: Proteinases in Mammalian Cells and Tissues (1977). Amsterdam/New York: Elsevier/North-Holland
- Bates, S.M., Weitz, J.I.: The status of new anticoagulants (2006). *Br. J. Haematol.* (134), 3-19.
- Bates, S.M., Weitz, J.L.: The mechanism of action of thrombin inhibitors (2000). *J. Invasive. Cardiol.* (12) (Suppl F), 27–32.
- Becker, C.F., Guimarães, J.A., Mourão, P.A.S., Verli, H.: Conformation of sulfated galactan and sulfated fucan in aqueous solutions: Implications to their anticoagulant activities (2007). *J. Mol. Graph. Model.* (26), 391–399.
- Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., DiNola, A., Haak, J.R.: Molecular-dynamics with coupling to an external bath (1984). *J. Chem. Phys.* (81), 3684-3690.
- Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., van Gunsteren, W., Hermans, J.: Interaction models for water in relation to protein hydration, Intermolecular Forces, Reidel, Dordrecht, The Netherlands, 1981, 331–342.
- Berendsen. H.J.C., van der Spoel, D., van Drunen, R.: GROMACS – a message-passing parallel molecular-dynamics implementation (1995). *Comput. Phys. Commun.* (91), 43-56.
- Blow, D.M.: The Enzyme (1971). Boca Raton, FL, USA: Boyer, P.D.Academic Press edn.
- Bode, W., Mayr, I., Baumann, U., Huber, R., Stone, S.R., & Hofsteenge, J.: The refined 1.9 Å crystal structure of human α -thrombin: Interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment (1989b). *EMBO J.* (8), 3467-3475.

- Bode, W., Turk, D., Karshikov, A.: The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe–Pro–Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure–function relationships (1992). *Protein Sci.* (1), 426–471.
- Bode, W.: Structure and interaction modes of thrombin (2006). *Blood Cells Mol. Dis.* (36), 122–130.
- Bouteille, B., Oukem, O., Bisser, S., Dumas, M.: Treatment perspectives for human African trypanosomiasis (2003). *Fundam. Clin. Pharmacol.* (17), 171–181.
- Broze, Jr G.J.: Tissue factor pathway inhibitor and the current concept of blood coagulation (1995). *Blood. Coagul. Fibrinolysis* (1), 7–13.
- Carter, W.J., Cama, E., Huntington, J.A.: Crystal structure of thrombin bound to heparin (2005). *J. Biol. Chem.* (280), 2745–2749
- Clare, B., Supuran, C.T.: Semi-empirical atomic charges and dipole moments in hypervalent sulfonamide molecules: descriptors in QSAR studies (1998). *Theochem.* (428), 109-121.
- Dang, O.D., Vindigni, A., Di Cera, E.: An allosteric switch controls the procoagulant and anticoagulant activities of thrombin (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (92), 5977–5981.
- Darden, T., York, D., Pedersen, L.: Particle Mesh Ewald – an N.log(N) method for Ewald sums in large systems (1993). *J. Chem. Phys.* (98), 10089-10092.
- Davie, E.W., Ratnoff, O.D.: Waterfall sequence for intrinsic blood clotting (1964). *Science* (145), 1310 –1312.
- de Groot, B.L., Grubmüller, H.: Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF (2001). *Science*, (294), 2353-2357.
- de Sant’Anna, C.M.R.: Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações IUPAC 1997) (2002). *Quim. Nova* (25), 505-512.
- Di Cera, E.: Thrombin (2008). *Mol. Aspects Med.* (29), 203–254.
- DiBella, E.E., Maurer, M.C., Scheraga, H.A.: Expression and folding of recombinant bovine prethrombin-2 and its activation to thrombin (1995). *J. Biol. Chem.* (270), 163–169.
- Docampo, R., Moreno, S.N.J.: Current chemotherapy of human African trypanosomiasis (2003). *Parasitol. Res.* (90), S10–S13

- Esmon, C.T., Suttie, J.W., Jackson, C.M.: The Functional Significance of Vitamin K Action (1975). *J. Biol. Chem.* (250), 4095-4099.
- Eyal, E., Gerzon, S., Potapov, V., Edelman, M., Sobolev, V.: The limit of accuracy of protein modeling: influence of crystal packing on protein structure (2005). *J. Mol. Biol.* (351), 431–442.
- Frenkel, E.P., Shen, Y.M., Haley, B.B.: The Direct Thrombin Inhibitors: Their Role and Use for Rational Anticoagulation (2005). *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.* (19), 119-145.
- Guex, N., Peitsch, M.C.: Swiss-Model and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling (1997). *Electrophoresis*, (18), 2714-2723. <http://www.expasy.org/spdbv>.
- Hageman, T.C., Endres, G.F., Scheraga, H.A.: Mechanism of action of thrombin on fibrinogen. On the role of the A chain of bovine thrombin in specificity and in differentiating between thrombin and trypsin (1975). *Arch. Biochem. Biophys.* (171), 327–336.
- Hansson, T., Oostenbrink, C., van Gunsteren, W.F.: Molecular dynamics simulations (2002). *Curr. Opin. Struct. Biol.* (12), 190-196
- Hedstrom, L.: Serine protease mechanism and specificity (2002). *Chem. Rev.* (102), 4501–4524.
- Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H.J.C., Fraaije, J.G.E.M.: LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations (1997). *J. Comput. Chem.* (18), 1463-1472.
- Hirsh, J.: Heparin (1991b). *N. Engl. J. Med.* (324), 1565–1574.
- Hoffman, M., Monroe, D.M. III.: A cell-based model of hemostasis (2001). *Thromb. Haemost.* (85), 958 –965.
- Horne, M.K., Stein, C.A., La Rocca, R.V., Myers, C.E.: Circulating glycosaminoglycan anticoagulants associated with suramin treatment (1988). *Blood*, (71), 273–279.
- Horne, M.K., Wilson, O.J., Cooper, M., Gralnick, H.R., Myers, C.E.: The effect of suramin on laboratory tests of coagulation (1992). *Thromb. Haemost.* (67), 434–439.
- Howell, W.H.: Heparin as an anticoagulant (1923). *Am. J. Physiol.* (63), 434–448.
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K.: VMD – Visual Molecular Dynamics (1996). *J. Mol. Graph.* (14), 33-38. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>.

- Jenny, N. S., Mann, K. G.: Coagulation Cascade: An Overview (1998). *Thrombosis and Hemorrhage*, 2^a Ed., Loscalzo, J.; Schafer, A. I. Eds.; Williams & Wilkins, Baltimore, pp 3-8.
- Karplus, M., Petsko, G.A.: Molecular dynamics simulations in biology (1990). *Nature*, (347), 631-639.
- Kettner, C., Shaw, R.: D-Phe-Pro-Arg-CH₂-Cl – A selective affinity label for thrombin (1979). *Thromb. Res.* (14), 969-973
- Kraut, J.: Serine proteases: structure and mechanism of catalysis (1977). *Annu. Rev. Biochem.* (46), 331–358.
- Kumar, R., Beguin, S., Hemker, H.C.: The effect of fibrin clots and clot-bound thrombin on the development of platelet procoagulant activity (1995). *Thromb. Haemost.* (74), 962–968.
- Kumar, R., Beguin, S., Hemker, H.C.: The influence of fibrinogen and fibrin on thrombin generation-evidence for feedback activation of the clotting system by clot bound thrombin (1994). *Thromb. Haemost.* (72), 713–721.
- La Rocca, R.V., Stein, C.A., Danesi, R., Cooper, M.R., Uhrich, M., Myers, C.E.: A pilot study of suramin in the treatment of metastatic renal cell carcinoma (1991). *Cancer*, (67), 1509–1513.
- Leach, A.R.: Molecular Modelling Principles and Applications (2001), 2nd Ed., Longman, Cingapura.
- Li, W., Johnson, D.J., Esmon, C.T., Huntington, J.A.: Structure of the antithrombin–thrombin–heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin (2004). *Nat. Struct. Mol. Biol.* (11), 857–862.
- Lindahl, E., Hess, B., van der Spoel, D.: GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis (2001), *J. Mol. Mod.* (7), 306-317.
- Liu, C.C., Brustad, E., Liu, W., Schultz, P.G.: Crystal structure of a biosynthetic sulfhirudin complexed to thrombin (2007). *J.Am.Chem.Soc.* (129), 10648-10649.
- Liu, X., Karimi, H.A.: High-throughput modeling and analysis of protein structural dynamics (2007). *Brief. Bioinformatics* (8), 432-445.
- Macfarlane, R.G.: An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier (1964). *Nature* (202), 498–499.
- Mann, K.G., Butenas, S., Brummel, K.: The dynamics of thrombin formation (2003). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (23), 17–25.

- Mengwasser, K.E, Bush, L.A, Shih, P., Cantwell, A.M., Di Cera, E.: Hirudin Binding Reveals Key Determinants of Thrombin Allosterity (2005). *J. Biol. Chem.* (280), 26997–27003.
- Merry, A.F.: Focus on Thrombin: Alternative Anticoagulants (2007). *Semin. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* (11), 256-261.
- Mohler, M.A., Refino, C.J., Chen, S.A., Chen, A.B., Hotchkiss, A.J.: D-Phe-Pro-Arg Chloromethylketone: Its potential use in inhibiting the formation of in vitro artifacts in blood collected during tissue-type plasminogen activator thrombolytic therapy (1986). *Thromb. Haemost.* (56), 160-164
- Monteiro, R.Q., Campana, P.T., Melo, P.A., Bianconi, M.L.: Suramin interaction with human α -thrombin: inhibitory effects and binding studies (2004). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (36), 2077–2085.
- Murray, D.W.G.: Heparin in thrombosis and embolism (1939). *Br. J. Surg.* (27), 567.
- Myles, T., Yun, T.H., Hall, S.W., Leung, L.L.: An extensive interaction interface between thrombin and factor V is required for factor V activation (2001b). *J. Biol. Chem.* (276), 25143–25149.
- Netzel-Arnett, S., Hooper, J.D., Szabo, R., Madison, E.L., Quigley, J.P., Bugge, T.H., Antalis, T.M.: Membrane anchored serine proteases: a rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer (2003). *Cancer Metastasis Rev.* (22), 237–258.
- Neurath, H., Walsh, K.A.: Role of proteolytic enzymes in biological regulation (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (73), 3825–3832.
- Newton, H.B.: Novel chemotherapeutic agents for the treatment of brain cancer (2000). *Expert Opin. Investig. Drugs* (9), 2815–2829.
- Nogami, K., Zhou, Q., Myles, T., Leung, L.L., Wakabayashi, H., Fay, P.J.: Exosite-interactive regions in the A1 and A2 domains of factor VIII facilitate thrombin-catalyzed cleavage of heavy chain (2005). *J. Biol. Chem.* (280), 18476–18487.
- Nutescu, E.A., Shapiro, N.L., Chevalier, A.: New Anticoagulant Agents: Direct Thrombin Inhibitors (2008). *Cardiol. Clin.* (26), 169-187.
- Ono, K., Nakane, H., Fukushima, M.: Differential inhibition of various deoxyribonucleic and ribonucleic acid polymerases by suramin (1988). *Eur. J. Biochem.* (172), 349–353.
- Page, M.J., Di Cera, E.: Serine peptidases: classification, structure and function (2008). *Cell Mol Life Sci.* (65), 1220-1236.

- Priestle, J.P., Rahuel, J., Rink, H., Tones, M., Grutter, M.G.: Changes in interactions in complexes of hirudin derivatives and human alpha-thrombin due to different crystal forms (1993). *Protein Sci.* (2), 1630–1642.
- PyMOL© 1998-2009 DeLano Scientific LLC, San Carlos, California, U.S.A. All Rights Reserved. <http://www.delanoscientific.com>.
- Reich, E., Rifkin, D.B., Shaw, E.: *Proteases and Biological Control* (1975). New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Rydel, T.J., Tulinsky, A., Bode, W., Huber, R.: Refined structure of the hirudin–thrombin complex (1991). *J. Mol. Biol.* (221), 583–601.
- Sakariassen, K.S., Bolhuis, P.A., Sixma, J.J.: Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII Von Willebrand factor bound to the subendothelium (1979). *Nature* (279), 636–638.
- Sali, A.: 100,000 protein structures for the biologist (1998). *Nat. Struct. Biol.* (5), 1029-1032.
- Schaftenaar, G., Noordik, J.H.: MOLDEN: a pre- and post-processing program for molecular and electronic structures (2000). *J. Comput. Aided. Mol. Des.* (4), 123-134.
- Schaftenaar, G.: MOLDEN. CAOS/CAMM Center, University of Nijmegen, Toernooiveld 1, 6525 ED NIJMEGEN, The Netherlands, 1997.
- Schmidt, M.W., Baldrige, K.K., Boatz, J.A., Elbert, S.T., Gordon, M.S., Jensen, J.H., Koseki, S., Matsunaga, N., Nguyen, K.A., Su, S.J., Windus, T.L., Dupuis, M., Montgomery, J.A.: General atomic and molecular electronic structure system (1993). *J. Comp. Chem.* (14), 1347-1363.
- Schuettelkopf, A.W., van Aalten. D.M.F.: PRODRG - a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes (2004). *Acta Crystallogr.* (D60), 1355—1363. http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrg_beta
- Segers, K., Dahlback, B., Nicolaes, G.A.: Coagulation factor V and thrombophilia: background and mechanisms (2007). *Thromb. Haemost.* (98), 530–542.
- Sheehan, J.P., Sadler, J.E.: Molecular mapping of the heparin-binding exosite of thrombin (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (91), 5518–5522.
- Sherwood, P., Brooks, B.R., Sansom, M.S.P.: Multiscale methods for macromolecular simulations (2008). *Curr. Opin. Struct. Biol.* (18), 630–640.

- Skrzypczak-Jankun, E., Carperos, V.E., Ravichandran, K.G., Tulinsky, A., Westbrook, M., Maraganore, J.M.: Structure of the hirugen and hirulog 1 complexes of alpha-thrombin (1991). *J. Mol. Biol.* (221), 1379–1393.
- Small, E.J.: Prostate cancer (1997). *Curr. Opin. Oncol.* (9), 277–286.
- Smith, L.J., Mark, A.E., Dobson, C.M., van Gunsteren, W.F.: Molecular dynamics simulations of peptide fragments from hen lysozyme: insight into non-native protein conformations (1998). *J. Mol. Biol.* (280), 703-719.
- Srivastava, S., Goswami, L.N., Dikshit, D.K.: Progress in the Design of Low Molecular Weight Thrombin Inhibitors (2005). *Med. Res. Rev.* (25), 66-92
- Stone, S.R., Maraganore, J.M.: Hirudin Interactions With Thrombin (1992). New York: Plenum Press
- Tollefsen, D.M.: Insight into the mechanism of action of heparin cofactor II (1995). *Thromb. Haemost.* (74), 1209–1274.
- Tsiang, M., Jain, A.K., Dunn, K.E., Rojas, M.E., Leung, L.L., Gibbs, C.S.: Functional mapping of the surface residues of human thrombin (1995). *J. Biol. Chem.* (270), 16854–16863.
- van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., van Buuren, A.R., Apol, E., Meulenhoff, P.J., Tieleman, D.P., Sijbers, A.L.T.M., Feenstra, K.A., van Drunen, R., Berendsen, H.J.C.: Gromacs User Manual version 3.3 (2005), www.gromacs.org.
- van Gunsteren, W.F., Berendsen, H.J.C.: Computer Simulations of molecular dynamics: methodology, applications, and perspectives in chemistry (1990). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (29), 992-1023.
- van Gunsteren, W.F., Mark, A.E.: On the interpretation of biochemical data by molecular dynamics computer simulation (1992). *Eur. J. Biochem.* (204), 947-961.
- Veldman, A., Hoffman, M., Ehrenforth, S.: New insights into the coagulation system and implications for new therapeutic options with recombinant factor VIIa (2003). *Curr. Med. Chem.* (10), 797–811.
- Verli, H., Calazans, A., Brindeiro, R., Tanuri, A., Guimarães, J.A.: Molecular dynamics analysis of HIV-1 matrix protein: Clarifying differences between crystallographic and solution structures (2007). *J. Mol. Graph. Model.* (26), 62-68.

- Verli, H., Guimarães, J.A.: Insights into the induced fit mechanism in antithrombin–heparin interaction using molecular dynamics simulations (2005). *J. Mol. Graph. Model.* (24), 203–212
- Verli, H., Guimarães, J.A.: Molecular dynamics simulation of a decasaccharide fragment of heparin in aqueous solution (2004). *Carbohydr. Res.* (339), 281–290.
- Verli, H.: Interação Heparina-Antitrombina: Reconhecimento Molecular Caracterizado por Ferramentas de Modelagem Molecular (2005). Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Tese de doutorado.
- Vine, A.K.: Recent advances in haemostasis and thrombosis (2009). *Retina* (29), 1–7.
- Voogd, T.E., Vansterkenburg, E.L., Wilting, J., Janssen, L.H.: Recent research on the biological activity of suramin (1993). *Pharmacol. Rev.* (45), 177–203.
- Wang, C.C.: Molecular mechanisms and therapeutic approaches to the treatment of African trypanosomiasis (1995). *Annu. Rev. Pharmacol. Ther.* (35), 93–127.
- Weitz, J., Hirsh, J.: New antithrombotic drugs. In: Colman RW, *et. al.*, editors. Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice (2002). 4th edition. Philadelphia: Lippencott Williams & Wilkins; 1529–1568.
- Weitz, J.I.: Low-molecular-weight heparins (1997). *N. Engl. J. Med.* (337), 688–698.
- Wolberg, A.S., Campbell, R.A.: Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis (2008). *Transfus. Apher. Sci.* (38), 15–23.
- Wuthrich, K.: Protein recognition by NMR (2000). *Nat. Struct. Biol.* (7), 188–189.
- Xu, H., Bush, L.A., Pineda, A.O., Caccia, S., Di Cera, E.: Thrombomodulin changes the molecular surface of interaction and the rate of complex formation between thrombin and protein C (2005). *J. Biol. Chem.* (280), 7956–7961.
- Yun, T.H., Baglia, F.A., Myles, T., Navaneetham, D., Lopez, J.A., Walsh, P.N., Leung, L.L.: Thrombin activation of factor XI on activated platelets requires the interaction of factor XI and platelet glycoprotein Ib alpha with thrombin anion-binding exosites I and II, respectively (2003). *J. Biol. Chem.* (278), 48112–48119.

10 Anexos

Durante a realização desta dissertação, o assunto em que vinha trabalhando durante meu período de iniciação científica, o qual também foi tema do meu trabalho de conclusão de curso, foi publicado num periódico de circulação internacional (anexo I). Além disso, tive a oportunidade de realizar colaborações com os grupos do Prof. Fábio Klamt (Laboratório de Extresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica – UFRGS) e Prof. Vanderlan Bolzani (Instituto de Química de Araraquara – UNESP), além de estar participando da co-orientação do aluno de iniciação científica Hernando Salles Rosa, Faculdade de Farmácia - UFRGS. Destas colaborações surgiram alguns trabalhos que serão listados abaixo. Também estão incluídos os arquivos *.mdp* (*molecular dynamics parameters*) utilizados na realização dos trabalhos apresentados nessa dissertação e as topologias empregadas para definir as ligações entre trombina e PPACK.

10.1 Anexo I

FEBS Lett., **2008**, (582), 3619-3624.

Characterization of the papillomavirus α 1E2 peptide unfolded to folded transition upon DNA binding

Guilherme Menegon Giesel, Luís Maurício T.R. Lima, Joana Faber-Barata,
Jorge Almeida Guimarães, Hugo Verli

RESUMO

Transcriptional regulation depends on sequence-specific binding of regulatory proteins to their responsive elements in viral DNA. The papillomavirus E2 protein binds to DNA through the consensus sequence ACCG-NNNN-CGGT, activating or inhibiting viral replication. Through molecular dynamics simulations we were able to characterize the role of the DNA molecule on E2 binding region (named α 1E2) conformation, acquiring structural insights for previous works suggesting an unfolded to folded transition upon α 1E2 complexation to DNA. Moreover, the results indicate sites to guide the design of α 1E2 synthetic derivatives to inhibit the HPV infection.

10.2 Anexo II

In preparation

Cofilin Oxidation Induces Conformational Changes and Decreases Actin Polymerization *in vitro*

Juliane Borba Minotto, Marco Antônio Debastiani, Alfeu Zanotto Filho, **Guilherme Menegon Giesel**, José Cláudio Fonseca Moreira, Hugo Verli, Fábio Klamt

10.3 Anexo III

In preparation

Jatrophidin I, a new cyclic peptide from brazilian *Jatropha curcas* L.: Isolation, characterization, synthesis, conformational studies and biological activity

Wanessa Fernanda Altei, Douglas Gatte Picchi, Eduardo Maffud Cilli, **Guilherme Menegon Giesel**, Hugo Verli, Vanderlan da Silva Bolzani

RESUMO

Previously we have isolated cyclic peptides from the latex of *Jatropha* genus species (Euphorbiaceae). Continuing the quest to find new peptides, we studied the latex of *Jatropha curcas* L. through extraction with ethyl acetate, and posterior fractionation in Sephadex G-15 column. After this protocol, peptidic fractions, detected by Cl_2/o -tolidine reagent, were purified by RP- HPLC resulting in two different peptides. The structural elucidation by mass spectroscopy and 1D/2D NMR showed the known cyclic peptide Pohlianin A, and one new cyclic peptide, that has been named "Jatrophidin I" (GWLNLLGP). This octapeptide was synthethized using Fmoc strategy. NMR studies in DMSO_{d6} revealed "cis/trans" conformations of Proline amide bond, and, to provide additional information to this equilibrium, studies of Molecular Dynamics/Simulated Annealing (MD/SA) simulations were realized considering the peptide with Proline in cis and trans orientations, resulting in two representations for the cyclic chain. Additionally, 2D NMR experiments of "Jatrophidin I" using different solvents and temperatures were obtained in order to visualize conformational changes in variable conditions. These data showed that the mainly conformation to this new peptide was found with Pro in cis configuration. Biological studies showed that the new peptide has week antifungal effect against *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *Cryptococcus neoformans*. New studies about antioxidant and antimalarial activities have been evaluated.

10.4 Arquivos .mdp

Os arquivos .mdp aqui representados estão descritos de forma genérica. Cada sistema possui grupos de moléculas características que deverão ser descritas nesses arquivos para permitir o acoplamento de pressão e temperatura a fim de realizar a simulação (veja manual para mais detalhes⁶).

➤ **Arquivo .mdp para minimização usando o algoritmo Steepest Descents**

Este é um arquivo padrão de minimização. Pode ser usado em qualquer sistema sem a necessidade de alterações.

```

title                = Yo
cpp                  = /lib/cpp
define               = -DFLEX_SPC
constraints          = none
integrator           = steep
emtol                = 1
emstep              = 0.001
nsteps              = 10000
nstcomm             = 1
nstxout             = 100
nstvout             = 100
nstfout             = 0
nstlog              = 100
nstenergy           = 100
nstlist             = 10
ns_type             = grid
coulombtype         = PME
rlist               = 0.9
rcoulomb            = 0.9
rvdw                = 0.9
pme_order           = 4
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl              = no
; Isotropic pressure coupling is now on
Pcoupl              = no

```

⁶ http://manual.gromacs.org/current/online/mdp_opt.html

➤ **Arquivo .mdp da primeira etapa de termalização (term_a)**

```

title                = MD_term_a
cpp                  = /lib/cpp
define               = -DFLEXIBLE
constraints          = all-bonds
integrator          = md
tinit               = 0.0
dt                  = 0.002      ; ps !
nsteps              = 500 ; total 1 ps ;0ps-1ps;.
nstcomm             = 1
nstxout             = 200
nstxtcout           = 0
xtc_precision       = 1000
nstvout             = 200
nstfout             = 0
nstlog              = 500
nstenergy           = 200
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
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl              = berendsen
tc-grps             = Protein SOL ; Definir aqui as moléculas do
sistema servindo de padrão para os outros arquivos .mdp
tau_t               = 0.1 0.1
ref_t               = 10 10
; Energy monitoring
energygrps         = Protein SOL ; Definir aqui as moléculas do
sistema da mesma maneira que no tc-grps
; Isotropic pressure coupling is now on
Pcoupl              = berendsen
Pcoupltype         = isotropic
tau_p               = 0.5
compressibility     = 4.5e-5
ref_p               = 1.0
; Generate velocities is off at 50 K.
gen_vel             = yes
gen_temp            = 10.0
gen_seed            = 173529

```

➤ **Arquivo .mdp da segunda etapa de termalização (term_b)**

```

title                = MD_term_b
cpp                  = /lib/cpp
define               = -DFLEXIBLE
constraints          = all-bonds
integrator           = md
tinit                = 1.0
dt                   = 0.002      ; ps !
nsteps               = 4500        ; total 9 ps.;1ps-10ps;
nstcomm              = 1
nstxout              = 200
nstvout              = 200
nstfout              = 0
nstlog               = 500
nstenergy            = 200
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
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl               = berendsen
tc-grps              = Protein SOL
tau_t                = 0.1 0.1
ref_t                = 50 50
; Energy monitoring
energygrps           = Protein SOL
; Isotropic pressure coupling is now on
Pcoupl               = berendsen
Pcoupltype           = isotropic
tau_p                = 0.5
compressibility      = 4.5e-5
ref_p                = 1.0
; Generate velocities is off at 50 K.
gen_vel              = no
gen_temp              = 50.0
gen_seed             = 173529

```

➤ **Arquivo .mdp da terceira etapa de termalização (term_c)**

```
title           = MD_term_c
cpp             = /lib/cpp
define          = -DFLEXIBLE
constraints     = all-bonds
integrator      = md
tinit          = 10.0
dt             = 0.002      ; ps !
nsteps         = 2500      ; total 5 ps.;10-15ps;
nstcomm        = 1
nstxout        = 200
nstvout        = 200
nstfout        = 0
nstlog         = 500
nstenergy      = 200
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
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl         = berendsen
tc-grps        = Protein SOL
tau_t          = 0.1 0.1
ref_t          = 100 100
; Energy monitoring
energygrps     = Protein SOL
; Isotropic pressure coupling is now on
Pcoupl         = berendsen
Pcoupltype    = isotropic
tau_p          = 0.5
compressibility = 4.5e-5
ref_p          = 1.0
; Generate velocities is off at 100 K.
gen_vel        = no
gen_temp       = 100.0
gen_seed       = 173529
```

➤ **Arquivo .mdp da quarta etapa de termalização (term_d)**

```

title                = MD_term_d
cpp                  = /lib/cpp
define               = -DFLEXIBLE
constraints          = all-bonds
integrator           = md
tinit                = 15.0
dt                   = 0.002      ; ps !
nsteps               = 2500        ; total 5 ps.;15ps-20ps;
nstcomm              = 1
nstxout              = 200
nstvout              = 200
nstfout              = 0
nstlog               = 500
nstenergy            = 200
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
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl               = berendsen
tc-grps              = Protein SOL
tau_t                = 0.1 0.1
ref_t                 = 150 150
; Energy monitoring
energygrps           = Protein SOL
; Isotropic pressure coupling is now on
Pcoupl               = berendsen
Pcoupltype           = isotropic
tau_p                 = 0.5
compressibility       = 4.5e-5
ref_p                 = 1.0
; Generate velocities is off at 150 K.
gen_vel              = no
gen_temp              = 150.0
gen_seed              = 173529

```

➤ **Arquivo .mdp da quinta etapa de termalização (term_e)**

```

title                = MD_term_e
cpp                  = /lib/cpp
define               = -DFLEXIBLE
constraints          = all-bonds
integrator           = md
tinit                = 20.0
dt                   = 0.002      ; ps !
nsteps               = 2500        ; total 5 ps ;20ps-25ps;.
nstcomm              = 1
nstxout              = 200
nstvout              = 200
nstfout              = 0
nstlog               = 500
nstenergy            = 200
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
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl               = berendsen
tc-grps              = Protein SOL
tau_t                = 0.1 0.1
ref_t                = 200 200
; Energy monitoring
energygrps           = Protein SOL
; Isotropic pressure coupling is now on
Pcoupl               = berendsen
Pcoupltype           = isotropic
tau_p                = 0.5
compressibility      = 4.5e-5
ref_p                = 1.0
; Generate velocities is off at 200 K.
gen_vel              = no
gen_temp              = 200.0
gen_seed             = 173529

```

➤ **Arquivo .mdp da sexta etapa de termalização (term_f)**

```

title                = MD_term_f
cpp                  = /lib/cpp
define               = -DFLEXIBLE
constraints          = all-bonds
integrator           = md
tinit                = 25.0
dt                   = 0.002      ; ps !
nsteps               = 2500        ; total 5 ps.;25ps-30ps;
nstcomm              = 1
nstxout              = 200
nstvout              = 200
nstfout              = 0
nstlog               = 500
nstenergy            = 200
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
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl               = berendsen
tc-grps              = Protein SOL
tau_t                = 0.1 0.1
ref_t                = 250 250
; Energy monitoring
energygrps           = Protein SOL
; Isotropic pressure coupling is now on
Pcoupl               = berendsen
Pcoupltype           = isotropic
tau_p                = 0.5
compressibility      = 4.5e-5
ref_p                = 1.0
; Generate velocities is off at 250 K.
gen_vel              = no
gen_temp              = 250.0
gen_seed             = 173529

```

➤ **Arquivo .mdp de dinâmica utilizando temperatura constante**

```

title                = MD_full_2ns
cpp                  = /lib/cpp
define               = -DFLEXIBLE
constraints          = all-bonds
integrator           = md
tinit                = 30.0
dt                   = 0.002      ; ps !
nsteps               = 985000     ; total 30ps-2000ps .
nstcomm              = 1
nstxout              = 200
nstvout              = 200
nstfout              = 0
nstlog               = 500
nstenergy            = 200
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
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl               = berendsen
tc-grps              = Protein SOL
tau_t                = 0.1 0.1
ref_t                = 310 310
; Energy monitoring
energygrps           = Protein SOL
; Isotropic pressure coupling is now on
Pcoupl               = berendsen
Pcoupltype           = isotropic
tau_p                = 0.5
compressibility       = 4.5e-5
ref_p                = 1.0
; Generate velocities is off at 310 K.
gen_vel              = no
gen_temp              = 310.0
gen_seed              = 173529

```

10.5 Topologias utilizadas no sistema trombina/PPACK

Abaixo estão listados os parâmetros utilizados no sistema onde a trombina está complexada ao PPACK. Para esse fim, alteramos os resíduos envolvidos nessa ligação utilizando as topologias dos resíduos originais do campo de força GROMOS96 43a1 como referência.

➤ **Aminoácidos modificados incluídos no arquivo ffG43a1.rtp**

❖ Histidina modificada para ligação ao PPACK

```
[ HIP ]
[ atoms ]
  N      N      -0.29000    0      -C      N      H      ga_31
  H      H      0.27000    0      N      CA     CA     ga_17
  CA     CH1     0.00000    1      -C      N      CA     ga_30
  CB     CH2     0.00000    1      N      CA     C      ga_12
  CG     C      -0.10000    2      CA     C      +N     ga_18
  ND1    NR      0.38000    2      CA     C      O      ga_29
  HD1    H      0.30000    2      O      C      +N     ga_32
  CD2    CR1     0.00000    2      N      CA     CB     ga_12
  CE1    CR1    -0.30000    2      C      CA     CB     ga_12
  NE2    NR      0.30000    2      CA     CB     CG     ga_14
  CE2    CH2     0.00000    2      CB     CG     ND1    ga_36
  C      C      0.380      3      CB     CG     CD2    ga_36
  O      O     -0.380      3      ND1    CG     CD2    ga_6
  CG     ND1    HD1    ga_35
  CG     ND1    CE1    ga_6
  HD1    ND1    CE1    ga_35
  N      H      gb_2      CG     CD2    NE2    ga_6
  N      CA     gb_20     ND1    CE1    NE2    ga_6
  CA     C      gb_26     CD2    NE2    CE1    ga_6
  C      O      gb_4      CD2    NE2    CE2    ga_19
  C      +N     gb_9      CE1    NE2    CE2    ga_19
  CA     CB     gb_26
  CB     CG     gb_26
  CG     ND1    gb_9
  CG     CD2    gb_9
  ND1    HD1    gb_2
  ND1    CE1    gb_9
  CD2    NE2    gb_9
  CE1    NE2    gb_9
  NE2    CE2    gb_16
[ bonds ]
[ impropers ]
; ai      aj      ak      al      gr_type
  N      -C      CA      H      gi_1
  C      CA      +N     O      gi_1
  CA     N      C      CB     gi_2
  CG     ND1    CD2    CB     gi_1
  CD2    CG     ND1    CE1    gi_1
  ND1    CG     CD2    NE2    gi_1
  CG     ND1    CE1    NE2    gi_1
  CG     CD2    NE2    CE1    gi_1
  CD2    NE2    CE1    ND1    gi_1
  ND1    CG     CE1    HD1    gi_1
  NE2    CD2    CE1    CE2    gi_1
[ dihedrals ]
; ai      aj      ak      al      gr_type
  -CA     -C      N      CA     gd_4
  -C      N      CA     C      gd_19
  N      CA     C      +N     gd_20
  N      CA     CB     CG     gd_17
[ angles ]
; ai      aj      ak      gr_type
  CA     CB     CG     ND1    gd_20
```

❖ Serina modificada para ligação ao PPACK

```

[ SEP ]
[ atoms ]
  N      N      -0.28000    0
  H      H       0.28000    0
  CA     CH1     0.00000    1
  CB     CH2     0.10000    2
  OG     OA     -0.55000    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     OG     gb_17
[ angles ]
; ai    aj    ak    gr_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     OG     ga_12
[ impropers ]
; ai    aj    ak    al    gr_type
N      -C    CA     H     gi_1
C      CA    +N    O     gi_1
CA     N     C     CB     gi_2
[ dihedrals ]
; ai    aj    ak    al    gr_type
-CA    -C    N     CA     gd_4
-C     N     CA     C     gd_19
N      CA     C     +N    gd_20
N      CA     CB     OG     gd_17

```

❖ Arginina modificada do PPACK para ligação à serina e
histidina

```

[ ARP ]
[ 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     CH2     0.09000    2
  NE     NE      -0.12000    2
  HE     H       0.20000    2
  CZ     C       0.30000    2
  NH1    NZ      -0.32000    2
  HH11   H       0.20000    2
  HH12   H       0.20000    2
  NH2    NZ      -0.30000    2
  HH21   H       0.20000    2
  HH22   H       0.20000    2
  C      C       0.380     3
  OP     OA      -0.380     3
  HP     H       0.24000    3
[ bonds ]
  N      H      gb_2
  N      CA     gb_20
  CA     C      gb_26
  C      OP     gb_12
  OP     HP     gb_1
  CA     CB     gb_26
  CB     CG     gb_26
  CG     CD     gb_26
  CD     NE     gb_20
  NE     HE     gb_2
  NE     CZ     gb_10
  CZ     NH1    gb_10
  CZ     NH2    gb_10
  NH1    HH11   gb_2
  NH1    HH12   gb_2
  NH2    HH21   gb_2
  NH2    HH22   gb_2
[ angles ]
; ai    aj    ak    gr_type
  -C    N     H     ga_31
  H     N     CA    ga_17
  -C    N     CA    ga_30
  N     CA    C     ga_12
  CA    C     OP    ga_12
  C     OP    HP    ga_11
  N     CA    CB    ga_12
  C     CA    CB    ga_12
  CA    CB    CG    ga_14
  CB    CG    CD    ga_14
  CG    CD    NE    ga_12
  CD    NE    HE    ga_19
  HE    NE    CZ    ga_22
  CD    NE    CZ    ga_32
  NE    CZ    NH1   ga_27
  NE    CZ    NH2   ga_27
  NH1   CZ    NH2   ga_27
  CZ    NH1   HH11  ga_22
  CZ    NH1   HH12  ga_22
  HH11  NH1   HH12  ga_23
  CZ    NH2   HH21  ga_22
  CZ    NH2   HH22  ga_22
  HH21  NH2   HH22  ga_23
[ impropers ]
; ai    aj    ak    al    gr_type
  N     -C    CA    H     gi_1
  CA    N     C     CB    gi_2
  NE    CD    CZ    HE    gi_1
  CZ    NH1   NH2   NE    gi_1
  NH1   HH11  HH12  CZ    gi_1
  NH2   HH21  HH22  CZ    gi_1
[ dihedrals ]
; ai    aj    ak    al    gr_type
  -CA   -C    N     CA    gd_4
  -C    N     CA    C     gd_19
  N     CA    C     OP    gd_20
  CA    C     OP    HP    gd_12
  N     CA    CB    CG    gd_17
  CA    CB    CG    CD    gd_17
  CB    CG    CD    NE    gd_17
  CG    CD    NE    CZ    gd_19
  CD    NE    CZ    NH1   gd_4
  NE    CZ    NH1   HH11  gd_4
  NE    CZ    NH2   HH21  gd_4

```

➤ **Aminoácidos modificados incluídos no arquivo ffG43a1.hdb**

HIP	2				
1	1	H	N	-C	CA
1	1	HD1	ND1	CG	CE1
SEP	1				
1	1	H	N	-C	CA
ARP	5				
1	1	H	N	-C	CA
1	1	HE	NE	CD	CZ
2	3	HH1	NH1	CZ	NE
2	3	HH2	NH2	CZ	NE
1	1	HP	OP	C	CA

➤ **Parâmetros de ligação incluídos no arquivo specbond.dat**

HIP	CE2	1	ARP	C	1	1.5	HIP	ARP
SEP	OP	1	ARP	C	1	1.5	SEP	ARP

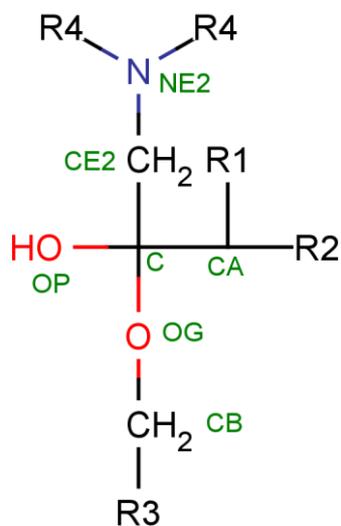
➤ **Parâmetros incluídos no arquivo aminoacids.dat**

HIP
SEP
ARP

➤ **Parâmetros que devem ser incluídos manualmente no arquivo .top**

O conjunto de parâmetros de ligações, ângulos e diedros listados no esquema abaixo definem a topologia do complexo tetraédrico entre trombina e PPACK formado pelos resíduos supracitados. Alguns deles o GROMACS automaticamente inclui no arquivo .top faltando apenas definir os parâmetros correspondentes, mas mesmo com essa facilidade, o arquivo deve ser conferido manualmente para garantir que todas as definições estão incluídas.

Topologia ligação
PPACK/Ser195/His57



R1: cadeia lateral Arg3 PPACK
R2: estrutura PPACK restante
R3: estrutura Ser195 restante
R4: estrutura His57 restante

[bonds]

CE2 C gb_26

OG C gb_17

[angles]

OP C OG ga_8

CE2 C OP ga_12

OG C CA ga_14

CE2 C CA ga_7

CE2 C OG ga_12

NE2 CE2 C ga_8

C OG CB ga_11

[dihedrals]

NE2 CE2 C CA gd_1

NE2 CE2 C OP gd_1

CB OG C OP gd_12

CB OG C CA gd_12

[impropers]

C OP CA CE2 gi_2

C OP CA OG gi_2

11 Curriculum Vitae

Currículo no Sistema Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5865771245547608>

I. Prêmios recebidos:

XIX Salão de Iniciação Científica da URGs: Destaque na área Ciências Biológicas 2007.

II. Apresentação de trabalhos em simpósios:

Giesel, G. M., Altei, W. F., Picchi, D. G., Cilli, E. M., Bolzani, V. S., Verli, H. 2009 Simulação de Dinâmica Molecular aplicada no estudo conformacional do peptídeo cíclico Jatroidina I de *Jatropha curcas*. Workshop: Fitomedicamentos – da química à terapêutica. Faculdade de Farmácia UFRGS.

III. Trabalhos científicos apresentados em congressos:

a. Nacionais:

Giesel, G. M., Lima, L. M. T. R., Faver-Barata, J., Guimarães, J.A., Verli, H.: Molecular dynamics simulation of the interaction between a peptide from papillomavirus E2 protein and DNA. *XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq*, 2006, Águas de Lindóia - SP, Brasil.

Giesel, G. M., Muller, A. P., Souza, C. G., Londero, L., Kawano, C., Gravina, F., Pitta, C., Vizuete, A. K., Moreira, J. D., Perry, M. L. S.: Efeitos de Altas Concentrações de íons Potássio Extracelular Sobre a Síntese Protéica em Córtex Cerebral de Ratos de 10 dias de Vida Pós-natal. *XVII Salão de Iniciação Científica da UFRGS*, 2005. Porto Alegre, RS, Brasil.

Giesel, G. M., Lima, L. M. T. R., Faber-Barata, J., Verli, H.: Caracterização do reconhecimento molecular do peptídeo $\alpha 1E2$ de HPV pelo DNA. *XVIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS*, 2006. Porto Alegre, RS, Brasil.

Giesel, G. M., Lima, L. M. T. R., Faber-Barata, J., Guimarães, J. A., Verli, H.: Simulação de dinâmica molecular da interação entre um peptídeo da proteína E2 de papilomavírus e o DNA. *XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS*, 2007. Porto Alegre, RS, Brasil.

b. Internacionais:

Fernandes, C. L., Becker, C. F., **Giesel, G. M.**, Lima, L. M. T. R., Verli, H.: The use of molecular dynamics simulations in the refinement of crystallographic structures. *XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and 10th International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB)*, 2007, Salvador – BA, Brasil.

Giesel, G. M., Altei, W. F., Picchi, D. G., Cilli, E. M., Bolzani, V. S., Verli, H.: MD/SA simulation applied to conformational study of *Jatropha curcas* cyclic peptide. *XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and XI Congress of the Pan American Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB)*, 2008, Águas de Lindóia – SP, Brasil.

Minotto, J. B., Debastiani, M. A., Zanotto Filho, A., **Giesel, G. M.**, Moreira, J. C. F., Verli, H., Klamt, F.: Cofilin Oxidation Induces Conformational Changes and Decreases Actin Polymerization in Vitro. *XXXVIII Annual Meeting of The Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)*, 2009, Águas de Lindóia – SP, Brasil.

Giesel, G. M., Verli, H.: tRMSF: a protein flexibility analysis in molecular dynamics as a function of both time and residue. *XXXVIII Annual Meeting of The Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)*, 2009, Águas de Lindóia – SP, Brasil.

Altei, W. F., Picchi, D. G., Barbosa, S.C., Cilli, E. M., Giannini, M. J., Cardoso-Lopes, E. M., Young, M. C. M., Torres, L. B., **Giesel, G. M.**, Verli, H., Bolzani, V. S.: NMR studies, solid phase synthesis and MD/SA simulation as a tool for structural elucidation of new bioactive peptides from the latex of *Jatropha curcas* (2008). *Planta Medica* (Stuttgart), (74), 922-922.

IV. Publicações em periódicos especializados:

Lima, L. M. T.R., Becker, C. F., **Giesel, G. M.**, Marques, A. F., Cargneluti, M. T., de Oliveira Neto, M., Monteiro, R. Q., Verli, H., Polikarpov, I.: Structural and thermodynamic analysis of thrombin:suramin interaction in solution and crystal phases (2009). *BBA. Proteins and Proteomics*, (1974), 873-881.

Giesel, G. M., Lima, L. M. T. R., Faber-Barata, J., Guimarães, J. A., Verli, H.: Characterization of the papillomavirus α 1E2 peptide unfolded to folded transition upon DNA binding (2008). *FEBS Letters*, (582), 3619-3624.

V. Co-Orientações de Iniciação Científica:

a. Em andamento:

Hernando Salles Rosa. *Caracterização molecular das propriedades anticoagulantes de saponinas*. Centro de Biotecnologia, UFRGS, a partir de julho de 2009.

VI. Bolsa recebida:

Bolsista CNPq – PIBIC de janeiro de 2005 a dezembro de 2007.

Bolsista CAPES do Programa de Mestrado em Biologia Celular e Molecular pelo Centro de Biotecnologia da UFRGS de março de 2008 a agosto de 2009.