



Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química



Departamento de Físico-Química

**Dinâmica Molecular da Enzima BCL (*Burkholderia cepacia* lipase):
Aspectos da Solvatação e Abertura do Sítio Catalítico na Presença de
Osmólitos e em Interfaces**

Ivan Pires de Oliveira

Tese de Doutorado

Campinas, SP

2017

Ivan Pires de Oliveira

**Dinâmica Molecular da Enzima BCL (*Burkholderia cepacia* lipase):
Aspectos da Solvatação e Abertura do Sítio Catalítico na Presença de
Osmólitos e em Interfaces**

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Leandro Martínez

Departamento de Físico-Química

Universidade Estadual de Campinas

Este arquivo corresponde à versão final da tese defendida pelo aluno Ivan Pires de Oliveira e orientada pelo Prof. Dr. Leandro Martínez.

Campinas, SP

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

Oliveira, Ivan Pires de, 1987-
OL4d Dinâmica molecular da enzima BCL (Burkholderia cepacia lipase) : aspectos da solvatação e abertura do sítio catalítico na presença de osmólitos e em interfaces / Ivan Pires de Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.
Orientador: Leandro Martínez.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.
1. Simulação de dinâmica molecular. 2. Solvatação. 3. Sorbitol. 4. Uréia. 5. Catálise enzimática. I. Martínez, Leandro, 1979-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Molecular dynamics of the enzyme BCL (Burkholderia cepacia lipase) : aspects of the solvation and opening of the catalytic site in the presence of osmolytes and at interfaces

Palavras-chave em inglês:

Molecular dynamic simulation

Solvation

Sorbitol

Urea

Enzymatic catalysis

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Leandro Martínez [Orientador]

Alessandro Silva Nascimento

Alexandre Suman de Araujo

Celso Aparecido Bertran

Pedro Antônio Muniz Vazquez

Data de defesa: 11-08-2017

Programa de Pós-Graduação: Química

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Leandro Martinez (Orientador)

Prof. Dr. Alessandro Silva Nascimento (IFSC-USP)

Prof. Dr. Alexandre Suman de Araujo (DFIS-UNESP)

Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran (IQ-UNICAMP)

Prof. Dr. Pedro Antônio Muniz Vazquez (IQ-UNICAMP)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do(a) aluno(a).

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pelo(a) aluno(a) **IVAN PIRES DE OLIVEIRA**, aprovada pela Comissão Julgadora em 11 de agosto de 2017.

“Neo: Why do my eyes hurt?

Morpheus: You’ve never used them before.”

(Diálogo do filme Matrix baseado na Alegoria da Caverna de Platão)

Agradecimentos

- A primeira pessoa que gostaria de agradecer é o Leandro. Aprendi muito com ele e serei sempre grato por tudo. Foi um grande prazer trabalhar esses quatro anos sob sua orientação. Tenho muito orgulho de ter sido seu orientado nesta etapa tão importante para mim. Obrigado Professor.
- Agradeço também a todos que tive contato no grupo de pesquisa durante esses anos: Luciano, Gabriel, Emilia, Geraldo, Iago, Felipe, Álvaro, Tayane, Antônio, Ricardo, Matheus e principalmente a Mariana;
- A todos os professores pelos ensinamentos. Também gostaria de agradecer a aos funcionários do IQ e da Unicamp pelo pronto atendimento e atenção despendida, desde a zeladoria até a secretaria da pós-graduação;
- Agradeço também a minha família pelo apoio de sempre e por compreenderem a minha ausência em vários momentos;
- Agradeço especialmente a Carol por ter sido tão companheira e ter topado o desafio de vir do Mato Grosso do Sul para Campinas há quatro anos. Sou grato pelos momentos de conversa, viagens, choros e risadas. Cada dia sou mais feliz ao seu lado;
- Às agências de fomento (CAPES, CNPq e FAPESP) e Unicamp que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho, em especial a CAPES pela bolsa.

Resumo

No ambiente intracelular algumas pequenas moléculas, comumente chamadas de osmólitos, contribuem para a estabilização de proteínas, quando estas são submetidas a estresse químico e físico. Compreender a natureza das interações destes osmólitos com proteínas pode ajudar no desenvolvimento de novos solventes e aumentar a estabilidade proteica visando aplicações biotecnológicas. Neste trabalho, usaremos como ferramenta de estudo simulações de Dinâmica Molecular para avaliar a dinâmica de solvatação, além de acoplar o método ABF (*Adaptive Biasing Force*) para estudar a acessibilidade do substrato ao sítio catalítico da enzima BCL (*Burkholderia cepacia* lipase), tanto na presença de sorbitol aquoso, quanto da proteína disposta em interfaces água/octano e água/éster metílico. Os resultados mostram que as interações dos solventes com os resíduos de aminoácidos da superfície proteica são altamente dependentes das características dos átomos que compõem ambos solventes e proteína, e do volume ocupado pelo sorbitol nas camadas de solvatação da BCL, sendo representado por um sistema dinâmico e altamente competitivo. A aplicação das integrais KB (*Kirkwood-Buff Integrals*) revelou que a protonação de Asp/Glu afeta o volume de água e uréia na primeira camada de solvatação, deslocando uréia da primeira para as camadas mais externas. Sugerimos que o efeito desnaturante induzido por uréia em pH ácido deve ter suas origens em duas explicações: grande acúmulo de uréia na superfície proteica, mesmo com perda relativa com a protonação de Asp/Glu, e aumento da afinidade do desnaturante pelo *backbone* protéico. A respeito do caráter estabilizante do sorbitol e relação com a eficiência catalítica da enzima BCL, os resultados apresentados mostram que este comportamento pode ser explicado pela conformação preferencialmente aberta do sítio catalítico da proteína, de acordo com as variações de energia livre entre as conformações fechada↔aberta obtidas pelo método ABF. Neste caso, o estabilizante diminuiu significativamente as energias livres associadas às estruturas abertas (distanciamento das α -hélices 5 e 9). Estruturalmente, o osmólito

sorbitol age diretamente no mecanismo de abertura do domínio catalítico, via impedimento estérico das conformações fechadas. Acompanhamos a orientação da enzima nas interfaces, que ocorreu em ~ 75 ns, sendo um processo termodinâmica e cineticamente favorável, possível de ser acompanhado por simulações MD. A orientação também foi acompanhada pela aproximação dos resíduos da tríade catalítica (Ser₈₇-Asp₂₆₄-His₂₈₆) com as moléculas de ambas as camadas hidrofóbicas (otano e éster metílico do ácido caprílico), com implicações claras na acessibilidade do substrato. Com a proteína orientada e estabilizada na interface, aplicamos o método ABF e calculamos os perfis de $\Delta G_{fechada \leftrightarrow aberta}$ em solução aquosa e nas interfaces. Os resultados deixam claro que as estruturas abertas são estabilizadas pelas interfaces e que isto pode ser devido aos domínios U1 e U2 serem hidrofóbicos, fato que possibilita a entrada de solvente orgânico no bolsão catalítico, impedindo a aproximação das α -hélices 5 e 9 com fechamento de sítio catalítico. Espera-se que os resultados apresentados nesta tese auxiliem tanto no entendimento da dinâmica de solvatação de proteínas pelos osmólitos sorbitol e uréia quanto na orientação da enzima BCL em diferentes interfaces, dispondo informações sobre a acessibilidade do substrato ao sítio catalítico, informação útil para uso racional em aplicações biotecnológicas.

Abstract

In the intracellular environment, certain small molecules commonly called osmolytes, contribute to the stabilization of proteins when these are submitted to chemical and physical stress. Understanding the nature of the interactions of these osmolytes with proteins can help in the development of new solvents and increase protein stability for biotechnological applications. In this work, we will use a Molecular Dynamics simulation as a tool study to evaluate the solvation dynamics, in addition to using the ABF (Adaptive Biasing Force) method to study the accessibility of the substrate to the catalytic site of the BCL (*Burkholderiacepacia* lipase) enzyme, both in the presence of aqueous sorbitol and of the protein prepared in water/octane and water/methyl ester interfaces. The results show that the interactions of the solvents with the amino acid residues of the protein surface are highly dependent on the characteristics of the atoms making up both solvent and protein, and of the volume occupied by the sorbitol in the BCL solvation layers, being represented by a dynamic and highly-competitive system. The application of the KB (*Kirkwood-Buff*) integrals revealed that the protonation of Asp/Glu affects the volume of water and urea in the first solvation layer, displacing urea from the first to the outer layers. We suggest that the denaturant effect induced by urea at an acid pH must have its origins in two explanations: a large accumulation of urea on the protein surface, even with a relative loss with the protonation of Asp/GLU, and an increased affinity of the denaturant for the protein backbone. With respect to the nature of the stabilizer sorbitol and the relation with the catalytic efficiency of the BCL enzyme, the results show that this behavior can be explained by the preferably open conformation of the protein's catalytic site according to the free energy variations between the closed↔opened conformation obtained through the ABF method. In this case, the stabilizer significantly decreased the free energies associated with open structures (distancing of the α -helices 5 and 9). Structurally, the osmolyte sorbitol acts directly on the opening mechanism of the catalytic domain through the steric hindrance

of closed conformations. We monitored the orientation of the enzyme at the interfaces, which occurred in \sim 75 ns, being a thermodynamically and kinetically favorable process that can be monitored through MD simulations. The orientation was also monitored by the approximation of residues of the catalytic triad (SER₈₇-Asp₂₆₄-His₂₈₆) with the molecules of both hydrophobic layers (octane and caprylic acid methyl ester), with clear implications for the accessibility of the substrate. With the protein oriented and stabilized in the interface, we applied the ABF method and calculated the $\Delta G_{closed \leftrightarrow open}$ profiles in an aqueous solution and in the interfaces. The results make it clear that the open structures are stabilized by the interfaces and that this may be due to the fact that the domains U1 and U2 are hydrophobic, which allows for the entry of an organic solvent in the catalytic pocket, preventing the approximation of the α -helices 5 and 9 with the closure of the catalytic site. The results presented in this thesis are expected to assist in the understanding of the solvation dynamics of proteins by the osmolytes sorbitol and urea regarding the orientation of the BCL enzyme in different interfaces, and providing information on the accessibility of the substrate to the catalytic site, useful information for rational use in biotechnological applications.

Lista de figuras

- Figura 1. 1** (A) Diagrama topológico da enzima BCL mostrando as suas estruturas secundárias: β -fitas (flechas), α -hélices e 3_{10} -hélices (retângulos). Os círculos verdes destacam os resíduos que compõem o sítio catalítico (Ser₈₇, Asp₂₆₄ e His₂₈₆). (B) Visão ampla da enzima mostrando o domínio C (verde), domínio U1 (azul) e domínio U2 (roxo). Figura adaptada.²¹ A BCL possui 320 aminoácidos e massa molecular de 33128 Da. O íon Ca²⁺ está destacado em vermelho.....30
- Figura 1. 2** (A) Abertura do sítio catalítico definido pelo afastamento das α -hélices 5 e 9 da enzima BCL. (B) Passos de simulação MD mostrando a exposição do sítio catalítico em solvente apolar tolueno. Figura adaptada.²⁴.....32
- Figura 1. 3** Alguns dos osmólitos, divididos em duas classes dependendo do papel exercido na atividade catalítica e caráter protetivo de proteínas. Mais compostos e a ocorrência de cada um podem ser obtidos em publicações anteriores.²⁸⁻³⁰34
- Figura 1. 4** Modelo sugerindo como a solvatação por osmólitos deve ocorrer na superfície de proteínas. Na desnaturação, a uréia deve interagir preferencialmente com a superfície da proteína, excluindo água. No caso protetivo, o poliol é excluído da superfície da proteína. Figura adaptada.³⁹36
- Figura 1. 5** Modelo de ação dos osmólitos considerando as variações de energia livre entre os estados nativo (N) e desnovelados (D). Estes compostos agem principalmente alterando as energias dos estados desnovelados. Figura adaptada.^{33,41}37
- Figura 1. 6** Desenho representativo dos parâmetros geométricos que definem os potenciais de interações intra e intermoleculares dos campos de força utilizados em simulações de Dinâmica Molecular.39

Figura 2. 1 Distribuição do solvente em torno do soluto. Em (A) a distribuição do solvente em torno do soluto. Em (B) perfil típico da função de distribuição, considerando uma camada ($r + dr$) de solvente em torno do soluto.....	48
Figura 2. 2 Visualização de três instantes das simulações MD da BCL em água, sorbitol e uréia. (A) sistema completo, (B) água, (C) sorbitol e (D) uréia. Nenhuma solvatação preferencial é observada, sugerindo uma distribuição aproximadamente homogênea dos solventes em torno da enzima BCL.....	52
Figura 2. 3 Funções de distribuição soluto-solvente (g_{ss}). O soluto considerado é a proteína e os solventes são (A) água, (B) sorbitol e (C) uréia. Os modelos mostram como o efeito competitivo ocorre na superfície da proteína de modo geral.....	56
Figura 2. 4 Perfis de energia livre mostrando que: (A) água é estabilizada por sorbitol e perturbada por uréia (<i>inset</i>); (B) interações proteína-sorbitol tornam-se menos favoráveis pela adição de uréia, principalmente a curtas distâncias; (C) sorbitol desestabiliza uréia nas camadas mais externas de solvatação.	57
Figura 2. 5 Funções de distribuição soluto-solvente g_{ss} considerando somente os átomos do <i>backbone</i> da enzima BCL e os solventes: (A-C) água; (D-F) sorbitol; (G-I) uréia.	59
Figura 2. 6 Frequência de distribuição do número de ligações de hidrogênio realizadas pela enzima BCL: (A) total de ligações; (B) entre os resíduos da BCL; (C) com água; (D) com sorbitol e (E) com uréia.....	61
Figura 2. 7 Sobrevivência das ligações de hidrogênio: (A) proteína-água; (B) proteína-proteína; (C) proteína-sorbitol e (D) proteína-uréia. Os <i>insets</i> mostram as quantidades relativas de ligações de hidrogênio calculadas comparativamente ao sistema somente em água e com adição dos osmólitos estudados.	63
Figura 2. 8 Funções de distribuição soluto-solvente (g_{ss}) de acordo com o tipo de resíduo, carregados, polares ou apolares. Solventes, (A-C): água; (D-F): sorbitol; (G-I): uréia. No modelo a direita, os tipos de resíduos mais afetados, em cada camada de solvatação, são indicados pelas linhas tracejadas.....	66

Figura 2. 9 Funções de distribuição soluto-solvente (g_{ss}) considerando somente os resíduos carregados como soluto. Solventes são: água, sorbitol e uréia. (A-C): resíduos ácidos aspartato e glutamato; (D-F): resíduos básicos lisina e arginina.....73

Figura 2. 10 Funções de distribuição soluto-solvente (g_{ss}) considerando átomos específicos dos osmólitos e água. (A) água, (B) sorbitol e (C) uréia. (D) g_{ss} apenas para os hidrogênios alifáticos do sorbitol e resíduos específicos da enzima BCL.75

Figura 3. 1 Comportamento do solvente em uma solução quando soluto é adicionado. Variações no volume são observadas de acordo com a afinidade do solvente-soluto. .87

Figura 3. 2 Distribuição relativa dos valores de rmsd para a enzima BCL considerando os átomos do *backbone* e da cadeia lateral. Em (A) Asp/Glu protonados e (B) Asp/Glu desprotonados, e comparação com adição do desnaturante uréia (sombra verde guia-referência). Em (C) valores de rmsd para cada resíduo da enzima BCL (estado protonado), mostrando que o aumento nos valores de rmsd está associado principalmente ao domínio U1, mantendo o núcleo hidrofílico (domínio C) mais rígido.²¹ A esfera vermelha é o íon Ca^{2+} 92

Figura 3. 3 Correlação entre as ligações de hidrogênio e a solvatação da enzima BCL: (A) proteína-água e (B) proteína-uréia. Em (C) o número de ligações de hidrogênio entre proteína-Asp/Glu e (D) o número de ligações de hidrogênio entre proteína-Asp/Glu considerando somente os resíduos ácidos não superficiais (Asp₅₅-Glu₁₉₇-Asp₂₂₈-Asp₂₃₆-Asp₂₄₂-Asp₂₆₄-Asp₂₈₈-Asp₂₈₉) destacados em verde na estrutura tridimensional.....95

Figura 3. 4 Mobilidade conformacional do resíduo Asp₂₆₄, que compõe a tríade catalítica de enzima BCL (Ser₈₇-Asp₂₆₄-His₂₈₆).^{3,93} Em (A) é possível observar que a forma protonada apresentou menores desvios da estrutura cristalográfica inicial, devido a realização de ligações de hidrogênio com His₂₈₆, Asp₂₆₄ atuando como doador na ligação. (B) mostra que a forma desprotonada do resíduo Asp₂₆₄ é mais flexível, com maiores valores de rmsd amostrados. No estado desprotonado, ligações de hidrogênio formadas entre o Asp₂₆₄ com o *backbone* da His₂₈₆ foram frequentemente amostradas, detalhadas na simulação 3 (S3).....97

Figura 3. 5 Efeito do estado de protonação dos resíduos ácidos Asp/Glu na distribuição de solvente na superfície proteica. (A) e (B) funções de distribuição soluto-solvente (g_{ss}) de acordo com a alteração no estado de protonação dos resíduos Asp/Glu. (C) e (D) mostram os valores das integrais de Kirkwood-Buff (KBI ou G_{ss}) para proteína-água e proteína-uréia. (E) e (F) mostram as primeiras derivadas de KBI em relação à distância. *Insets:* mostram a primeira camada de solvatação (FSL – do inglês *First Solvation Layer*) e a segunda camada de solvatação (SSL – do inglês *Second Solvation Layer*).....100

Figura 3. 6 Valores de G_{ss} para a solvatação da enzima BCL por água e uréia, de acordo com o estado de protonação dos resíduos ácidos Asp/Glu. Em (A-C) G_{ss} considerando uma camada de solvatação espessa até 10 Å (G_{solv}). Em (D-F) proporcionalidade de solvatação das duas primeiras camadas, dada por $\gamma_{solv} = G_{solv1^a}/G_{solv2^a}$, de acordo com G_{ss} para a primeira camada de solvatação (FSL) e segunda camada de solvatação (SSL), definidas pelas áreas sob os respectivos picos de máximo.104

Figura 3. 7 Modelo da microsolvatação proteica por água e uréia de acordo com o estado de protonação dos resíduos ácidos Asp/Glu. O fluxo de moléculas está associado aos valores de KBI calculados para as primeira e segunda camadas de solvatação.106

Figura 3. 8 Distribuição de (A) água e (B) uréia em torno do *backbone* protéico de acordo com o estado de protonação dos resíduos ácidos Asp/Glu. A distribuição relativa de água no *backbone* (priemeira camada) é levemente diminuída pela protonação. A afinidade *backbone*-uréia (interações de curto alcance) é levemente aumentada, sendo uma possível razão do desnívelamento protóico induzido por este desnaturante em pH ácido.....108

Figura 3. 9 Modelo ilustrando a perturbação nas ligações de hidrogênio proteína-uréia com as cadeias laterais de Asp/Glu protonadas e efeitos na distribuição de uréia em torno do *backbone* protóico. Em (A) para os átomos de HN e N, com moléculas de uréia atuando como receptora da ligação. Em (B) para os átomos de C e O, com uréia sendo doadora da ligação. Observa-se que em ambiente de pH ácido a uréia deve agir mais fortemente como receptora das ligações de hidrogênio.....110

Figura 4. 1 Mecanismo reacional da enzima BCL envolvendo os resíduos Ser₈₇, Asp₂₆₄ e His₂₈₆, que compõem a tríade catalítica desta enzima. Figura adaptada.³116

Figura 4. 2 Perfil de energia livre típico para dois estados conformacionais (A e B) separados por uma barreira energética. Em nosso caso, estes estados são representados pelos estados conformacionais aberto e fechado da enzima BCL.....121

Figura 4. 3 Distribuições relativas das distâncias entre as α -hélices 5 e 9 em simulações MD tradicionais. Coordenada reacional ξ adotada neste trabalho como sendo a distância entre os carbonos alfa ($C\alpha$) de Gly₂₅₀ e Phe₁₄₂. Sistema contendo somente água (azul) e contendo água+sorbitol (vermelho), concentração de sorbitol de ~ 1 mol·L⁻¹. A esfera amarela é o íon Ca²⁺.....123

Figura 4. 4 Perfis de energia livre obtidos pelos cálculos de ABF para a abertura do sítio catalítico da enzima BCL de acordo com adição gradativa de sorbitol de 0 a 1 mol·L⁻¹. Imagens mostrando conformações das α -hélices 5 e 9 nas posições fechada e aberta. A convergência dos perfis de energia livre foi definida pela comparação dos valores obtidos nos passos crescentes da simulação.....125

Figura 4. 5 Análise estrutural das interações do sorbitol na entrada do sítio catalítico da enzima BCL ($\sim 1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de sorbitol). Cada molécula de sorbitol identificada é destacada com uma seta vermelha em quatro frames aleatórios das simulações MD. Isto mostra que o custo energético associado ao fechamento do sítio catalítico pode ser explicado por um mecanismo direto devido ao efeito estérico promovido por moléculas do estabilizante sorbitol interagindo diretamente com as α -hélices 5 e 9 (domínio U1 e U2 destacados em verde). A esfera vermelha é o íon Ca^{2+} 127

Figura 4. 6 Modelo energético qualitativo da abertura do sítio catalítico da enzima BCL na presença de concentrações crescentes do osmólito estabilizante sorbitol. Sugere-se que as conformações abertas do sítio catalítico são favorecidas por sorbitol devido ao decréscimo na energia livre associada às estruturas abertas das α -hélices 5 e 9. Esta estabilização pode ser explicada estruturalmente pelo efeito estérico desempenhado por moléculas de sorbitol, sendo consequência das interações hidrofóbicas com resíduos dos domínios U1 e U2. 129

Figura 5. 1 Modelo cinético envolvendo a orientação de lipases em interfaces, proposto por R. Verger e GH De Hass, baseado no modelo cinético de Michaelis-Menten-Henri.¹²³ O processo de orientação da enzima BCL (E) na interface deve atingir uma conformação acessível (E^*) ao solvente (S). (E^*S) é o intermediário enzima-substrato e (P) o produto. Figura adaptada.^{3,124} 135

Figura 5. 2 Estruturas moleculares dos solventes orgânicos utilizados na confecção das interfaces com água. Octano e CAME (*Caprylic Acid Methyl Ester*). 136

-
-
- Figura 5. 3** Orientação da enzima BCL nas interfaces água/CAME e água/octano. O ângulo de rotação é definido como o ângulo entre o vetor normal a interface e apontando para a fase aquosa (cinza), e o vetor (vermelho) centrado no sítio ativo (amarelo). Com tais definições, a configuração inicial apresenta estes vetores aproximadamente ortogonais entre si, sendo que a sua colinearidade indica que a abertura do sítio ativo está orientada para a fase orgânica. (A) Ângulo de rotação medido no tempo de simulação. (B) Taxa de rotação, ou seja, velocidade angular de rotação do ângulo θ , em função do tempo de simulação. Ambos os gráficos mostram que a estabilidade das orientações é obtida antes de 100 ns de simulação, com a abertura do sítio ativo orientada para a fase orgânica.....140
- Figura 5. 4** Miscibilidade das duas fases, solvatação proteica e orientação da enzima nas interfaces. (A) Água (ciano) é parcialmente solúvel na fase do ester metílico (vermelho). A interface é, portanto, espessa e pouco particionada, fato que torna a enzima BCL significativamente solvatada por ambos os solventes. (B) A interface composta por água (ciano) e octano (roxo) é estreita e bem definida, devido à imiscibilidade dos componentes. A enzima BCL interage com a fase de octano apenas superficialmente, porém precisamente orientada para expor a abertura do sítio catalítico para a fase orgânica.....141
- Figura 5. 5** Entrada dos solventes na abertura do sítio catalítico da enzima BCL, levando a interações diretas com a tríade catalítica. (A) octano e (B) CAME.143
- Figura 5. 6** Análises conformacionais da enzima BCL nas interfaces: (A) raio de giro, (B) fração de contatos nativos; (C) RMSD em função do tempo de simulação. Na interface água/CAME a enzima é mais estável, enquanto que na interface água/octano aparentemente há uma pequena alteração estrutural comparativamente a estrutura proteica em água. As linhas azuis e as sombras em ciano representam a média e desvio padrão para cada uma das propriedades observadas previamente em simulações da BCL em água pura.⁷⁶144

Figura 5. 7 Flutuações estruturais dos resíduos da enzima BCL em função do tempo, de acordo com o RMSD dos átomos C α em relação a estrutura inicial da simulação. (A) interface água/octano. (B) interface água/CAME. Claramente, as mesmas regiões de altos desvios são observadas em ambas as interfaces (resíduos 15-30; 120-160; 220-270), porém com deslocamentos maiores observados na interface com octano.....145

Figura 5. 8 Exposição do bolsão catalítico, representada pela distância entre os domínios U1 e U2 da enzima BCL após a interação com a fase orgânica. (A) Distâncias entre os átomos de C α dos resíduos Phe142 (domínio U1) e Gly250 (domínio U2), em função do tempo de simulação, indicando aumento na abertura catalítica após a reorientação da proteína (~75 ns). (B) e (C) distribuições das distâncias nas interfaces com octano e CAME, respectivamente, mostrando que o distanciamento dos domínios é maior na interface água/octano. A linha vertical azul (~22 Å) indica a distância associada à forma aberta da enzima em água pura.....146

Figura 5. 9 Perfis de energia livre da abertura do bolsão catalítico da enzima BCL em água e em interfaces com octano e CAME. As menores energias livres das formas abertas da enzima nas interfaces resultam da penetração das moléculas orgânicas dentro dos domínios U1 e U2, que impedem o retorno para o estado fechado. Não somente a forma aberta da enzima se torna mais estável nas interfaces, como a barreira de energia livre associada à transição que existe em água é eliminada. A convergência dos perfis de energia livre foi definida pela comparação dos valores obtidos nos passos crescentes da simulação.....149

Figura 5. 10 Mecanismo de ativação da enzima BCL em interfaces água/solventes orgânicos: a enzima é parcialmente ativa em água, podendo ser encontrada nos estados aberto ou fechado com igual probabilidade. Quando a proteína atinge a interface, rapidamente ela se reorienta para expor os domínios U1 e U2 para a fase orgânica. Finalmente, a abertura do bolsão catalítico se torna altamente favorável do ponto de vista da termodinâmica, e expõe a tríade catalítica para o substrato ou solução de substrato.....151

Lista de tabelas

Tabela 2. 1 Detalhe dos sistemas simulados, contendo a enzima BCL, osmólitos e água.....	47
Tabela 2. 2 Ligações de hidrogênio realizadas pela enzima BCL nos sistemas simulados.....	61
Tabela 3. 1 Detalhes dos sistemas simulados. Cinco simulações independentes de 40 ns foram realizadas para cada sistema.....	86
Tabela 4. 1 Detalhe dos sistemas simulados aplicando o método ABF.....	118
Tabela 5. 1 Detalhe dos sistemas simulados nas interfaces.....	138

Lista de abreviaturas e siglas

ABF – *Adaptive Biassing Force*

BCL – *Burkholderia cepacia lipase*

BM – *Stem Bromelain*

CAME – *Caprylic Acid Methyl Ester* (Éster Metílico do Ácido Caprílico)

$\text{C}\alpha$ – Carbono alfa do *backbone* protéico

CD – *Circular Dichroism* (Dicroismo Circular)

CG – *Conjugate-Gradient*

CK – *Creatine Kinase* (Creatina Quinase)

CRL – *Candida rugosa lipase*

FTIR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (Espectroscopia de Infravermelho com Transforma de Fourier)

GdnHCl – *Guanidine hydrochloride* (Cloridrato de guanidina)

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

KBI – *Kirkwood-Buff Integrals* (Integrais de Kirkwood-Buff)

MD – *Molecular Dynamics* (Dinâmica Molecular)

NMA – *N-methylacetamida*

PDB – *Protein Data Bank*

PMF – *Potential Mean Force* (Potencial de Força Média)

RML – *Rhizomucor miehei lipase*

RMSD – *Root Mean Square Deviations* (Desvio Quadrático Médio)

RDF – *Radial Distribution Function* (Função de Distribuição Radial)

SB – *Stem Bromelain*

SPR – *Surface Plasmon Resonance* (Ressonância Plasmônica de Superfície)

TAG – Triacilglicerol

TI – *Thermodynamic Integration* (Integração Termodinâmica)

TLL – *Thermomyces lanuginosa lipase*

TMAO – *Trimethylamine N-oxide* (N-óxido de trimetilamina)

Sumário

Listas de figuras	XI
Listas de tabelas	XIX
Listas de abreviaturas e siglas	XX
Capítulo 1	26
1. Contextualização da área de estudo	26
1.1. Descrição da enzima BCL (<i>Burkholderia cepacia</i> lipase)	27
1.1.1. Obtenção e aplicação da proteína.....	27
1.1.2. Características estruturais e conformacionais	29
1.2. Solvatação de proteínas por osmólitos estabilizantes vs. desestabilizantes.....	33
1.3. Simulações de Dinâmica Molecular: conceitos e aplicação no estudo da solvatação de proteínas.....	37
Capítulo 2	44
2. Solvatação competitiva da enzima BCL por sorbitol, uréia e água	44
2.1. Metodologia	45
2.1.1. Simulações de Dinâmica Molecular	45
2.1.2. Funções de distribuição.....	47
2.1.3. Ligações de hidrogênio	49

2.2. Resultados e discussões.....	50
2.2.1. Solvatação competitiva entre os solventes pela superfície da enzima BCL	50
2.2.2. Distribuição dos solventes em torno da enzima BCL: uma visão geral	53
2.2.3. Interação dos osmólitos com o <i>backbone</i> da enzima BCL	57
2.2.4. Efeitos na estruturação das ligações de hidrogênio.....	60
2.2.5. Distribuição de água na superfície proteica conforme os tipos de resíduos	65
2.2.6. Solvatação competitiva dos osmólitos conforme os tipos de resíduos	69
2.2.7. Solvatação dos resíduos carregados: ácidos <i>vs.</i> básicos	70
2.2.8. Funções de distribuição para átomos específicos e a orientação preferencial dos solventes.....	74
2.2.9. Perturbação das interações água-proteína promovida pelos osmólitos.....	78
2.3. Conclusões parciais	79
Capítulo 3	82
3. Microsolvatação da enzima BCL por uréia: considerações sobre o estado de protonação dos resíduos ácidos Aspartato e Glutamato	82
3.1. Metodologia	84
3.1.1. Simulações de Dinâmica Molecular.....	85
3.1.2. Integrais de Kirkwood-Buff (KBI)	86
3.2. Resultados e discussões.....	91
3.2.1. Alterações conformacionais da enzima BCL.....	91

3.2.2.	Perturbação das ligações de hidrogênio	93
3.2.3.	Asp ₂₆₄ : dependência da mobilidade com o estado de protonação.....	96
3.2.4.	Perfil da distribuição de água e uréia em torno da proteína de acordo com o estado de protonação de Asp/Glu	97
3.2.5.	Análise da microsolvatação proteica de acordo com a alteração do estado de protonação de Asp/Glu	101
3.2.6.	Efeitos da protonação de Asp/Glu na solvatação do <i>backbone</i> protéico....	106
3.3.	Conclusões parciais	110
Capítulo 4	113
4.	Aspectos energéticos da abertura do sítio catalítico da enzima BCL na presença de sorbitol.....	113
4.1.	Metodologia	116
4.1.1.	Simulações de Dinâmica Molecular	117
4.1.2.	Metodologia ABF (<i>Adaptive Biasing Force</i>).....	118
4.2.	Resultados e discussões.....	121
4.2.1.	Abertura do sítio catalítico em simulações MD tradicionais.....	122
4.2.2.	Perfis de energia livre para abertura/fechamento do sítio catalítico	123
4.2.3.	Análise estrutural: espaço ocupado pelo sorbitol na entrada do sítio catalítico	125

4.2.4. Modelo energético da abertura do sítio catalítico da enzima BCL na presença de sorbitol	128
4.3. Conclusões parciais	130
<i>Capítulo 5</i>	132
5. Dinâmica orientacional da enzima BCL em interfaces e efeitos na acessibilidade do substrato.....	132
5.1. Metodologia	135
5.1.1. Simulações de Dinâmica Molecular.....	136
5.2. Resultados e discussões.....	138
5.2.1. Orientação dos domínios U1 e U2 nas interfaces água/CAME e água/octano	
138	
5.2.2. Alterações conformacionais da enzima BCL de acordo com a orientação nas interfaces	143
5.2.3. Perfil de energia livre para o afastamento das hélices α 5 e α 9 com domínios U1 e U2 imersos na fase orgânica.....	147
5.2.4. Modelo enzimático da BCL em interface: translação, orientação e energia livre de abertura do sítio catalítico	150
5.3. Conclusões parciais	152
<i>Conclusões finais da tese</i>	153
<i>Perspectivas</i>	155
<i>Referências</i>	157

Capítulo 1

Contextualização da área de estudo

Proteínas possuem diversas funções dentro de organismos vivos, dentre as quais se destacam o papel desempenhado pelas enzimas. Estas macromoléculas são responsáveis por promoverem catálise de diversas reações bioquímicas, que dependem essencialmente das propriedades da enzima, do substrato alvo e do meio ambiente em que a enzima se encontra. Triacilglicerol lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas importantes para uma gama enorme de reações bioquímicas devido à alta especificidade e eficiência catalítica. Também têm papel de destaque em diferentes campos industriais, tais como produtos químicos, produtos farmacêuticos, alimentos e biocombustíveis.^{1,2} Em condições apropriadas lipases podem catalisar a hidrólise de óleos e gorduras (compostos essencialmente de triacilgliceróis) e algumas reações químicas específicas como esterificação, interesterificação, alcoólise, e acidólise, desempenhando papel importante na indústria biotecnológica.²⁻⁴

Devido ao potencial de aplicação industrial de proteínas, muitos métodos têm sido desenvolvidos tanto para aumentar a estabilidade quanto otimizar a atividade catalítica. Algumas destas estratégias são a derivatização de aminoácidos, mutagênese e uso de cosolventes como aditivos.⁵⁻⁷ O uso de cosolventes possui algumas vantagens como baixos custo e complexidade técnica, quando comparado com métodos de modificação de proteínas, levando a aplicações práticas mais viáveis.⁸

1.1. Descrição da enzima BCL (*Burkholderia cepacia* lipase)

1.1.1. Obtenção e aplicação da proteína

Lipases podem ser obtidas de diferentes fontes biológicas, tais como animais, vegetais e microorganismos. No entanto, algumas características fazem com que as enzimas microbianas sejam mais utilizadas, como: altos rendimentos de obtenção da

Capítulo 1. Contextualização da área de estudo

enzima; manipulação genética facilitada; menor interferência da sazonalidade no desenvolvimento; crescimento relativamente rápido dos organismos e condições econômicas mais viáveis.²

A enzima BCL é extraída da bactéria *Burkholderia cepacia*. Este microorganismo é patogênico, gram-negativa, oportunista em pessoas com sistema respiratório debilitado. Porém, praticamente inofensiva para pessoas saudáveis.⁹ Esta bactéria foi descoberta na década de 1950 por W.H. Burkholder, quem identificou o microorganismo responsável pela deterioração de cebolas.¹⁰ Até a década de 1990 esta bactéria era designada como *Pseudomonas cepacia*. No entanto, estudos de taxonomia envolvendo RNA, estabeleu um novo gênero para o microorganismo. Na ocasião, o cientista que o descobriu foi elegantemente homenageado.¹¹

A produção de lipases, e de enzimas de uma forma geral, em proporções industriais é realizada principalmente por fermentação submersa, de forma que os nutrientes necessários para o crescimento do microorganismo ficam solubilizados em fase líquida. Todo o processo é realizado em biorreatores com diferentes capacidades de produção, de 10 a 100 mil litros, produzindo, principalmente, de forma descontínua por batelada em tempos que variam de um dia até uma semana. Estes biorreatores são dotados de sistemas de aquecimento e resfriamento, possibilitando o controle de temperatura, além de outras variáveis ambientais como, pH e concentração de oxigênio dissolvido.¹²

A lipase da enzima BCL também pode ser produzida por fermentação em estado sólido, como mostrado previamente por T.F.C. Salum e colaboradores. Com possibilidade de obtenção de biodiesel em reatores de leito fixo.¹³

Outras aplicações da enzima BCL evolvem seu uso como biocatalisador na indústria de alimentos, formulações de detergentes, e síntese de compostos químicos enantiosseletivos.^{14,15} De forma análoga às lipases de modo geral, a BCL catalisa reações de hidrólise,^{16,17} síntese enantiosseletiva de alcoóis,¹⁸ e transesterificação com ampla aplicação na produção de biodiesel.¹⁹

1.1.2. Características estruturais e conformacionais

As lipases possuem grande variação de tamanho, mas possuem similaridade sequencial nas proximidades dos resíduos que compõem o sítio catalítico. Além disso, é encontrado um padrão em suas estruturas tridimensionais, um núcleo comum entre lipases denominado enovelamento α/β -hidrolase (α/β -hydrolase fold).²⁰ Este enovelamento é composto essencialmente por oito β -folhas e seis α -hélices, que abriga a tríade catalítica ([Ser/Asp/Cys]-His-[Asp/Glu]). O resíduo de Serina é sempre encontrado em um “cotovelo” no centro da enzima entre uma β -fita e uma α -hélice.²¹

A enzima BCL é frequentemente dividida em três partes, dois domínios pequenos (U1 e U2) e um grande domínio (C), que compõem o volume total desta proteína (~30Åx~40Åx~50Å). O domínio C é composto pelos resíduos: 1-117, 167-214 e 262-320. A combinação destes resíduos forma uma β -folha central composta pelas β -fitas 1-6. Também compõem este domínio seis α -hélices (α 1 e α 11; α 2, α 3, α 7 e α 10). Os domínios menores são formados da seguinte maneira: U1 (resíduos 118-166) abriga três α -hélices (α 4, α 5 e α 6); U2 (resíduos 215-261) composto por duas β -fitas antiparalelas, β -hairpin (β 3 e β 4) e duas α -hélices (α 8 e α 9).^{21,22} Além disso, um íon Ca²⁺ está presente na estrutura, ligando o domínio U2 ao domínio C. A Figura 1.1 mostra a distribuição das estruturas secundárias da enzima BCL e sua forma tridimensional, com destaque para a tríade catalítica formada por Ser₈₇, Asp₂₆₄ e His₂₈₆.³

A estrutura proteica utilizada nesta tese foi obtida no banco de dados PDB (*Protein Data Bank*),²³ código identificador 1YS1. Esta proteína foi resolvida por cristalografia de raio-X, resolução de 1,10 Å. A proteína apresenta 19 mutações nos seus resíduos de aminoácidos (A2D, G3N, S18T, N40R, S92T, D125G, S137T, H154N, Q165K, R171Q, L218I, F221G, L232I, V240A, L243P, I256V, L266V, K276Q, Y300N).

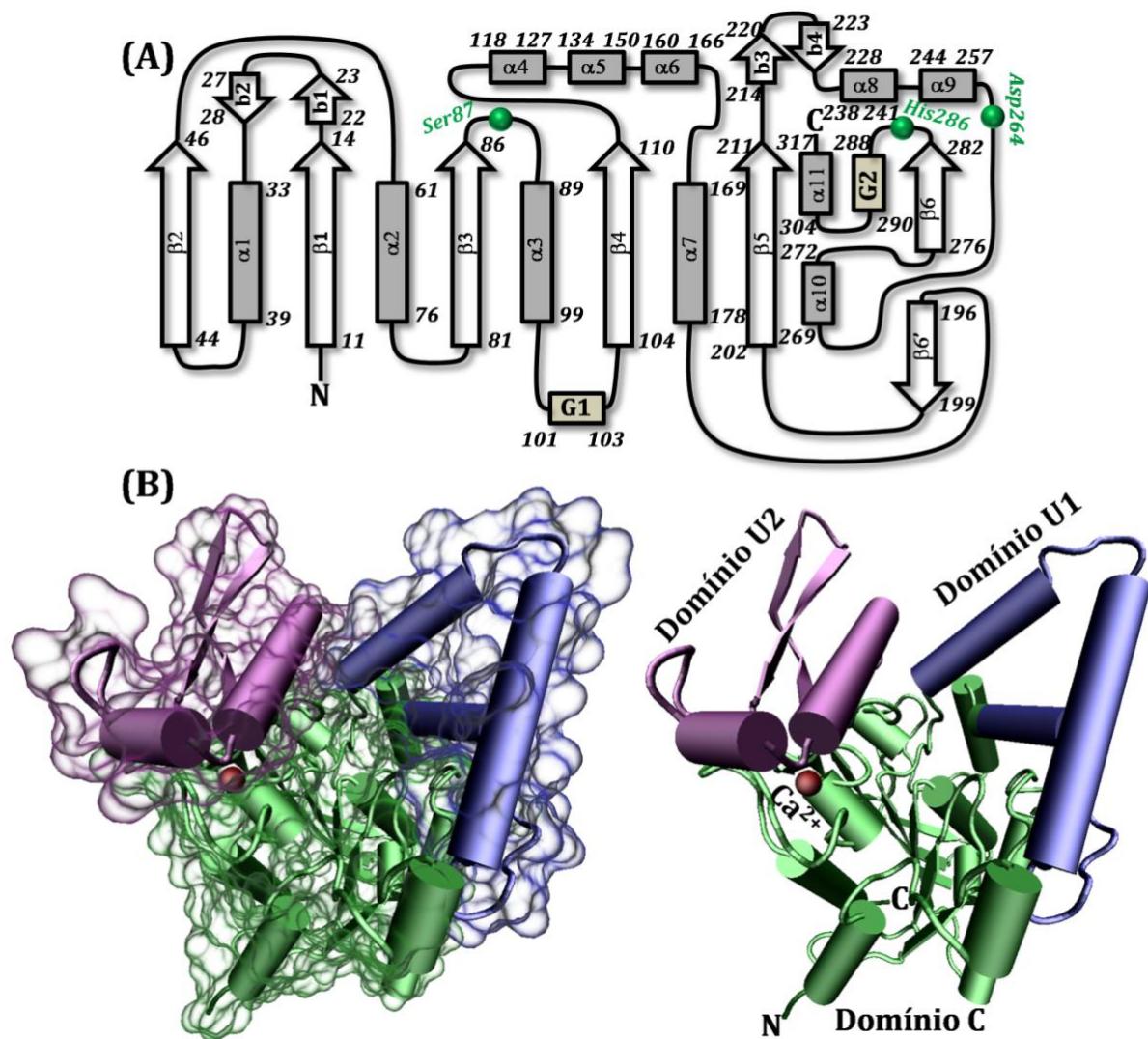


Figura 1. 1 (A) Diagrama topológico da enzima BCL mostrando as suas estruturas secundárias: β-fitas (flechas), α-hélices e 3₁₀-hélices (retângulos). Os círculos verdes destacam os resíduos que compõem o sítio catalítico (Ser₈₇, Asp₂₆₄ e His₂₈₆). (B) Visão ampla da enzima mostrando o domínio C (verde), domínio U1 (azul) e domínio U2 (roxo). Figura adaptada.²¹ A BCL possui 320 aminoácidos e massa molecular de 33128 Da. O íon Ca²⁺ está destacado em vermelho.

Os domínios U1 e U2 abrigam estruturas que desempenham papel crucial na atividade catalítica da enzima BCL, especificamente as α -hélices 5 e 9. Estas duas hélices estão diretamente relacionadas com a abertura do sítio catalítico. Na situação aberta as duas hélices se distanciam expondo os resíduos Ser₈₇-Asp₂₆₄-His₂₈₆ ao substrato, levando à reação catalítica de interesse (Figura 1.2).³ Fatores que alteram o equilíbrio de abertura/fechamento deste subdomínio devem ter implicações diretas na eficiência catalítica. Alguns estudos mostram que este processo de abertura pode ser induzido em ambiente essencialmente apolar ou em interfaces entre as fases apolar/aquosa.^{24,25} Este mecanismo é bem interessante, principalmente considerando o substrato alvo apolar desta enzima, sendo investigado nos capítulos 4 e 5 desta tese.

Outro aspecto importante que pode ser explorado, considerando a orientação em interfaces, é o mecanismo de dissociação do substrato para dentro do bolsão catalítico. Além, é claro, da dissociação do produto do sítio catalítico para a solução. Nestes casos, as propriedades hidrofílicas das moléculas (nas formas de substratos e produtos) devem influenciar na migração destas moléculas para as fases orgânicas ou aquosas. Estes mecanismos de dissociação não serão abordados nesta tese, mas ficarão como perspectivas para futuros trabalhos.

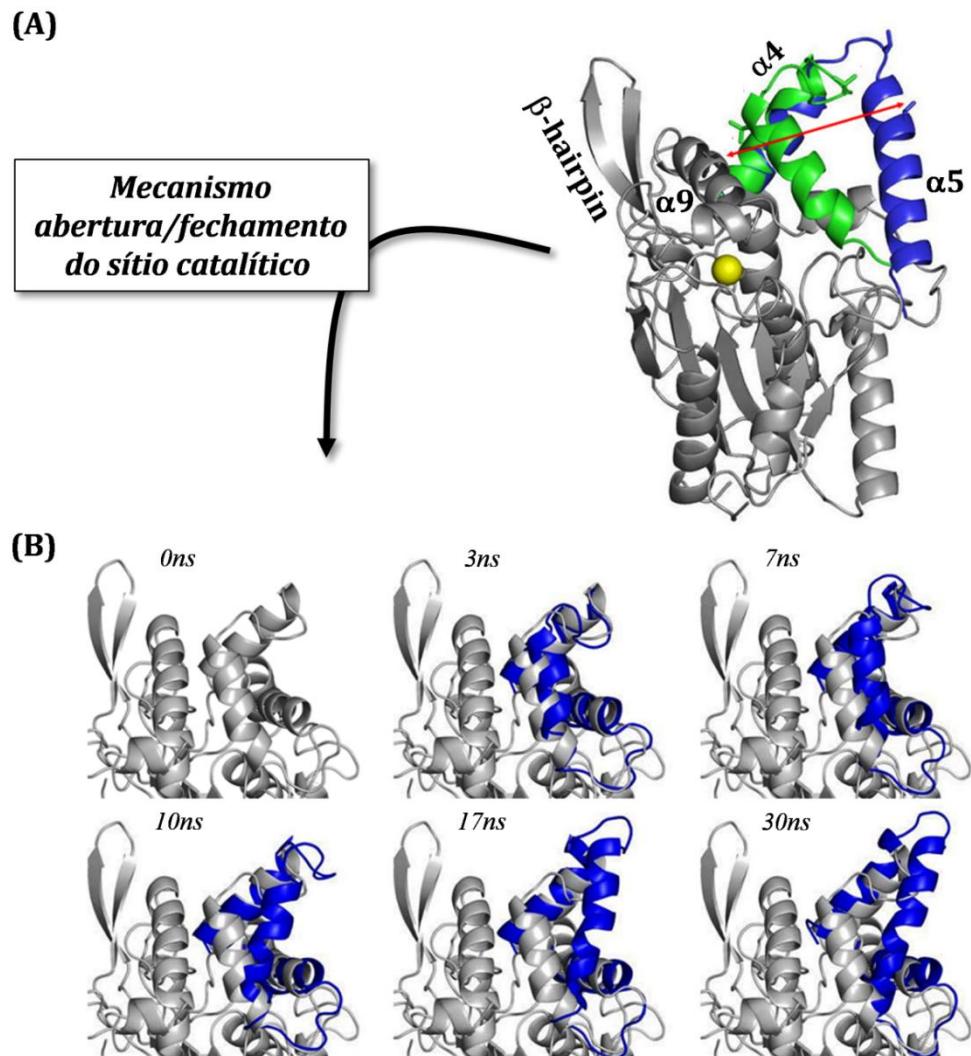


Figura 1. 2 (A) Abertura do sítio catalítico definido pelo afastamento das α -hélices 5 e 9 da enzima BCL. (B) Passos de simulação MD mostrando a exposição do sítio catalítico em solvente apolar tolueno. Figura adaptada.²⁴

1.2. Solvatação de proteínas por osmólitos estabilizantes vs. desestabilizantes

A catálise enzimática pode ser fortemente influenciada pelas condições ambientais em que a proteína se encontra. Perturbações físicas e químicas como temperatura, pH do meio reacional, concentração de sais e presença de co-solventes podem levar tanto à diminuição quanto ao aumento da atividade catalítica.²⁶ Neste sentido, cada enzima deve possuir máxima taxa de conversão num conjunto próprio destas variáveis ambientais.

Alguns compostos curiosamente exercem papel importante tanto no processo catalítico, quanto na estabilização de proteínas. Estes compostos são agrupados de forma geral em duas classes e são comumente chamados de osmólitos, compostos orgânicos de pequena massa molecular. (I) osmólitos estabilizantes: este subgrupo é dividido em polióis (sorbitol, trehalose, glicerol, outros), metilaminas (*TMAO-trimethylamine N-oxide*, sarcosina) e derivados de aminoácidos (prolina, taurina, outros); (II) osmólitos desestabilizantes: subgrupo composto por uréia e GdnHCl (*guanidine hydrochloride*).²⁷ Alguns exemplos de osmólitos são apresentados na Figura 1.3.

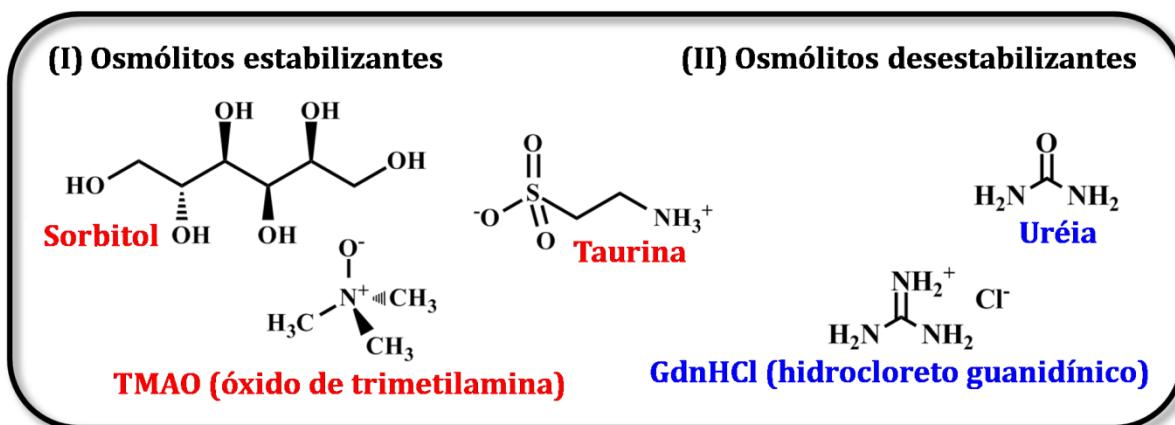


Figura 1. 3 Alguns dos osmólitos, divididos em duas classes dependendo do papel exercido na atividade catalítica e caráter protetivo de proteínas. Mais compostos e a ocorrência de cada um podem ser obtidos em publicações anteriores.²⁸⁻³⁰

Os osmólitos que possuem caráter protetivo conseguem manter as funções e estruturas de proteínas mesmo quando estas são submetidas a estresse por agentes químicos ou físicos, protegendo-as da desnaturação.^{31,32} Tratando especificamente de polióis, diversos trabalhos na literatura verificaram a influência direta destes compostos na estabilidade proteica e atividade enzimática.¹⁶ Por outro lado, parece existir uma concentração ideal de polióis para atuarem como estabilizantes, sendo ultrapassado este limiar seu efeito passa a ser deletério, como relatado para trehalose.²⁸ Os tipos de osmólitos, bem como suas concentrações ideais, têm sido selecionados pela natureza durante o processo evolutivo. Organismos usam este efeito de proteção e adaptam-se a ambientes hostis, prevenindo a desnaturação proteica e mantendo suas funções biológicas.^{27,33} Neste sentido, entender como estes compostos agem na estabilização proteica contribui em dois aspectos: (I) compreender a adaptação evolutiva dos organismos vivos através do mecanismo molecular envolvido; (II) fornecer informações para processos biotecnológicos que buscam o desenvolvimento de novos osmólitos e enzimas.

Capítulo 1. Contextualização da área de estudo

O caráter desnaturante da uréia também tem sido amplamente discutido na literatura, com diversas sugestões sobre seu mecanismo de ação. O efeito desestabilizante pode ser devido às interações diretas com o *backbone* das proteínas, levando a perturbações nas interações intermoleculares dos resíduos, principalmente ligações de hidrogênio, com efeito direto na perda das estruturas secundárias.³⁴ Trabalhos realizados com pequenos peptídeos têm mostrado que a uréia pode interagir fortemente com resíduos polares levando à estabilização de conformações do estado inativo. Esta molécula também pode alterar a estrutura e dinâmica de solvatação das moléculas de água com o peptídeo.³⁵ Por outro lado, os osmólitos estabilizantes detêm propriedades protetoras contra agentes químicos desnaturantes, tal como a uréia. Isto foi demonstrado recentemente por Rani e Venkatesu que estudaram a estabilidade e atividade de uma proteína com importância médica devido à sua atividade anti-inflamatória, a enzima BM (*stem bromelain*), em solução aquosa de vários osmólitos estabilizantes (glicerol, sorbitol, sacarose e trehalose) na presença de desnaturantes químicos (uréia e GdnHCl).³⁶ Existem algumas sugestões para este mecanismo, por exemplo, pela exclusão direta de moléculas de uréia da superfície proteica, ou pelo efeito indireto via estabilização de moléculas de água.^{29,37} Estes modelos tentam explicar de maneira simplificada quais são as perturbações sofridas pelos solventes e como isso altera a dinâmica de solvatação de proteínas por estes osmólitos.³⁸

Os mecanismos estabilizantes/desestabilizantes dos osmólitos são comumente explicados levando em conta as interações favoráveis com a superfície da proteína. Se o osmólito apresenta características desnaturantes, este deve ser fortemente atraído para a superfície proteica e, caso seja um osmólito protetivo, o comportamento contrário deve ser observado. Como consequência da afinidade do osmólito pela superfície proteica, ocorre acúmulo ou exclusão de água das primeiras camadas de hidratação.^{37,39} Esta dinâmica de solvatação é frequentemente lembrada quando se discute resultados experimentais embasados no microambiente molecular,³⁹ como mostrado genericamente na Figura 1.4.

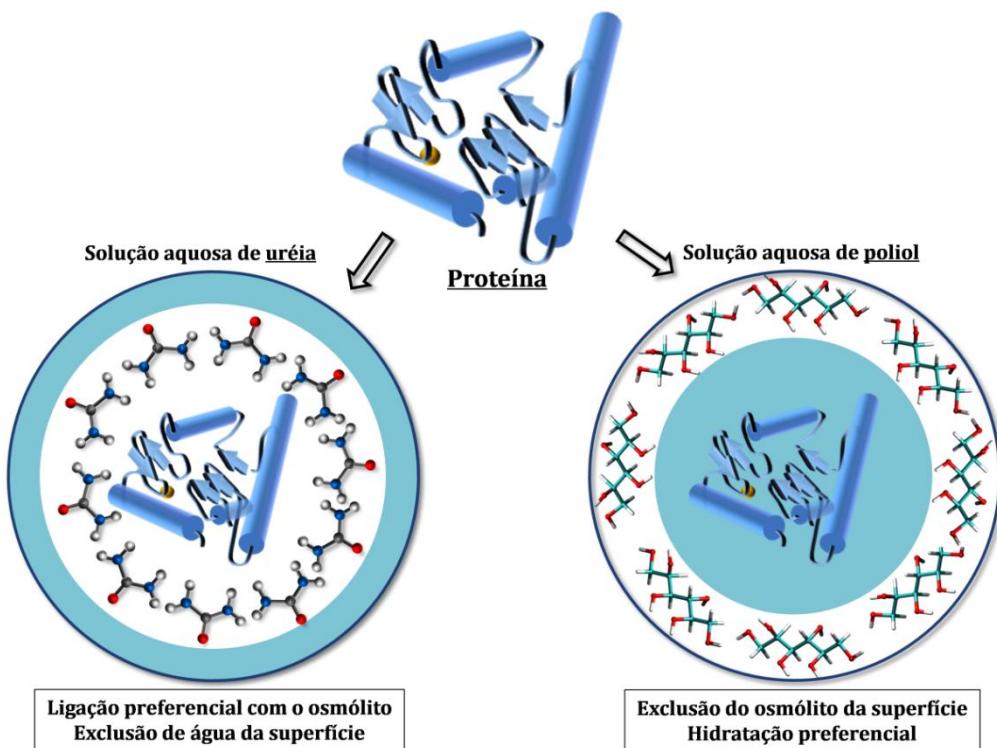


Figura 1. 4 Modelo sugerindo como a solvatação por osmólitos deve ocorrer na superfície de proteínas. Na desnaturação, a uréia deve interagir preferencialmente com a superfície da proteína, excluindo água. No caso protetivo, o poliol é excluído da superfície da proteína. Figura adaptada.³⁹

O modelo apresentado na Figura 1.4 é o primeiro passo para compreender os processos de estabilização e desnaturação envolvendo osmólitos, pois estamos analisando somente as conformações enoveladas da proteína. Se considerarmos que a uréia liga-se fortemente aos resíduos superficiais, portanto mais expostos da proteína, este desnaturante deve estabilizar as estruturas de maior área superficial, ou seja, as estruturas desnoveladas. Por outro lado, se o osmólito não estabiliza as conformações de maiores áreas superficiais, a proteína mantém-se no estado enovelado e, portanto, trata-se de um osmólito estabilizante,^{33,40,41} conforme modelo apresentado na Figura 1.5. Nestes casos, os osmólitos agem alterando as energias livres principalmente dos estados

Capítulo 1. Contextualização da área de estudo

desnovelados: (I) dificultando o acesso a estes estados (estabilizante) ou (II) facilitando a acessibilidade destes estados (desestabilizante).

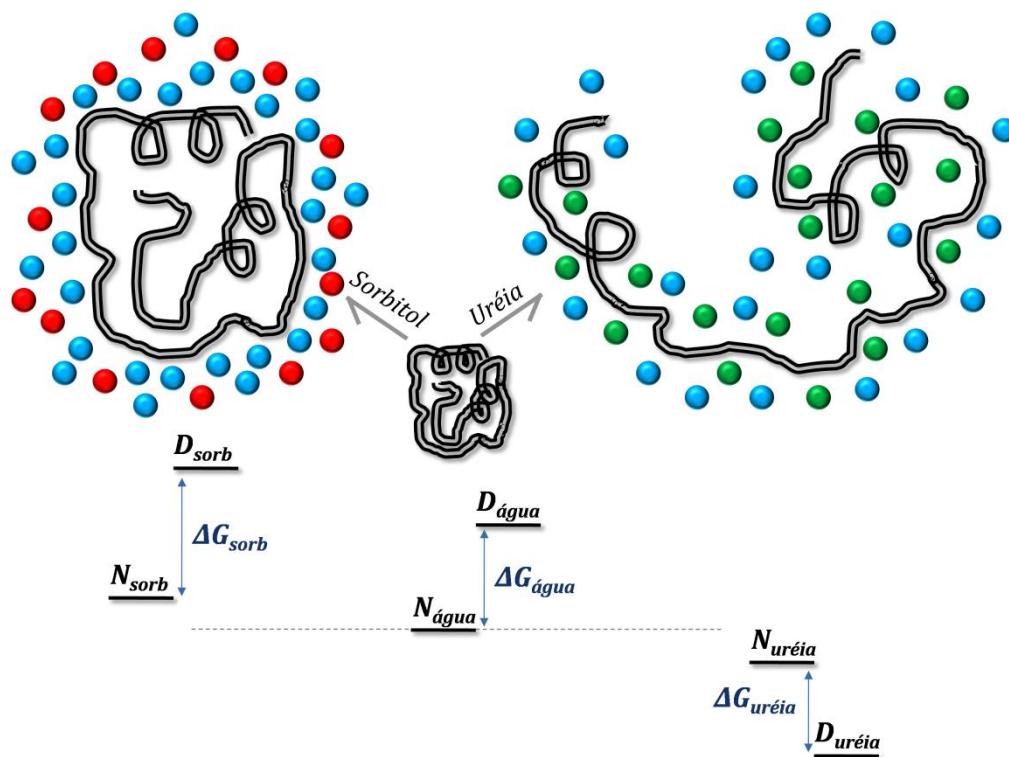


Figura 1. 5 Modelo de ação dos osmólitos considerando as variações de energia livre entre os estados nativo (N) e desnovelados (D). Estes compostos agem principalmente alterando as energias dos estados desnovelados. Figura adaptada.^{33,41}

1.3. Simulações de Dinâmica Molecular: conceitos e aplicação no estudo da solvatação de proteínas

Simulações de Dinâmica Molecular (MD do inglês *Molecular Dynamics*) são utilizadas para estudar como um dado sistema molecular evolui com o tempo, considerando as interações entre as partículas do ponto de vista da Mecânica Clássica. Para realizar os cálculos de MD é preciso conhecer as coordenadas e velocidades

Capítulo 1. Contextualização da área de estudo

iniciais dos átomos, seus potenciais de interação (intra e inter-moleculares) e as equações de movimento clássicas.

Existem disponíveis diversos potenciais clássicos para a realização das simulações MD, cada um com uma composição própria sobre as equações que fornecem o potencial resultante. Desta forma, diferentes Campos de Força, que é a combinação da forma funcional com o conjunto dos arquivos de parâmetros de potenciais e topologia, podem ser utilizados para realizar as simulações MD, como CHARMM,^{42,43} OPLS,⁴⁴ GROMOS⁴⁵ e AMBER.⁴⁶ Estes Campos de Força possuem funções de energia potencial similares à da Equação 1.1. Nesta equação, V_{total} é uma soma dos potenciais intra e intermoleculares, como: ligações covalentes (1º termo); ângulos, formados por três átomos adjacentes e ligados covalentemente (2º termo); torções diedrais, para um conjunto de quatro átomos (3º termo); potenciais de Lennard-Jones, para pares de átomos que interagem por forças de Van der Walls (4º termo); e potencial eletrostático, que descreve as interações entre átomos carregados (5º termo).

$$V_{total} = \frac{1}{2} \sum_{lig} k_b (r - r_0)^2 + \frac{1}{2} \sum_{ang} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \frac{1}{2} \sum_{died} k_\omega [1 + \cos(n\omega - \gamma)] \\ + \sum_{pares} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{pares} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad Eq. 1.1$$

Na Equação 1.1 os seguintes parâmetros devem ser definidos: k_b , r_0 , k_θ , θ_0 , k_ω , n , γ , ϵ_{ij} , σ_{ij} , q_i , q_j . Tais parâmetros podem ser obtidos por métodos experimentais ou cálculos quânticos e faz parte do processo de parametrização molecular.

Outras contribuições podem ser adicionadas ao cálculo de V_{total} através de termos como os potenciais de Urey-Bradley e ângulos impróprios. Portanto, V_{total} é composto pelos potenciais que descrevem as interações intra-moleculares (ligações,

Capítulo 1. Contextualização da área de estudo

ângulos e diedros, além de Urey-Bradley e impróprios) e inter-moleculares (Lennard-Jones e Coulomb), mostradas na Figura 1.6.

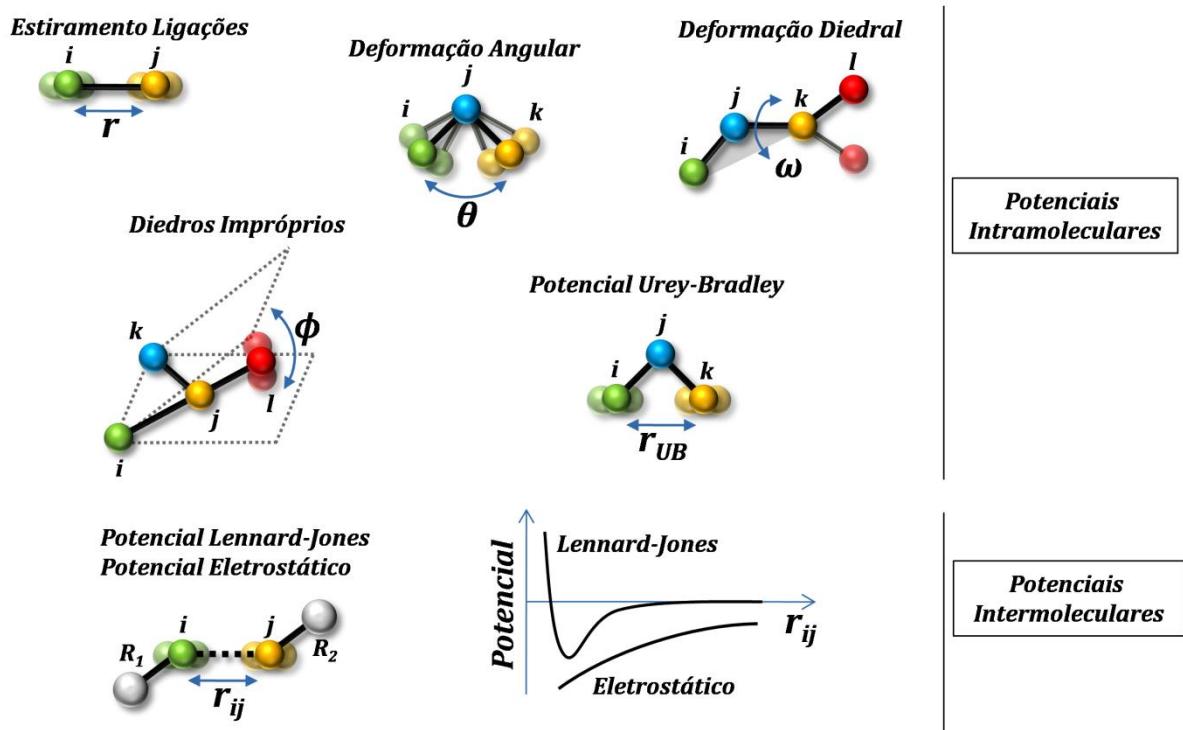


Figura 1. 6 Desenho representativo dos parâmetros geométricos que definem os potenciais de interações intra e intermoleculares dos campos de força utilizados em simulações de Dinâmica Molecular.

As coordenadas iniciais dos átomos para proteínas podem ser obtidas pelo banco de dados PDB (*Protein Data Bank*),²³ por exemplo. Os demais componentes como solventes e contra-íons podem ser adicionados randomicamente na caixa de simulação. O inicio da simulação se dá pela definição das velocidades iniciais dos átomos que compõem o sistema, estas velocidades podem ser zero ou mais comumente atribuídas de acordo com a distribuição de probabilidades de Maxwell-Boltzmann, com a energia cinética do sistema correspondendo à temperatura termodinâmica. Cada componente da velocidade segue a distribuição descrita na Equação 1.2:

$$p_{(vel)} = \left(\frac{m}{2\pi k_B T}\right)^{1/2} \exp\left[-\frac{1}{2} \frac{mv^2}{k_B T}\right] \quad \text{Eq. 1.2}$$

Onde: $p_{(vel)}$ é a probabilidade do átomo de massa m na temperatura T ter velocidade v .

Com os parâmetros do Campo de Força, posições e velocidades iniciais definidos, as trajetórias podem ser obtidas por integração numérica das equações diferenciais de movimento. Ou seja, devem-se determinar as posições e velocidades em um passo seguinte ($t + \Delta t$), isto é feito através do método de diferenças finitas, com as posições seguintes sendo calculadas por expansões de Taylor. Os programas de simulação MD usam geralmente algoritmos de *Verlet*,⁴⁷ ou variações deste como *Velocity-Verlet*, implementado no NAMD.⁴⁸ De modo geral, estes algorítmos calculam as interações entre os átomos considerando suas posições e as forças que atuam em cada átomo. A força que atua em cada átomo é calculada pelo gradiente do potencial $F_i(t) = -\nabla V_{(t)}$. Desta forma, usando a segunda Lei de Newton, a aceleração de cada átomo também é calculada: $F_i(t) = -\nabla V_{(t)} = m_i a_i(t)$, onde m_i é a massa do átomo i . Depois do cálculo da aceleração, a velocidade de cada átomo no instante ($t + \Delta t$) deve ser calculada. Obtendo-se as velocidades em ($t + \Delta t$), as novas posições podem ser calculadas. Com as novas posições definidas, o programa recalcula os potenciais de interação, seguido do cálculo de força, aceleração, velocidade e novas posições. Estes ciclos correspondem a trajetória da simulação e descrevem a evolução temporal do sistema molecular.

Especificamente, o algorítimo *Velocity-Verlet* calcula as novas posições utilizando expansões de Taylor de segunda ordem, como mostrado na Equação 1.3.

$$x(t + \Delta t) = x(t) + v(t)\Delta t + \frac{a(t)\Delta t^2}{2} \quad \text{Eq. 1.3}$$

Capítulo 1. Contextualização da área de estudo

A obtenção da velocidade posterior em $(t + \Delta t)$ é realizada de acordo com a velocidade no instante (t) e pelo cálculo da média das acelerações nos instantes (t) e $(t + \Delta t)$, mostrado na Equação 1.4.

$$v(t + \Delta t) = v(t) + \frac{a(t)\Delta t}{2} + \frac{a(t + \Delta t)\Delta t}{2} \quad \textbf{Eq. 1.4}$$

Neste caso, para o cálculo da velocidade em $(t + \Delta t)$ as acelerações nos instantes (t) e $(t + \Delta t)$ devem ser obtidas. O que o algoritmo faz é armazenar um vetor de velocidade por passo de simulação. Primeiramente, as acelerações são determinadas calculando-se as forças no instante (t) . Posteriormente, as velocidades são calculadas em um instante intermediário $(t + \Delta t/2)$, de acordo com a Equação 1.5.

$$v(t + \Delta t/2) = v(t) + \frac{\Delta t}{2} a(t) \quad \textbf{Eq. 1.5}$$

O algoritmo utiliza o valor da velocidade calculado em $(t + \Delta t/2)$ para obter as novas posições no instante desejado $(t + \Delta t)$, conforme mostrado na Equação 1.6.

$$x(t + \Delta t) = x(t) + v(t + \Delta t/2)\Delta t \quad \textbf{Eq. 1.6}$$

Com as novas posições determinadas, o algoritmo consegue aplicar o campo de força e determinar novas forças em $(t + \Delta t)$. Consequentemente possibilita o cálculo da velocidade em $(t + \Delta t)$, mostrado na Equação 1.7, finalizando um ciclo dentro da Dinâmica Molecular.

$$v(t + \Delta t) = v(t + \Delta t/2) + \frac{\Delta t}{2} a(t + \Delta t) \quad \text{Eq. 1.4}$$

Simulação MD é uma técnica ideal para buscar informações a respeito da distribuição do solvente em torno de proteínas e testar as hipóteses descritas anteriormente. Sabemos, por estudos prévios, que a solvatação de lipases pode ocorrer de forma bem heterogênea quando submetida a uma mistura de solventes com polaridades bem distintas, como água e CO₂ supercrítico, por exemplo.⁴⁹ Por outro lado, quando ambos, água e solvente, possuem polaridades similares, as diferenças na distribuição da solvatação em torno da proteína deve ser mais sutil. Estudos anteriores de simulações MD utilizando TMAO como agente protetor sugerem que a estabilização pode ocorrer indiretamente via estruturação das moléculas de água.³⁷ Também diminuiria as interações da água com os grupamentos amida da proteína, sendo que tais interações são indesejadas pois podem levar a proteína à desnaturação.^{50,51} O TMAO apresenta três grupamentos metila, portanto é um osmólito relativamente hidrofóbico. Considerando que polióis possuem mais de um grupamento hidroxila em suas estruturas, portanto mais hidrofílicos, a dinâmica de interação com os resíduos de aminoácidos devem ocorrer de forma alternativa ao TMAO.

Estudo utilizando simulação MD tem mostrado que o volume (e massa molar) do poliol tem influência na estabilização proteica, quanto mais volumoso o osmólito, mais eficiente ele se torna.⁵² Um dos mais volumosos poliois que são utilizados com frequência é a trehalose. O papel protetor deste osmólito quando induzido em um sistema com uréia foi avaliado por simulações MD.⁵³ Neste caso, foi utilizado NMA (*N-methylacetamida*) como modelo de peptídeo e computadas as funções de distribuição e ligações de hidrogênio entre os solventes e o NMA. O trabalho mostrou que as ligações de hidrogênio NMA-água foram afetadas pela presença de moléculas de uréia, e que a trehalose, por outro lado, não competiu significativamente com uréia por estas ligações. Isto sugere que o poliol age estabilizando proteínas não pela exclusão de uréia de sua superfície, mas sim de uma forma alternativa.

Entender como acontece a distribuição dos osmólitos na superfície de proteínas pode ajudar a desvendar o mecanismo que envolve a estabilização destas macromoléculas biológicas. Neste sentido, estudamos a dinâmica de solvatação da enzima BCL na presença de dois osmólitos comumente utilizados em ensaios de estabilidade protéica: sorbitol e uréia. Primeiramente discutiremos sobre solvatação desta enzima por estes osmólitos em solução aquosa, identificando os tipos de resíduos com maior afinidade. Posteriormente, discutiremos sobre a influência do sorbitol no processo de abertura do sítio catalítico com implicações na acessibilidade do substrato. Finalmente, avaliaremos o processo de orientação da enzima BCL em duas interfaces com polaridades distintas, água e octano ou éster metílico do ácido caprílico. Espera-se que o conjunto de informações apresentadas aqui auxilie no entendimento da dinâmica de solvatação proteica por estes osmólitos e na interpretação dos efeitos de estabilidade e atividade catalítica da enzima BCL.

Capítulo 2

Solvatação competitiva da enzima BCL por sorbitol, uréia e água

A dinâmica de solvatação da enzima BCL (*Burkholderia cepacia* lipase) foi analisada buscando entender quais os efeitos que os osmólitos sorbitol e uréia exercem sobre as moléculas de água na superfície da enzima BCL, bem como as interações competitivas dos osmólitos entre si. Neste capítulo mostraremos como se dá a distribuição destas moléculas em torno da enzima em questão, sendo que este comportamento pode ser estendido para proteínas de modo geral, considerando a semelhança molecular baseada nos resíduos de aminoácidos.

2.1. Metodologia

Simulações de Dinâmica Molecular foram realizadas partindo-se da estrutura cristalográfica da enzima BCL disponível no banco de dados PDB (*Protein Data Bank* ID:1YS1),²³ contendo 320 resíduos de aminoácidos e resolução de 1,10Å.²² O ligante (ácido hexilfosfônico (R)-2-metil-3-fenilpropil éster) complexado ao sitio catalítico foi removido da estrutura para a confecção das caixas de simulação. Este complexante é um análogo ao substrato natural desta enzima, o triacilglicerol (TAG).

2.1.1. Simulações de Dinâmica Molecular

As configurações iniciais foram construídas com o programa Packmol,⁵⁴ contendo a enzima BCL, água e íons Na⁺ e Cl⁻ (concentração de ~0,1 mol·L⁻¹) para neutralizar cargas da caixa de simulação, além de sorbitol e uréia, de acordo com o sistema desejado. As concentrações de sorbitol e uréia foram mantidas mais próximas possível a 1.0 mol·L⁻¹, valor utilizado experimentalmente.¹⁶ As concentrações de água também foram alteradas o mínimo possível entre os sistemas. Vale ressaltar que manter as mesmas quantidades de solventes sem alterar suas concentrações é um pouco

Capítulo 2. Solvatação competitiva da enzima BCL por sorbitol, uréia e água

complicado, pois sempre que adicionamos um novo solvente o volume total do sistema aumenta e, portanto, diminui a concentração dos solventes que já faziam parte do sistema anteriormente. Isto é importante, pois pode influenciar nas análises dos resultados. Com estas considerações, foram construídos quatro sistemas mostrados com mais detalhes na Tabela 2.1. Estes sistemas foram equilibrados como segue: (I) com todos os átomos da enzima BCL fixos realizou-se a relaxação dos solventes com 1000 passos de minimização de energia pelo método de Gradientes-Conjugados (GC) seguidos de 200 ps de simulação MD; (II) mantendo somente os átomos de carbonos alfa ($C\alpha$) da proteína fixos, 500 passos de minimização GC foram realizados, seguidos de mais 200 ps de simulação MD; (III) sem fixar nenhum átomo da enzima BCL foi realizada simulação MD de 2,2 ns.

As coordenadas e velocidades finais da etapa de equilibração foram utilizadas para iniciar os cálculos das trajetórias das simulações MD. Trajetórias de 40 ns foram simuladas em *ensemble* NPT em temperatura de 298.15 K e pressão de 1 atm. O controle da pressão foi mantido pelo barostato de Langevin (com período de 200 ps com tempo de decaimento de 100 ps) e temperatura de 298.15 K. A temperatura foi mantida constantemente através da dinâmica de Langevin (com frequência de perturbação de 10 ps^{-1}). O campo de força CHARMM foi utilizado tanto para a proteína quanto para os solventes (água, sorbitol e uréia),^{55,56} adotando o modelo TIP3P para a água.⁵⁷ As simulações foram computadas com o programa NAMD⁴⁸ e as visualizações obtidas com VMD.⁵⁸ Foram confeccionados quatro sistemas de simulação para estudar a dinâmica de solvatação da BCL, apresentados na Tabela 2.1. Para todas as condições descritas, cinco simulações MD foram realizadas empregando o protocolo descrito acima, totalizando 800 ns (4 sistemas x 5 simulações x 40 ns).

Tabela 2. 1 Detalhe dos sistemas simulados, contendo a enzima BCL, osmólitos e água.

Sistema	Notação	Quantidade de moléculas/Concentração (mol·L ⁻¹)		
		Água	Sorbitol	Uréia
1	BCL-H₂O	20800/55,49	0	0
2	BCL-Sor-H₂O	20800/49,25	400/0,95	0
3	BCL-Ure-H₂O	20800/52,68	0	400/1,01
4	BCL-Ure-Sor-H₂O	20800/46,74	400/0,90	400/0,90

2.1.2. Funções de distribuição

A função de distribuição é uma ferramenta muito útil dentro da mecânica estatística. Ela informa quantitativamente, como ocorre a variação da densidade de partículas de acordo com distância em torno de uma determinada partícula central, como mostrado na Figura 2.1.

Comumente, as funções de distribuição mais usuais são as chamadas RDFs (*Radial Distribution Functions*). Tais funções podem ser interpretadas como a razão entre as probabilidades de se encontrar uma determinada partícula em um dado volume ao redor da partícula central, comparativamente a probabilidade de se encontrar esta mesma partícula no mesmo volume na ausência da partícula central. Em termos práticos, estas probabilidades são os números médios de partículas calculadas nestes volumes iguais, conforme mostrado na Equação 2.1.

$$g_{(r)} = \frac{\rho_{(r,r+dr)}}{\rho_{(r,r+dr)}^*} = \frac{\langle N_{(r,r+dr)} \rangle}{\langle N_{(r,r+dr)}^* \rangle} \quad \text{Eq. 2.1}$$

Especialmente para os nossos sistemas, os componentes da equação podem ser definidos como:

$\rho_{(r,r+dr)}$ e $\rho_{(r,r+dr)}^*$: probabilidades de encontrar o solvente na camada esférica $r+dr$, na presença e na ausência da proteína, respectivamente.

$\langle N_{(r,r+dr)} \rangle$ e $\langle N_{(r,r+dr)}^* \rangle$: números médios de moléculas do solvente contabilizados na casca esférica $r+dr$ nas trajetórias e em uma distribuição aleatória com a densidade do solvente na ausência do soluto, respectivamente.

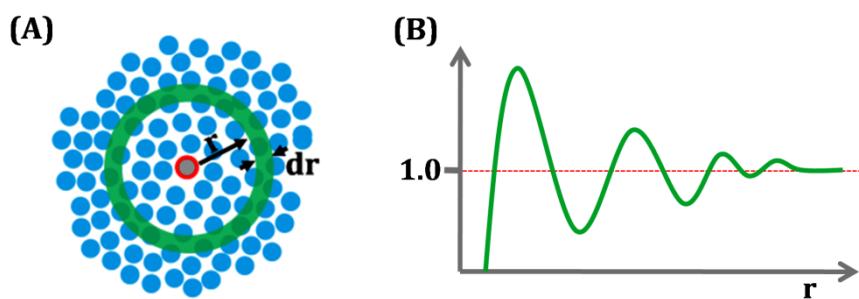


Figura 2. 1 Distribuição do solvente em torno do soluto. Em (A) a distribuição do solvente em torno do soluto. Em (B) perfil típico da função de distribuição, considerando uma camada ($r + dr$) de solvente em torno do soluto.

As análises de solvatação da proteína na presença dos solventes foram realizadas pelo cálculo das funções de distribuição soluto-solvente (g_{ss}).⁵⁹ Estas funções

Capítulo 2. Solvatação competitiva da enzima BCL por sorbitol, uréia e água

são semelhantes às funções de distribuição radial, porém ao invés de considerar a distância entre os centros de massa do soluto (proteína) e solventes (água, sorbitol ou uréia), toma-se a menor distância entre átomos que compõem o soluto ou solvente, esta é uma forma mais adequada de investigar a solvatação considerando o caráter não-esférico das moléculas. Com adequada normalização estas funções fornecem as mesmas interpretações termodinâmicas que as tradicionais funções de distribuição radial.⁵⁹

O cálculo das funções g_{ss} foram implementadas no pacote do programa MDAnalysis.⁶⁰ A normalização das funções g_{ss} foi realizada criando, para cada *frame* da trajetória, uma distribuição aleatória dos solventes com a mesma densidade do sistema em estudo. Esta normalização é formalmente correta desde que não haja correlação entre as posições das moléculas do soluto e do solvente além das dadas pelas suas interações, quando considerado a proteína toda. Porém, se o soluto considerado é apenas parte da proteína (por exemplo, quando é calculada g_{ss} considerando apenas os átomos do *backbone* da enzima BCL ou para os tipos de resíduos da proteína), a função g_{ss} deve ser interpretada apenas do ponto de vista qualitativo, devido à existência das correlações indiretas. Com isso, a distribuição deve ser adequadamente normalizada considerando as interações restantes.

2.1.3. Ligações de hidrogênio

As ligações de hidrogênio são interações intermoleculares muito bem orientadas. Estas interações ocorrem quando um átomo de hidrogênio encontra-se fortemente atraído por dois outros átomos com alta eletronegatividade. Esta ligação pode ser definida como X-H \cdots Y, onde X-H estão ligados covalentemente, e X é considerado o doador e Y o receptor da ligação.⁶¹ No início da década de 1960 Linus Pauling definiu que nas ligações deste tipo X e Y devem ser átomos com alta eletronegatividade, especificamente Flúor, Oxigênio e Nitrogênio.⁶² X e Y podem pertencer a moléculas distintas ou partes da mesma molécula. O ângulo formado entre X-H \cdots Y é de aproximadamente 180°, sendo que quanto mais próximo a esse valor mais

forte é a interação e menor será a distância H \cdots Y.⁶¹ Neste trabalho é considerada uma ligação de hidrogênio quando os átomos X e Y estiverem distantes em até 3 Å e um limite de $180^\circ \pm 20^\circ$ para o ângulo formado entre X-H \cdots Y.

O tempo de sobrevivência destas interações foi quantificado através de função de correlação temporal,⁶³ que consiste na probabilidade de uma ligação de hidrogênio ser encontrada em tempo ($t+\Delta t$) dado que a ligação foi observada em t . Foram calculadas as frações de ligações de hidrogênio encontradas em *frames* consecutivos da trajetória, que são separados por um intervalo de tempo discreto Δt . Se uma dada ligação de hidrogênio está presente em n *frames* consecutivos da trajetória, ela contribui para a correlação no tempo $n\Delta t$, considerando $\Delta t = 1\text{ps}$. Todos os cálculos de ligações de hidrogênio foram realizados com o programa MDAnalysis.⁶⁰

2.2. Resultados e discussões

2.2.1. Solvatação competitiva entre os solventes pela superfície da enzima BCL

A explicação mais simples para justificar os efeitos de estabilização/desestabilização promovidos pelos osmólitos está baseada na partição destes compostos e água na superfície da proteína.²⁸ De modo geral, quando há estabilização da proteína, o osmólito deve ser excluído da sua superfície, favorecendo a hidratação preferencial. Por outro lado, o efeito desestabilizante dos osmólitos é associado a sua solvatação proteica preferencial. Em ambos os casos, as energias livres associadas aos estados enovelados e desnvolados são afetadas, como descrito previamente na Figura 1.5.

A solvatação de lipases pode ser bem heterogênea em sua superfície, caso a diferença de polaridades dos solventes seja grande, isto acontece devido à natureza apolar de muito dos resíduos que compõem estas enzimas.³⁹ Ao visualizarmos os sistemas simulados neste trabalho, observamos que a distribuição dos solventes em torno da enzima BCL é visualmente homogênea, mostrando que nenhum efeito de exclusão ou ligação preferencial promovido por sorbitol ou uréia é facilmente identificável, inclusive sem nenhuma agregação nítida em qualquer parte da proteína (Figura 2.2). Esta solvatação heterogênea poderia ser mais nítida, caso os osmólitos fossem hidrofóbicos e insolúveis em água.⁴⁹ Considerando que a heterogeneidade da solvatação em torno da enzima BCL não é óbvia, utilizamos as funções de distribuição soluto-solvente (g_{ss}) e investigamos como isto ocorre do ponto de vista quantitativo.

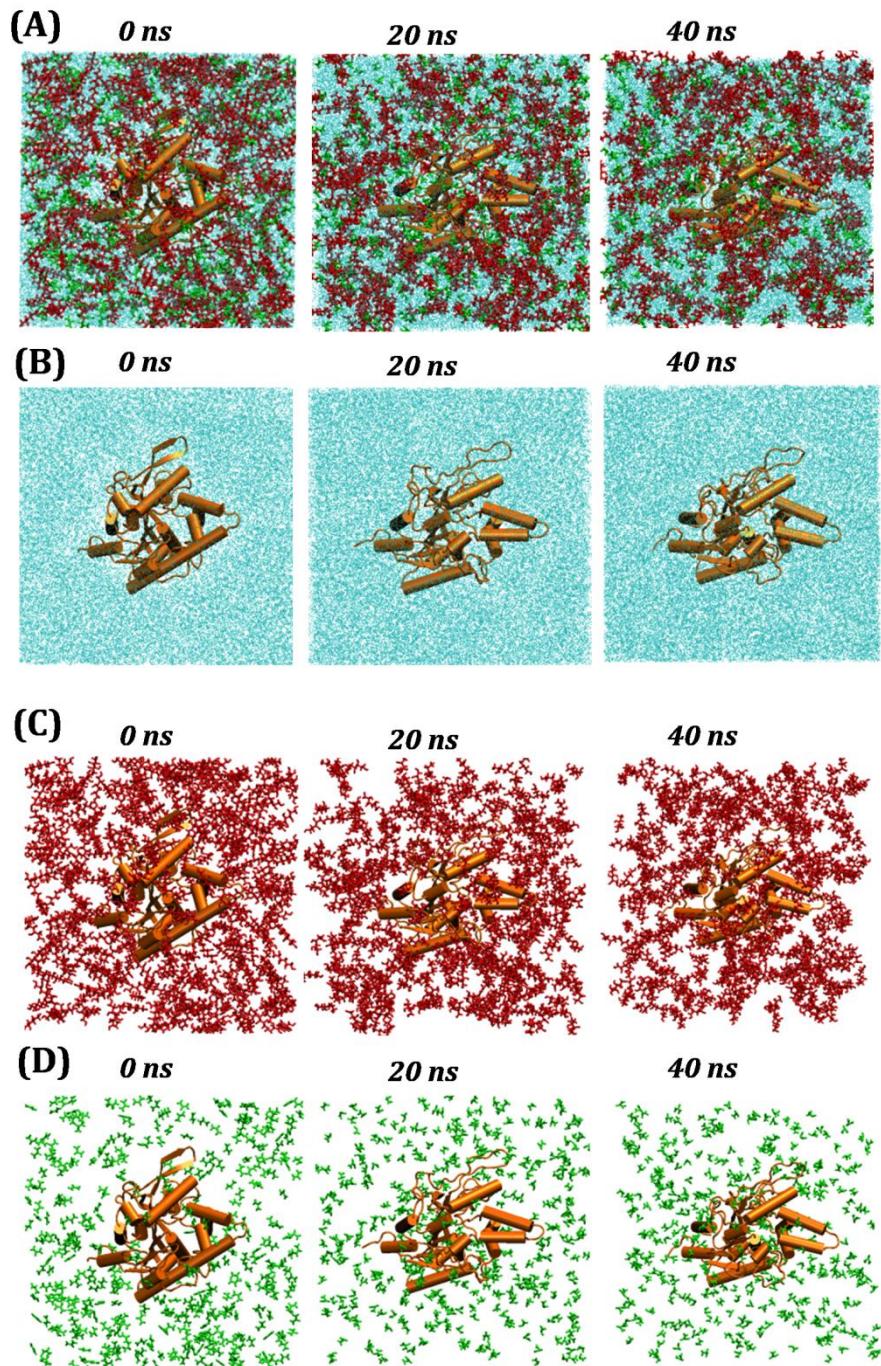


Figura 2.2 Visualização de três instantes das simulações MD da BCL em água, sorbitol e uréia. (A) sistema completo, (B) água, (C) sorbitol e (D) uréia. Nenhuma solvatação preferencial é observada, sugerindo uma distribuição aproximadamente homogênea dos solventes em torno da enzima BCL.

2.2.2. Distribuição dos solventes em torno da enzima BCL: uma visão geral

Perfis detalhados de como a solvatação ocorre são mais bem investigados pelas funções de distribuição soluto-solvente (g_{ss}),^{59,60} mostradas na Figura 2.3, considerados solventes água, sorbitol e uréia. A Figura 2.3A mostra a distribuição de água em torno da enzima BCL na ausência e na presença dos osmólitos. Sorbitol e uréia apresentam efeitos opostos na exclusão de água das proximidades da enzima: (a) sorbitol exclui moléculas de água a partir da segunda camada de solvatação (entre 2.5 e 6.5 Å); (b) porém, estabiliza água na primeira camada de solvatação, dado pelo aumento no primeiro pico de g_{ss} , (*inset* da Figura 2.3A); (C) por outro lado, uréia desestabiliza água na primeira camada de solvatação dado pelo decréscimo no primeiro pico de g_{ss} , isto indica que a uréia liga-se preferencialmente com a superfície da enzima, por ligações de hidrogênio, por exemplo; (D) para grande distâncias, maiores que 2.5 Å o efeito da uréia na exclusão de água é bem menor quando comparado com aquele promovido pelo sorbitol.

Alguns detalhes chamam a atenção na Figura 2.3A: a função g_{ss} quando ambos sorbitol e uréia estão presentes é muito semelhante à função g_{ss} somente na presença de sorbitol, com restauração da distribuição de água na primeira camada de solvatação (perturbada na presença de uréia) e deslocamento de água para regiões mais distantes, isto mostra o efeito estabilizador do sorbitol sobre a água na primeira camada de solvatação, mesmo na presença de uréia, restabelecendo a afinidade proteína-água. É importante destacar que as concentrações de água diminuem com a adição dos osmólitos (ver Tabela 2.1), portanto, funções g_{ss} proteína-água semelhantes entre os sistemas não significa mesmo número de moléculas de água interagindo com a proteína.

No esquema da Figura 2.3A sugerimos uma visão simplificada dos efeitos da solvatação competitiva, considerando duas camadas: os efeitos de solvatação são

Capítulo 2. Solvatação competitiva da enzima BCL por sorbitol, uréia e água

distintos para a primeira camada de solvatação (primeiro pico de g_{ss}) e a camada mais externa (considerada a partir do primeiro vale até ~ 6.5 Å). O decréscimo da densidade relativa de água na camada mais externa pode ser explicado pelo volume ocupado pelo sorbitol. Este osmólito é relativamente grande (>8 Å de extensão), e, portanto, ao ligar-se na superfície da proteína (por ligações de hidrogênio e apolares, detalhadas adiante) exclui um volume considerado de moléculas de água, justificando o decréscimo de g_{ss} proteína-água da camada mais externa. Na Figura 2.3A ainda é possível ver que a uréia compete fortemente com moléculas de água nas duas camadas de solvatação, dado pelo decréscimo na função g_{ss} proteína-água em todas as distâncias. A distribuição da solvatação por água, sorbitol e uréia em torno da enzima BCL não é homogênea, sendo fortemente dependente do tipo de resíduo, isto será discutido detalhadamente na seção 2.2.5.

A análise destes resultados sugere que a estabilização de água na primeira camada de solvatação por sorbitol contribui para a estabilização do estado nativo da proteína. Por outro lado, a desestabilização de água em todas as camadas pode estar associada às propriedades desnaturantes da uréia observadas experimentalmente.^{64–66} Além disso, o efeito estabilizante da água por sorbitol é observado mesmo na presença da uréia, sugerindo que o efeito de contrabalancear as ações da uréia pode ser devido à orientação de moléculas de água na primeira camada de solvatação.

A solvatação competitiva entre sorbitol e uréia pela superfície proteica é complexa, mostrada nas Figuras 2.3B e 2.3C pelas funções g_{ss} . A análise da Figura 2.3B mostra claramente que o sorbitol interage diretamente com a superfície da proteína, apesar de picos largos indicarem interações menos específicas que as da água (isto será explorado na seção 2.2.8). O primeiro pico de g_{ss} em ~ 1.8 Å mostra interações do tipo ligações de hidrogênio com a proteína. É importante destacar que na Figura 2.3A houve um pequeno aumento na distribuição de água na superfície da enzima na presença de sorbitol, isto significa que a substituição de moléculas de água na superfície da enzima pelo efeito competitivo do sorbitol ocorre proporcionalmente menos do que o aumento na concentração de sorbitol na solução, distante da proteína. Isto mostra que neste processo competitivo, a água prevalece com suas moléculas mais bem orientadas

Capítulo 2. Solvatação competitiva da enzima BCL por sorbitol, uréia e água

formando ligações de hidrogênio. A adição de uréia neste sistema contendo água e sorbitol (ver Figura 2.3B linha verde e modelo) mostra que sorbitol é deslocado das proximidades da enzima BCL pelas moléculas de uréia, este mesmo comportamento é observado quando a competição ocorre com a água. Em resumo, moléculas de uréia possuem a capacidade de ficarem concentradas na superfície proteica, deslocando água e até mesmo sorbitol.

A adição de sorbitol no sistema contendo uréia e água mostra que o primeiro pico de g_{ss} da uréia não é afetado (Figura 2.3C). Porém, efeito competitivo é observado na camada mais externa. O sorbitol deposita-se na superfície proteica sem alterar a densidade relativa de uréia, porém age excluindo moléculas de uréia que estejam um pouco mais distantes.

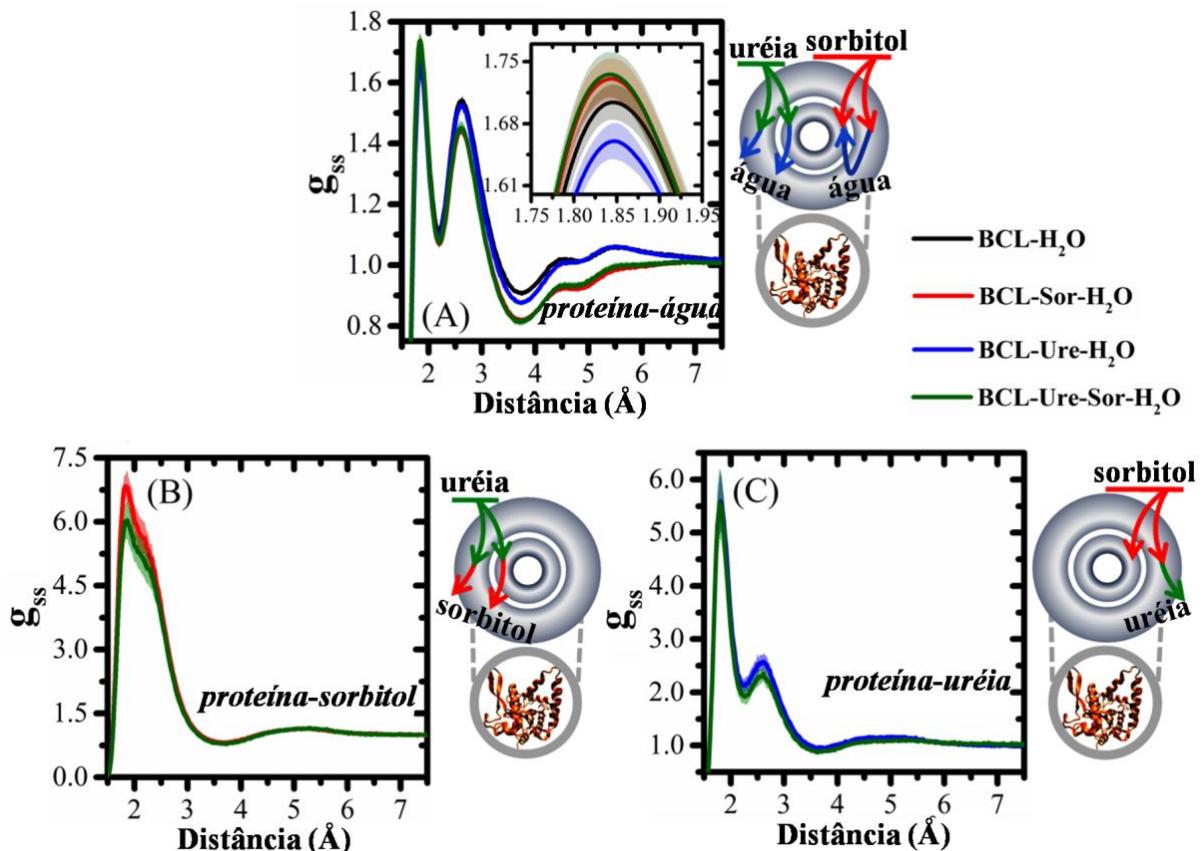


Figura 2.3 Funções de distribuição soluto-solvente (g_{ss}). O soluto considerado é a proteína e os solventes são (A) água, (B) sorbitol e (C) uréia. Os modelos mostram como o efeito competitivo ocorre na superfície da proteína de modo geral.

As distribuições dos solventes em torno da enzima BCL mostrados na Figura 2.3 podem ser interpretados também pelos potenciais de força média (PMF) ou energia livre, através de $\Delta G = -RT \ln g_{ss}$, apresentados na Figura 2.4. Na Figura 2.4A é possível ver que a energia livre associada à água na superfície da proteína é menor na primeira camada de solvatação na presença de sorbitol e maior quando a solução é composta por água e uréia, comparativamente ao perfil de energia livre para água pura (linha preta na Figura 2.4A). A Figura 2.4B deixa claro que a afinidade de sorbitol pela proteína é diminuída pela presença da uréia. A Figura 2.4C mostra que a afinidade de uréia pela

enzima não é afetada em curtas distâncias, somente na camada mais externa, em regiões mais distantes.

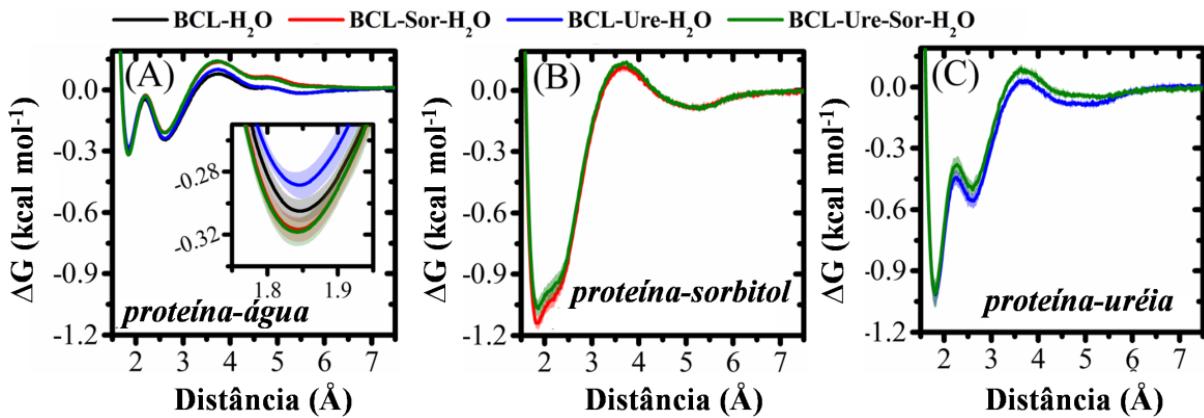


Figura 2.4 Perfis de energia livre mostrando que: (A) água é estabilizada por sorbitol e perturbada por uréia (inset); (B) interações proteína-sorbitol tornam-se menos favoráveis pela adição de uréia, principalmente a curtas distâncias; (C) sorbitol desestabiliza uréia nas camadas mais externas de solvatação.

2.2.3. Interação dos osmólitos com o *backbone* da enzima BCL

Para entender um pouco mais sobre como agem estes compostos na dinâmica de solvatação de proteínas, calculamos g_{ss} considerando a cadeia principal da enzima BCL, apresentados na Figura 2.5. A Figura 2.5A mostra que moléculas de água interagem em curtas distâncias com a cadeia principal. Observando as Figuras 2.5B e 2.5C vemos que isto é devido às ligações de hidrogênio entre as moléculas de água (doador) e os oxigênios da carbonila da amida (receptor). De modo mais geral, as interpretações sobre a perturbação das moléculas de água por sorbitol e uréia podem ser feitas de forma semelhante ao descrito na seção 2.2.2, onde o sorbitol aumenta a densidade relativa de água próximo à enzima BCL e desloca da camada mais externa; ademais, uréia diminui a afinidade de água em todas as distâncias. Também é possível

notar que moléculas de água têm acesso limitado aos átomos do *backbone*, pois as funções de distribuição apresentam valores menores que o calculado para solução distante da proteína.

Sorbitol e uréia, contrariamente ao observado para água, acumulam-se muito próximo à cadeia principal da enzima. Na Figura 2.5D é possível ver que na distância de ligações de hidrogênio ($\sim 1.8 \text{ \AA}$) há um aumento de ~ 3.4 vezes em relação à solução. Isto pode ser explicado essencialmente pelas ligações de hidrogênio formadas entre o oxigênio da carbonila (receptor) e as hidroxilas que compõem as moléculas de sorbitol (doador), mostrado na Figura 2.5E. Ao mesmo tempo, há uma importante disposição de sorbitol na camada externa de solvatação, principalmente em torno dos átomos de nitrogênio e hidrogênio do grupamento amida (Figura 2.5F). A adição de uréia diminui a afinidade de sorbitol em todas as partes do *backbone*, exceto para distâncias curtas (ligações de hidrogênio) entre os átomos de N e H da amida (Figura 2.5F, $\sim 1.8 \text{ \AA}$).

Comparativamente, o aumento da densidade local de uréia no *backbone* é menor que o observado para o sorbitol (comparação do primeiro pico de g_{ss} entre as Figuras 2.5D e 2.5G), enquanto a densidade relativa da uréia aumenta ~ 1.8 vezes a do sorbitol é aumentada em ~ 3.4 vezes, isto mostra a facilidade com que sorbitol interage com *backbone* de proteínas por ligações de hidrogênio.

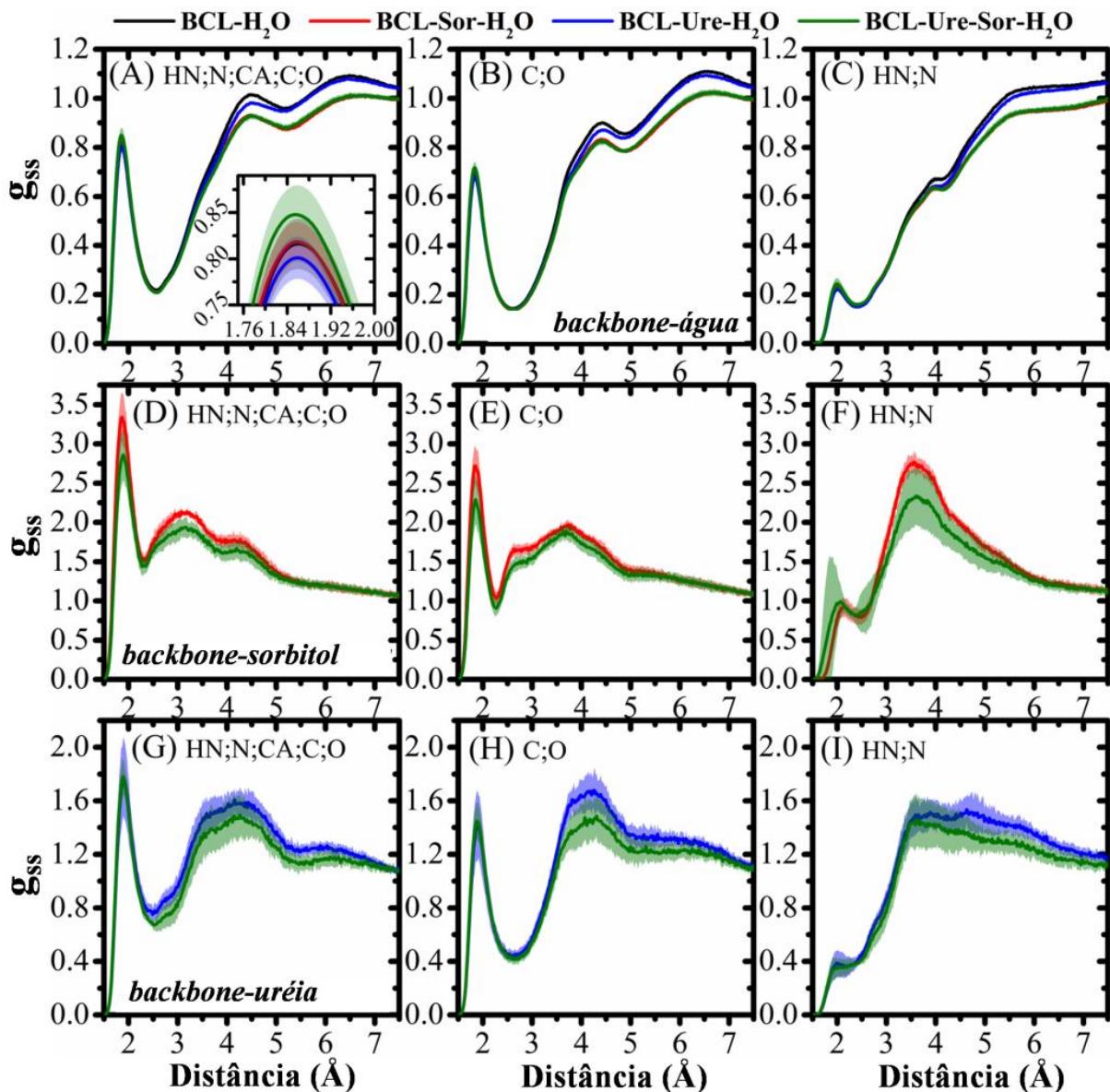


Figura 2.5 Funções de distribuição soluto-solvente g_{ss} considerando somente os átomos do *backbone* da enzima BCL e os solventes: (A-C) água; (D-F) sorbitol; (G-I) uréia.

As moléculas de uréia não sofrem nenhuma perturbação pelo sorbitol em distâncias mais curtas, mantendo a densidade inalterada em relação à solução, o que leva a funções de distribuições quase sobrepostas próximo à proteína, porém com efeito nítido para a camada mais externa, como pode ser visualizado na Figura 2.5G. A Figura

2.5H mostra que moléculas de uréia atuam como doadoras na ligação de hidrogênio com os átomos de oxigênio da amida do *backbone*, fato que não é observado quando estas atuam como receptoras da ligação, mostrado na Figura 2.5I. Como observado anteriormente, sorbitol diminui a densidade relativa de uréia nas camadas mais externas, devido ao seu grande volume. Esta exclusão de uréia promovida pelo sorbitol deve ajudar a explicar seu papel estabilizador, pois isto certamente limita o número de trocas de moléculas de uréia com a superfície da proteína (isto se deve ao decréscimo na probabilidade de uma molécula de uréia transladar da segunda camada de solvatação para a primeira e substituir uma molécula de uréia por outra). A uréia é reportada como agente causadora de quebras de interações proteína-proteína através de ligações diretas com o *backbone*.³⁴

2.2.4. Efeitos na estruturação das ligações de hidrogênio

Os osmólitos sorbitol e uréia possuem a capacidade de realizar ligações de hidrogênio com a superfície da enzima BCL, e com isso, alterar as interações entre os próprios resíduos da proteína e entre proteína-água. Tais interações intermoleculares foram investigadas com detalhes e os resultados são apresentados na Figura 2.6 e Tabela 2.2.

Na Figura 2.6A é possível observar que o número total de ligações de hidrogênio diminui com adição de sorbitol, uréia ou ambos. No entanto, este decréscimo é bem sutil, apenas 4 ou 5 ligações são perdidas das 278 realizadas no sistema BCL-H₂O. Interessante observar que as interações entre os resíduos da proteína não são afetadas (Figura 2.6B), isto ocorre porque nenhuma perturbação significativa da proteína foi observada nesta escala de tempo das simulações (40ns). Neste sentido, nos estágios iniciais de interação entre os resíduos protéicos e os osmólitos sorbitol e uréia (antes de qualquer desnaturação promovida pela uréia), os efeitos mais importantes e possíveis de serem observados nesta escala de tempo consistem em como uréia e sorbitol substituem as interações proteína-água.

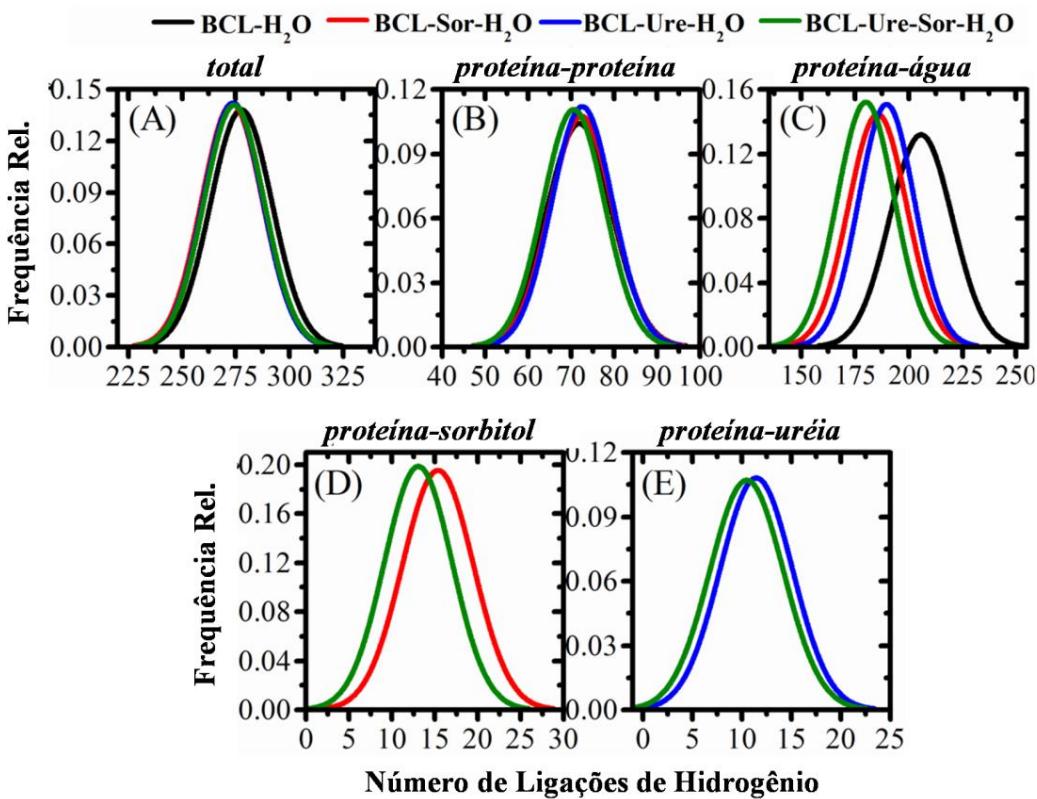


Figura 2.6 Frequência de distribuição do número de ligações de hidrogênio realizadas pela enzima BCL: (A) total de ligações; (B) entre os resíduos da BCL; (C) com água; (D) com sorbitol e (E) com uréia.

Tabela 2.2 Ligações de hidrogênio realizadas pela enzima BCL nos sistemas simulados.

Sistema <i>Lig. de hidrogênio</i>	BCL-H ₂ O	BCL-Sor-H ₂ O	BCL-Ure-H ₂ O	BCL-Ure-Sor-H ₂ O
<i>total</i>	278±14	273±14	274±14	274±14
<i>proteína-proteína</i>	72±8	72±7	73±7	71±7
<i>proteína-água</i>	206±15	186±14	190±13	180±13
<i>proteína-sorbitol</i>	---	15±4	---	13±4
<i>proteína-uréia</i>	---	---	11±4	10±4

As ligações de hidrogênio realizadas entre BCL e água são perturbadas pela presença dos osmólitos, sendo reduzidas (Figura 2.6C). Inicialmente o número de ligações de hidrogênio entre BCL-água é de 206 no sistema contendo somente água e diminui para 186 com adição de sorbitol (perda de 20 ligações) e 190 com adição de uréia (perda de 16 ligações), portanto sorbitol substitui mais ligações de hidrogênio proteína-água do que a uréia. Quando os dois osmólitos estão presentes a perda de ligações é maior ainda (de 206 para 180, perda de 26 ligações), porém o efeito não é completamente aditivo, sendo que sorbitol substitui cerca de 13 ligações de hidrogênio entre BCL-água e uréia aproximadamente 10 ligações de hidrogênio, isto sugere que neste sistema algumas interações alternativas possam ser favorecidas. A competição entre sorbitol e uréia por interações com a proteína podem ser vistas nas Figuras 2.6D e 2.6E, onde a uréia nitidamente dificulta que sorbitol realize interações desta natureza com a superfície da enzima BCL. Devido à competitividade, sorbitol também tem efeito perturbativo nas moléculas de uréia, porém em menor magnitude.

O tempo de sobrevivência das ligações de hidrogênio realizadas pela enzima BCL entre seus próprios resíduos ou com os solventes são mostrados na Figura 2.7. Adição de sorbitol promove pequeno, porém consistente aumento na quantidade de ligações de hidrogênio que sobrevivem por mais tempo em todos os casos. Este comportamento também é observado para uréia em menor escala. Na Figura 2.7A é possível ver como as interações proteína-água são estabilizadas por sorbitol (comparativamente ao sistema compostos somente por água), onde as frações de ligações que sobrevivem a períodos mais longos (>20 ps) são ~ 1.8 vezes maiores que o sistemas em água pura. Com ambos os osmólitos juntos estes valores são ~ 1.5 vezes maiores, e na presença somente de uréia ~ 1.3 vezes.

Na Figura 2.7B é possível ver que as ligações de hidrogênio entre os resíduos da enzima BCL sobrevivem por mais tempo na presença de sorbitol, uréia e ambos, sugerindo um efeito aditivo (pontos verdes no *inset*). Ademais, ligações de hidrogênio proteína-sorbitol sobrevivem por longos períodos de tempo na presença de uréia

(Figura 2.7C). Sorbitol age aumentando significativamente o tempo de sobrevivência das ligações de hidrogênio, inclusive para proteína-uréia (Figura 2.7D).

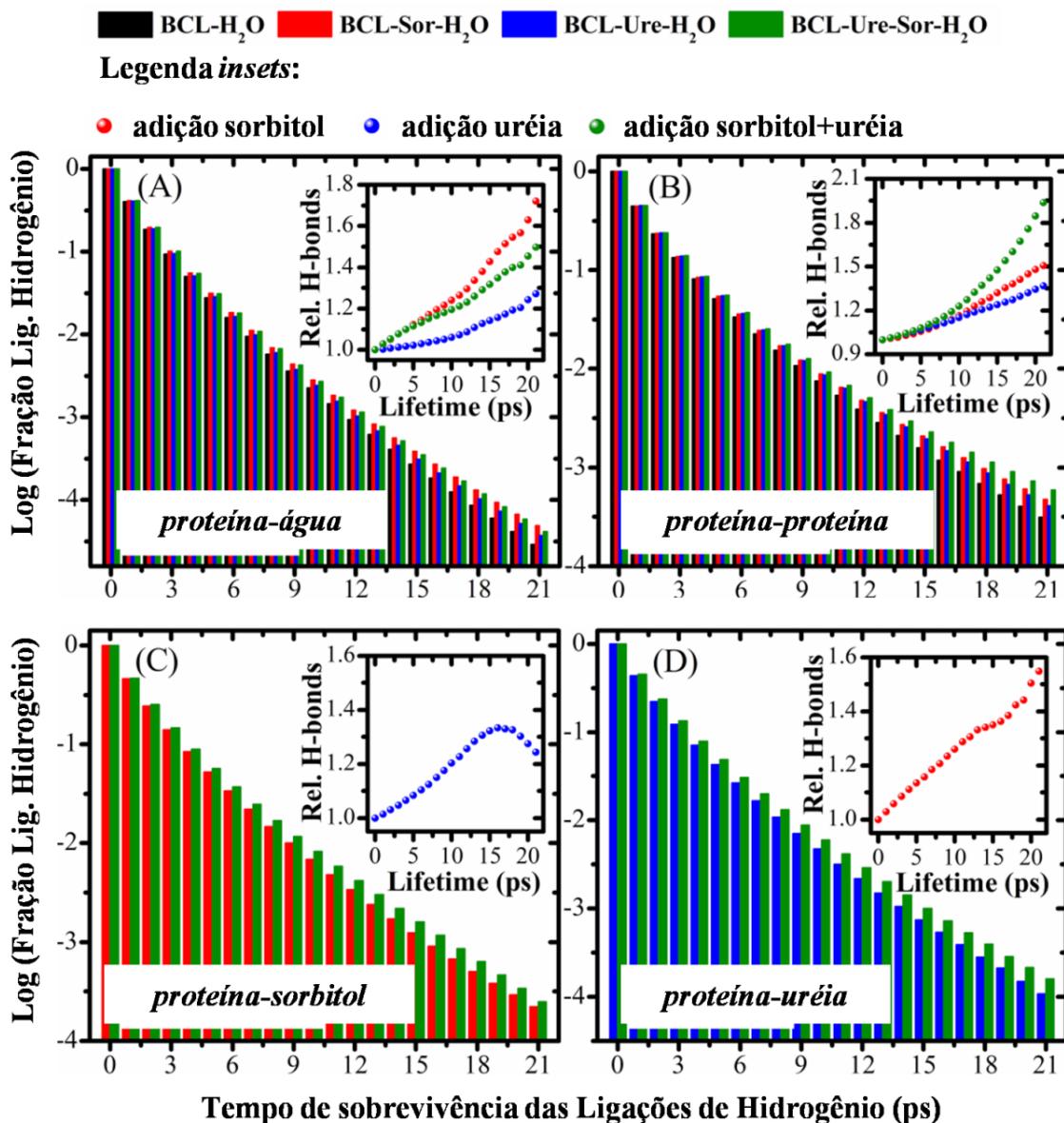


Figura 2.7 Sobrevivência das ligações de hidrogênio: (A) proteína-água; (B) proteína-proteína; (C) proteína-sorbitol e (D) proteína-uréia. Os *insets* mostram as quantidades relativas de ligações de hidrogênio calculadas comparativamente ao sistema somente em água e com adição dos osmólitos estudados.

O aumento no tempo de sobrevivência das ligações de hidrogênio proteína-água a partir da adição de sorbitol está provavelmente relacionado com a exclusão de água (ou uréia) da segunda camada de solvatação da enzima BCL (dado pelas funções de distribuição g_{ss} na Figura 2.3A e pelos perfis de energia livre da Figura 2.4). Esta exclusão de água (ou uréia) das camadas mais externas (acima de $\sim 2.2 \text{ \AA}$) de solvatação faz com que as ligações de hidrogênio realizadas por proteína-água ou proteína-uréia tenham menor probabilidade de serem trocadas por outras moléculas de água ou uréia (que poderiam estar em regiões mais distantes como a segunda camada de solvatação), desta forma aumentando o tempo de sobrevivência da ligação. Este mecanismo pode explicar a estabilização das interações proteína-água, que pode ter como consequência indireta a estabilização estrutural de proteínas. Com isso, é possível sugerir que o efeito do sorbitol pode ser descrito pelos seus efeitos indiretos na dinâmica de solvatação da água, mas que depende das suas interações diretas na superfície da proteína através de ligações de hidrogênio (e interações apolares descritas posteriormente), que resultam em exclusão de água das camadas mais externas por efeito estérico. Neste sentido, é de se esperar que a estabilização destas ligações água-proteína seja maior, quanto maior seja a capacidade do osmólito ligar-se a superfície da proteína e maior também sua capacidade de excluir outros solventes de acordo com seu volume. Portanto, este mecanismo é interessante por não ser completamente indireto (dependente somente da ação do osmólito nas propriedades da solução), e nem completamente direto no sentido de realizar ligações extremamente específicas com os resíduos da enzima BCL. Em resumo, podemos sugerir que a estabilização promovida pelo sorbitol é resultado da exclusão de moléculas de água e uréia da segunda camada de solvatação.^{52,67} Veremos a seguir que esta exclusão de água (e uréia) não é homogênea para todos os tipos de resíduos, havendo singularidades de acordo com a polaridade e carga das cadeias laterais.

2.2.5. Distribuição de água na superfície proteica conforme os tipos de resíduos

As distribuições dos solventes em torno da enzima BCL considerando os tipos de resíduos (carregados, polares e apolares) são mostradas pelas funções de distribuição soluto-solvante g_{ss} na Figura 2.8. Estas funções g_{ss} mostram qualitativamente a distribuição de água, sorbitol e uréia em torno das partes específicas da proteína, considerando as características das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos.

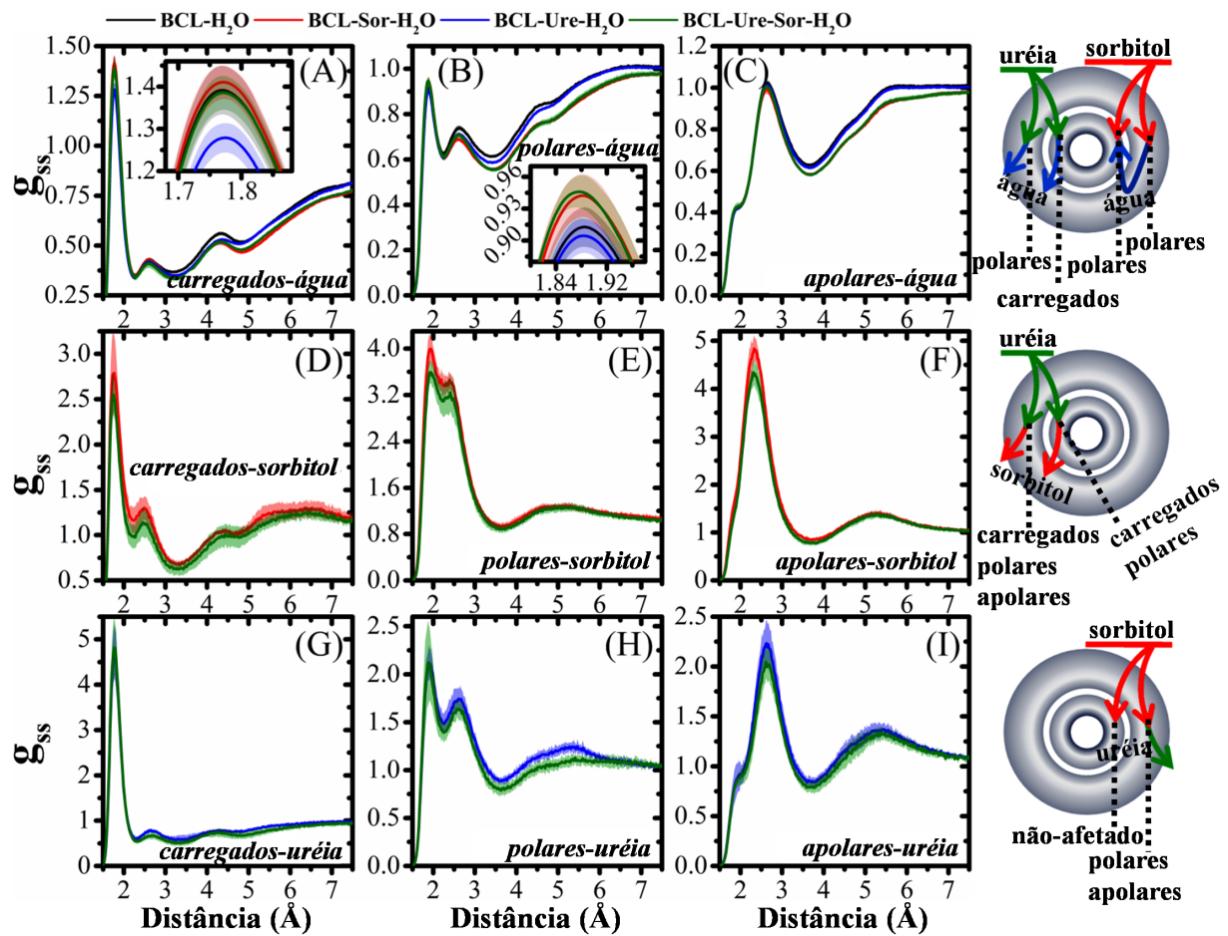


Figura 2.8 Funções de distribuição soluto-solvente (g_{ss}) de acordo com o tipo de resíduo, carregados, polares ou apolares. Solventes, (A-C): água; (D-F): sorbitol; (G-I): uréia. Ao modelo a direita, os tipos de resíduos mais afetados, em cada camada de solvatação, são indicados pelas linhas tracejadas.

A distribuição dos solventes ao redor da proteína toda dada na Figura 2.3 é uma combinação das contribuições em cada parte específica da proteína, mostrado na Figura 2.8. As distribuições de água em torno dos resíduos carregados da enzima BCL são mostradas na Figura 2.8A na ausência e presença dos osmólitos. A adição de sorbitol não possui efeito significativo na afinidade de água por este tipo de resíduo, (observado anteriormente para a proteína toda na Figura 2.3) principalmente na primeira camada

de solvatação, com sutil deslocamento de água para camadas mais externas. Com isso, podemos sugerir que o sorbitol não aumenta a densidade relativa de moléculas de água nos resíduos carregados, pois o efeito competitivo leva a funções g_{ss} muito semelhantes. Por outro lado, é possível ver que a uréia apresenta propriedades contrárias à do sorbitol (Figura 2.8A). O primeiro pico de g_{ss} carregados-água diminui quando a uréia é adicionada, indicando que as moléculas de água são substituídas por uréia nos resíduos carregados mais do que o decréscimo da concentração da solução, ou seja, a uréia perturba a hidratação dos resíduos carregados. Interessante notar o efeito que o sorbitol desempenha restaurando a densidade relativa de água em torno da enzima BCL mesmo na presença da uréia, funções g_{ss} muito semelhantes na Figura 2.8A, comparação das linhas verde e vermelho no *inset*.

Anteriormente na Figura 2.3A mostramos que a distribuição de água em torno da enzima BCL é afetada pelo sorbitol, o perfil de g_{ss} considerando a proteína toda é muito semelhante ao observado quando consideramos somente os resíduos polares, mostrado na Figura 2.8B. Neste caso, há um aumento no primeiro pico de g_{ss} e decréscimo em g_{ss} para a camada mais externa, exatamente como observado quando consideramos a proteína toda. Isto deixa claro que o efeito do sorbitol observado ocorre essencialmente nos resíduos polares: sorbitol estabiliza água na primeira camada de solvatação e exclui das camadas mais distantes. Outro aspecto interessante é que a uréia (descrito na Figura 2.3A) afeta negativamente a afinidade de água pela superfície da enzima BCL, observamos agora que este efeito é relativamente pequeno para os resíduos polares, mostrado pelo leve decréscimo na função g_{ss} tanto para o primeiro pico quanto para g_{ss} da segunda camada de solvatação. Da mesma forma, a mistura contendo os dois osmólitos mais água mostra que o sorbitol atua mantendo a distribuição proporcionalmente igual ao sistema contendo somente o osmólito estabilizante, como descrito anteriormente, isto pode estar associado ao seu efeito estabilizador de proteínas.

A distribuição de água em torno dos resíduos apolares da enzima BCL é mostrada na Figura 2.8C. É possível observar que há pouca influência tanto de sorbitol quanto de uréia, principalmente em curtas distâncias, mantendo as mesmas densidades

relativas tanto na presença quanto na ausência dos osmólitos. Ademais, é possível observar que o sorbitol promove exclusão de água em regiões mais distantes dos resíduos apolares da proteína, além da primeira camada de solvatação.

Considerando as análises das funções de distribuição g_{ss} para os tipos de resíduos, podemos deduzir que a função g_{ss} para proteína-água mostrada na Figura 2.3A é uma combinação não trivial das componentes dadas nas Figuras 2.8A-C, das quais podemos tomar algumas conclusões: (1) o decréscimo no primeiro pico de g_{ss} proteína-água quando uréia é adicionada no sistema ocorre devido a perturbação ocorrida nos resíduos carregados dado pela forte interação carregados-uréia (Figura 2.8A); (2) o aumento no primeiro pico de g_{ss} proteína-água quando sorbitol é adicionado ao sistema é devido ao aumento da afinidade de água pelos resíduos polares, porém não carregados, já que nestes a alteração em g_{ss} é mínima (comparar *insets* das Figuras 2.7A e 2.7B); (3) a exclusão de água nas camadas mais externas, dada pelo menor valor de g_{ss} quando sorbitol é adicionado, ocorre em todos os resíduos principalmente nos polares. A uréia também desloca água em camadas mais distantes nos resíduos polares, mas significativamente menos que sorbitol; (4) As funções g_{ss} de água-proteína (considerando toda a proteína ou resíduos específicos) mostram que nas misturas com sorbitol e uréia as funções g_{ss} se aproximam das funções na presença somente de sorbitol. Portanto, sorbitol restaura a afinidade de água pela proteína, quando perturbada por uréia.

Na seção 2.2.4, foi sugerido que a estabilização das ligações de hidrogênio proteína-água promovida pelo sorbitol pode ser entendida a partir de um mecanismo indireto, dependente das ligações diretas do sorbitol com a superfície proteica, que excluem água da segunda camada de solvatação por efeito estérico. Agora, considerando os tipos de resíduos, podemos mostrar que isto ocorre principalmente nos resíduos polares, consistentemente com a dependência de formação de ligações de hidrogênio proteína-sorbitol. Este efeito é menor nos resíduos apolares, pois as interações do tipo ligações de hidrogênio devem ocorrer somente com o *backbone* da proteína. Como a densidade de água é baixa nesta região (ver Figura 2.5) as moléculas de sorbitol podem se alocar próximos a estes resíduos sem afetar a distribuição relativa de água. Além

disso, esta exclusão de água das camadas mais externas ocorre muito sutilmente nos resíduos carregados devido à alta afinidade entre os resíduos carregados e as moléculas de água. Considerando as discussões anteriores, podemos supor que o efeito positivo do sorbitol em manter a estrutura nativa de proteínas pode ser devido à estabilização de água na sua primeira camada de solvatação, especificamente nos resíduos polares. Por outro lado, a desnaturação de proteínas promovida por uréia pode estar associada à desidratação dos resíduos carregados.

2.2.6. Solvatação competitiva dos osmólitos conforme os tipos de resíduos

As distribuições de sorbitol e uréia na superfície da enzima BCL podem ser visualizadas na Figura 2.8. Especificamente para o sorbitol, na ausência e presença de uréia (Figuras 2.8D-F) e para uréia na ausência e presença de sorbitol (Figuras 2.8G-I), é mostrado como é a solvatação destes osmólitos por cada tipo de resíduo da enzima BCL e como eles competem entre si.

A Figura 2.8D mostra que o sorbitol interage (como doador) com os resíduos carregados da enzima BCL formando ligações de hidrogênio (pico em $\sim 1.8 \text{ \AA}$), sendo perturbadas pela adição de moléculas de uréia (comparar curvas vermelha e verde), esta perturbação também ocorre nos resíduos polares (Figura 2.8E), não sendo observada em apolares devido a impossibilidade de formação de ligações de hidrogênio em $\sim 1.8 \text{ \AA}$ (Figura 2.8F). Uréia diminui a afinidade de sorbitol pela proteína até $\sim 3 \text{ \AA}$ em todos os tipos de resíduos. Para camadas que vão além desta distância, diminui a solvatação apenas significativamente nos resíduos carregados. Isto mostra como a uréia tem alta afinidade por este tipo de resíduo.

As Figuras 2.8G-I mostram que a solvatação competitiva entre os osmólitos sorbitol e uréia não é simétrica. Havíamos mostrado anteriormente que a uréia não é afetada na primeira camada de solvatação pelo sorbitol (Figura 2.3), vemos nas Figuras

2.8G e 2.8H que a solvatação por uréia dos resíduos carregados e os polares de fato não são afetados pelas moléculas de sorbitol. Como esperado a função de g_{ss} apolares-uréia assume valores pequenos para o primeiro pico, mostrando a impossibilidade de interações hidrofóbicas. Além disso, é possível especificar agora onde ocorre o deslocamento de uréia da segunda camada de solvatação (ver Figura 2.3), sendo mais evidente nos polares e apolares, conforme esperado devido à alta afinidade de uréia pelas cadeias laterais carregadas dos aminoácidos.

É possível fazer algumas comparações quantitativas do aumento da densidade relativa, tanto de sorbitol quanto de uréia em cada tipo de resíduo. Por exemplo, para as interações de curtas distâncias (primeira camada de solvatação) podemos ver que o primeiro pico de g_{ss} carregados-uréia é da ordem de ~4.8 (Figura 2.8G). Por outro lado, para o sorbitol é de ~2.7 (Figura 2.8D). Isto mostra que a uréia possui afinidade muito maior do que sorbitol por este tipo de resíduo. O oposto é observado para os outros tipos de resíduos polares e apolares, onde os primeiros picos de g_{ss} para o sorbitol (~4.0 e ~4.9, Figuras 2.8E e 2.8F, respectivamente) são quantitativamente maiores que os observados para uréia (~2.1 e ~2.2, Figuras 2.8H e 2.8I, respectivamente). Neste sentido, podemos sugerir dois efeitos relacionados à solvatação envolvendo os tipos de resíduo da enzima BCL: (1) a desidratação dos resíduos carregados é causada pela forte afinidade das moléculas de uréia por este tipo de resíduo; (2) a contribuição do sorbitol no efeito estabilizante da estrutura nativa de proteínas pode ser devido à sua alta afinidade pelos resíduos polares e apolares.

2.2.7. Solvatação dos resíduos carregados: ácidos vs. básicos

As interações dos osmólitos (sorbitol e uréia) e água com os tipos de resíduos da enzima BCL são particularmente diferentes. Estes osmólitos são retratados com efeitos opostos na estabilização de proteínas,³⁹ e como observado na seção 2.2.6 apresentam competitividade altamente dependente do tipo de resíduo, não sendo necessariamente simétrica, com notável diferença para os resíduos carregados. Como

mostrado nas Figuras 2.8D e 2.8G, uréia compete fortemente com sorbitol pelos resíduos carregados para formar ligações de hidrogênio, com as funções g_{ss} carregados-uréia muito pouco afetadas pelo sorbitol na primeira camada de solvatação. Considerando as assimetrias na solvatação dos resíduos carregados por uréia e sorbitol, podemos investigar mais detalhadamente a dinâmica de solvatação dividindo os resíduos carregados ácidos (aspartato e glutamato) e básicos (lisina e arginina).

A Figura 2.9A mostra a função g_{ss} para a distribuição de água em torno somente dos resíduos ácidos (Asp e Glu). Como esperado, moléculas de água são altamente organizadas em torno destes resíduos devido à grande orientação das ligações de hidrogênio. Estas orientações e afinidades não são aumentadas quando sorbitol é adicionado (comparação das linhas em preto e vermelho). Por outro lado, moléculas de uréia promovem nítido decréscimo no primeiro pico de g_{ss} entre os resíduos ácidos e água, mostrando sua alta capacidade de deslocar tanto moléculas de água quanto de sorbitol. Interessante notar que a adição de sorbitol no sistema contendo água e uréia (linha verde), restabelece a densidade relativa de água nas proximidades da proteína, mostrando novamente que este é um efeito particular do sorbitol associado ao seu efeito de contrabalancear a perturbação causada por moléculas de uréia. Este efeito restaurador é bem mais evidente para os resíduos básicos (Figura 2.9D).

As Figuras 2.9B e 2.9C deixam claro que, no processo competitivo entre sorbitol e uréia pelas ligações de hidrogênio na superfície da enzima BCL, as moléculas de uréia perturbam a afinidade Asp/Glu-sorbitol de forma que a densidade relativa Asp/Glu-uréia é mantida (Figura 2.9C). A Figura 2.9B mostra que este deslocamento de sorbitol ocorre em toda a extensão das primeira e segunda camadas de solvatação. A partir destes resultados, podemos mostrar que moléculas de uréia estão altamente concentradas em torno dos resíduos ácidos, com densidade local (distância da ordem de ligações de hidrogênio) sete vezes superior ($g_{ss} \sim 7.0$). Neste sentido, podemos afirmar que a uréia liga-se muito fortemente aos resíduos carregados ácidos Asp/Glu e o sorbitol não é capaz de diminuir a afinidade Asp/Glu-uréia.

Foi discutido a partir da Figura 2.8A que o sorbitol não alterava significativamente a densidade relativa de água em torno dos resíduos carregados, isto

Capítulo 2. Solvatação competitiva da enzima BCL por sorbitol, uréia e água

também foi constatado especificamente para os resíduos ácidos (Figura 2.9A). Porém, há uma leve estabilização de água promovida pelo sorbitol para os resíduos básicos Lys/Arg (Figura 2.9D), curiosamente no sistema contendo todos os solventes (BCL-Ure-Sor-H₂O), a afinidade de água aumenta na primeira camada de solvatação, como indicado pelo primeiro pico de g_{ss}. Na Figura 2.8D mostramos que uréia competia deslocando sorbitol dos resíduos carregados, agora sabemos que isto ocorre principalmente nos resíduos básicos, como mostrado na Figura 2.9E. De modo geral, o aumento na densidade relativa próxima aos resíduos ácidos é muito maior em comparação com os resíduos básicos, tanto para sorbitol quanto para uréia.

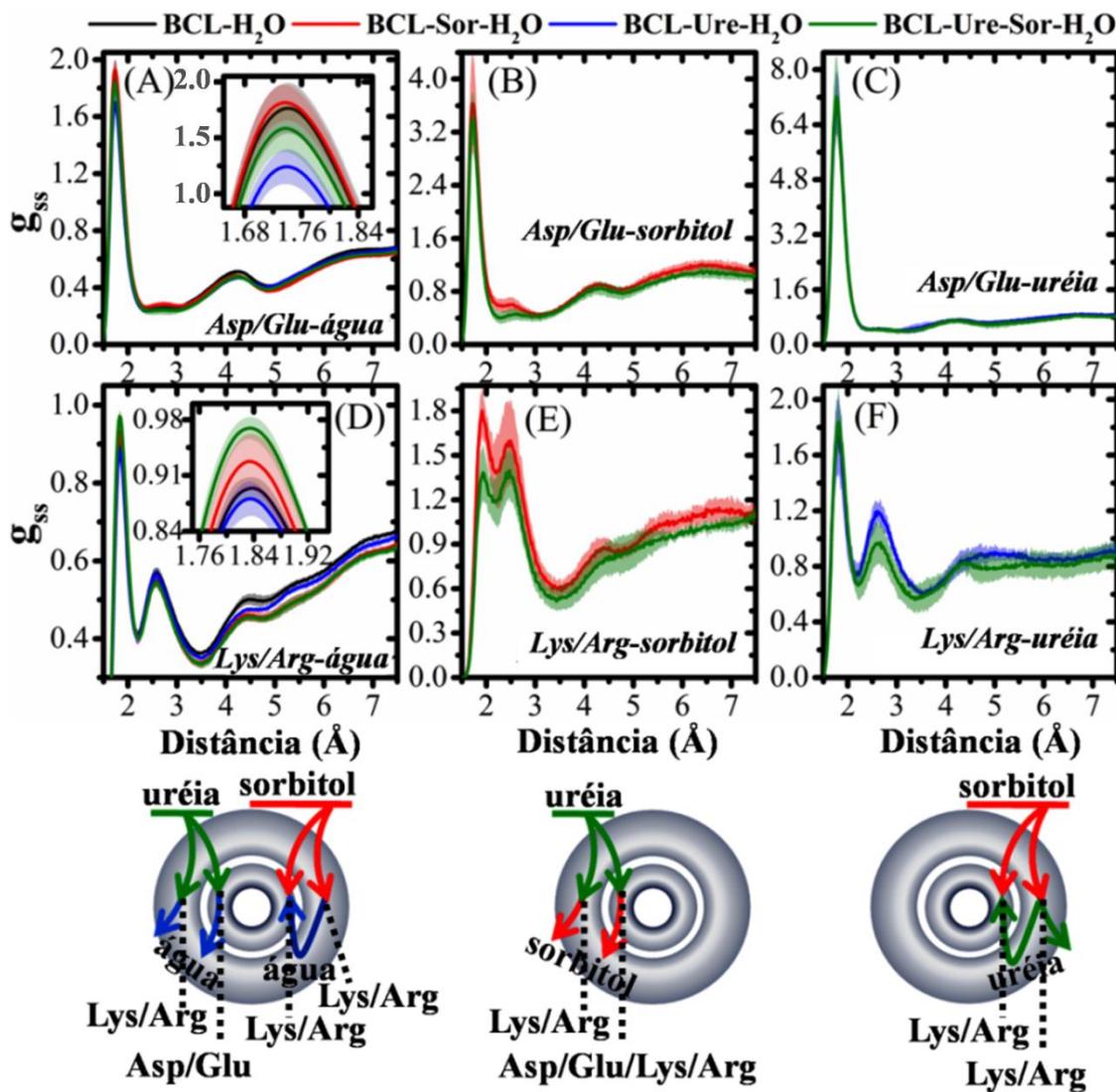


Figura 2.9 Funções de distribuição soluto-solvente (g_{ss}) considerando somente os resíduos carregados como soluto. Solventes são: água, sorbitol e uréia. (A-C): resíduos ácidos aspartato e glutamato; (D-F): resíduos básicos lisina e arginina.

Algumas sugestões podem ser dadas a partir das observações descritas: (1) as interações de uréia e sorbitol pelos resíduos carregados ocorrem diferentemente, dependendo da natureza do resíduo (ácido ou básico); (2) moléculas de uréia interagem fortemente pelos resíduos ácidos Asp/Glu, sendo que tais interações não são

perturbadas pela adição de moléculas de sorbitol; (3) as interações Lys/Arg-uréia são afetadas por sorbitol principalmente na segunda camada de solvatação. Estes resultados deixam claro a importância dos resíduos carregados (principalmente na forma ácida) para a dinâmica de solvatação de proteínas por uréia. Neste sentido, o processo de desnaturação proteica promovido por uréia deve estar diretamente relacionado com as fortes interações deste osmólito desestabilizante com os resíduos Asp/Glu nas suas formas ácidas desprotonadas.

Ademais, o decréscimo da atividade enzimática na presença de uréia⁶⁸ pode ser explicado pela inibição do sítio catalítico, isto é plausível, pois os sítios catalíticos de lipases são compostos essencialmente por três resíduos, aspartato ou glutamato, histidina e serina (especificamente na BCL: Asp264, His286, Ser87),^{69,70} sendo que os resíduos Asp/Glu podem ligar-se mais facilmente a moléculas de uréia. A partir destas observações, uma hipótese nos ocorre: a mutação de resíduos carregados ácidos na superfície proteica, por resíduos hidrofóbicos, por exemplo, pode ser uma possível estratégia para aumentar a estabilidade de proteínas em meios contendo o desnaturante uréia.

2.2.8. Funções de distribuição para átomos específicos e a orientação preferencial dos solventes

As interações proteína-uréia são descritas nas seções anteriores, onde mostramos que a uréia interage fortemente com a superfície da enzima BCL, com alta afinidade pelos resíduos ácidos Asp/Glu carregados. Estes resíduos possuem grupamento carboxilato que podem realizar ligações de hidrogênio (como aceitador de ligações de hidrogênio) com grupamentos amida da uréia. Para entender como os osmólitos se orientam na superfície da enzima BCL, aplicamos as funções de distribuição g_{ss} considerando átomos específicos que compõem os solventes (Figura 2.10).

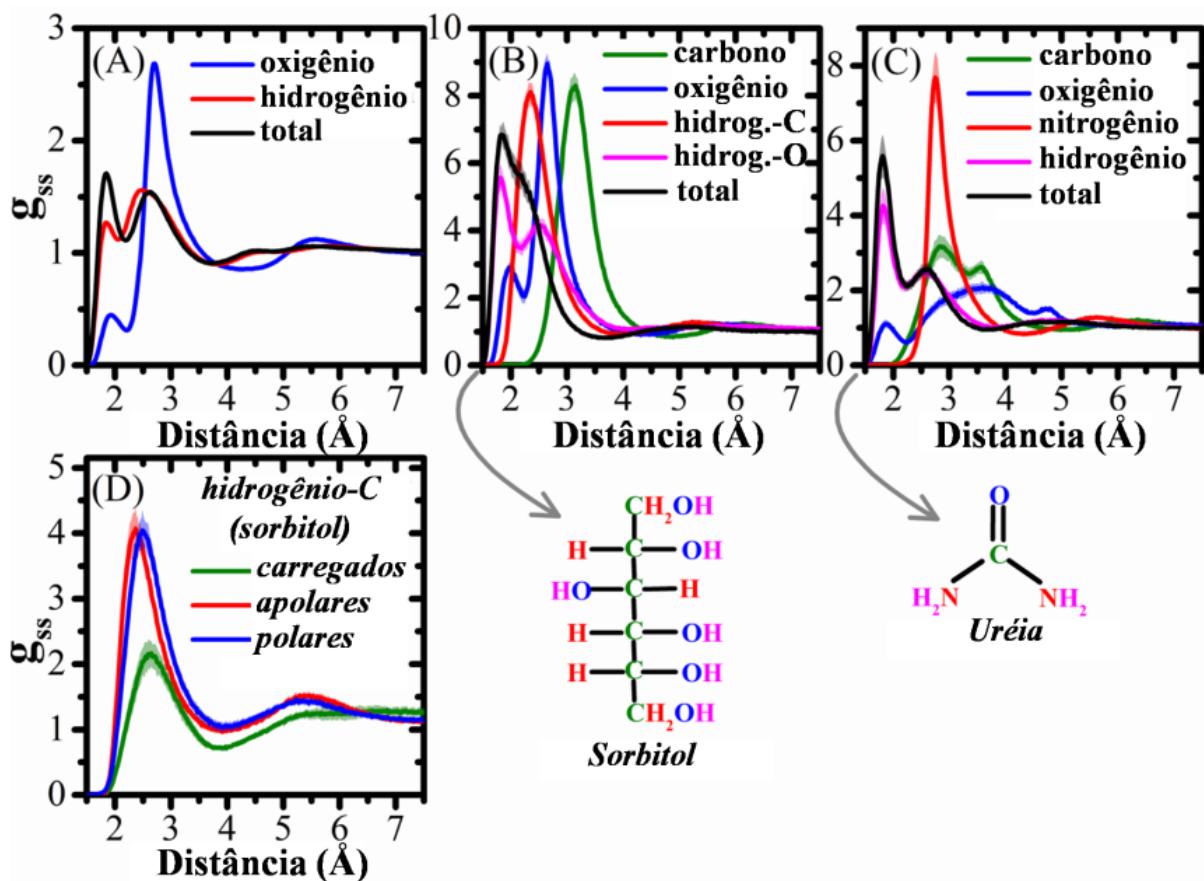


Figura 2. 10 Funções de distribuição soluto-solvente (g_{ss}) considerando átomos específicos dos osmólitos e água. (A) água, (B) sorbitol e (C) uréia. (D) g_{ss} apenas para os hidrogênios alifáticos do sorbitol e resíduos específicos da enzima BCL.

A distribuição de água em torno da proteína pode ser detalhada pela orientação de seus átomos de hidrogênio e oxigênio, como mostrado na Figura 2.10A. É possível observar que moléculas de água ligam-se à superfície proteica formando ligações de hidrogênio tanto como doadoras quanto receptoras nas ligações, como esperado, porém mais como doadoras do hidrogênio na ligação. Nenhuma alteração significativa nestes perfis de g_{ss} foi observada com a adição dos osmólitos sorbitol e uréia.

A Figura 2.10B mostra a disposição dos átomos de sorbitol em torno da enzima BCL, nenhuma diferença significativa é observada com a adição da uréia. É possível observar que o sorbitol age como doador de ligações de hidrogênio (linha rosa, hidrogênio da hidroxila) e receptor (linha azul, oxigênio da hidroxila), sendo mais frequentemente orientado como doador na ligação. Estas diferentes orientações que mostram o caráter doador são confirmadas pelo primeiro pico das funções g_{ss} , que ocorre em $\sim 2 \text{ \AA}$ para o oxigênio e mais orientado para hidrogênio $\sim 1.7 \text{ \AA}$.

A função de distribuição g_{ss} sorbitol-proteína, considerando a proteína toda, apresenta um pico largo, “ombro”, em $\sim 2.2 \text{ \AA}$ (Figuras 2.3B e 2.10B), indicando sobreposição de funções g_{ss} distintas. A separação das distribuições associadas a cada tipo de átomo possibilita identificar a contribuição unitária que leva ao alargamento deste pico, como mostra a função g_{ss} para os hidrogênios alifáticos do sorbitol (Figura 2.10B-linha vermelha), hidrogênios ligados aos átomos de carbono (hidrogênio-C). Este resultado mostra que este alargamento não é devido às interações indiretas sorbitol-proteína (mediadas por moléculas de água, por exemplo), mas sim por interações diretas apolares do sorbitol com a proteína, que não estão presentes na água e uréia. Analisando com mais detalhes a solvatação dos tipos de resíduos por sorbitol (Figuras 2.8D e 2.8F), é possível ver que a distribuição em $\sim 2.4 \text{ \AA}$ é dominante para as interações com os resíduos apolares (Figura 2.8F), tem importância secundária para os resíduos polares (Figura 2.8E) e tem pouca relevância para os resíduos carregados (Figura 2.8D). Detalhes adicionais das interações apolares (realizadas por hidrogênio-C) podem ser visualizados pelas funções g_{ss} considerando partes específicas da enzima BCL, de acordo com os tipos específicos de resíduos, mostrado na Figura 2.10D. Um resultado importante é que para os resíduos carregados, o pico associado com hidrogênio-C ocorre acima de 2.5 \AA associado a um aumento da densidade local de ~ 2.2 , que é uma densidade relativa maior que a obtida para g_{ss} sorbitol-carregados mostrado anteriormente na Figura 2.8D (~ 1.3), inclusive com pico observado ligeiramente mais próximo à superfície proteica, abaixo de 2.5 \AA . A interpretação para isto é que os hidrogênios alifáticos (hidrogênio-C) não são os átomos do sorbitol mais frequentemente próximos dos resíduos carregados.

Para os resíduos polares e apolares a contribuição dos hidrogênios alifáticos na composição das funções g_{ss} sorbitol-proteína é muito mais importante. Para os resíduos polares (Figura 2.8E), o pico de g_{ss} associado à distribuição de hidrogênio-C está mais próximo em comparação com os resíduos carregados (Figura 2.8D), e levemente deslocado no “ombro” observado na distribuição total, considerando todos os átomos de sorbitol, mostrado nas Figuras 2.3B e 2.10B. Isto é um indicativo que o alargamento do pico de g_{ss} está associado com as interações apolares realizadas pelos hidrogênios alifáticos. A função g_{ss} da distribuição apolar-sorbitol (Figura 2.8F) é praticamente predita pela distribuição considerando apenas os hidrogênios alifáticos (hidrogênio-C), Figura 2.10D. Na Figura 2.8F existe um pequeno “ombro” em curtas distâncias, que é devido às ligações de hidrogênio do *backbone* da proteína com sorbitol, porém todo o restante da curva de g_{ss} é muito similar com o perfil obtido considerando os átomos de hidrogênio-C. Portanto, sorbitol forma importantes interações apolares com resíduos tanto polares quanto apolares, através de seus átomos de hidrogênio alifáticos. Esta propriedade é particularmente importante, pois mostra que este osmólito interage com porções hidrofóbicas da proteína, que são negligenciadas por moléculas de água.

As funções de distribuição para os átomos específicos da uréia são mostrados na Figura 2.10C (as funções g_{ss} são muito similares na presença do sorbitol). Neste caso, é possível ver claramente que a distribuição em torno de toda a enzima BCL é governada pelas interações dos hidrogênios da amida. É possível observar que a uréia realiza ligações de hidrogênio com a superfície da enzima como receptora (linha azul) e principalmente como doadora (linha rosa). Interessante observar que nenhum pico de g_{ss} considerando isoladamente os átomos corresponde ao segundo pico em $\sim 2.6 \text{ \AA}$, indicando que este pico é devido à interações indiretas, intermediadas por moléculas de água, com a superfície da proteína.

2.2.9. Perturbação das interações água-proteína promovida pelos osmólitos

As funções de distribuição g_{ss} mostraram algumas propriedades interessantes dos solventes. É importante destacar que, quando ambos sorbitol e uréia estão presentes na solução, as funções de distribuição água-proteína são muito semelhantes às funções g_{ss} na ausência de uréia. Isto significa que o sorbitol exerce papel restaurador das energias-livre de solvatação da água, que são desfavorecidas na presença de uréia. A interpretação destes fenômenos não é muito simples, pois funções de distribuições similares implicam em uma ocupação local que é proporcional a concentração molar, onde a solvatação relativa por água deve ser restaurada. Quando comparamos os sistemas BCL-Sor-H₂O e BCL-Ure-Sor-H₂O, funções g_{ss} água-proteína similares implicam em menos moléculas de água interagindo com a superfície da proteína, proporcionalmente à redução na concentração molar de água resultante da adição de uréia. Para distância curta, podemos observar que esta redução na solvatação por água coincide com as perdas de ligações de hidrogênio proteína-água, mostrada na Figura 2.6C. Ao mesmo tempo, vemos que uréia compete com sorbitol pelas ligações de hidrogênio, deslocando o estabilizante (Figura 2.6D). Portanto, a restauração das funções g_{ss} (no sistema BCL-Ure-Sor-H₂O) significa que moléculas de uréia deslocam preferencialmente moléculas de sorbitol do que de água. Isto pode ser visto na Tabela 2.2, onde o número de ligações de hidrogênio proteína-água diminui somente em ~3% com adição de uréia no sistema contendo água e sorbitol (de ~186 para ~180 ligações de hidrogênio). As concentrações molares de água nestes sistemas variam de 49.25 mol·L⁻¹ (BCL-Sor-H₂O) para 46.74 mol·L⁻¹ (BCL-Ure-Sor-H₂O), ver Tabela 2.1, logo uma redução de ~5%. As concentrações são aproximadas porque dependem da estimativa do volume da proteína. Considerando estas reduções tanto da substituição das ligações de hidrogênio proteína-água quanto das concentrações molares, deveríamos esperar um pequeno aumento na função g_{ss} proteína-água no primeiro pico (distância das ligações

de hidrogênio), que é de fato observado na Figura 2.3A (*inset*). Se esta análise também for realizada comparando a adição de sorbitol no sistema com uréia e água, podemos ver que há um decréscimo de ~5% nas ligações de hidrogênio proteína-água (de ~190 para ~180), sendo que o decréscimo na concentração molar ocorre em ~11% (de 52.68 para 46.74 mol·L⁻¹). Portanto, sorbitol compete com água deslocando-as através de ligações de hidrogênio, porém este efeito é menor do que a redução na concentração de água. Isto logicamente implica em aumento no primeiro pico de g_{ss} referente a interações do tipo ligações de hidrogênio, que é claramente demonstrado na Figura 2.3A.

2.3. Conclusões parciais

A aparente distribuição homogênea dos osmólitos sorbitol e uréia na superfície da enzima BCL mostrou-se bastante complexa quando analisada através das funções de distribuição. Apesar da complexidade envolvida nas interações moleculares proteína-solvente, algumas conclusões importantes podem ser sugeridas: (1) de forma geral, a superfície da proteína é disputada por todos os solventes: água, sorbitol e uréia. A solvatação da proteína é dinâmica e heterogênea, fortemente dependente dos tipos de resíduos que constituem a enzima BCL e as características dos átomos que compõem as moléculas dos solventes; (2) sorbitol tem a capacidade de estruturar moléculas de água em curtas distâncias (na primeira camada de solvatação) e desloca moléculas de água em longas distâncias, provavelmente devido ao seu volume. Por outro lado, uréia tem a capacidade de deslocar moléculas de água tanto da primeira quanto da segunda camada de solvatação. Interessante observar o efeito restaurador do sorbitol na distribuição de água em torno da proteína quando esta é perturbada por uréia; (3) existe uma distribuição característica dos solventes em torno do *backbone* da enzima BCL: água interage preferencialmente com os átomos do grupo carbonila (C=O), porém a densidade relativa em torno destes átomos é menor que a obtida na solução. Sorbitol interage fortemente com o *backbone* proteico (pico de g_{ss} em ~2.5 Å), sendo estas interações perturbadas na presença da uréia. O desestabilizante uréia tem alta afinidade

em curtas distâncias pelos grupos carbonila. Interessante notar que a uréia é desestabilizada por sorbitol somente em longas distâncias do *backbone*; (4) as distribuições das ligações de hidrogênio solvente-proteína são afetadas quando sorbitol ou uréia (ou ambos) estão presentes na superfície da enzima BCL. A principal diferença é observada para a redução das ligações de hidrogênio proteína-água. Com adição dos osmólitos, novas ligações de hidrogênio são formadas proteína-sorbitol e proteína-uréia, sendo que o número total de ligações de hidrogênio não é significativamente alterado. Além disso, a disposição do sorbitol em torno da superfície da proteína aumenta o tempo de sobrevivência das ligações de hidrogênio proteína-água. Isto pode ser explicado pelo volume ocupado pelas moléculas de sorbitol que excluem água das camadas mais distantes, desta forma evita que haja trocas de moléculas de água na superfície da enzima BCL. Este efeito deve estar associado com o efeito estabilizador promovido pelo sorbitol e pode ser investigado com mais detalhes futuramente; (5) A estabilização de água na primeira camada de solvatação da enzima BCL, promovida pelo sorbitol, ocorre principalmente nos resíduos polares. Ademais, moléculas de água são excluídas das camadas mais externas de todos os resíduos, principalmente dos resíduos polares também. No caso da adição de uréia, há forte competição com deslocamento de moléculas de água, principalmente dos resíduos carregados. O efeito de proteção do sorbitol pode ser visualizado pela manutenção das funções de distribuição g_{ss} proteína-água (entre os sistemas BCL-Sor-H₂O e BCL-Ure-Sor-H₂O) com perfis muito semelhantes em praticamente todos os resíduos em todas as distâncias; (6) Moléculas de água são desestabilizadas por uréia, especialmente, na primeira camada de solvatação dos resíduos ácidos Asp/Glu. Por outro lado, sorbitol atua estabilizando água em torno dos resíduos básicos Lys/Arg. Interações carregados-sorbitol são menos perturbadas por uréia nos resíduos ácidos do que nos básicos. Como o comportamento competitivo não é simétrico, as interações carregados-uréia, na presença de sorbitol, permanecem praticamente inalteradas nos resíduos ácidos e somente afetadas em longas distâncias para os resíduos básicos; (7) Análises mais detalhadas mostraram que existe uma região entre a primeira e a segunda camada de solvatação (~2.4Å) onde o sorbitol é frequentemente encontrado interagindo com a enzima BCL, isto é possível devido às interações realizadas pelos seus hidrogênios alifáticos. Acreditamos que esta interação pode ser responsável por parte do efeito estabilizador desempenhado pelo sorbitol.

Capítulo 2. Solvatação competitiva da enzima BCL por sorbitol, uréia e água

Simulações de Dinâmica Molecular foram realizadas para obter uma descrição de fácil compreensão e detalhada da dinâmica de solvatação da superfície da enzima BCL quando os dois osmólitos sorbitol (estabilizante) e uréia (desnaturante) estão presentes em meio aquoso. Estes resultados mostram que os modelos termodinâmicos simples (exclusão dos solventes de forma particionada da superfície proteica) não podem explicar satisfatoriamente a complexidade das interações em nível molecular, e que a interpretação das interações sorbitol-proteína e uréia-proteína (mostrados em detalhes aqui), bem como o uso destas informações devem necessariamente levar em conta a natureza química dos resíduos da proteína e as características dos átomos que compõem os osmólitos. Com isso, esperamos que as interpretações, apontadas até o presente momento, possam guiar futuros trabalhos que avaliam estabilidade de proteínas em meios não-aquosos, e possibilitar abordagens mais racionais tanto para desenvolvimento de solventes quanto de proteínas.

Os resultados e discussões apresentados neste Capítulo estão detalhados no trabalho:

Oliveira IP, Martinez L. Molecular basis for competitive solvation of the Burkholderia cepacia lipase by sorbitol and urea. *Phys Chem Chem Phys.* 2016;18(31):21797-21808. doi:10.1039/C6CP01789D.

Capítulo 3

**Microsolvatação da enzima BCL por uréia:
considerações sobre o estado de protonação
dos resíduos ácidos Aspartato e Glutamato**

As proteínas são formadas pela junção de aminoácidos (via ligações peptídicas) com cadeias laterais com diferentes propriedades moleculares, especialmente em termos de polaridade. As cadeias laterais de aminoácidos podem interagir com outros resíduos da própria proteína ou com solventes através de várias interações intermoleculares, incluindo apolares, dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio e eletrostáticas.^{71,72} O balanço do conjunto de interações proteína-proteína e protein-solvente é importante para determinar qual estado da proteína será estabilizado, de acordo com o deslocamento no equilíbrio Nativo↔Desnaturado.⁵⁰ Neste sentido, a estabilidade de proteínas está diretamente relacionada com perturbações que possam ocorrer em sua solvatação.⁷³

Sabe-se que moléculas de uréia são agentes perturbadores de proteínas.^{74,75} O mecanismo envolvido no processo de desnaturação proteica por uréia é frequentemente associado a perda das interações proteína-proteína, possivelmente substituídas por novas interações proteína-uréia.³⁴ No entanto, detalhes sobre como este processo se inicia ainda são desconhecidos e precisam ser avaliados. Em geral, modelos disponíveis na literatura sugerem que a uréia deve interagir diretamente com os resíduos protéicos superficiais, excluindo moléculas de água para regiões mais distantes da proteína.³⁹ Detalhamos no Capítulo 2 como esta solvatação ocorre, em função das características das cadeias laterais dos resíduos. Além disso, algumas discussões na literatura consideram que o efeito desnaturante provocado pela uréia possa estar associado às interações que ocorrem diretamente no *backbone* das proteínas.³⁴ De fato, estas duas hipóteses foram confirmadas por nós, onde observamos alta afinidade de moléculas de uréia pela superfície proteica (~6x mais concentrada na primeira camada de solvatação em relação ao *bulk* da solução), além de alta densidade relativa de moléculas de uréia ligadas ao *backbone* protético através de ligações de hidrogênio (uréia-NH…O=C-backbone).⁷⁶ Uma análise mais detalhada revelou onde a uréia liga-se preferencialmente, sendo altamente concentrada nos resíduos carregados da proteína, especialmente nos resíduos ácidos Asp e Glu.⁷⁶ Esta propriedade será investigada com mais detalhes neste Capítulo.

Diversos trabalhos experimentais têm mostrado que proteínas geralmente tendem a se desnovelar ou perder sua capacidade catalítica com o decréscimo no pH do ambiente em que se encontram. Além do sistema com pH ácido ser por si só altamente desnaturante, a adição de uréia faz com que a proteína seja mais facilmente desnovelada,⁷⁷⁻⁷⁹ como foi demonstrado, por exemplo, para a enzima proteolítica SB (*Stem Bomelain*), que contém 17 resíduos de Asp/Glu na estrutura (8% dos 212 que compõem a sequência completa).⁸⁰ Contudo, as discussões sobre como a solvatação proteína-uréia ocorre em função das alterações do pH, ainda não convergiram para uma clara definição de como as moléculas de uréia devem estar associadas à proteína. Neste Capítulo, mostraremos como ocorre a solvatação proteica por uréia e água dependente da protonação dos resíduos ácidos Asp/Glu. Os resultados apresentados levarão uma reinterpretação da solvatação preferencial como principal mecanismo de desnaturação induzida por uréia.

3.1. Metodologia

Para fazer o estudo de solvatação por uréia com variações no estado de protonação dos resíduos ácidos Asp/Glu, utilizamos simulações de Dinâmica Molecular partindo da estrutura cristalográfica da enzima BCL (*Burkholderia cepacia* lipase) disponível no banco de dados PDB (*Protein Data Bank* ID:1YS1),^{22,23} detalhado previamente na seção 2.1. A topologia do estado protonado foi gerada utilizando o programa psfgen, contido no pacote de programas do NAMD,⁸¹ utilizando os parâmetros CHARMM adequados para cada estado de protonação.

3.1.1. Simulações de Dinâmica Molecular

Para estudar a dinâmica de solvatação proteica, nós aplicamos as simulações de Dinâmica Molecular convencionais, adotando a estrutura da enzima BCL (*Burkholderia cepacia* lipase PDB ID: 1YS1) como proteína modelo,^{22,23} sendo removido o ligante complexado, ácido hexilfosfônico (R)-2-metil-3-fenilpropil éster, da estrutura cristalográfica. As caixas de simulação foram construídas com o programa Packmol,⁵⁴ contendo a proteína centralizada e moléculas de água, íons Na⁺ e Cl⁻ para neutralizar cargas do sistema.

Os sistemas foram equilibrados de acordo com protocolo-base adotado na tese: (I) com todos os átomos da enzima BCL fixos realizou-se a relaxação dos solventes com 1000 passos de minimização de energia pelo método de Gradientes-Conjugados (GC) seguidos de 200 ps de simulação MD; (II) mantendo somente os átomos de carbonos alfa (C_α) da proteína fixos, 500 passos de minimização GC foram realizados, seguidos de mais 200 ps de simulação MD; (III) sem fixar nenhum átomo da enzima BCL foi realizada simulação MD de 2,2 ns.

As coordenadas e velocidades finais da etapa de equilibração foram utilizadas para iniciar os cálculos das trajetórias das simulações MD. Trajetórias de 40 ns foram simuladas em *ensemble* NPT em temperatura de 298.15 K e pressão de 1 atm. O controle da pressão foi mantido pelo barostato de Langevin (com período de 200 ps, e tempo de decaimento de 100 ps) e temperatura de 298.15 K. A temperatura foi mantida constante através da dinâmica de Langevin (com frequência de perturbação de 10 ps⁻¹). O campo de força CHARMM foi utilizado tanto para a proteína quanto para os solventes (água e uréia),^{55,56} adotando o modelo TIP3P para a água.⁵⁷ As simulações foram computadas com o programa NAMD⁴⁸ e as visualizações obtidas com VMD.⁵⁸ Foram confeccionados quatro sistemas de simulação para estudar a dinâmica de solvatação da BCL, apresentados na Tabela 3.1. Para todas as condições descritas, cinco simulações MD foram realizadas empregando o protocolo descrito acima, totalizando 800 ns (4 sistemas x 5 simulações x 40 ns). As análises dos resultados foram realizadas utilizando o pacote

Capítulo 3. Microsolvatação da enzima BCL por uréia: considerações sobre o estado de protonação dos resíduos ácidos Aspartato e Glutamato

de ferramentas do MDAnalysis, incluindo rmsd (*root mean square deviations*) ligações de hidrogênio, funções de distribuição soluto-solvente (g_{ss}) e integrais de Kirkwood-Buff (KBI).⁶⁰

Tabela 3. 1 Detalhes dos sistemas simulados. Cinco simulações independentes de 40 ns foram realizadas para cada sistema.

Sistema	Notação	Quantidade de Moléculas	
		Concentração(mol·L⁻¹)	
		Água	Uréia
1	Proteína + Água	20800	
	Asp/Glu desprotonado	55,49	0
2	Proteína + Água + Uréia	20800	400
	Asp/Glu desprotonado	52,68	1,01
3	Proteína + Água	20800	
	Asp/Glu protonado	55,49	0
4	Proteína + Água + Uréia	20800	400
	Asp/Glu protonado	52,68	1,01

3.1.2. Integrais de Kirkwood-Buff (KBI)

As interações proteína-solventes podem ser estudadas através das integrais de Kirkwood-Buff (KBI).^{82,83} Esta teoria de soluções (*Kirkwood-Buff theory*), de abordagem mecânico-estatística, foi desenvolvida inicialmente por John G. Kirkwood (1907-1959) e Frank P. Buff (1924-2009), tendo como marco inicial um trabalho publicado no começo da década de 1950.⁸² A aplicação desta teoria possibilita obter informações termodinâmicas de cunho macroscópico a partir do cálculo das distribuições dos solventes em torno de solutos, a partir das funções de distribuição (RDFs).^{82,84}

Esta metodologia é uma ferramenta poderosa para investigar propriedades termodinâmicas de soluções de acordo com a distribuição de solventes em torno de solutos⁸⁵ podendo, inclusive solutos serem macromoléculas biológicas, como proteínas.^{86,87} Para o cálculo das integrais de Kirkwood-Buff, primeiro é necessário computar as funções de distribuição, que devem ser usadas como *input* para obter as KBI, dadas pela Equação 3.1.

$$G_{ij} = \int_0^{\infty} [g_{ij}(r) - 1] 4\pi r^2 dr \quad \text{Eq. 3.1}$$

onde, g_{ij} é a função de distribuição radial (RDF) para os pares ij soluto-solvente.

Podemos entender o significado das integrais KB usando um modelo simples como, por exemplo, a adição de um soluto em um recipiente contendo um determinado solvente. Neste caso, o solvente pode assumir dois comportamentos: ser atraído pelo soluto ou ser repelido. Nos dois casos, há um volume deslocado do solvente comparativamente ao seu estado inicial, como mostrado na Figura 3.1.

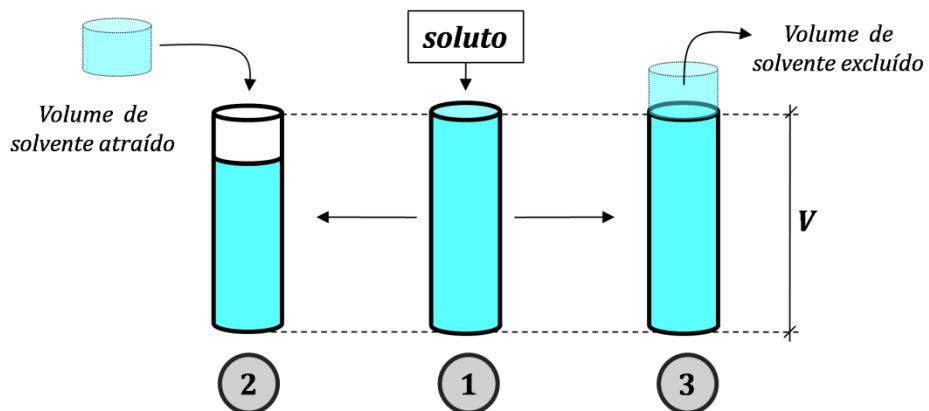


Figura 3.1 Comportamento do solvente em uma solução quando soluto é adicionado. Variações no volume são observadas de acordo com a afinidade soluto-solvente.

Neste caso, vamos considerar o volume do recipiente (V) fixo. Na condição 1, ausência do soluto, o solvente tem concentração (moléculas/volume) c_1 , com número de moléculas contidas no recipiente dado por $N_1(V) = c_1 V$. Com a adição do soluto, parte do solvente é excluído para fora do recipiente (solução 3). O número de moléculas de solvente excluído é dado pela simples diferença entre as quantidades dentro do recipiente nas soluções 1 e 3 ($N_1(V) - N_3(V)$). De forma semelhante, o número de moléculas de solvente atraído, necessário para completar o volume (V), é dado pela diferença entre as quantidades dentro do recipiente nas soluções 1 e 2 ($N_2(V) - N_1(V)$). Em ambas as situações, o número de solvente deslocado corresponde a um volume de solvente puro, dado pelas Equações 3.1 e 3.2, para as soluções 2 e 3, respectivamente.

$$\Delta V_{\text{solvente}} = \frac{N_2(V) - N_1(V)}{c_1} \quad \text{Eq. 3.1}$$

$$\Delta V_{\text{solvente}} = \frac{N_1(V) - N_3(V)}{c_1} \quad \text{Eq. 3.2}$$

Podemos definir uma função ($G(V)$) que associa a variação de volume do solvente com a adição de soluto em mols ($n_{\text{sólido}}$): $G(V) \equiv \pm \Delta V / n_{\text{sólido}}$. Logo, $G(V)$ assume as seguintes formas para as soluções 2 e 3, respectivamente: $G(V) = \frac{N_2(V) - N_1(V)}{c_1 n_{\text{sólido}}}$ (volume de solvente atraído) e $G(V) = -\frac{N_1(V) - N_3(V)}{c_1 n_{\text{sólido}}}$ (volume de solvente excluído). Neste sentido, $G(V)$ informa o deslocamento volumétrico de solvente por mol de soluto adicionado.

A associação destas propriedades macroscópicas com as propriedades microscópicas de distribuição do solvente pode ser realizada como descrito a seguir. O

Capítulo 3. Microsolvatação da enzima BCL por uréia: considerações sobre o estado de protonação dos resíduos ácidos Aspartato e Glutamato

cálculo do número de moléculas de solvente é realizado pela integral em todo o volume de acordo com a concentração do solvente. Portanto, os números de moléculas de solvente em cada solução (1, 2 e 3) são dados por: $N_i(V) = \int_V c_i(\vec{r}) dV$. Neste caso, ($c_i(\vec{r})$) é a concentração de solvente a uma distância \vec{r} da solução. Com isso, as funções $G(V)$ podem ser calculadas para as soluções 2 e 3, de acordo com as Equações 3.3 e 3.4 a seguir:

$$G(V) = \frac{1}{c_1 n_{soluto}} [N_2(V) - N_1(V)] = \frac{1}{c_1 n_{soluto}} \left[\int_V c_2(\vec{r}) dV - \int_V c_1(\vec{r}) dV \right] \quad \text{Eq. 3.3}$$

$$G(V) = \frac{1}{c_1 n_{soluto}} [N_3(V) - N_1(V)] = \frac{1}{c_1 n_{soluto}} \left[\int_V c_3(\vec{r}) dV - \int_V c_1(\vec{r}) dV \right] \quad \text{Eq. 3.4}$$

Considerando que na solução 1 a concentração de solvente (c_1) é constante em toda a sua extensão, a função $G(V)$ pode ser expressa pelas Equações 3.5 e 3.6.

$$\begin{aligned} G(V) &= \frac{1}{n_{soluto}} \left[\int_V \frac{c_2(\vec{r})}{c_1(\vec{r})} dV - \int_V \frac{c_1(\vec{r})}{c_1(\vec{r})} dV \right] = \frac{1}{n_{soluto}} \left[\int_V \frac{c_2(\vec{r})}{c_1(\vec{r})} dV - \int_V dV \right] \\ &= \frac{1}{n_{soluto}} \int_V \left[\frac{c_2(\vec{r})}{c_1(\vec{r})} - 1 \right] dV \end{aligned} \quad \text{Eq. 3.5}$$

$$\begin{aligned} G(V) &= \frac{1}{n_{soluto}} \left[\int_V \frac{c_3(\vec{r})}{c_1(\vec{r})} dV - \int_V \frac{c_1(\vec{r})}{c_1(\vec{r})} dV \right] = \frac{1}{n_{soluto}} \left[\int_V \frac{c_3(\vec{r})}{c_1(\vec{r})} dV - \int_V dV \right] \\ &= \frac{1}{n_{soluto}} \int_V \left[\frac{c_3(\vec{r})}{c_1(\vec{r})} - 1 \right] dV \end{aligned} \quad \text{Eq. 3.6}$$

A partir da definição das funções de distribuição como $g(\vec{r}) = \frac{c_2(\vec{r})}{c_1(\vec{r})}$ e $g(\vec{r}) = \frac{c_3(\vec{r})}{c_1(\vec{r})}$, a função $G(V)$ assume sua aparência mais conhecida, mostrada na Equação 3.7. Com $g(\vec{r})$ assumindo perfil distinto para cada uma das soluções 2 e 3, de acordo com o deslocamento de solvente.

$$G(V) = \frac{1}{n_{sóluto}} \int_V [g(\vec{r}) - 1] dV \quad \text{Eq. 3.7}$$

Neste caso, fica claro que $G(V)$ expressa um volume de solvente atraído ou excluído pela adição de n mols do soluto.

Do ponto de vista mais prático, a integral até uma determinada distância r , é o volume de solvente até tal distância na presença do soluto, comparativamente ao volume de solvente neste mesmo r na ausência do soluto. Portanto, esta integral pode assumir valores positivos ou negativos, dependendo do acúmulo ou repulsão de solvente próximo ao soluto, respectivamente.

Nesta tese, no entanto, utilizamos uma função de distribuição ligeiramente diferentes das tradicionais RDFs. Aqui, as funções de distribuição g_{ss} consideram r como a menor distância entre soluto-solvente e não os centros de massa das usuais $g(r)$, descritas previamente na seção 2.1.2. Contudo, estas funções, se devidamente normalizadas, podem ser utilizadas para obtenção de propriedades termodinâmicas de forma semelhante às RDFs.⁵⁹

Os valores da integral G devem ser positivos, caso o solvente se encontre preferencialmente próximo à superfície da proteína ou negativos, caso seja preferencialmente excluído para o *bulk* da solução. Com isso, a aplicação destas integrais neste trabalho permite discutir de forma detalhada e quantitativa a solvatação preferencial por diferentes componentes do solvente, e como as alterações no estado de

protonação dos resíduos Asp/Glu podem alterar as afinidades proteína-água e proteína-uréia nas primeira e segunda camadas de solvatação.

3.2. Resultados e discussões

3.2.1. Alterações conformacionais da enzima BCL

Análises conformacionais da proteína, de acordo com o cálculo de rmsd, revelaram influência do desnaturante uréia, aumentando os valores de rmsd (Figura 3.2). Este aumento de rmsd não foi alto, indicando que o processo de desnovelamento proteico deve ocorrer numa escala de tempo de simulação maior. No entanto, a proteína se distancia da estrutura cristalográfica em ambos os casos (Asp/Glu protonados ou desprotonados). Podemos ver que o deslocamento é mais evidente quando os resíduos Asp/Glu estão em suas formas protonadas, mostrado na Figura 3.2A. Este aumento na mobilidade pode ser explicado pela perda da efetividade das ligações de hidrogênio proteína-proteína realizadas pelas cadeias laterais dos resíduos Asp/Glu, este aspecto será discutido adiante. Interessante notar que o rmsd da proteína (com Asp/Glu desprotonados) apresenta uma frequência de amostragem muito bem definida em torno de ~2,0 Å, mostrado na Figura 3.2B, quando a enzima está na presença somente de água, sendo deslocado para valores maiores de rmsd quando uréia é adicionada no sistema. Isto pode ser explicado pelo fato de moléculas de uréia apresentarem alta afinidade pela forma desprotonada da proteína, que será detalhada adiante neste Capítulo. Com a análise separada da mobilidade de cada resíduo (Figura 3.2C), é possível observar que algumas regiões são mais móveis na presença de uréia, comparativamente à presença somente de água, destacado pelas setas na figura. Interessante observar a alta mobilidade do domínio U1.

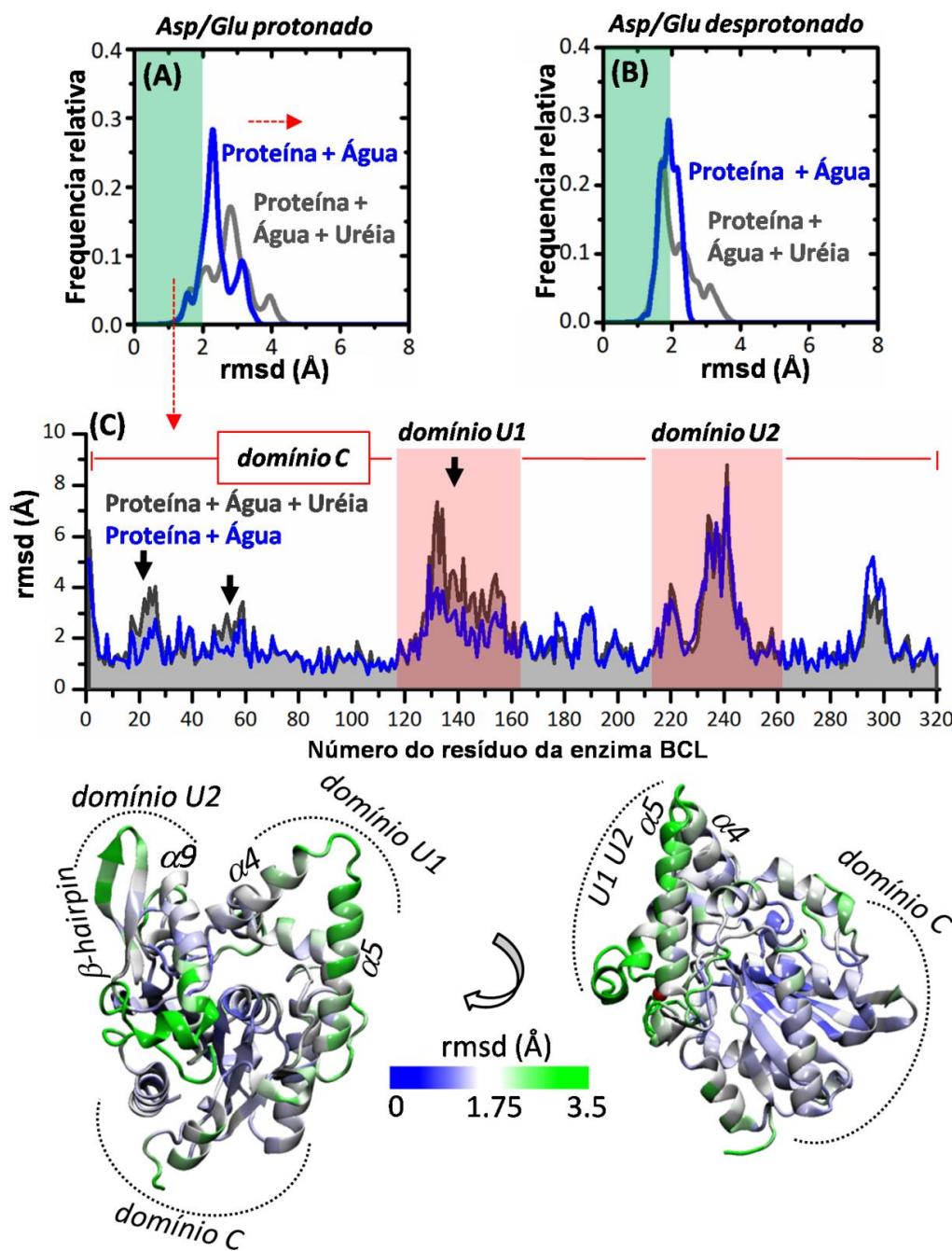


Figura 3.2 Distribuição relativa dos valores de rmsd para a enzima BCL considerando os átomos do *backbone* e da cadeia lateral. Em (A) Asp/Glu protonados e (B) Asp/Glu desprotonados, e comparação com adição do desnaturante uréia (sombra verde guia-referência). Em (C) valores de rmsd para cada resíduo da enzima BCL (estado protonado), mostrando que o aumento nos valores de rmsd está associado principalmente ao domínio U1, mantendo o núcleo hidrofílico (domínio C) mais rígido.²¹ A esfera vermelha é o íon Ca²⁺.

As análises dos resultados de rmsd mostram que a proteína desvia levemente de sua estrutura cristalográfica inicial quando Asp/Glu estão protonados (situação simulando um ambiente com pH ácido), neste caso específico a região que apresenta maior mobilidade é o domínio U1, que está diretamente relacionado com a abertura do sítio catalítico da enzima BCL.^{21,69} Além disso, a Figura 3.2A mostra que a adição de uréia possibilita amostragens de altos valores de rmsd (~4 Å), sugerindo que a adição do desnaturante faz com que a proteína acesse estados conformacionais distantes do estado nativo. Portanto, em uma situação em que a proteína esteja imersa em um ambiente de pH ácido, a adição de uréia aumentou levemente a mobilidade proteica. Este resultado deve ter correlação com o fato de que a uréia é um desnaturante mais eficiente em condições de baixo pH, conforme evidenciado experimentalmente, por exemplo, para RNase de *Rhizopus stolonifer*.⁸⁸

3.2.2. Perturbação das ligações de hidrogênio

Moléculas de água e uréia competem entre si para interagirem preferencialmente pelos resíduos da superfície proteica, sendo que moléculas de água são claramente deslocadas por moléculas do desnaturante. Isto tem como efeito imediato a redução do número total de ligações de hidrogênio proteína-água, como discutido no Capítulo 2.⁷⁶ Mostramos que moléculas de uréia possuem alta afinidade pela proteína, principalmente por resíduos carregados e polares, especialmente com Asp/Glu através de ligações de hidrogênio muito bem orientadas (uréia-NH···O=C-Asp/Glu), com moléculas de uréia atuando principalmente como doadoras nas ligações de hidrogênio.

O deslocamento do equilíbrio químico para a forma protonada dos resíduos Asp/Glu tem impacto imediato nas ligações de hidrogênio proteína-uréia, como mostrado na Figura 3.3B. Este mesmo decréscimo nas ligações de hidrogênio também é observado para as interações proteína-água, mostrado na Figura 3.3A, sendo explicado

Capítulo 3. Microsolvatação da enzima BCL por uréia: considerações sobre o estado de protonação dos resíduos ácidos Aspartato e Glutamato

igualmente pela perda das orientações água···Asp/Glu e uréia···Asp/Glu. Partindo-se desta informação, podemos mostrar que, quando os resíduos ácidos Asp/Glu estão protonados, ocorre perda de afinidade de ambas as moléculas de água e uréia pela superfície proteica, dada pelo decréscimo no número de ligações de hidrogênio. Este resultado é importante, pois mostra que em uma situação em que o pH do ambiente é ácido (com os resíduos de Asp/Glu em seus estados protonados) o aumento do caráter desnaturante da uréia, observado experimentalmente,⁸⁸ não deve estar associado às interações uréia···Asp/Glu, tendo em vista a perda significativa destas interações. Portanto, a afirmação de que a desnaturação induzida por uréia em pH ácido deve ser uma consequência do aumento das interações com a superfície proteica, deve ser investigada com mais detalhes, principalmente considerando os resultados apresentados aqui de decréscimo deste tipo de interação específica.

Quando os resíduos ácidos Asp/Glu estão nas suas formas protonadas, a enzima BCL apresentou maiores mobilidades conformacionais, como mostrado na Figura 3.2, de acordo com os maiores valores de rmsd. Agora, podemos sugerir que esta mobilidade maior pode estar correlacionada com o fato de os resíduos Asp/Glu protonados perderem parte da capacidade de formarem ligações de hidrogênio bem orientadas com os próprios resíduos da proteína, como mostrado na Figura 3.3C e, especificamente para os resíduos de Asp/Glu não superficiais na Figura 3.3D. A presença de uréia não afeta significativamente a distribuição das ligações de hidrogênio proteína-proteína, conforme já esperado devido ao tempo de simulação. Contudo, efeitos mais evidentes provocados pelo desnaturante podem ser observados, por simulações de Dinâmica Molecular, especialmente em altas concentrações de uréia para pequenos peptídeos acima da temperatura ambiente.³⁵

Sabemos que a solvatação pela superfície proteica é altamente competitiva. Além disso, moléculas de água e uréia interagem fortemente umas com as outras.^{50,89} Como o sistema é competitivo, a perda de afinidade pela superfície proteica (decréscimo nas ligações de hidrogênio) pode aumentar a afinidade água-uréia nas camadas superficiais, fazendo com que a hidratação da proteína seja comprometida.

Capítulo 3. Microsolvatação da enzima BCL por uréia: considerações sobre o estado de protonação dos resíduos ácidos Aspartato e Glutamato

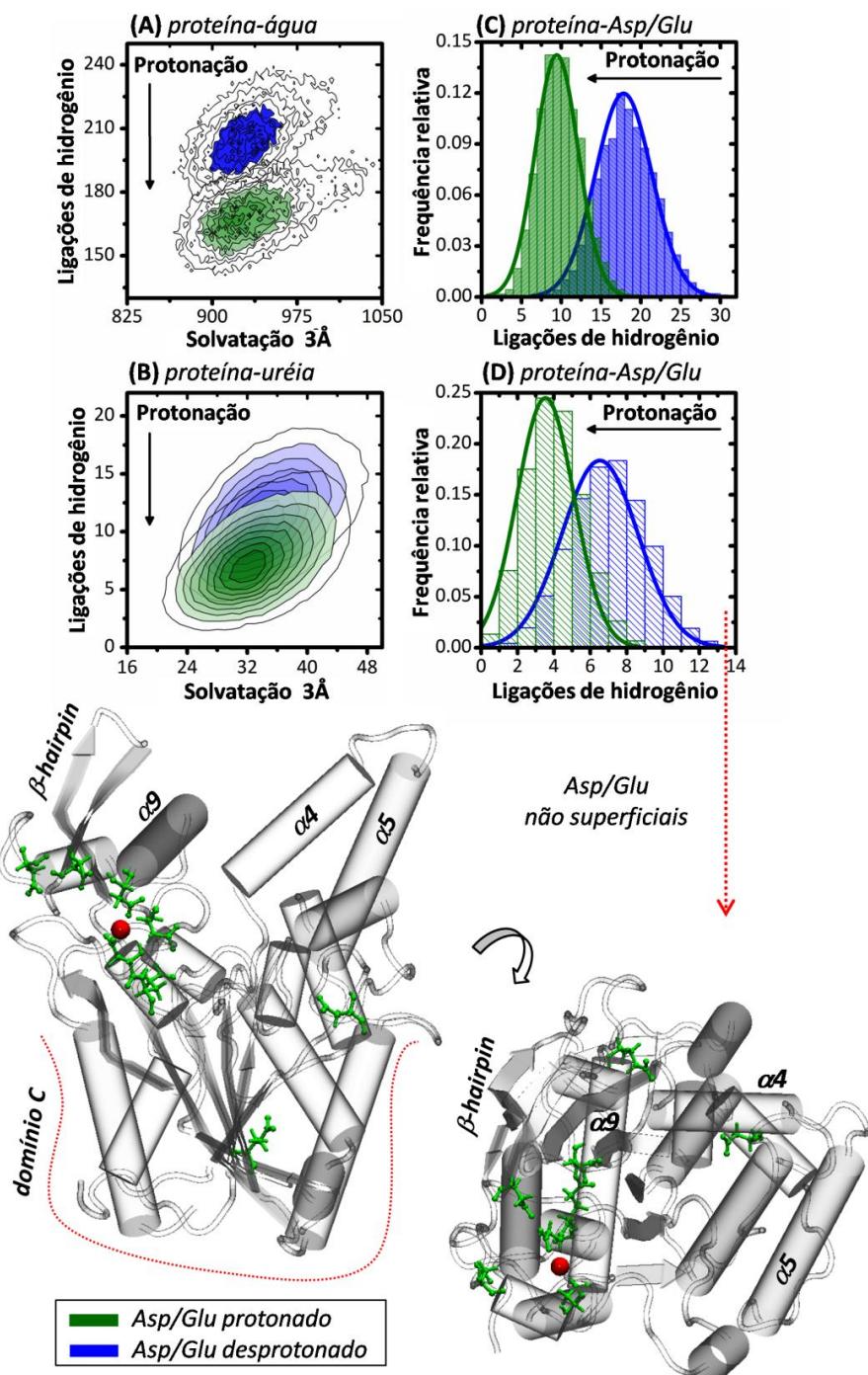


Figura 3.3 Correlação entre as ligações de hidrogênio e a solvatação da enzima BCL: (A) proteína-água e (B) proteína-uréia. Em (C) o número de ligações de hidrogênio entre proteína-Asp/Glu e (D) o número de ligações de hidrogênio entre proteína-Asp/Glu considerando somente os resíduos ácidos não superficiais (Asp₅₅-Glu₁₉₇-Asp₂₂₈-Asp₂₃₆-Asp₂₄₂-Asp₂₆₄-Asp₂₈₈-Asp₂₈₉) destacados em verde na estrutura tridimensional.

3.2.3. Asp₂₆₄: dependência da mobilidade com o estado de protonação

A forma protonada dos resíduos de Asp/Glu faz com que, de forma geral, aumente a mobilidade proteica (Figura 3.2), de acordo com aumento nos valores de rmsd para todos os resíduos que compõem a proteína. No entanto, se analisarmos especificamente o resíduo de Asp₂₆₄ que compõe a tríade catalítica da enzima BCL (Ser₈₇-Asp₂₆₄-His₂₈₆)⁹⁰ um comportamento contrário é observado, conforme mostrado na Figura 3.4. Neste caso, a forma protonada de Asp₂₆₄ (Figura 3.4A) apresenta menores valores de rmsd quando comparado com a forma desprotonada (Figura 3.4B). Isto pode ser explicado pela formação de ligação de hidrogênio com o anel imidazol da cadeia lateral de His₂₈₆, especificamente Asp₂₆₄ atuando como doador da ligação de hidrogênio. A Figura 3.4B mostra que a forma desprotonada contribui mais para a mobilidade do Asp₂₆₄, que pode ser devido às interações com a cadeia principal (*backbone-NH*···O=C-Asp) dos resíduos vizinhos, especialmente com His₂₈₆. Esta proximidade, em ambas as situações, se deve ao papel direto desempenhado por estes resíduos na reação biocatalítica promovida pela enzima BCL, conforme mecanismo proposto para esta proteína.^{3,90,91} De forma resumida, estes resultados mostram que o deslocamento nas formas Protonado_{Asp264}↔Desprotonado_{Asp264} tem impacto direto nos estados conformacionais amostrados pelo resíduo de Asp₂₆₄, sendo que a His₂₈₆ estabiliza a forma protonada através de seu anel imidazol. Podemos tentar correlacionar este resultado com dados experimentais, pois é de conhecimento que a enzima BCL apresenta máxima atividade catalítica em pH levemente ácido para neutro.^{78,79,92} Aqui, conseguimos observar que, numa suposta condição ácida, o resíduo de Asp₂₆₄ se mantém muito bem orientado, próximo de His₂₈₆, portanto, possivelmente, capaz de participar mais efetivamente do mecanismo catalítico. Contudo, estudos mais detalhados devem ser feitos para investigar a relação da protonação de Asp₂₆₄ com a atividade catalítica da enzima BCL.

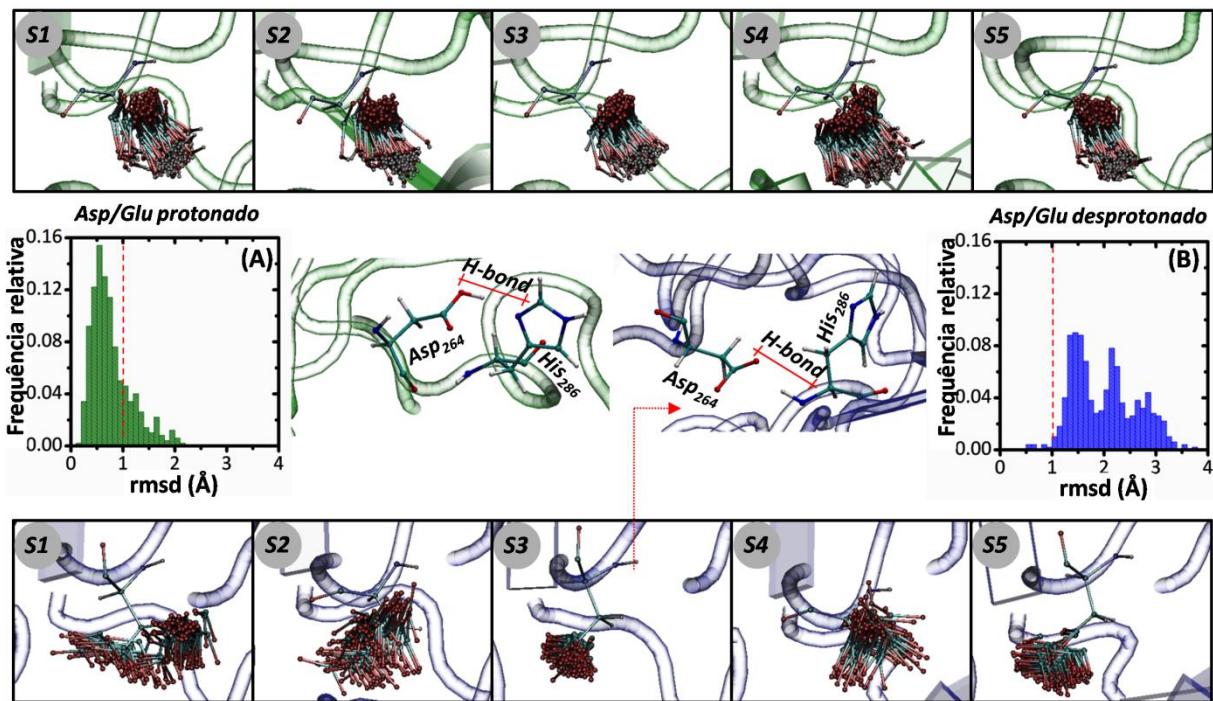


Figura 3.4 Mobilidade conformacional do resíduo Asp₂₆₄, que compõe a tríade catalítica de enzima BCL (Ser₈₇-Asp₂₆₄-His₂₈₆).^{3,93} Em (A) é possível observar que a forma protonada apresentou menores desvios da estrutura cristalográfica inicial, devido a realização de ligações de hidrogênio com His₂₈₆. Asp₂₆₄ atuando como doador na ligação. (B) mostra que a forma desprotonada do resíduo Asp₂₆₄ é mais flexível, com maiores valores de rmsd amostrados. No estado desprotonado, ligações de hidrogênio formadas entre o Asp₂₆₄ com o backbone da His₂₈₆ foram frequentemente amostradas, detalhadas na simulação 3 (S3).

3.2.4. Perfil da distribuição de água e uréia em torno da proteína de acordo com o estado de protonação de Asp/Glu

A microsolvatação proteica pode ser investigada em detalhes através das funções de distribuição soluto-solvente (g_{ss}), mostradas na Figura 3.5. Esta ferramenta é

Capítulo 3. Microsolvatação da enzima BCL por uréia: considerações sobre o estado de protonação dos resíduos ácidos Aspartato e Glutamato

adequada para este estudo, pois possibilita avaliar a estrutura dos solventes nas proximidades da proteína. Além disso, aplicação posterior das integrais de Kirkwood-Buff permite associar um volume de solvente excluído ou acumulado no domínio da proteína.⁸⁴

A Figura 3.5A mostra que distribuição de água na superfície proteica é levemente afetada pela protonação dos resíduos ácidos Asp/Glu. Ocorre uma pequena perturbação nas ligações de hidrogênio (água \cdots Asp/Glu), indicada pelo decréscimo no primeiro pico de g_{ss} . Este fato tem como consequência o deslocamento de água para a segunda camada de solvatação, de acordo com o aumento observado no segundo pico de g_{ss} (aumento da densidade relativa de água na segunda camada de solvatação). Por outro lado, a distribuição de uréia em torno da proteína é altamente perturbada pela protonação dos resíduos ácidos Asp/Glu, como mostra a Figura 3.5B. Interessante observar a perda de afinidade de interações proteína-uréia na primeira camada de solvatação em ~ 1.8 Å (desorientação das ligações de hidrogênio uréia-NH \cdots O=C-Asp/Glu), mas a segunda camada de solvatação é levemente estabilizada, como indicado pelo pequeno aumento da densidade relativa nas funções g_{ss} (segundo pico). Contudo, ainda é possível observar uma alta densidade relativa de uréia na superfície proteica, mesmo depois da protonação dos resíduos Asp/Glu, de acordo com o decréscimo de g_{ss} na primeira camada de solvatação (de ~ 5.6 para ~ 4.0).

As Figuras 3.5C e 3.5D mostram as integrais de Kirkwood-Buff (KBI), correspondentes às distribuições de água ou uréia em torno da proteína. Podemos observar que ocorre exclusão de ambos os solventes em curtas distâncias (menores do que ~ 1.67 Å), isto é devido à repulsão estérica entre átomos dos solventes e átomos da proteína ($g_{ss} < 1$), que leva a valores negativos da integral. Na primeira região de concentração do solvente ($\sim 1.67 <$ distância (Å) $< \sim 2.21$), ocorre formação de ligações de hidrogênio mais bem orientadas, com os solventes atuando como doadores das ligações de hidrogênio.⁷⁶ A segunda região com alta densidade relativa de solvente ($\sim 2.21 <$ distância (Å) $< \sim 3.31$), faz com os valores de KBI se tornem menos negativos, dada pelo acúmulo de solventes nas duas camadas de solvatação. Os valores de G_{ss} convergem para valores diferentes de acordo com os estados de protonação dos

Capítulo 3. Microsolvatação da enzima BCL por uréia: considerações sobre o estado de protonação dos resíduos ácidos Aspartato e Glutamato

resíduos ácidos Asp/Glu. Os solventes são atraídos menos efetivamente pela superfície proteica quando os resíduos Asp/Glu estão em suas formas protonadas (linha verde sempre abaixo da linha azul), como mostrado nas Figuras 3.5C e 3.5D. Além disso, é possível observar que a perda de afinidade pela superfície proteica é muito mais evidente para as moléculas de uréia, mostrando que o estado de protonação dos resíduos ácidos Asp/Glu é muito importante para determinar como as moléculas de uréia estão distribuídas na superfície proteica. Neste sentido, estes resultados mostram que em pH ácido, as interações proteína-uréia são perturbadas. Portanto, a desnaturação proteica em pH ácido, induzida por moléculas de uréia, resulta de forma não trivial das interações diretas proteína-uréia.

Utilizamos as integrais de Kirkwood-Buff para avaliar o acúmulo dos solventes nas duas camadas de solvatação da enzima BCL. Com isso, a estrutura dos solventes nestas camadas mais próximas da superfície proteica pode ser estudada, e estão ilustrados nas Figuras 3.5E (proteína + água) e 3.5F (proteína + água + uréia). As áreas calculadas em baixo dos picos máximos, referentes a cada camada de solvatação, foram utilizadas para determinar o acúmulo de moléculas de água ou uréia na primeira ou na segunda camada de solvatação, como descrito mais adiante.

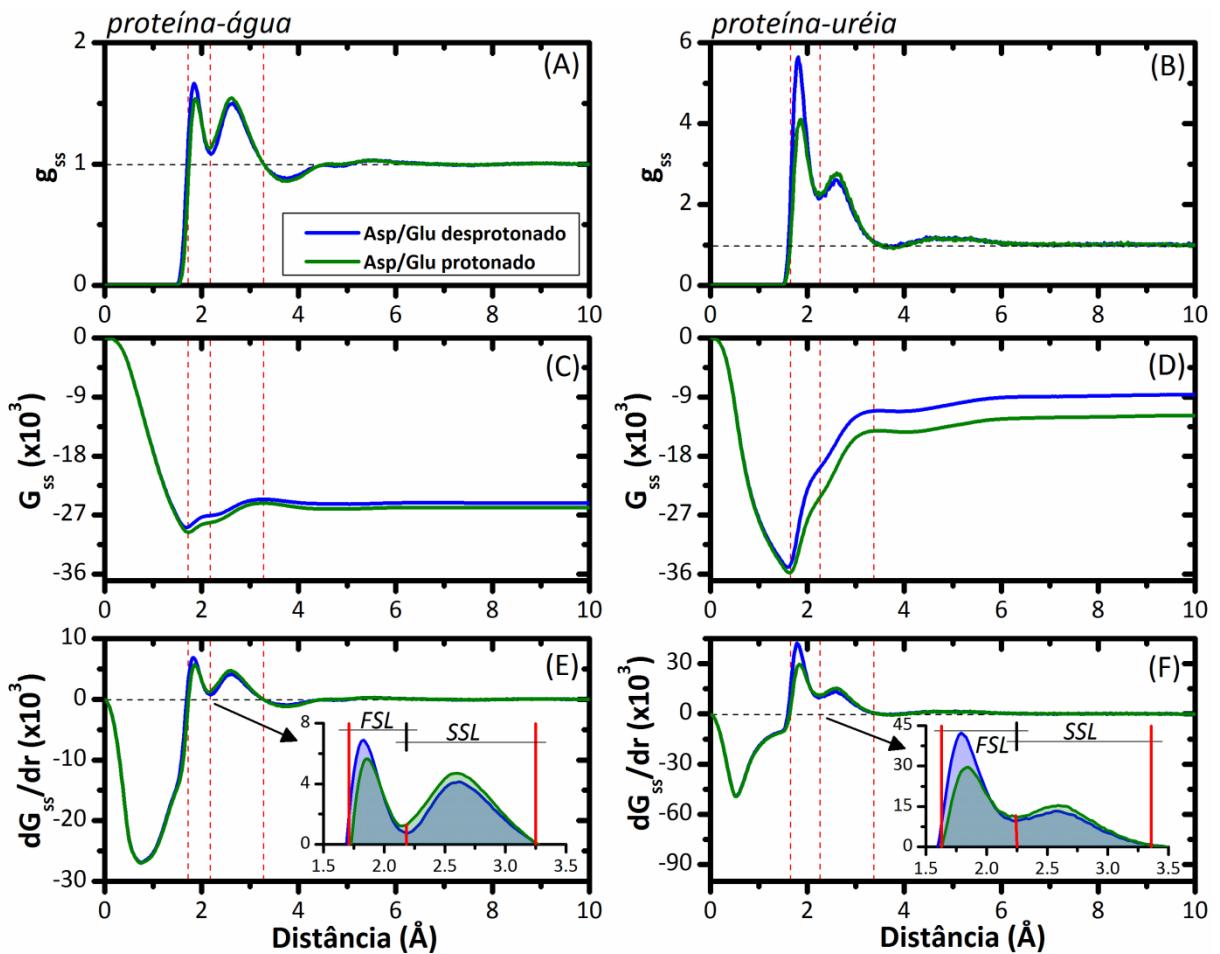


Figura 3.5 Efeito do estado de protonação dos resíduos ácidos Asp/Glu na distribuição de solvente na superfície proteica. (A) e (B) funções de distribuição soluto-solvente (g_{ss}) de acordo com a alteração no estado de protonação dos resíduos Asp/Glu. (C) e (D) mostram os valores das integrais de Kirkwood-Buff (KBI ou G_{ss}) para proteína-água e proteína-uréia. (E) e (F) mostram as primeiras derivadas de KBI em relação à distância. *Insets:* mostram a primeira camada de solvatação (FSL – do inglês *First Solvation Layer*) e a segunda camada de solvatação (SSL – do inglês *Second Solvation Layer*).

Os resultados sugerem que o efeito de desnaturação proteica em pH ácido é favorecido por uréia, observado experimentalmente,^{94,95} não é, necessariamente, resultado exclusivamente de interações Asp/Glu···uréia na primeira camada de solvatação de proteínas. Caso existisse uma dependência direta, o efeito do desnaturante

Capítulo 3. Microsolvatação da enzima BCL por uréia: considerações sobre o estado de protonação dos resíduos ácidos Aspartato e Glutamato

uréia deveria ser mais pronunciado em alto pH, dado pelo acúmulo de uréia próximo aos resíduos ácidos Asp/Glu desprotonados. Interessante observar que dados experimentais mostraram a capacidade de proteínas manterem suas estruturas secundárias mesmo em pH alcalino, inclusive com alta concentração de uréia.⁷⁷ Estes resultados sugerem que, apesar do desnaturante uréia estar muito bem orientado formando ligações de hidrogênio com os resíduos Asp/Glu (uréia-NH \cdots O=C-Asp/Glu) na forma desprotonada, isto não deve ser o principal componente para favorecer o desnívelamento protéico induzido por uréia.

3.2.5. Análise da microsolvatação proteica de acordo com a alteração do estado de protonação de Asp/Glu

A solvatação proteica por água e uréia para uma larga camada de solvatação (distância até 10 Å) foram apresentados nas Figuras 3.6A-C (de acordo com $G_{ss} = \int (g_{ss(r)} - 1)dV_{(r)}$, descrito na seção 3.1.2). Estes valores de KBI podem ser correlacionados com a concentração de uréia, fornecendo um parâmetro de interação preferencial (Γ),^{96,97} uma estimativa do volume molar de excesso do osmólito, podendo ser positivo ou negativo, de acordo com a afinidade pela superfície proteica. O cálculo de Γ_{ureia} é calculado a partir de G_{ss} e da concentração de uréia:

$$\Gamma_{ureia} = Conc_{ureia} \left(\frac{mol}{L} \right) x \left[(G_{ss} \text{ proteína} \cdots \text{uréia}) \left(\frac{cm^3}{mol} \right) - (G_{ss} \text{ proteína} \cdots \text{água}) \left(\frac{cm^3}{mol} \right) \right]$$

Asp/Glu desprotonados:

$$[\text{urea}] = 1,01 \text{ mol/L}$$

$$G(\text{prot-água}) = -25766,60 \text{ cc/mol}$$

$$G(\text{prot-urea}) = -8566,98 \text{ cc/mol}$$

$$\Gamma = 1,01x[(-8566,98) - (-25766,60)] =$$

$$17371,62 \text{ cc/L ou } \mathbf{17,37}$$

Asp/Glu protonados:

$$[\text{urea}] = 1,01 \text{ mol/L}$$

$$G(\text{prot-água}) = -26234,00 \text{ cc/mol}$$

$$G(\text{prot-urea}) = -11758,60 \text{ cc/mol}$$

$$\Gamma = 1,01x[(-11758,60) - (-26234,00)] =$$

$$14620,76 \text{ cc/L ou } \mathbf{14,62}$$

Podemos observar que ambos os valores de Γ são positivos, mostrando que a superfície proteica é preferencialmente solvatada pela uréia, independentemente do estado de protonação dos resíduos ácidos Asp/Glu. Porém, podemos observar que o parâmetro de interação preferencial Γ é $\sim 14,62$ quando Asp/Glu estão protonados, aumentando cerca de 19% para $\sim 17,37$ quando Asp/Glu estão na forma desprotonada. Isto mostra que, em um ambiente ácido, a protonação dos resíduos de Asp/Glu leva ao decréscimo na afinidade proteína-uréia.

Detalhes de alterações na microsolvatação por água e uréia na primeira e na segunda camada de solvatação, de acordo com o estado de protonação de Asp/Glu, podem ser estudados avaliando valores das integrais de Kirkwood-Buff associados a cada camada de solvatação, de acordo com um parâmetro de solvatação γ_{solv} definido como: $\gamma_{solv} = G_{solv}^{1^a}/G_{solv}^{2^a}$, mostrado nas Figuras 3.6D-F, onde $G_{solv}^{1^a}$ é o valor de KBI para a primeira camada de solvatação (FSL) e $G_{solv}^{2^a}$ o valor de KBI para a segunda camada de solvatação (SSL), de acordo com as áreas sob as curvas mostradas na Figuras 3.5E e F,⁵³ detalhados a seguir.

Nas Figuras 3.6A-C é possível observar a convergência dos valores de G_{solv} para proteína-uréia e proteína-água de acordo com o estado de protonação de Asp/Glu. É observada uma leve exclusão de moléculas de água promovida por uréia, comparação das Figuras 3.6A e 3.6B. Isto ocorre por causa do efeito competitivo destas moléculas pela superfície da enzima BCL, que exclui moléculas de água para camadas mais distantes da proteína.⁷⁶ Na Figura 3.6C, o valor de G_{solv} associado as moléculas de uréia (protein-uréia) é menos negativo ($\sim -10 \times 10^3$) quando comparado com G_{solv} para proteína-água ($\sim -25 \times 10^3$). Isto mostra a grande afinidade de moléculas de uréia pelas duas camadas de solvatação (ver Figura 3.5D, G_{ss} de 1.62 até 3.37 Å). De forma geral, G_{solv} proteína-água é levemente afetada pela protonação dos resíduos ácidos Asp/Glu. Isto significa que a translação das moléculas de água nas camadas mais internas de solvatação, devido as alterações no estado de protonação, não interfere significativamente no valor total de convergência de G_{ss} . Por outro lado, este efeito é

Capítulo 3. Microsolvatação da enzima BCL por uréia: considerações sobre o estado de protonação dos resíduos ácidos Aspartato e Glutamato

bem mais evidente para interações proteína-uréia, dado pelo maior valor negativo de G_{ss} , mostrado na Figura 3.6C, mostrando que a afinidade de uréia pela superfície proteica é dependente do estado de protonação dos resíduos ácidos Asp/Glu.

Podemos acompanhar o deslocamento de moléculas de água e uréia especificamente nas duas primeiras camadas de solvatação mais próximas da proteína, e monitorar o deslocamento de ambas as moléculas dependentes da alteração no estado de protonação dos resíduos Asp/Glu. Este olhar ampliado (*zoom*) nesta região próxima da enzima BCL é analisado de acordo com os respectivos valores de G_{solv} associados a estas duas camadas, mostrado nas Figuras 3.6D-F.

O efeito competitivo que a uréia desempenha, faz com que moléculas de água sejam excluídas proporcionalmente de ambas as camadas de solvatação, isto é observado pelo mesmo valor de γ_{solv} , comparação entre as Figuras 3.6D e 3.5E (~0,7 para Asp/Glu desprotonado e ~0.5 para Asp/Glu protonado, igualmente para os dois sistemas). Ademais, moléculas de uréia apresentam alta afinidade pela primeira camada de solvatação comparativamente à segunda camada, dado pelo alto valor de γ_{solv} (~1.65), mostrado na Figura 3.6F. No entanto, a protonação dos resíduos ácidos Asp/Glu leva a decréscimo de γ_{solv} para proteína-uréia, revelando uma exclusão significativa de moléculas de uréia da primeira camada de solvatação, em relação a segunda camada. Como já discutido anteriormente, isto é explicado pela perda da efetividade das ligações de hidrogênio proteína-uréia. Este decréscimo também é observado para as interações proteína-água, de acordo também com a perda de orientação das ligações de hidrogênio. É importante destacar o grande decréscimo em γ_{solv} para proteína-uréia (~1.65 para 1.12, Figura 3.6F), confirmando que a afinidade das moléculas de uréia depende do estado de protonação dos resíduos ácidos Asp/Glu. Portanto, efeitos de desnaturação proteica induzida por uréia em pH ácido não devem ser discutidos em termos de aumento da solvatação proteica por uréia, ou do aumento de interações diretas com resíduos da superfície proteica.

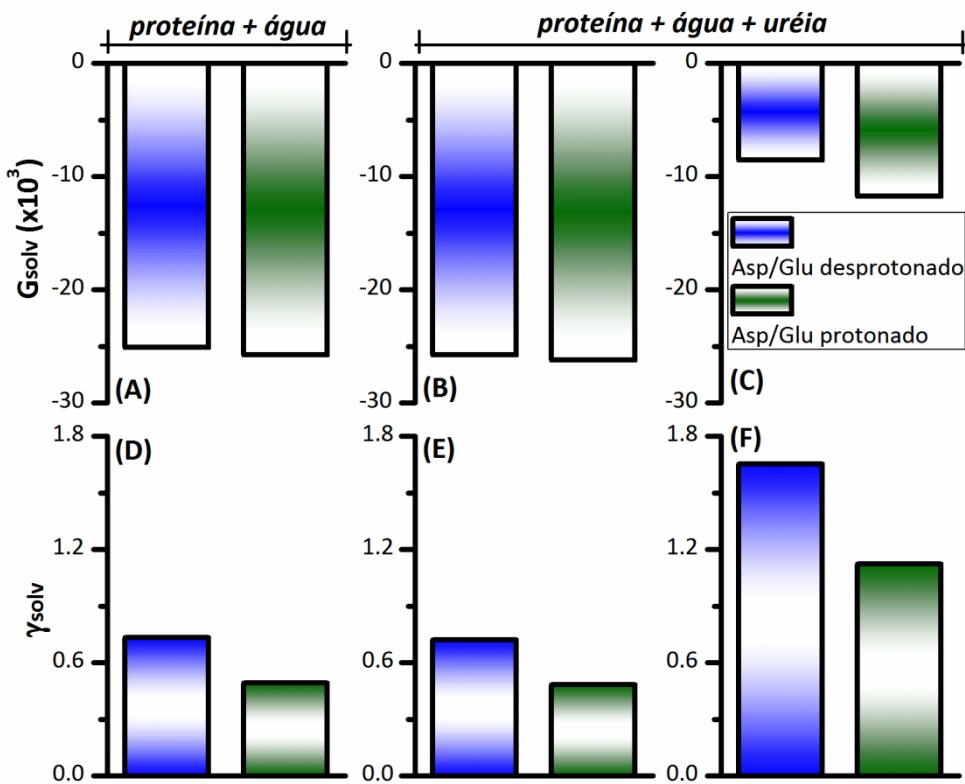


Figura 3.6 Valores de G_{ss} para a solvatação da enzima BCL por água e uréia, de acordo com o estado de protonação dos resíduos ácidos Asp/Glu. Em (A-C) G_{ss} considerando uma camada de solvatação espessa até 10 Å (G_{solv}). Em (D-F) proporcionalidade de solvatação das duas primeiras camadas, dada por $\gamma_{\text{solv}} = \frac{G_{\text{solv}}^{1^{\text{a}}}}{G_{\text{solv}}^{2^{\text{a}}}}$, de acordo com G_{ss} para a primeira camada de solvatação (FSL) e segunda camada de solvatação (SSL), definidas pelas áreas sob os respectivos picos de máximo.

A partir das análises dos resultados de microsolvatação proteica, podemos construir um modelo simples que mostra como ocorre a translação de moléculas de uréia nas duas camadas de solvatação mais próximas da superfície da proteína, de acordo com o estado de protonação dos resíduos ácidos Asp/Glu, apresentado na Figura 3.7. De acordo com o parâmetro γ_{solv} , podemos sugerir que existem dois comportamentos distintos para a solvatação de proteínas por uréia (e para água também) dependente dos estados de protonação dos resíduos Asp/Glu:

Capítulo 3. Microsolvatação da enzima BCL por uréia: considerações sobre o estado de protonação dos resíduos ácidos Aspartato e Glutamato

- (I) Sentido direto no deslocamento do equilíbrio do modelo. Quando os resíduos Asp/Glu estão protonados, ocorre decréscimo nas orientações das ligações de hidrogênio (perda de afinidade) proteína...uréia. Isto leva ao deslocamento de moléculas de uréia da primeira para a segunda camada de solvatação (a mesma interpretação pode ser feita para as interações proteína...água). Com isso, em uma situação de ambiente com pH ácido em que a proteína esteja imersa, pode-se sugerir que as moléculas de uréia percam parte da afinidade pela superfície proteica e que as interpretações dos resultados de desnívelamento induzido por uréia em pH baixo devem considerar este comportamento;
- (II) Sentido inverso no deslocamento do equilíbrio do modelo. Por outro lado, quando os resíduos Asp/Glu estão desprotonados, ocorre aumento na afinidade por moléculas de uréia (ligações de hidrogênio bem orientadas). Isto faz com que moléculas de uréia fiquem concentradas na primeira camada de solvatação, interagindo fortemente com os resíduos da superfície proteica (interpretação valida para as moléculas de água também). Ou seja, em um ambiente de pH alcalino, o deslocamento do equilíbrio para o estado desprotonado dos resíduos Asp/Glu leva ao aumento da concentração de uréia na superfície proteica. Portanto, simplesmente aumentar a solvatação por uréia não deve necessariamente aumentar o caráter desnaturante desta molécula.
-

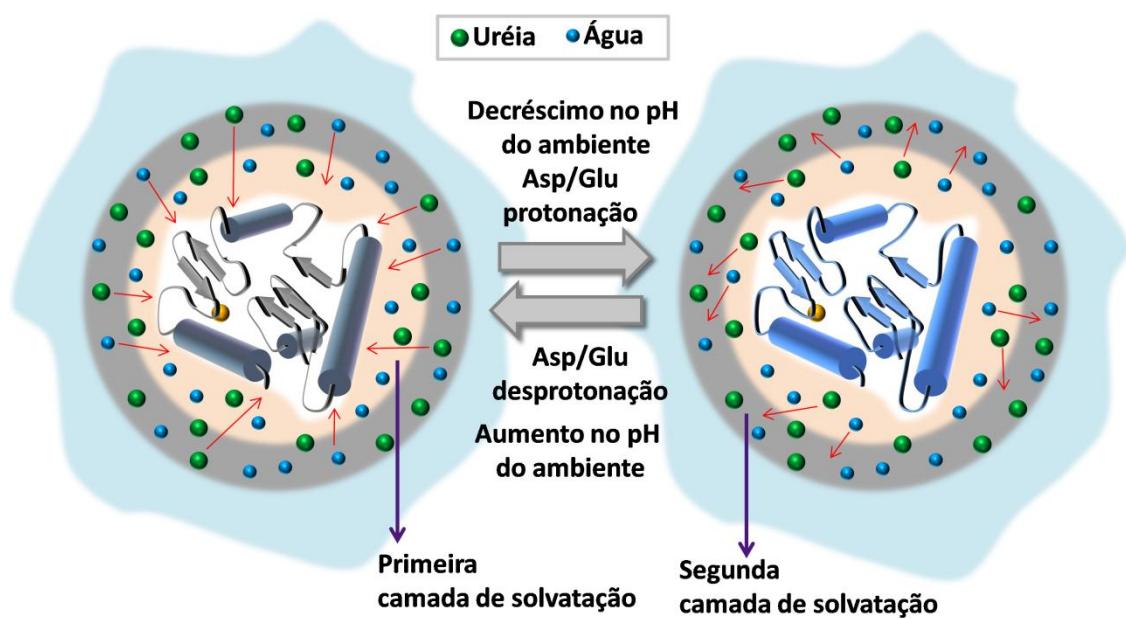


Figura 3. 7 Modelo da microsolvatação proteica por água e uréia de acordo com o estado de protonação dos resíduos ácidos Asp/Glu. O fluxo de moléculas está associado aos valores de KBI calculados para as primeira e segunda camadas de solvatação.

3.2.6. Efeitos da protonação de Asp/Glu na solvatação do *backbone* protéico

Os mecanismos da ação desnaturante da uréia sugeridos na literatura, como afinidade pela superfície e/ou *backbone* protéico,^{34,35} foram verificados previamente no Capítulo 2 (Figuras 2.4 e 2.7), onde observamos acúmulo de uréia tanto no *backbone* quanto nas cadeias laterais.⁷⁶ Isto confirma que o efeito desnaturante pode ter origem nos contatos favoráveis proteína-uréia, via interações tanto hidrofóbicas quanto ligações de hidrogênio, reportada por nós e por outros pesquisadores.^{76,98} Contudo, os efeitos considerando o estado de protonação proteico ainda são poucos conhecidos. Discutimos inicialmente a influência para os resíduos superficiais, agora discutiremos especificamente sobre os átomos da cadeia principal.

Análises da solvatação somente do *backbone* proteico, Figura 3.8, mostram que a distribuição de água é afetada pela protonação de Asp/Glu (Figura 3.8A),

Capítulo 3. Microsolvatação da enzima BCL por uréia: considerações sobre o estado de protonação dos resíduos ácidos Aspartato e Glutamato

diminuindo sua densidade relativa (que já é inferior ao *bulk* da solução). Podemos supor que esta desidratação do *backbone* seja responsável pelas características desnaturantes de um sistema em pH ácido. Contudo, a distribuição de uréia é aumentada em curto alcance (Figura 3.8B), pico de g_{ss} em ~1.9 Å, quando Asp/Glu estão protonados. Neste sentido, a indução desnaturante da uréia em pH ácido deve estar correlacionada com a leve estabilização destas moléculas, via interações de curto alcance, com o *backbone* proteico. Interessante observar que a distribuição relativa de água em torno do *backbone* da enzima BCL, nas camadas mais externas, permanece praticamente inalterada, porém, para *backbone*-uréia, é nitidamente afetado (distâncias entre 2.2 e 6.5 Å). Em outras palavras, o estado protonado dos resíduos Asp/Glu promove aumento na afinidade da cadeia principal por uréia, na primeira camada de solvatação.

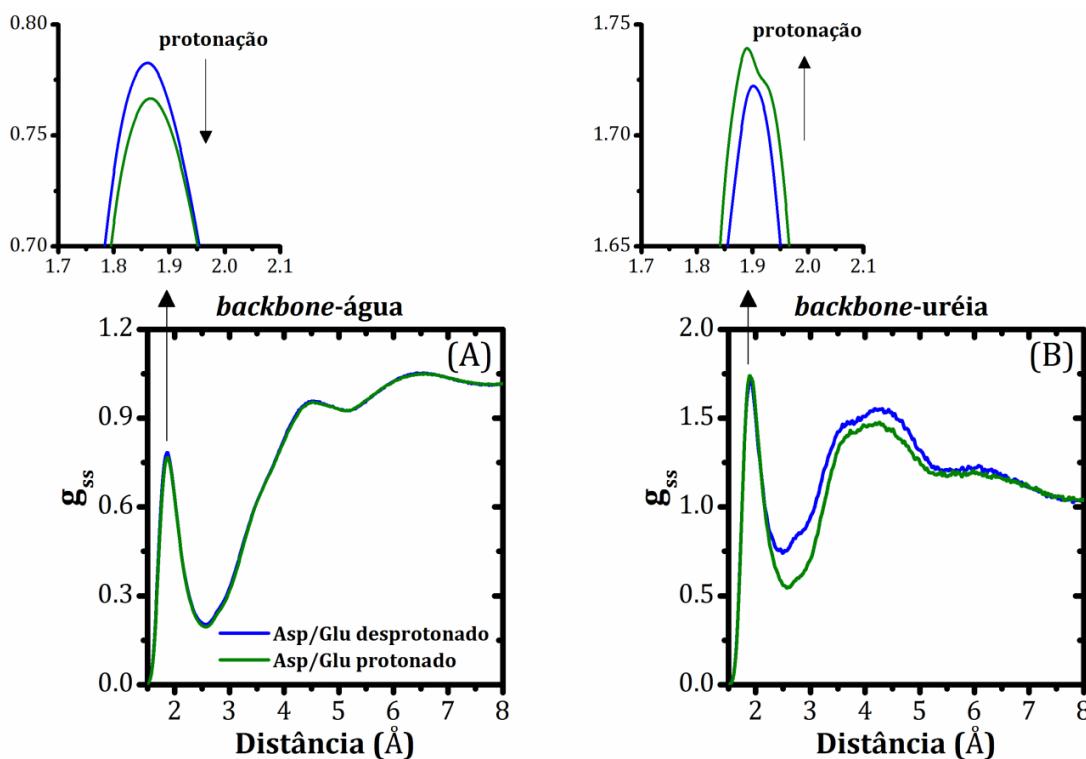


Figura 3.8 Distribuição de (A) água e (B) uréia em torno do *backbone* protético de acordo com o estado de protonação dos resíduos ácidos Asp/Glu. A distribuição relativa de água no *backbone* (priemeira camada) é levemente diminuída pela protonação. A afinidade *backbone*-uréia (interações de curto alcance) é levemente aumentada, sendo uma possível razão do desnivelamento protético induzido por este desnaturante em pH ácido.

Anteriormente, na Figura 3.3, mostramos que a protonação dos resíduos Asp/Glu afeta negativamente a formação das ligações de hidrogênio proteína-uréia. Consequentemente, a concentração de uréia em torno da superfície proteica também diminui, conforme mostrado na Figura 3.5, e informado pelo parâmetro de interação preferencial. A protonação de tais resíduos também afeta diretamente o perfil de solvatação das camadas mais internas, mostrado no modelo da Figura 3.7. Agora, podemos entender como tudo isto pode estar relacionado com o resultado apresentado na Figura 3.8, onde observa-se uma leve estabilização das ligações de hidrogênio uréia-*backbone*.

Capítulo 3. Microsolvatação da enzima BCL por uréia: considerações sobre o estado de protonação dos resíduos ácidos Aspartato e Glutamato

As análises mais detalhadas das interações de curto alcance entre a uréia e a cadeia principal da enzima BCL, são apresentadas na Figura 3.9. Sabemos que a uréia atua essencialmente como doadora das ligações de hidrogênio,⁷⁶ e, portanto, a protonação de Asp/Glu deve interferir na orientação e efetividade destas interações. Na Figura 3.9, sugerimos que esta perturbação nas ligações de hidrogênio das cadeias laterais pode afetar as ligações de hidrogênio internas com o *backbone* protéico. De fato, os resultados sugerem que há uma estabilização das ligações de hidrogênio, com a uréia atuando como receptora da ligação de hidrogênio (Figura 3.9A), com leve perda de afinidade atuando como doadora da ligação (Figura 3.9B). Portanto, o pequeno acréscimo do primeiro pico de g_{ss} da Figura 3.8 (*inset*) deve-se a estabilização das ligações de hidrogênio formadas entre o oxigênio carbonílico da uréia e o grupamento amino da cadeia principal da proteína. Isto significa que, mesmo com perda relativa de afinidade pela superfície proteica em condição de pH ácido (decréscimo de g_{ss} de ~5.6 para ~4.0, Figura 3.5), o *backbone* da enzima continua com grande acúmulo de moléculas de uréia, agindo agora preferencialmente como receptoras da ligação, e não somente como doadoras. Esta versatilidade pode justificar as propriedades desnaturantes deste osmólito.

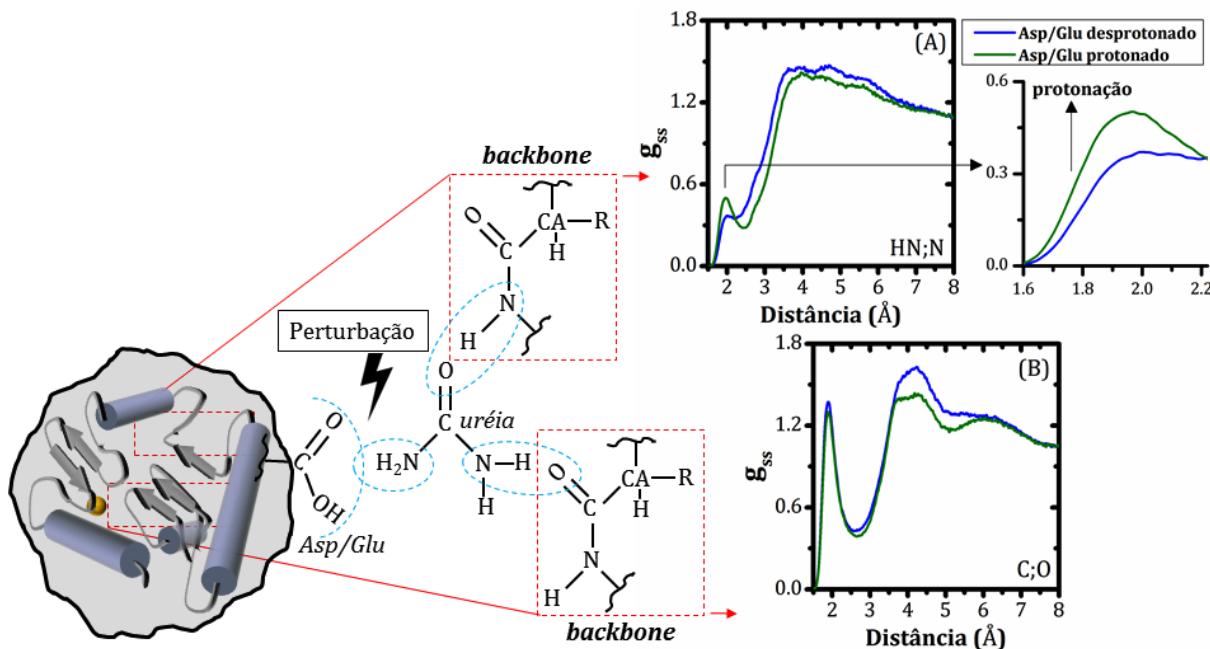


Figura 3.9 Modelo ilustrando a perturbação nas ligações de hidrogênio proteína-uréia com as cadeias laterais de Asp/Glu protonadas e efeitos na distribuição de uréia em torno do *backbone* protéico. Em (A) para os átomos de HN e N, com moléculas de uréia atuando como receptora da ligação. Em (B) para os átomos de C e O, com uréia sendo doadora da ligação. Observa-se que em ambiente de pH ácido a uréia deve agir mais fortemente como receptora das ligações de hidrogênio.

3.3. Conclusões parciais

Considerando os resultados apresentados neste Capítulo, podemos sugerir algumas propriedades associadas à microsolvatação proteica por uréia dependente do estado de protonação dos resíduos ácidos Asp/Glu:

- (I) Do ponto de vista da mobilidade proteica, em uma situação em que a proteína esteja imersa em um ambiente de pH ácido, a adição de uréia aumentou levemente a mobilidade proteica. Este resultado deve ter correlação com o fato de que a uréia é um desnaturante mais eficiente em condições de baixo pH, conforme evidenciado

experimentalmente.⁸⁸ Porém, as interações diretas com a superfície proteica não são favorecidas;

- (II) Quando os resíduos ácidos Asp/Glu estão nas suas formas protonadas, a enzima BCL apresentou maiores mobilidades, de acordo com os maiores valores de rmsd. Esta mobilidade maior pode estar correlacionada com o fato de os resíduos Asp/Glu protonados perderem parte da capacidade de formarem ligações de hidrogênio bem orientadas com os próprios resíduos da proteína, especificamente para os resíduos de Asp/Glu não superficiais;
- (III) O deslocamento nas formas Protonado_{Asp264}↔Desprotonado_{Asp264} tem impacto direto nos estados conformacionais amostrados pelo resíduo de Asp₂₆₄, sendo que a His₂₈₆ estabiliza a forma protonada através de seu anel imidazol. Neste caso, a forma protonada apresentou menor mobilidade. Existem resultados que mostram que a enzima BCL apresenta máxima atividade catalítica em pH ~7. Porém, existe uma certa tolerância desta enzima , que mantêm significativa atividade enzimática mesmo em pH ácido.^{78,79,92} Estes resultados podem ter correlação, mas devem ser investigados com mais detalhes;
- (IV) A protonação de Asp/Glu afeta a afinidade por água e uréia na primeira camada de solvatação, levando a uma leve estabilização da segunda camada. Neste sentido, as propriedades desnaturantes (induzidas por uréia em baixo pH) não devem estar necessariamente associadas com aumento das interações de curto alcance uréia...Asp/Glu. Portanto, os efeitos desnaturantes podem ter outras causas, como interações com resíduos polares (além de interações com *backbone*). Isto faz sentido, considerando a alta afinidade de uréia por estes tipos de resíduos em ambas as camadas de solvatação e

devido à alteração do caráter de Asp/Glu, de carregado para polar protonado;

- (V) Podemos sugerir que o estado de protonação dos resíduos Asp/Glu interefere na solvatação do *backbone* proteico. Especificamente para a uréia, ocorre um leve aumento na afinidade em curto alcance. Isto é explicado pela possibilidade de formação de ligações de hidrogênio *backbone*-uréia, com o osmólito atuando como receptor das ligações. Neste sentido, a desnaturação promovida por uréia em condições de baixo pH pode ser explicado a partir de dois fenômenos conjuntos: (1) alta densidade de uréia na superfície proteica, apesar da perda relativa de afinidade (decréscimo de g_{ss} de ~5.6 para ~4.0, Figura 3.5); (2) aumento da afinidade de uréia pelo *backbone* protéico, principalmente pela capacidade da uréia em fazer novas ligações de hidrogênio através de seu oxigênio carbonílico com o grupamento amino da cadeia principal da proteína.

Capítulo 4

Aspectos energéticos da abertura do sítio catalítico da enzima BCL na presença de sorbitol

Capítulo 4. Aspectos energéticos da abertura do sítio catalítico da enzima BCL na presença de sorbitol

Os campos da bioquímica e biofísica molecular buscam entender o papel estrutural de proteínas nas suas funções biológicas. Entender esta relação é importante, pois sabe-se que variações nas estruturas tridimensionais de proteínas podem levar a alterações nas associações proteína-ligante, por exemplo.⁹⁹ As funções biológicas desempenhadas pelas enzimas são altamente dependentes das suas formas tridimensionais, sendo indispensável que a proteína esteja em seu estado nativo para que ocorra a catálise bioquímica de interesse.¹⁰⁰

A enzima BCL está dentro do grupo das triacilglicerol lipases (EC 3.1.1.3), que são enzimas que pertencem à família das serina hidrolases, que comumente hidrolisam ésteres em ácidos carboxílicos e alcoóis, apesar da possibilidade de serem utilizadas na catálise de diversas reações em ambientes aquo-restritos, tais como esterificação, interesterificação, alcoólise, e acidólise.³ Esta versatilidade possibilita que as lipases possuam muitas aplicações industriais, gerando uma gama de produtos dentro das indústrias de alimentos, farmacêutica, química e até mesmo aplicações ambientais como tratamento de rejeitos gordurosos.^{2,101,102}

O mecanismo de catálise enzimática envolve necessariamente o acesso do substrato ao sítio catalítico. Em lipases o sítio catalítico é formado pelos resíduos [Ser/Asp/Cys]-His-[Asp/Glu] que ficam frequentemente alocados internamente na proteína.^{21,90} A acessibilidade do substrato aos resíduos do sítio catalítico deve acontecer por algum mecanismo específico. Este mecanismo é sugerido em lipases pela abertura/fechamento de estruturas que agem como “portas”, permitindo ou não a entrada do substrato com consequente catálise. Alguns exemplos de enzimas que apresentam este mecanismo incluem as lipases de *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, *Thermomyces lanuginosa* e *Burkholderia cepacia*, entre outras.¹⁰³ A enzima BCL apresenta um mecanismo de acessibilidade do substrato pela abertura do sítio catalítico, isso ocorre via afastamento das α -hélices 5 e 9, que são hospedadas nos domínios U1 (resíduos 118-166) e U2 (resíduos 215-261), respectivamente.^{21,22} O restante da enzima BCL é composta pelo domínio C (resíduos 1-117, 167-214 e 262-320) e não apresenta nenhuma transição conformacional aparentemente relacionada a abertura do domínio catalítico.

Capítulo 4. Aspectos energéticos da abertura do sítio catalítico da enzima BCL na presença de sorbitol

A reação catalisada pela BCL envolve três resíduos específicos (Ser₈₇, Asp₂₆₄ e His₂₈₆), e o mecanismo proposto é mostrado na Figura 4.1. Primeiramente, os resíduos de His₂₈₆ e Asp₂₆₄ promovem a ativação de Ser₈₇ através de sua desprotonação. O caráter nucleofílico da Ser₈₇ é aumentado, levando ao ataque da carbonila do substrato, que por sua vez leva à formação de um intermediário acila. Ao mesmo tempo o subproduto R'XH é liberado, normalmente álcool, ou o diacilglicerol, que pode ser convertido em monoacilglicerol e finalmente à molécula de glicerol livre. O último passo trata da restauração do sítio catalítico, realizada através do ataque nucleofílico da água ao intermediário, levando à formação do ácido orgânico e reestruturação molecular dos resíduos de Ser₈₇, His₂₈₆ e Asp₂₆₄.^{3,90} Este mecanismo é utilizado para explicar a atividade catalítica de lipases de uma maneira geral.

Um estudo recente mostrou que o estabilizante sorbitol tem efeito direto na atividade catalítica da enzima BCL, que é aumentada na medida em que a concentração deste poliol aumenta.¹⁶ Supomos que o mecanismo de abertura do sítio catalítico da BCL deve estar correlacionado com o efeito observado experimentalmente. Neste Capítulo estudamos o mecanismo de abertura/fechamento do domínio catalítico da enzima BCL em soluções aquosas de sorbitol, aplicando o método ABF (*Adaptive Biasing Force*). Entender este processo de abertura/fechamento do sítio catalítico da enzima BCL, na presença de osmólitos estabilizantes, pode ajudar na compreensão da acessibilidade do substrato inclusive para outras enzimas.

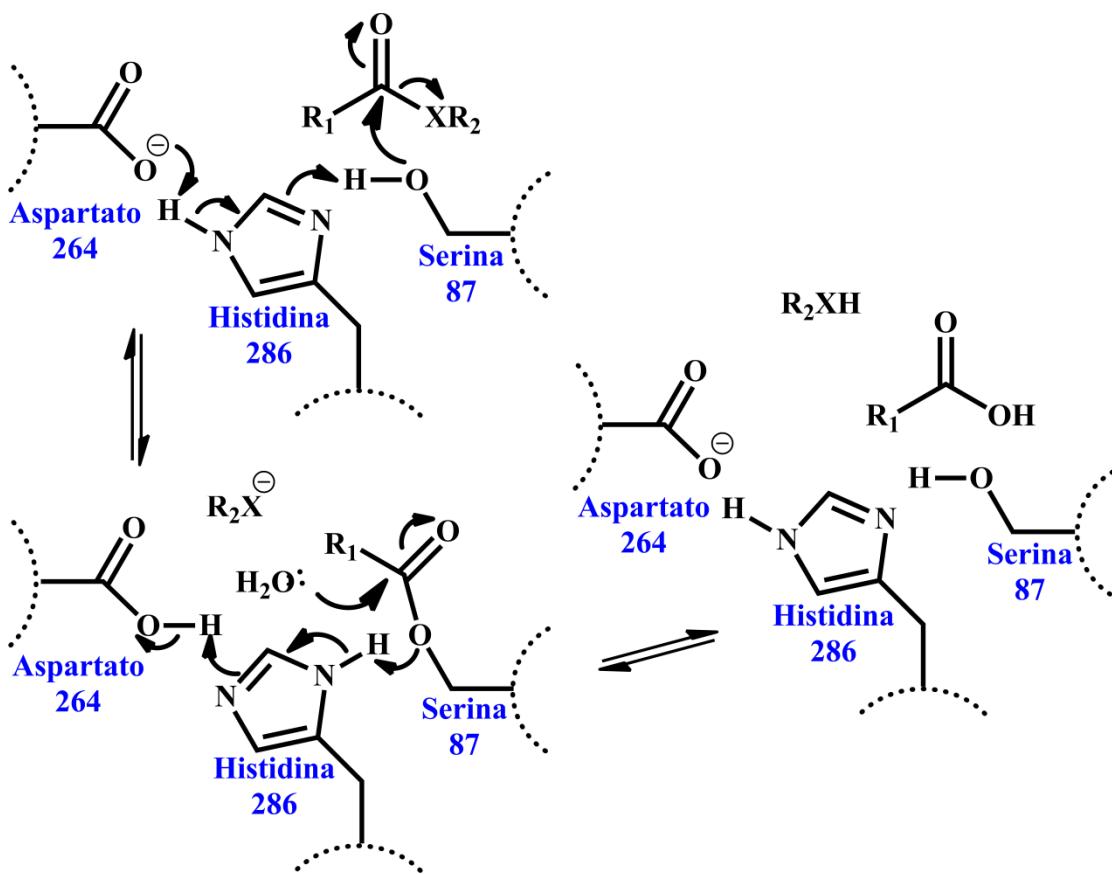


Figura 4. 1 Mecanismo reacional da enzima BCL envolvendo os resíduos Ser₈₇, Asp₂₆₄ e His₂₈₆, que compõem a tríade catalítica desta enzima. Figura adaptada.³

4.1. Metodologia

Neste Capítulo, utilizamos simulações de Dinâmica Molecular para calcular perfis de energia livre da abertura do sítio catalítico através da metodologia ABF (*Adaptive Biasing Force*), que faz parte do conjunto de métodos de Integração Termodinâmica,^{104,105} detalhado mais adiante.

4.1.1. Simulações de Dinâmica Molecular

De forma semelhante ao descrito nos Capítulos anteriores, as simulações de Dinâmica Molecular foram realizadas partindo-se da estrutura cristalográfica da enzima BCL obtida do banco de dados *Protein Data Bank* (PDB ID:1YS1),²² com resolução de 1.10 Å e 320 resíduos de aminoácidos, removido o ligante complexado (ácido hexilfosfônico (R)-2-metil-3-fenilpropil éster).²² As configurações iniciais (caixas de simulação) foram construídas com o programa Packmol,⁵⁴ contendo a enzima BCL centralizada, água e íons Na⁺ e Cl⁻ (concentrações de íons ~0.1 mol·L⁻¹) para neutralizar cargas do sistema e sorbitol nas concentrações desejadas, gerando cinco sistemas com diferentes concentrações de sorbitol, mostrado na Tabela 4.1. Estes sistemas foram equilibrados seguindo protocolo padrão adotado: (1) mantendo todos os átomos da proteína fixos, os solventes foram relaxados através do método de minimização de energia Gradientes-Conjugados (GC), 1000 passos, seguidos de 2 ns de simulação de Dinâmica Molecular convencional; (2) mantendo somente os átomos C_α da enzima BCL fixos, a estrutura foi relaxada por 500 passos de minimização GC, seguidos de mais 2 ns de simulação MD; (3) as coordenadas e velocidades do passo anterior foram utilizadas para dar inicio as trajetórias de produção acopladas ao método ABF. Trajetórias de aproximadamente 400 ns foram realizadas para cada sistema, em *ensemble* NPT a 1 atm de pressão e temperatura de 298.15 K, totalizando 2000 ns de simulação. O controle da pressão foi mantido pelo barostato de Langevin (com período de 200 ps, e tempo de decaimento de 100 ps) e temperatura de 298.15 K. A temperatura foi mantida constantemente através da dinâmica de Langevin (com frequência de perturbação de 10 ps⁻¹). O campo de força CHARMM foi utilizado para enzima BCL, sorbitol, água (modelo TIP3)⁵⁷ e íons.^{55,56}

As simulações MD foram computadas pelo programa NAMD,⁴⁸ e a visualização das trajetórias foi realizada utilizando o programa VMD.⁵⁸ Os cálculos de ABF foram realizados pelo módulo *colvars* implementado no próprio programa NAMD.¹⁰⁶ A análise

Capítulo 4. Aspectos energéticos da abertura do sítio catalítico da enzima BCL na presença de sorbitol

das distâncias entre os átomos Cα-Cα nas simulações foi realizada com o pacote de ferramentas disponíveis no MDAnalysis.⁶⁰

Tabela 4. 1 Detalhe dos sistemas simulados aplicando o método ABF.

Sistema	Notação	Quantidade de Moléculas Concentração (mol·L⁻¹)	
		Água	Sorbitol
1	0	20800 ~54	0
2	0.25	20800 ~52	100 0,25
3	0.50	20800 ~50	200 0,5
4	0.75	20800 ~45	350 0,75
5	1.00	20800 ~42	500 1,0

4.1.2. Metodologia ABF (*Adaptive Biasing Force*)

A técnica utilizada para estudar a abertura do sitio catalítico da enzima BCL é baseada no método ABF (*Adaptive Biasing Force*), esta técnica é utilizada quando se deseja aumentar a amostragem de determinadas conformações moleculares que podem ser pouco acessíveis por simulações de Dinâmica Molecular convencionais. Isto ocorre devido a altas barreiras energéticas que dificultam a transição entre estados conformacionais (Figura 4.2), que são suavizadas pelo algoritmo de ABF implementado no programa de simulação (neste caso o NAMD).⁴⁸

A respeito do método ABF, este faz parte do conjunto de métodos de Integração Termodinâmica, de forma que os valores da diferença de energia livre (ΔG) são calculados pela integração da derivada de G em relação à coordenada de reação ξ :

$$G_{\xi_1} - G_{\xi_0} = \int_{\xi_0}^{\xi_1} \frac{dG}{d\xi} d\xi \quad \text{Eq. 4.1}$$

Onde $\frac{dG}{d\xi}$ é dado por:

$$\frac{dG}{d\xi} = \left\langle \frac{\partial H}{\partial \xi} \right\rangle_{\xi} \quad \text{Eq. 4.2}$$

Na Eq. 4.2 H é a Hamiltoniana do sistema e o subscrito ξ define que a média é calculada para um valor fixo da coordenada de reação. Com a variação de ξ pode-se, portanto, obter o perfil de ΔG ao longo do parâmetro de ordem ξ .^{107,108}

Considerando que ξ é a coordenada de um determinado átomo (x_1), a Equação 4.2 pode ser reescrita, permitindo fazer associações com grandezas físicas, de acordo com a Equação 4.3.

$$\frac{dG}{dx_1} = \left\langle \frac{\partial H}{\partial x_1} \right\rangle_{x_1} = \left\langle \frac{\partial U}{\partial x_1} \right\rangle_{x_1} = -\langle \vec{F}_1 \rangle_{x_1} \quad \text{Eq. 4.3}$$

Neste caso, como não há variação de temperatura, as diferenças de energia potencial são as relevantes, logo, $\left\langle \frac{\partial H}{\partial x_1} \right\rangle_{x_1}$ pode ser expressa por $\left\langle \frac{\partial U}{\partial x_1} \right\rangle_{x_1}$. Neste sentido, uma simulação com x_1 fixo permite calcular $\frac{dG}{dx_1}$ a partir da energia potencial do sistema. Ainda na Equação 4.3, a variação de energia livre com a variação da coordenada reacional é calculada pela força média em x_1 ($-\langle \vec{F}_1 \rangle_{x_1}$), sendo o potencial de força média (PMF) a função $G(x_1)$.

O método ABF suaviza as barreiras de potenciais de forma adaptativa, possibilitando a amostragem de estados conformacionais inacessíveis em tempos curtos de simulações convencionais. Neste caso, o algoritmo do ABF obtém $\frac{dG}{d\xi}$ de acordo com a força média que atua na coordenada reacional, $\langle \vec{F}_\xi \rangle_\xi$. A estimativa desta força média é calculada de acordo com as forças instantâneas que agem em ξ em pequenos intervalos da coordenada de reação (“janelas” $\Delta\xi$). Neste sentido, após n passos de simulação com uma largura de “janela” definida previamente (j), $\frac{dG}{d\xi}$ será estimada pela média das forças instantâneas que agem em ξ , como mostra a Equação 4.4.¹⁰⁹

$$\langle \vec{F}_\xi(n, j) \rangle_\xi = \frac{1}{n^j} \sum_{i=1}^{n^j} \vec{F}_{\xi_i} \quad \text{Eq. 4.4}$$

Depois de obter uma estimativa adequada da força média que atua sobre o sistema, o método ABF aplica uma força externa com mesmo módulo e direção oposta, permitindo a amostragem homogênea de todos os pontos da coordenada de reação.^{105,107} A Figura 4.2 ilustra, do ponto de vista mais prático, como o perfil de energia livre para a transição aberta/fechada deve ocorrer de acordo com a coordenada de reação ξ definida aqui.

Como mencionado anteriormente, o método ABF foi utilizado a partir dos pacotes disponíveis para o NAMD. Neste caso, aplicamos o cálculo de ABF apenas na etapa (3) descrita anteriormente (etapa de produção), com os seguintes parâmetros adotados: intervalo da coordenada de reação, “janela”, de 0.1 Å ($\Delta\xi$); limite inferior da coordenada de reação ξ (5.0 Å) e limite superior da coordenda de reação ξ (28.0 Å) com constante de força de 10.0 kcal/mol/Å² e amostragem de 5000 pontos. A coordenada de reação ξ foi definida como sendo a distância entre as α -hélices 5 e 9. Para isto, escolhemos a distância entre dois resíduos que compõem as α -hélices 5 (Phe₁₄₂) e 9 (Gly₂₅₀), especificamente entre os C α destes resíduos. Esta coordenada foi escolhida

Capítulo 4. Aspectos energéticos da abertura do sítio catalítico da enzima BCL na presença de sorbitol

devido a trabalhos anteriores que usam parâmetro semelhante para avaliar a acessibilidade do substrato ao sítio catalítico em meios aquosos e solventes orgânicos.^{24,25}

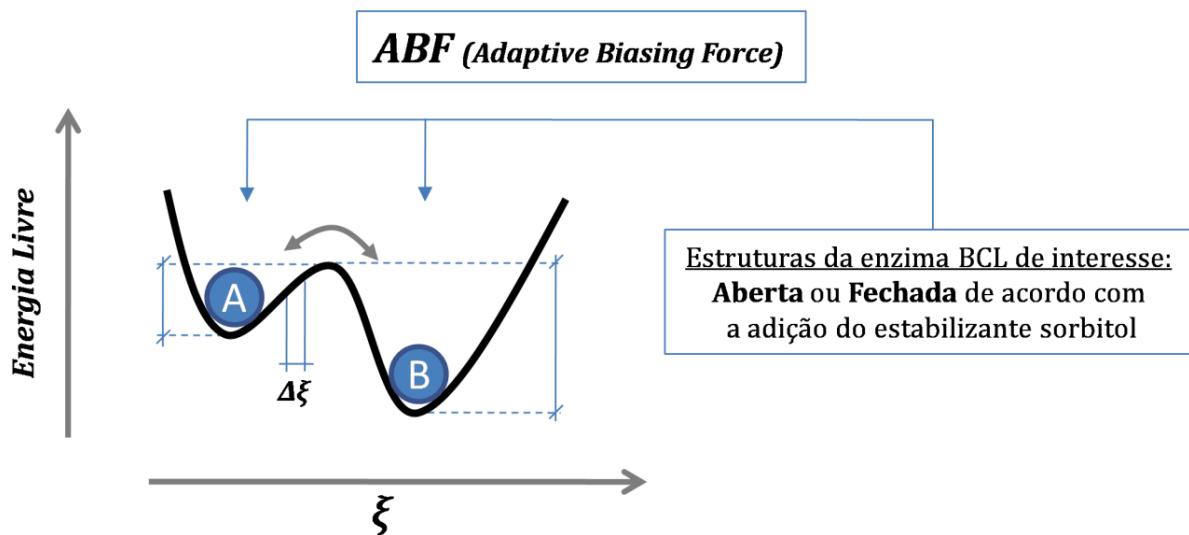


Figura 4. 2 Perfil de energia livre típico para dois estados conformacionais (A e B) separados por uma barreira energética. Em nosso caso, estes estados são representados pelos estados conformacionais aberto e fechado da enzima BCL.

4.2. Resultados e discussões

Sabemos agora que a dinâmica de solvatação destes osmólitos estabilizantes (sorbitol) e desnaturante (uréia) ocorre de forma competitiva e heterogênea na superfície proteica com forte dependência dos tipos de resíduos da proteína e das propriedades atômicas dos osmólitos. Apesar de toda a informação que obtivemos a respeito da solvatação da superfície proteica nas primeiras camadas de solvatação, ainda não conseguimos afirmar de forma contundente como o osmólito sorbitol age em nível molecular para aumentar a atividade catalítica da enzima BCL, conforme demonstrado experimentalmente.¹⁶ Neste sentido, tentamos entender este efeito a

Capítulo 4. Aspectos energéticos da abertura do sítio catalítico da enzima BCL na presença de sorbitol

partir da acessibilidade do substrato ao sítio catalítico. Mostramos anteriormente, na Figura 1.2 da seção 1.1, que a enzima BCL possui um mecanismo de abertura/fechamento,²⁴ via afastamento das α -hélices 5 e 9, que leva a exposição do sítio catalítico.^{21,22} Considerando isto, nossa hipótese é que as moléculas de sorbitol possam agir favorecendo a estrutura aberta do sítio catalítico, mantendo as duas α -hélices afastadas e, portanto, facilitando a entrada do substrato para que ocorra a reação catalítica.³

4.2.1. Abertura do sítio catalítico em simulações MD tradicionais

Para acompanhar a abertura do sítio catalítico calculamos a distância entre as α -hélices 5 e 9 nas trajetórias das simulações dos sistemas contendo somente água comparativamente ao sistema com adição de sorbitol. Em nossos estudos preliminares usando MD tradicional tivemos dificuldades de amostragem do processo de abertura/fechamento do sítio catalítico (dado pelas distâncias entre os resíduos Gly₂₅₀-Phe₁₄₂), mostrado na Figura 4.3 (estes resultados foram obtidos a partir de cinco simulações independentes de 40 ns realizadas na ausência e na presença de sorbitol com etapas de equilibração e minimização, descritos no Capítulo 2).⁷⁶ Observamos na Figura 4.3 que as distâncias entre os resíduos considerados como coordenadas reacionais, são estatisticamente muito semelhantes entre si nos sistemas somente com água e água+sorbitol. Estes resultados mostraram pouca diferença na abertura do sítio catalítico entre estes dois sistemas (pequena amostragem das α -hélices 5 e 9 próximas, no sistema contendo somente água e sempre abertas no sistema com água+sorbitol), isto se deve à dificuldade de amostragem da conformação fechada na escala de tempo destas simulações. Aqui, é importante mencionar que há um forte indício de que a estrutura aberta é favorecida na presença de sorbitol, dado pela amostragem bem definida em ~ 21 Å na Figura 4.3 (linha vermelha). Neste sentido, aplicamos o método ABF para amostrar as conformações assumidas por estas duas α -hélices e as energias-livres associadas a estas conformações (aberta/fechada), na ausência e presença do osmólito estabilizante sorbitol.

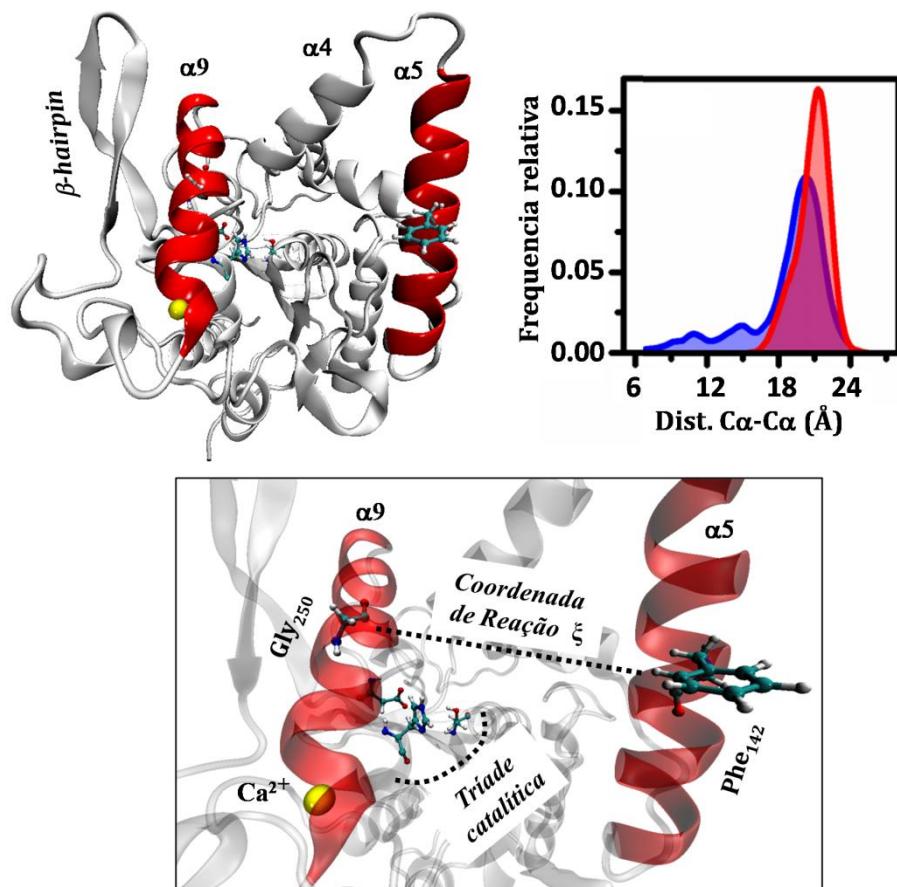


Figura 4.3 Distribuições relativas das distâncias entre as α -helices 5 e 9 em simulações MD tradicionais. Coordenada reacional ξ adotada neste trabalho como sendo a distância entre os carbonos alfa ($C\alpha$) de Gly₂₅₀ e Phe₁₄₂. Sistema contendo somente água (azul) e contendo água+sorbitol (vermelho), concentração de sorbitol de $\sim 1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. A esfera amarela é o íon Ca²⁺.

4.2.2. Perfis de energia livre para abertura/fechamento do sítio catalítico

Os resultados de cálculo de energia livre para as estruturas aberta/fechada pelo método ABF são apresentados na Figura 4.4. Podemos ver claramente que há uma relação com o resultado descrito na seção 4.2.1 (Figura 4.3) para as simulações MD convencionais. Podemos ver que, quando a enzima BCL está imersa em ambiente

Capítulo 4. Aspectos energéticos da abertura do sítio catalítico da enzima BCL na presença de sorbitol

somente aquoso na ausência do estabilizante sorbitol ($0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), existe um platô em $5 < \xi (\text{\AA}) < 9$, com valor de ΔG de $\sim 0 \text{ kcal/mol}$, definido aqui como o estado de referência. Neste sentido, parece não haver nenhum impedimento para que as α -hélices 5 e 9 mantenham-se próximas quando a enzima está imersa em água. De forma semelhante, parece não haver nenhuma restrição para que adote a conformação aberta também (ΔG de $\sim 0 \text{ kcal/mol}$). No entanto, estas duas conformações são separadas por uma barreira energética em $\xi \sim 14 \text{ \AA}$ ($\sim 9 \text{ kcal/mol}$). Por outro lado, interessante observar que a energia livre fica cada vez mais negativa para a abertura do sítio catalítico de acordo com o aumento da concentração do estabilizante sorbitol, ou seja, decréscimo da energia livre associada ao aumento de ξ (afastamento das α -hélices 5 e 9). Neste sentido, moléculas de sorbitol devem agir de forma a manter estas estruturas distantes, através da diminuição das energias livre associada às estruturas abertas (estabilização deste estado conformacional).

Sabe-se experimentalmente que a adição de sorbitol leva ao aumento da atividade catalítica da enzima BCL em solução aquosa.¹⁶ Existem alguns estudos que avaliaram alterações conformacionais desta proteína dependentes da presença de poliois, como os desenvolvidos por Secundo F. *et al.* e Azizi A. *et al*, empregando técnicas como a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), dicroísmo circular (CD) e ressonância plasmônica de superfície (SPR).^{16,110} Contudo, não foram detalhados nestes trabalhos os impactos dos estabilizantes polióis no processo de abertura do sítio catalítico.

Com base nos resultados apresentados até aqui, podemos sugerir que o processo de abertura do sítio catalítico da enzima BCL está diretamente relacionado com a presença do sorbitol. Em outras palavras, adição de sorbitol faz com que o processo de abertura do sítio catalítico seja energeticamente favorável. Isto deve levar à maior acessibilidade do substrato ao bolsão catalítico e, portanto, favorecer o processo catalítico observado experimentalmente.

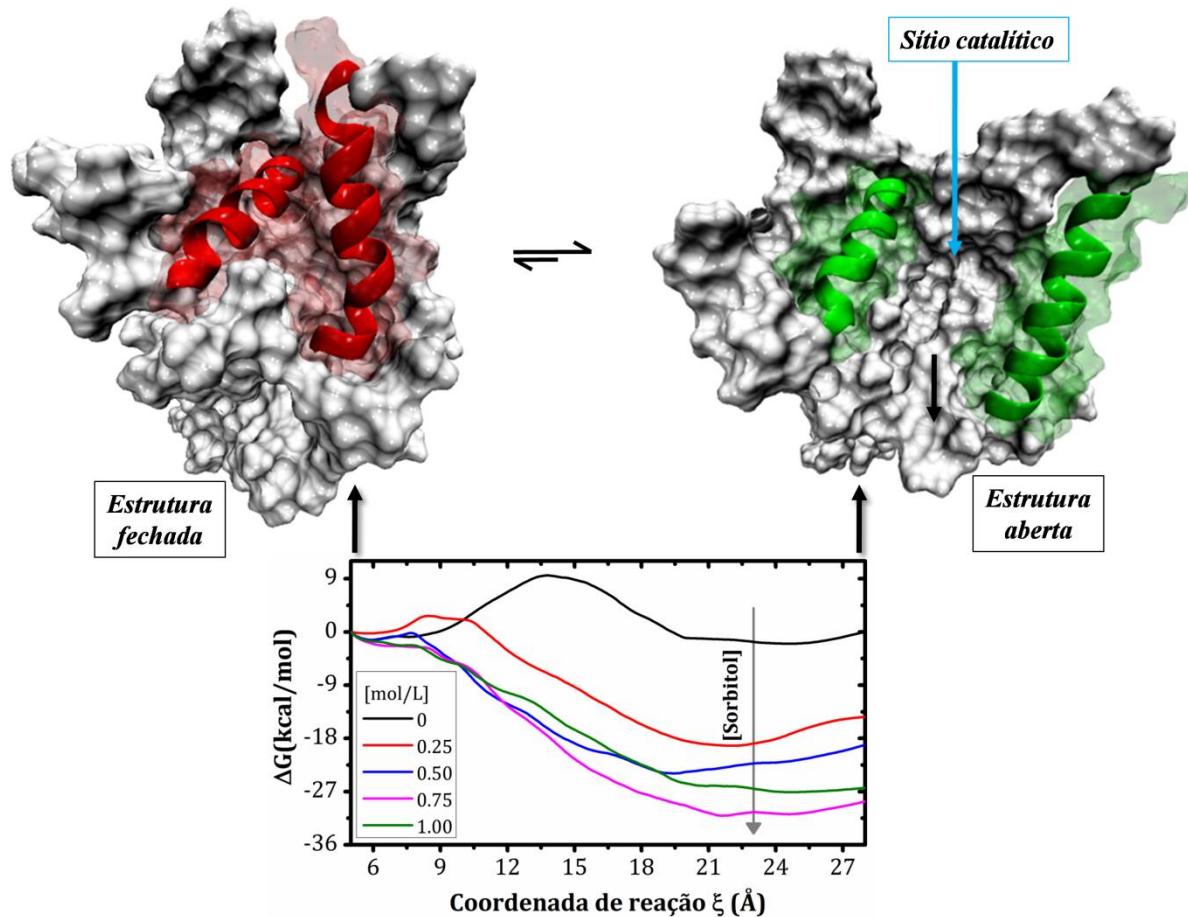


Figura 4.4 Perfis de energia livre obtidos pelos cálculos de ABF para a abertura do sítio catalítico da enzima BCL de acordo com adição gradativa de sorbitol de 0 a 1 mol·L⁻¹. Imagens mostrando conformações das α-hélices 5 e 9 nas posições fechada e aberta. A convergência dos perfis de energia livre foi definida pela comparação dos valores obtidos nos passos crescentes da simulação.

4.2.3. Análise estrutural: espaço ocupado pelo sorbitol na entrada do sítio catalítico

Os cálculos de energia livre mostram que as estruturas abertas do sítio catalítico da enzima BCL na presença do estabilizante sorbitol são energeticamente favoráveis (mostrado na Figura 4.4). Isto significa que na presença do sorbitol a força calculada nas simulações tem resultado no sentido de abertura do sítio catalítico. Nas

Capítulo 4. Aspectos energéticos da abertura do sítio catalítico da enzima BCL na presença de sorbitol

simulações MD o campo de força calcula o potencial resultante das interações intra e intermoleculares e, portanto, o sorbitol deve contribuir com interações nos subdomínios das α -hélices 5 e 9, ajudando a manter estas estruturas distantes. Isto deve ser verdade, considerando que moléculas do estabilizante sorbitol frequentemente visitam a entrada do domínio catalítico, conforme mostrado na Figura 4.5. Neste caso, podemos comprovar esta afirmação escolhendo aleatoriamente *frames* das simulações de Dinâmica Molecular e observando a presença de moléculas de sorbitol no espaço formado entre as α -hélices 5 e 9 (na Figura 4.5, cada molécula foi destacada com uma seta vermelha, sendo que no mínimo quatro moléculas de sorbitol foram encontradas nesta região).

O motivo pelo qual as moléculas de sorbitol são eficientes em promover aumento catalítico pode ser explicado do ponto de vista das interações intermoleculares. Podemos supor que exista alguma interação específica que justifique a presença de sorbitol neste espaço, por exemplo. De fato, a visitação desempenhada pelas moléculas do estabilizante nesta região deve ter suas origens no caráter hidrofóbico dos domínios U1 e U2.^{18,21,69} Sabe-se que estes domínios correspondem a porção menos hidrofílica da enzima BCL, e que pode ter grande afinidade por fases orgânicas.^{24,25,111} Esta propriedade será explorada no Capítulo 5, que mostrará como ocorre a orientação da enzima em interfaces orgânico/aquosa. Por outro lado, sabemos também (a partir dos resultados apresentados no Capítulo 2) que o sorbitol apresenta significativa capacidade de depositar-se na superfície proteica através de interações hidrofóbicas, via carbonos alifáticos (ver Figura 2.10). Considerando estas duas propriedades: (1) caráter hidrofóbico dos domínios U1 e U2 e (2) afinidade de sorbitol por resíduos apolares, podemos sugerir que há um mecanismo direto que explica a abertura do sítio catalítico da enzima BCL, onde o sorbitol interage com resíduos da BCL na entrada do domínio catalítico. Deve-se levar em conta que este deve ser um efeito benéfico, pois caso contrário os resultados experimentais mostrariam queda na atividade catalítica da enzima quando exposta a moléculas de sorbitol, devido à inibição da enzima, por exemplo. Logo, podemos sugerir que o sorbitol age através de efeito estérico mantendo as estruturas das hélices α 5 e α 9 distantes entre si, facilitando a entrada do substrato e refletindo nas propriedades cinéticas da enzima BCL.¹⁶

Capítulo 4. Aspectos energéticos da abertura do sítio catalítico da enzima BCL na presença de sorbitol

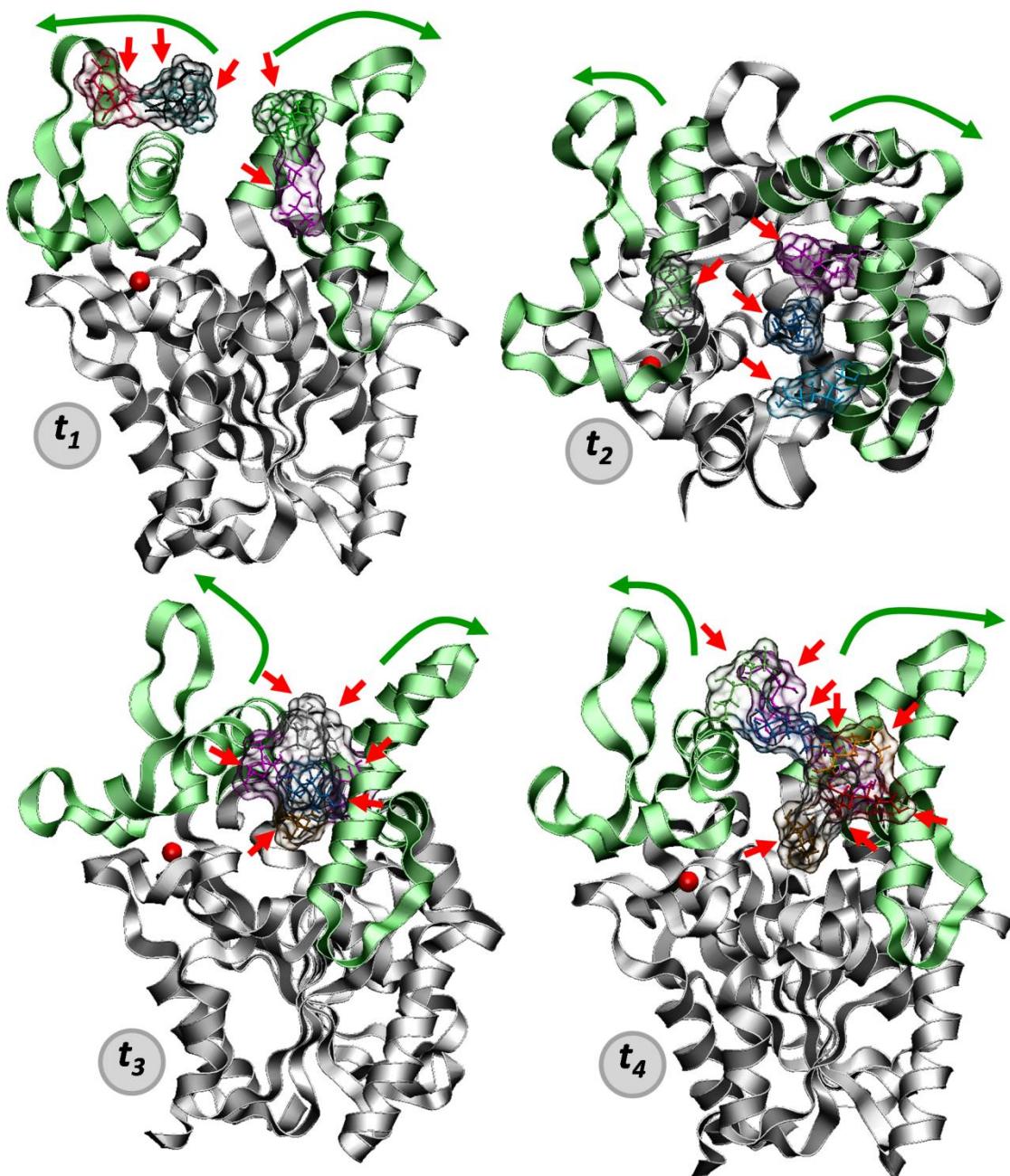


Figura 4.5 Análise estrutural das interações do sorbitol na entrada do sítio catalítico da enzima BCL ($\sim 1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de sorbitol). Cada molécula de sorbitol identificada é destacada com uma seta vermelha em quatro frames aleatórios das simulações MD. Isto mostra que o custo energético associado ao fechamento do sitio catalítico pode ser explicado por um mecanismo direto devido ao efeito estérico promovido por moléculas do estabilizante sorbitol interagindo diretamente com as α -hélices 5 e 9 (domínio U1 e U2 destacados em verde). A esfera vermelha é o íon Ca^{2+} .

4.2.4. Modelo energético da abertura do sítio catalítico da enzima BCL na presença de sorbitol

Com base nos resultados apresentados até o presente momento, podemos sugerir que o aumento na atividade catalítica da enzima BCL, na presença do estabilizante sorbitol,¹⁶ pode ser explicado considerando os aspectos energéticos associados ao mecanismo de abertura/fechamento do sitio catalítico dado pela coordenada reacional ξ , mostrado na Figura 4.4. Considerando as energias livre associadas a estes dois estados conformacionais “aberto” e “fechado”, pode-se observar que o sorbitol age diminuindo significativamente as energias livres das estruturas abertas. Interessante observar que o decréscimo da energia livre das estruturas abertas está associado ao incremento na concentração de sorbitol do sistema. Neste sentido, aumentar a concentração de sorbitol leva a um valor mais negativo de ΔG associado a transição conformacional fechada↔aberta. Este resultado está de acordo com dados experimentais¹⁶ e pode explicar, do ponto de vista molecular, como este estabilizante age para induzir o aumento na atividade catalítica da enzima BCL.

Aqui é importante mencionar que este efeito não deve ser infinitamente positivo, tendo um limite, a partir do qual a proteína poderia ser perturbada por altas concentrações do osmólito estabilizante, conforme já discutido previamente na literatura por Singh LR e colaboradores.²⁸ Nestes casos, diferentes proteínas, tais como creatina quinase,¹¹² α -cristalina,¹¹³ cutinase,¹¹⁴ α -lactalbumina,¹¹⁵ podem ser perturbadas por altas concentrações de polióis como glicerol, trehalose, xilitol e inositol. De forma análoga, a enzima BCL também poderia ser perturbada por altas concentrações de sorbitol, acima de 1 mol·L⁻¹. Porém, para estudar este aspecto, deveríamos conduzir ensaios experimentais e de modelagem computacional adicionais, que ficarão como perspectivas para futuros trabalhos.

Discutimos no Capítulo 1, Figura 1.4, que os modelos adotados comumente consideram que, quando um osmólito é estabilizante, este deve ser excluído da

Capítulo 4. Aspectos energéticos da abertura do sítio catalítico da enzima BCL na presença de sorbitol

superfície proteica, levando ao acréscimo na afinidade por água.^{29,39} Tal comportamento deveria explicar aspectos relacionados ao aumento de estabilidade proteica e atividade catalítica. No entanto, podemos agora questionar este modelo de forma mais contundente. A partir dos resultados apresentados, podemos mostrar que o sorbitol é frequentemente encontrado em uma região bem importante da enzima BCL, não sendo excluído para o *bulk* da solução (detalhado no Capítulo 2), levando ao decréscimo de ΔG das estruturas abertas, de acordo com o afastamento das α -hélices 5 e 9. Portanto, nesta interpretação a interação direta proteína-sorbitol deve ser a causa molecular para os resultados experimentais observados,¹⁶ contrapondo com a justificativa comumente adotada que considera a exclusão do poliol da superfície proteica.^{16,29,39}

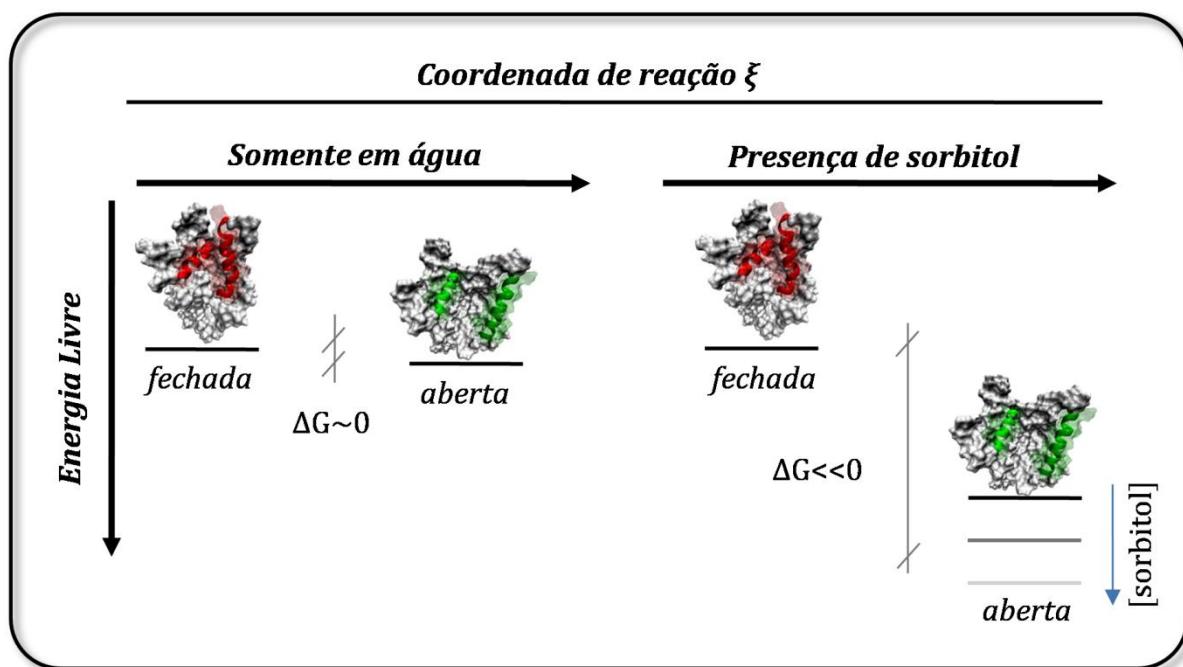


Figura 4. 6 Modelo energético qualitativo da abertura do sítio catalítico da enzima BCL na presença de concentrações crescentes do osmólito estabilizante sorbitol. Sugere-se que as conformações abertas do sítio catalítico são favorecidas por sorbitol devido ao decréscimo na energia livre associada às estruturas abertas das α -hélices 5 e 9. Esta estabilização pode ser explicada estruturalmente pelo efeito estérico desempenhado por

moléculas de sorbitol, sendo consequência das interações hidrofóbicas com resíduos dos domínios U1 e U2.

4.3. Conclusões parciais

A partir dos resultados apresentados aqui, podemos sugerir algumas conclusões para o mecanismo de abertura do sítio catalítico da enzima BCL na presença do estabilizante sorbitol:

- (I) A primeira constatação foi que simulações MD convencionais não são capazes de mapear suficientemente os estados conformacionais aberto/fechado a ponto de identificar com clareza a influência do sorbitol em favorecer um destes estados. Somente podemos afirmar que, em uma simulação convencional MD, os estados fechados dificilmente serão amostrados na presença do sorbitol, conforme mostrado na Figura 4.3;
 - (II) Considerando que a atividade catalítica da enzima BCL deve ser modulada pela acessibilidade do substrato ao sítio catalítico desta proteína, podemos sugerir que o osmólito sorbitol desempenha um papel direto no mecanismo de abertura do domínio catalítico, via impedimento estérico das conformações fechadas. Isto ocorre devido às visitações do sorbitol na entrada do bolsão catalítico, impedindo a aproximação das α -hélices 5 e 9. Esta visitação não deve ter ação inibitória, muito pelo contrário, como identificado experimentalmente;¹⁶
 - (III) Este processo de abertura/fechamento do sítio catalítico da enzima BCL na presença de sorbitol pode ser claramente explicado do ponto de vista energético, aplicando método ABF, com o estabilizante diminuindo
-

Capítulo 4. Aspectos energéticos da abertura do sítio catalítico da enzima BCL na presença de sorbitol

significativamente as energias livres associadas às estruturas abertas (distanciamento das α -hélices 5 e 9);

- (IV) Finalmente, sugerimos que o aumento na concentração do osmólito sorbitol faz com ΔG associado à transição conformacional fechada↔aberta do sítio catalítico da enzima BCL, fique mais negativo, explicando os resultados experimentais que mostram aumento de atividade catalítica com incremento na concentração de sorbitol.¹⁶ Podemos supor que este mecanismo também possa explicar como o sorbitol estabiliza outras lipases que possuem mecanismo semelhante de entrada do substrato.

Capítulo 5

Dinâmica orientacional da enzima BCL em interfaces e efeitos na acessibilidade do substrato

Proteínas possuem mecanismos biofísicos próprios para desempenhar suas funções biológicas com eficiência, adquiridos ao longo do processo evolutivo nos diferentes organismos.¹¹⁶ Um bom exemplo das especificidades de proteínas são as lipases, que podem se comportar de maneira distinta de acordo com o microambiente em que se encontram, por exemplo, assumir diferentes conformações quando imersas em ambientes aquosos ou hidrofóbicos.^{103,117} Este comportamento deve-se à função desta proteína em converter substratos apolares e será detalhado mais adiante.

As triacilglicerol lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas específicas que promovem a biocatálise de triacilgliceróis (TAGs) em seus ácidos graxos livres.^{3,118} Essencialmente convertem um substrato altamente hidrofóbico em produto anfifílico.^{3,119} O mecanismo mais geral da catálise envolve a difusão da proteína da fase aquosa para a interface formada entre as fases orgânico/aquosa, como mostrado na Figura 5.1. Especificamente, a fase orgânica pode ser uma solução saturada do substrato apolar ou o próprio substrato imerso em solvente orgânico de baixa polaridade.^{3,101} Após a translação para a interface, a enzima (E) deve assumir estados energéticos mais favoráveis à catálise, levando a facilidade de associação com o substrato (S), que está na fase hidrofóbica, e formação do complexo E*S. Por fim o produto (P) é formado e liberado para a fase aquosa, tornando-se disponível para ser utilizado pelos organismos vivos ou ser concentrado e extraído em aplicações biotecnológicas.^{120,121}

A enzima BCL (*Burkholderia cepacia* lipase) deve apresentar um mecanismo semelhante ao descrito acima, com migração para a interface, adotando uma conformação preferencial. Vale lembrar que esta enzima apresenta três domínios: U1 (resíduos 118-166), U2 (215-261) e C (1-117;167-214;262-320), sendo os domínios U1 e U2 mais hidrofóbicos e diretamente associados a abertura do sítio catalítico.^{21,22} Estudos anteriores mostraram que esta enzima apresenta duas conformações possíveis: (1) aberta, com as hélices α 5 e α 9 distantes entre si; (2) fechada, com a hélice α 5 dobrada sobre a α 9. Estes dois estados conformacionais assumidos pela enzima BCL estão diretamente associados com a abertura do sítio catalítico e exposição dos resíduos que compõem a tríade catalítica (Ser₈₇-Asp₂₆₄-His₂₈₆).²⁴ Anteriormente, S. Barbe e colaboradores mostraram que as conformações assumidas pelos domínios U1 e U2 são dependentes do microambiente de solvatação. Neste caso, a enzima manteve o sítio

Capítulo 5. Dinâmica orientacional da enzima BCL em interfaces e efeitos na acessibilidade do substrato

catalítico preferencialmente aberto quando tais domínios estavam em contato com a fase orgânica octano.²⁵ Estes resultados estão de acordo com a possibilidade de favorecimento de estados energéticos favoráveis dentro de uma interface (E* na Figura 5.1).

O favorecimento de estados conformacionais abertos de sítios catalíticos, na presença de interfaces água/tolueno, também foi identificado para outras lipases como CRL (*Candida rugosa* lipase), RML (*Rhizomucor miehei* lipase) e TLL (*Thermomyces lanuginosus* lipase).¹⁰³ Tais resultados mostram que o mecanismo de abertura do sítio catalítico destas enzimas são altamente dependentes da solvatação hidrofóbica de domínios específicos e são independentes, por exemplo, da indução pelo substrato. Contudo, alguns pontos ainda não são detalhados na literatura, e, portanto, serão discutidos neste Capítulo: (1) o tempo necessário para que ocorra a orientação na interface e a dependência com a polaridade da fase orgânica; (2) estimar quantitativamente o processo de abertura=fechamento, através dos cálculos de energia livre por ABF, com os domínios U1 e U2 imersos na fase orgânica octano ou CAME (éster metílico do ácido caprílico).

Considerando a similaridade no mecanismo de acessibilidade do substrato ao domínio catalítico entre a enzima BCL e outras lipases, as discussões apresentadas aqui poderão ser extrapoladas para a compreensão deste fenômeno em enzimas como CRL, RML e TLL entre outras¹²² na presença de interfaces orgânico/aquosas.

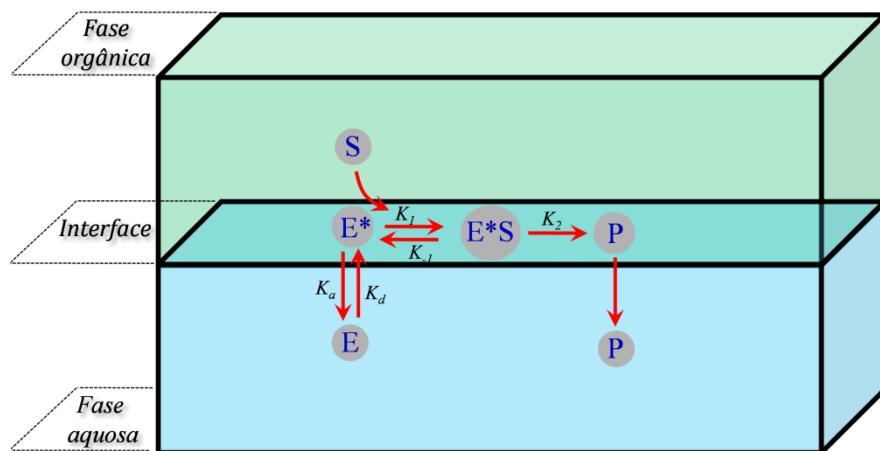


Figura 5. 1 Modelo cinético envolvendo a orientação de lipases em interfaces, proposto por R. Verger e GH De Hass, baseado no modelo cinético de Michaelis-Menten-Henri.¹²³ O processo de orientação da enzima BCL (E) na interface deve atingir uma conformação acessível (E^*) ao solvente (S). (E^*S) é o intermediário enzima-substrato e (P) o produto. Figura adaptada.^{3,124}

5.1. Metodologia

Aplicamos neste Capítulo simulações de Dinâmica Molecular convencionais e cálculos de energia livre da abertura do sítio catalítico da enzima BCL pelo método ABF.^{106,108} Inicialmente realizamos as simulações MD da enzima BCL disposta sem nenhuma orientação preferencial nas interfaces orgânico/aquosa. Depois que a enzima se estabilizou nas interfaces, as coordenadas foram salvas e utilizadas para iniciar as simulações MD acopladas ao método ABF.

5.1.1. Simulações de Dinâmica Molecular

As simulações de Dinâmica Molecular foram conduzidas de forma semelhante ao descrito nos capítulos anteriores, com alguns detalhes para a confecção das interfaces, descritos a seguir. As caixas de simulação foram construídas a partir da estrutura cristalográfica da enzima BCL disponível no banco de dados de estruturas de proteínas *Protein Data Bank* (PDB ID:1YS1),²³ resolução de 1.10 Å, contendo 320 resíduos de aminoácidos e um íon Ca²⁺.²² O ligante (ácido hexilfosfônico (R)-2-metil-3-fenilpropil éster) complexado no sítio catalítico da estrutura foi removido. As interfaces foram confeccionadas com auxílio do programa Packmol,⁵⁴ com a proteína centralizada e a caixa de simulação contendo metade do volume completado com água e a outra metade com CAME (éster metílico do ácido caprílico) ou octano. Detalhes das estruturas dos solventes orgânicos são mostrados na Figura 5.2. Um terceiro sistema foi construído contendo somente água, usado como referência no cálculo de ABF. Íons Na⁺ e Cl⁻ foram adicionados para neutralizar cargas do sistema.

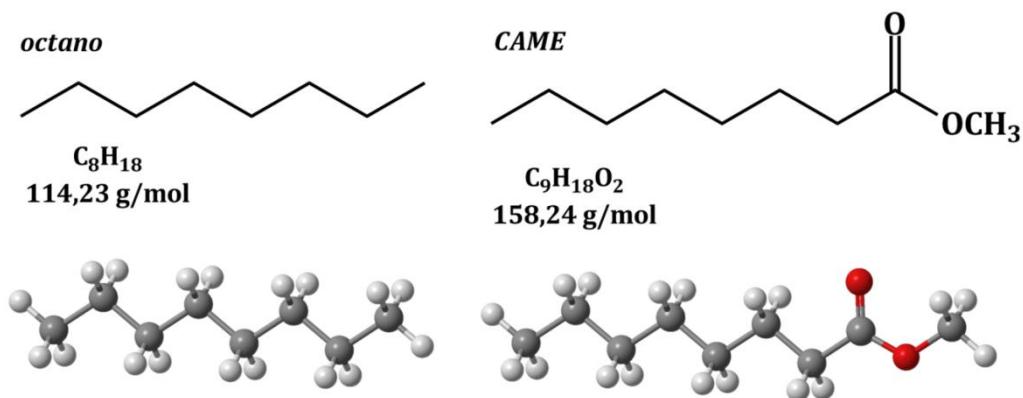


Figura 5. 2 Estruturas moleculares dos solventes orgânicos utilizados na confecção das interfaces com água. Octano e CAME (*Caprylic Acid Methyl Ester*).

As caixas de simulação contendo a enzima nas interfaces foram equilibradas em duas etapas, seguidas da corrida de produção: (1) com todos os átomos fixos da enzima BCL, as moléculas de água e CAME ou octano foram relaxadas através do método de minimização de energia Gradientes-Conjugados (GC) por 15000 passos, seguidos de 2 ns de simulação de MD convencional; (2) fixando todos os átomos C α da proteína, o sistema foi relaxado por mais 500 passos de minimização GC, seguidos de outros 2 ns de simulação MD; (3) as coordenadas e velocidades da etapa de minimização foram utilizadas para iniciar as trajetórias de produção, totalizando 200 ns.

Para os cálculos de perfis de energia livre, as coordenadas e velocidades do último passo da etapa anterior, com a enzima BCL orientada nas interfaces, foram utilizadas para dar inicio às trajetórias de produção, associadas ao cálculo de energia livre pelo método ABF, total de 200 ns para cada sistema. Neste caso, as etapas de minimização não foram realizadas, partindo-se diretamente para a etapa de produção (~200 ns). Em todos os casos, as trajetórias (e etapas de minimização) foram realizadas em *ensemble* NPT a 1 atm de pressão e temperatura de 298.15 K. Com controle de pressão mantido pelo barostato de Langevin (com período de 200 ps, e tempo de decaimento de 100 ps) e temperatura de 298.15 K, mantida constantemente através da dinâmica de Langevin (com frequência de perturbação de 10 ps⁻¹). O campo de força CHARMM foi utilizado para todas as moléculas e íons envolvidos, com modelo TIP3⁵⁷ adotado para água.^{55,56} As simulaçõesMD foram realizadas utilizando o programa NAMD,⁴⁸ e visualização das trajetórias utilizando o programa VMD.⁵⁸

Os cálculos de perfil de energia livre foram realizados pelo módulo *colvars* implementado no próprio programa NAMD,¹⁰⁶ adotando-se o intervalo da coordenada de reação de 0.1 Å ($\Delta\xi$), limite inferior da coordenada de reação ξ (5.0 Å) e limite superior da coordenda de reação ξ (28.0 Å) com constante de força de 10.0 kcal/mol/Å² e amostragem de 5000 pontos. A coordenada de reação ξ foi definida como descrito no Capítulo 4, sendo considerada a distância entre as α -hélices 5 e 9, especificamente, a distância entre os C α de dois resíduos que compõem as α -hélices 5 (Phe₁₄₂) e 9 (Gly₂₅₀). A coordenada reacional foi definida desta forma devido ao uso recorrente deste parâmetro em trabalhos recentes, que avaliam a acessibilidade do substrato ao sítio

Capítulo 5. Dinâmica orientacional da enzima BCL em interfaces e efeitos na acessibilidade do substrato

catalítico em meio aquoso e de solventes orgânicos, por exemplo.^{24,25} Por fim, as análises de distâncias entre os átomos Cα-Cα, raio de giro, contatos nativos e rmsd nas trajetórias foram realizadas com o pacote de ferramentas disponíveis no MDAnalysis,⁶⁰ e VMD.⁵⁸

Tabela 5. 1 Detalhe dos sistemas simulados nas interfaces.

Sistema	Notação	Aplicação ABF	Quantidade de Moléculas		
			Água	CAME	Octano
1	CAME	Não	15000	2000	0
2	OCTA	Não	15800	0	2500
3	H ₂ O	Sim	20800	0	0
4	CAME	Sim	15000	2000	0
5	OCTA	Sim	15800	0	2500

5.2. Resultados e discussões

5.2.1. Orientação dos domínios U1 e U2 nas interfaces água/CAME e água/octano

As simulações foram iniciadas com a proteína disposta nas interfaces água/solventes orgânicos com orientação aleatória, porém nas duas interfaces a BCL foi igualmente disposta na caixa de simulação, portanto, alterando-se somente o solvente orgânico. Neste sentido, descrevemos aqui a orientação funcional da enzima BCL nas interfaces sem a introdução de nenhuma pré-definição.

Capítulo 5. Dinâmica orientacional da enzima BCL em interfaces e efeitos na acessibilidade do substrato

De forma surpreendentemente rápida, a enzima BCL rotacionou de tal forma a expor a abertura do sítio catalítico para a fase orgânica. As rotações ocorreram em tempos de simulação inferiores a 100 ns, como mostrado na Figura 5.3. Em ambas as interfaces com octano e CAME, a reorientação completa da proteína aconteceu em aproximadamente 80 ns de simulação, com a rotação na interface com octano sendo aparentemente mais rápida (Figura 5.3B). O ângulo orientacional no início da simulação era de $\sim 100^\circ$, e convergiu para $\sim 18^\circ$ na interface com octano e para $\sim 35^\circ$ na interface com o ester metílico.

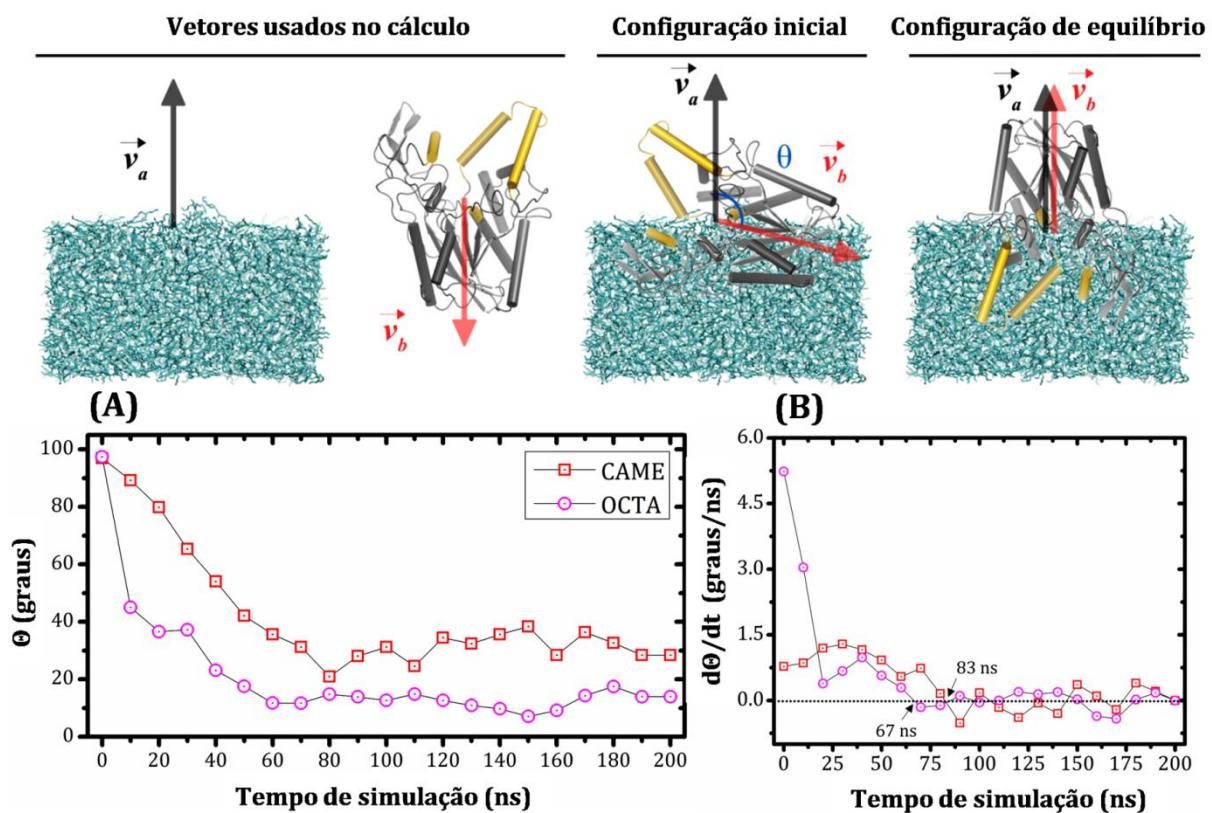


Figura 5.3 Orientação da enzima BCL nas interfaces água/CAME e água/octano. O ângulo de rotação é definido como o ângulo entre o vetor normal a interface e apontando para a fase aquosa (cinza), e o vetor (vermelho) centrado no sítio ativo (amarelo). Com tais definições, a configuração inicial apresenta estes vetores aproximadamente ortogonais entre si, sendo que a sua colinearidade indica que a abertura do sítio ativo está orientada para a fase orgânica. (A) Ângulo de rotação medido no tempo de simulação. (B) Taxa de rotação, ou seja, velocidade angular de rotação do ângulo θ , em função do tempo de simulação. Ambos os gráficos mostram que a estabilidade das orientações é obtida antes de 100 ns de simulação, com a abertura do sítio ativo orientada para a fase orgânica.

Os domínios U1 e U2 assumem uma orientação aproximadamente paralela com as interfaces, mas a imersão nas fases orgânicas é diferente em cada caso. Os domínios U1 e U2 são mais hidrofóbicos, e o domínio C mais hidrofílico, sendo que estas diferenças na hidrofilicidade são determinantes para a orientação final da enzima nas

Capítulo 5. Dinâmica orientacional da enzima BCL em interfaces e efeitos na acessibilidade do substrato

interfaces água/octano e água/CAME. O ester metílico é muito mais miscível em água do que o octano devido a polaridade do grupamento ester, como mostrado na Figura 5.4. Isto leva a interações mais favoráveis do CAME com o domínio C da enzima BCL. Além disso, as interações do ester metílico com as cadeias laterais polares e *backbone* dos aminoácidos da proteína retardam a rotação da enzima. Este tipo de interação não está presente no octano, o que resulta nas diferenças dos equilíbrios orientacionais observados da enzima BCL em cada interface.

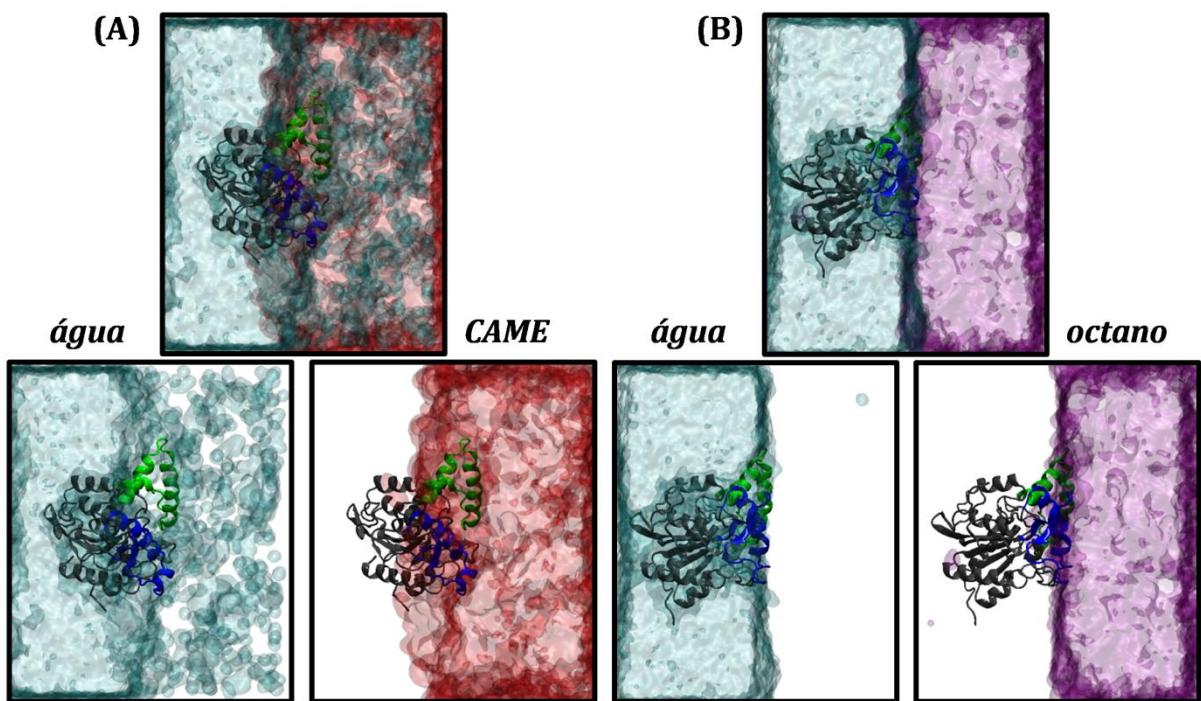


Figura 5. 4 Miscibilidade das duas fases, solvatação proteica e orientação da enzima nas interfaces. (A) Água (ciano) é parcialmente solúvel na fase do ester metílico (vermelho). A interface é, portanto, espessa e pouco particionada, fato que torna a enzima BCL significativamente solvatada por ambos os solventes. (B) A interface composta por água (ciano) e octano (roxo) é estreita e bem definida, devido à imiscibilidade dos componentes. A enzima BCL interage com a fase de octano apenas superficialmente, porém precisamente orientada para expor a abertura do sítio catalítico para a fase orgânica.

A exposição da tríade catalítica para a fase orgânica está representada na Figura 5.5. A rotação da enzima BCL leva a uma orientação estável na interface, fato que é altamente sugestivo de um estado ativado. Devido a alta polaridade do ester metílico comparativamente ao octano, a proteína está parcialmente imersa na fase orgânica do CAME, enquanto que as interações da enzima com octano é apenas superficial. Em ambos os casos, porém, moléculas do solvente orgânico penetram na cavidade do sítio ativo e interagem diretamente com os resíduos da tríade catalítica (Ser87-Asp264-His286).

Resumidamente, nossos resultados mostram que a enzima BCL é rapidamente orientada nas interfaces compostas por água e os dois solventes orgânicos, expondo superfície do *core* hidrofílico (domínio C) para a fase aquosa e os domínios mais hidrofóbicos (U1 e U2), que hospedam a abertura do sítio catalítico, para a fase orgânica. As orientações finais em ambas as interfaces são estáveis, persistindo por tempo superior a 130 ns, indicando sua relevância funcional. O grau de hidrofobicidade da fase orgânica parece estar correlacionado com a velocidade de orientação, sendo que todo o evento ocorre mais rapidamente na interface com octano comparativamente ao observado com o éster metílico.

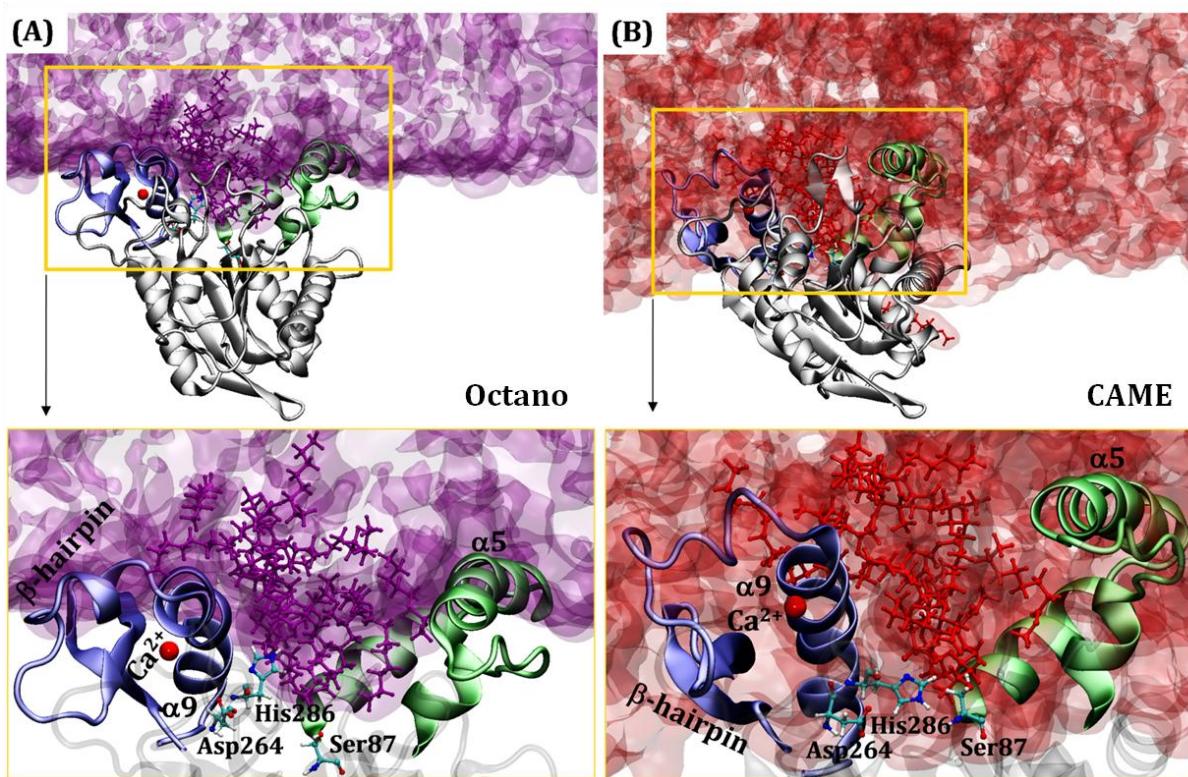


Figura 5.5 Entrada dos solventes na abertura do sítio catalítico da enzima BCL, levando a interações diretas com a tríade catalítica. (A) octano e (B) CAME.

5.2.2. Alterações conformacionais da enzima BCL de acordo com a orientação nas interfaces

A estabilidade estrutural da enzima BCL em cada interface foi avaliada por parâmetros como raio de giro, fração de contatos nativos e RMSD em relação à estabilidade estrutural somente em água, como mostrado na Figura 5.6. A estrutura proteica da enzima BCL se mostrou estável na interface água/CAME, enquanto leves alterações estruturais são observadas na interface com octano.

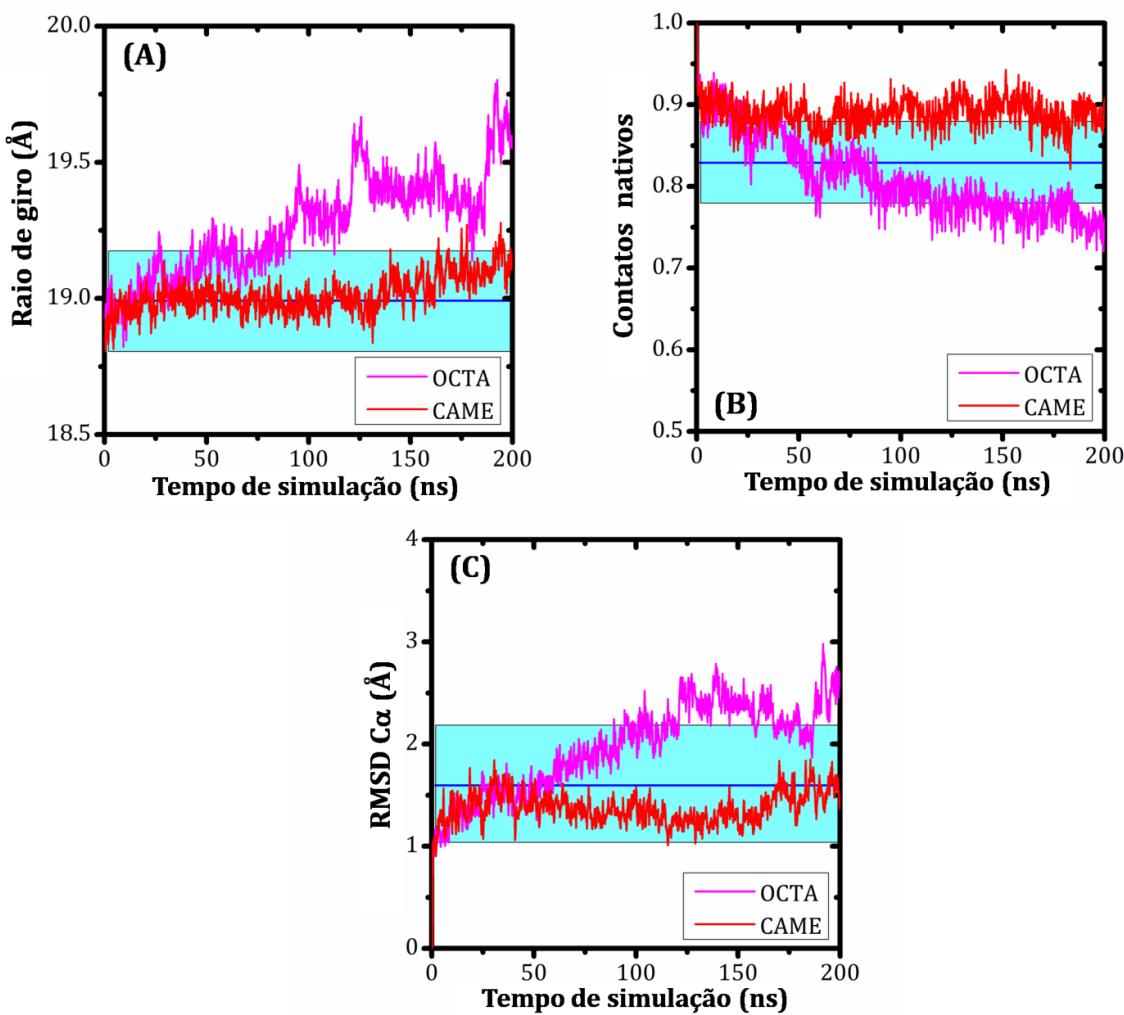


Figura 5.6 Análises conformacionais da enzima BCL nas interfaces: (A) raio de giro, (B) fração de contatos nativos; (C) RMSD em função do tempo de simulação. Na interface água/CAME a enzima é mais estável, enquanto que na interface água/octano aparentemente há uma pequena alteração estrutural comparativamente a estrutura proteica em água. As linhas azuis e as sombras em ciano representam a média e desvio padrão para cada uma das propriedades observadas previamente em simulações da BCL em água pura.⁷⁶

As alterações estruturais observadas para a interface com octano podem ser um sinal de início de desnaturação ou alteração estrutural associada com função da enzima na interface orgânica.¹²⁵ Portanto, para investigar estas duas possibilidades, nós

calculamos os RMSDs independentemente para cada resíduo, para identificar a região da proteína responsável pela alteração conformacional observada na interface com octano (Figura 5.7). Interessante observar que as regiões da proteína com deslocamentos significantes na interface com octano são também as mesmas regiões de alta flexibilidade na interface com CAME. Esta similaridade aponta para papel funcional destas flutuações, embora possam ser superestimada na interface com octano.

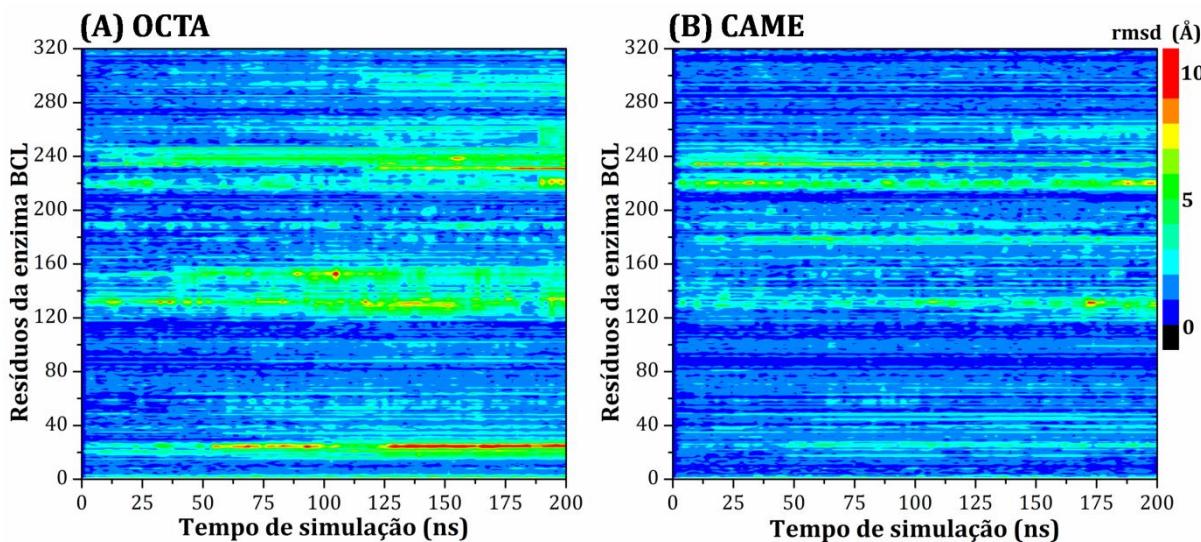


Figura 5.7 Flutuações estruturais dos resíduos da enzima BCL em função do tempo, de acordo com o RMSD dos átomos C α em relação a estrutura inicial da simulação. (A) interface água/octano. (B) interface água/CAME. Claramente, as mesmas regiões de altos desvios são observadas em ambas as interfaces (resíduos 15-30; 120-160; 220-270), porém com deslocamentos maiores observados na interface com octano.

As regiões de maiores mobilidades observadas na Figura 5.7 compreendem os domínios U1 e U2 (resíduos 118-166 e 215-261, respectivamente), que estão em contato direto com a fase orgânica depois da reorientação da proteína. Na Figura 5.8 mostramos a posição relativa destes domínios, medida pela distância entre os resíduos Phe142 e Gly250 (ver Figura 4.3). Claramente, estes domínios são afastados entre si quando interagem com a fase orgânica, principalmente na interface com octano. A distância entre Phe142 e Gly250 também aumenta na interface com CAME, porém não na

mesma extensão. O aumento na abertura da cavidade catalítica situada entre os domínios U1 e U2 expõe a tríade catalítica (Ser87-Asp264-His286), e indica que as flutuações conformacionais observadas estão associadas com a ativação proteica, como discutido previamente.

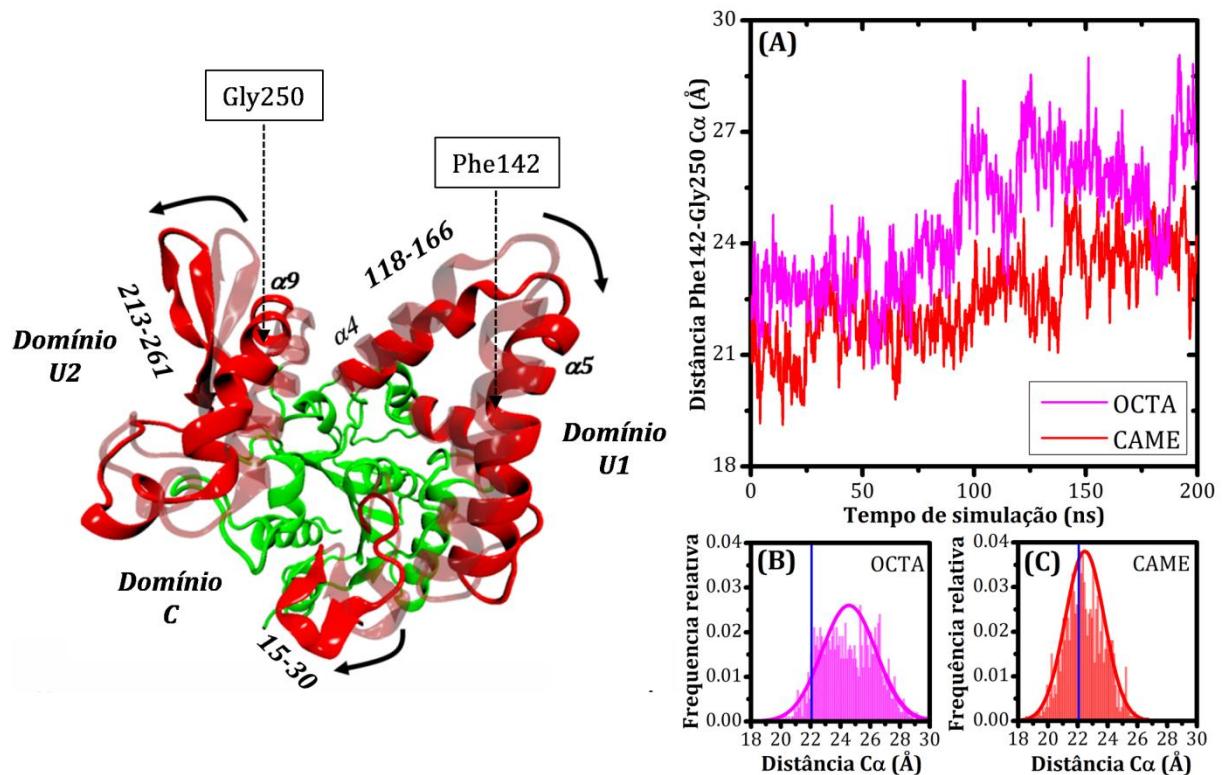


Figura 5. 8 Exposição do bolsão catalítico, representada pela distância entre os domínios U1 e U2 da enzima BCL após a interação com a fase orgânica. (A) Distâncias entre os átomos de C α dos resíduos Phe142 (domínio U1) e Gly250 (domínio U2), em função do tempo de simulação, indicando aumento na abertura catalítica após a reorientação da proteína (~75 ns). (B) e (C) distribuições das distâncias nas interfaces com octano e CAME, respectivamente, mostrando que o distanciamento dos domínios é maior na interface água/octano. A linha vertical azul (~22 Å) indica a distância associada à forma aberta da enzima em água pura.

5.2.3. Perfil de energia livre para o afastamento das hélices α 5 e α 9 com domínios U1 e U2 imersos na fase orgânica

Lipases diferem de outras esterases pela dependência de sua atividade com a concentração de substrato. Particularmente, lipases apresentam significativo aumento em sua atividade catalítica em soluções saturadas de substratos.^{126,127} De forma semelhante, a atividade catalítica de lipases também é aumentada na presença de solventes orgânicos, sugerindo o papel estrutural das interfaces no processo catalítico.^{128,129} No entanto, a enzima BCL e outras lipases também são ativas em soluções aquosas.¹⁶

A atividade enzimática da BCL pode ser governada pela abertura e fechamento da cavidade catalítica, que parece ser favorecida pela interação com as fases orgânicas. A modulação da exposição do sítio de ligação pode ser de natureza cinética ou termodinâmica. Se a for de natureza cinética, a energética para a transição entre as conformações aberta \rightleftharpoons fechada deveria ser reduzida. Por outro lado, se a ativação for termodinâmica, as interações com a fase orgânica devem promover a estabilização relativa da conformação aberta ativa.

Para comprovar o mecanismo de ativação nas interfaces água/solventes orgânicos, nós calculamos os perfis de energia livre ao longo da coordenada de reação associada com a abertura e fechamento do bolsão catalítico. Dado que a orientação da enzima nas interfaces é muito rápida, usamos as configurações da BCL obtidas a partir das simulações convencionais, descritas na seção anterior. Com a proteína equilibrada nas interfaces, realizamos os cálculos de energia livre de abertura e fechamento dos domínios U1 e U2 usando o método ABF (*Adaptive Biasing Force*). Adicionalmente, os mesmos perfis de energia livre foram obtidos em água pura.

A Figura 5.9 apresenta o perfil de energia livre associado com a abertura da cavidade catalítica em diferentes meios. Em água (linha preta), o estado conformacional fechado (~ 6 Å) e o estado conformacional aberto (~ 22 Å) possuem energias livres similares. Portanto, as simulações indicam que a enzima BCL pode ser encontrada em ambas os estados, inativo (fechada) e ativo (aberta) com mesma probabilidade. Além disso, é possível observar uma barreira energética associada à transição entre os dois

Capítulo 5. Dinâmica orientacional da enzima BCL em interfaces e efeitos na acessibilidade do substrato

estados de $\sim 9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, o que implica que implica que a transição deve ser um evento raro na temperatura ambiente.

Nas interfaces, no entanto, ocorre uma grande estabilização do estado conformacional aberto do sítio ativo. As energias livres calculadas para os estados abertos são agora $\sim 55 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ menor do que o estado fechado. Ademais, não há mais a barreira energética associada com a transição (linhas azul e vermelha na Figura 5.9). Estes perfis de energia livre implicam que nas interfaces o estado aberto da proteína é completamente dominate, e não existe uma barreira cinética para a ativação da enzima quando está em contato com a fase orgânica. De fato, este resultado é consistente com a observação em nossas simulações de abertura do sítio catalítico no curto tempo de simulação comparado com as flutuações estruturais típicas da proteína. Portanto, as interações com a fase orgânica, na orientação adequada, induzem uma rápida e irreversível abertura da cavidade catalítica.

A partir da perspectiva estrutural, nós podemos atribuir uma maior estabilidade da forma aberta da enzima BCL pela penetração de moléculas orgânicas na cavidade catalítica (Figura 9.5). Esta penetração do solvente é altamente favorável, por causa da natureza hidrofóbica dos resíduos dos domínios U1 e U2. Uma vez que o solvente está disposto na entrada do sítio catalítico, o volume ocupado pelas moléculas orgânicas impede o mecanismo inverso, ou seja, a aproximação das α -hélices 5 e 9.

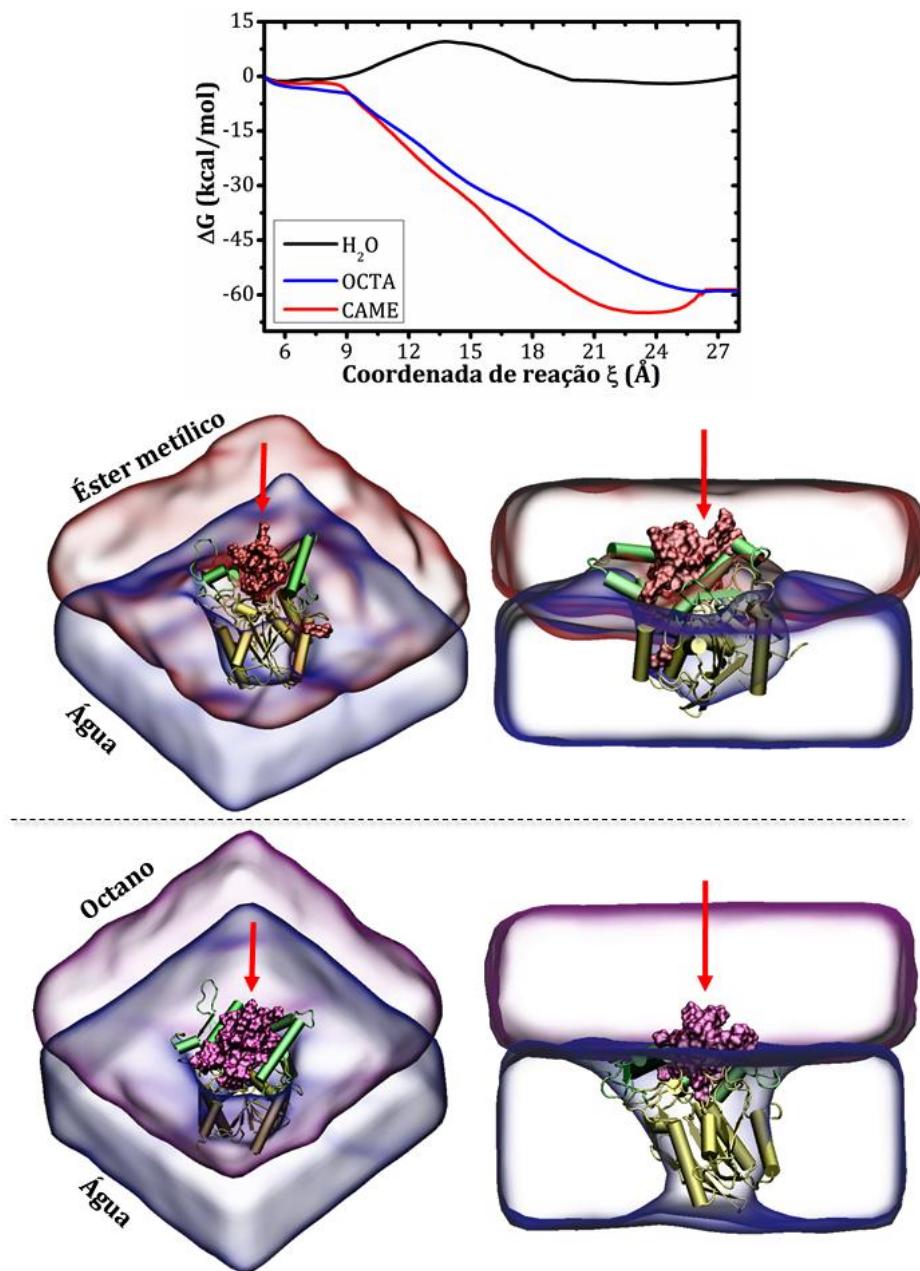


Figura 5.9 Perfis de energia livre da abertura do bolsão catalítico da enzima BCL em água e em interfaces com octano e CAME. As menores energias livres das formas abertas da enzima nas interfaces resultam da penetração das moléculas orgânicas dentro dos domínios U1 e U2, que impedem o retorno para o estado fechado. Não somente a forma aberta da enzima se torna mais estável nas interfaces, como a barreira de energia livre associada à transição que existe em água é eliminada. A convergência dos perfis de energia livre foi definida pela comparação dos valores obtidos nos passos crescentes da simulação.

5.2.4. Modelo enzimático da BCL em interface: translação, orientação e energia livre de abertura do sítio catalítico

Os resultados apresentados aqui permitem propor um mecanismo geral de ativação da enzima BCL em interfaces, com especificidade previamente desconhecida. O mecanismo é mostrado na Figura 10.

Em água, a BCL apresenta igual probabilidade de ser encontrada em suas formas aberta ou fechada (diferença de energia livre de zero), e existe uma barreira associada à transição entre estes dois estados. Considerando que a forma fechada não permite a entrada de substrato, a atividade enzimática da BCL é reduzida.

Na presença da interface com solvente menos polar, a enzima BCL migra para a interface e rapidamente se reorienta de forma a maximizar as interações dos domínios hidrofóbicos U1 e U2 com a fase orgânica. A escala de tempo deste fenômeno de reorientação parece ocorrer em tempos inferiores a microsegundos, portanto, não implica em barreira importante para a ativação enzimática. A extensão de polaridades amostradas por octano e CAME é similares aquelas encontradas em substratos naturais de lipases, e com isso, esperamos que mecanismos e escala de tempos similares possam ser observados para outras interfaces com relevância biofísica.

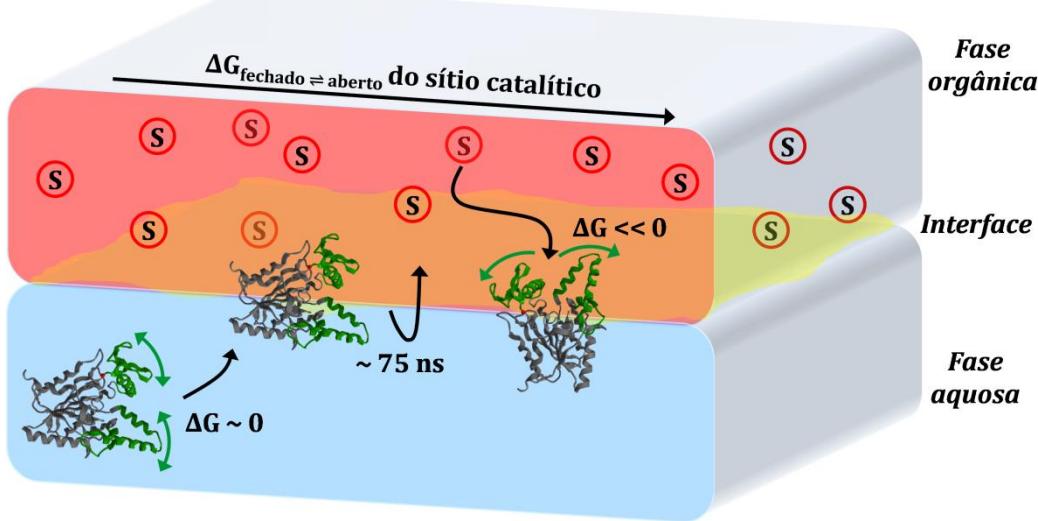


Figura 5. 10 Mecanismo de ativação da enzima BCL em interfaces água/solventes orgânicos: a enzima é parcialmente ativa em água, podendo ser encontrada nos estados aberto ou fechado com igual probabilidade. Quando a proteína atinge a interface, rapidamente ela se reorienta para expor os domínios U1 e U2 para a fase orgânica. Finalmente, a abertura do bolsão catalítico se torna altamente favorável do ponto de vista da termodinâmica, e expõe a tríade catalítica para o substrato ou solução de substrato.

Finalmente, uma vez que a proteína esteja devidamente orientada na interface, a barreira da energia livre associada com a abertura do sítio catalítico é reduzida, de forma que a cavidade catalítica aberta permite a entrada de moléculas da fase orgânica. A entrada destas moléculas, usualmente maiores que as moléculas de água, estabilizam completamente a forma aberta da enzima, tornando o processo de fechamento termodinamicamente inacessível à temperatura ambiente.

O acesso facilitado do substrato ao sítio catalítico quando a enzima assume a forma aberta nas interfaces explica o aumento na atividade catalítica, que é observado para a enzima BCL e outras lipases em meios heterogêneos, ou em soluções saturadas do substrato, onde é esperada a formação de aglomerados moleculares do substrato.^{2,3}

5.3. Conclusões parciais

Considerando os resultados apresentados neste Capítulo, podemos agora inferir sobre a orientação de lipases em interfaces, especialmente a enzima BCL, e influência na abertura do sítio catalítico. Tais conclusões podem ajudar a explicar o fenômeno da ativação de lipases em interfaces:

- (I) A orientação da enzima BCL na interface ocorreu numa pequena escala de tempo de simulação (~75 ns), mostrando que este processo é termodinâmica e cineticamente muito favorável. Além disso, o processo de orientação da enzima BCL nas interfaces é acompanhado pela aproximação dos resíduos da tríade catalítica (Ser₈₇-Asp₂₆₄-His₂₈₆) com as moléculas da fase orgânica e consequentemente do substrato, considerando sua alta hidrofobicidade;
 - (II) Alterações estruturais, de acordo com os rmsds, raio de giro e contatos nativos, mostraram que a enzima BCL se afastou mais de sua estrutura cristalográfica inicial com o solvente mais apolar (octano). Porém, nenhum processo de desnaturação foi identificado, mostrando que este mecanismo é intrínseco desta proteína, onde os domínios U1 e U2, quando imersos na fase orgânica, se distanciam expondo o sítio catalítico;
 - (III) Os perfis de energia livre calculados para a abertura do sítio catalítico mostram claramente como as interfaces devem agir para induzir o aumento na atividade catalítica. Podemos sugerir que, sendo os domínios U1 e U2 hidrofóbicos, solventes da camada orgânica acumulam-se na entrada do sítio catalítico, dificultando que o processo de “fechamento” ocorra, e facilitando a entrada do substrato.
-

Conclusões finais da tese

O desenvolvimento deste trabalho possibilitou compreender com mais detalhes as interações entre osmólitos (estabilizante sorbitol e desnaturante uréia) com superfícies proteicas. Os resultados de solvatação para a enzima BCL, fornecidas nos Capítulos 1 e 2, podem ser extrapolados para proteínas de forma geral. Nestes casos, identificamos que a solvatação proteica é altamente competitiva, contrapondo as hipóteses correntes da literatura, onde considera-se um processo de particionamento do solvente nas camadas mais próximas da superfície proteica. Isto abre caminho para que as discussões sobre a estabilidade de proteínas induzida por polióis, como o sorbitol, não sejam pautadas somente pela “exclusão preferencial” ou “hidratação preferencial”, deve-se considerar a complexidade das interações proteína-poliol. Por outro lado, o caráter desnaturante da uréia é tradicionalmente explicado pela sua capacidade de interagir com a superfície de proteínas “interação preferencial” e deslocamento de moléculas de água “desidratação preferencial”, sendo que quanto mais efetivo este comportamento, maior caráter desnaturante deve ser observado. Questionamos uma possível supervalorização desta interpretação, ou seja, o efeito desnaturante induzido por uréia pode ter suas origens em interações que vão além da simples interpretação do aumento da afinidade pela superfície proteica como um todo. Uma possível explicação fornecida no Capítulo 2 considera as interações com o *backbone* proteico como sendo importantes para o início do processo de desnívelamento, inclusive pela capacidade da uréia em atuar nesta região tanto como receptora ou doadora nas ligações de hidrogênio, dependendo do estado de protonação dos resíduos ácidos Asp/Glu. Ainda investigando sobre a influência do sorbitol no aumento da atividade catalítica, mostramos no Capítulo 4 que este osmólito pode atuar estabilizando os estados conformacionais “abertos” do sítio catalítico (via afastamento dos domínios hidrofóbicos U1 e U2), justificado pela alta afinidade do sorbitol por resíduos apolares. Este mecanismo, inclusive, pode ser extrapolado para o entendimento deste fenômeno em outras proteínas e utilizando outros polióis como trehalose ou sacarose. Finalmente,

Conclusões finais da tese

estudamos um aspecto muito importante dentro do mecanismo cinético envolvendo lipases, a orientação e ativação interfacial. Nos resultados apresentados no Capítulo 5, mostramos que este processo é possível de ser acompanhado por simulações de Dinâmica Molecular (orientações em ~75 ns), já que apresentam uma cinética de rotação rápida. Mostramos como os domínios U1, U2 e C orientam-se no sistema particionado. Com isso, a camada hidrofóbica estabiliza a conformação “aberta” da enzima BCL, aproximando moléculas do solvente ao sítio enzimático e expondo a tríade catalítica. Sugerimos que este fenômeno deve justificar a eficiência enzimática de lipases em sistemas com interfaces orgânico/aquosas.

Perspectivas

- ✓ Estudar a dinâmica de solvatação por outros osmólitos estabilizantes pertencentes à classe dos derivados de aminoácidos (taurina, betaina e prolina, por exemplo) e metilaminas como o TMAO, identificando a distribuição destes compostos nos diferentes tipos de resíduos protéicos. Inclusive com alteração no estado de protonação de alguns resíduos, como aspartato, glutamato, lisina, arginina e histidina;
- ✓ Conduzir um trabalho experimental e de modelagem computacional para avaliar se a enzima BCL também pode ser perturbada em altas concentrações de sorbitol, acima de $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Isto mostraria estruturalmente como a enzima BCL se comportaria nos extremos de concentrações deste poliol;
- ✓ Avaliar abertura/fechamento de outras enzimas que apresentem mecanismo semelhante de abertura do sítio catalítico (lipases de *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei* e *Thermomyces lanuginosa*, entre outras)¹⁰³ na presença de outros polióis (glicerol, trehalose, manitol e sacarose, por exemplo);
- ✓ Investigar a acessibilidades de substratos ao sítio catalítico da BCL na presença de interfaces. Isto pode ser feito de forma a avaliar como a polaridade de substratos pode influenciar na catálise enzimática, por exemplo, substratos muito hidrofóbicos devem ficar transladando na fase orgânica e mais facilmente entrar no sítio catalítico, assumindo que a enzima rapidamente se oriente na interface. Pode-se também investigar a influência do solvente orgânico neste processo;

Perspectivas

- ✓ Aplicar o método ABF para estudar a dissociação de ligantes da enzima BCL. Pode-se avaliar a dissociação de diferentes substratos (TAGs com cadeias carbônicas variadas em tamanho e saturação) tanto em solução aquosa quanto em interfaces. Isto mostraria um perfil de afinidade do substrato pelo sítio catalítico dependente da orientação enzimática em interfaces. Pode-se também avaliar a dissociação de produtos (ácidos graxos com diferentes tamanhos e saturações) em solução aquosa e interfaces. Neste caso poderia ser estudado um mecanismo alternativo de difusão do produto, considerando a sua migração para fase aquosa (e não pela abertura das α -hélices 5 e 9);

 - ✓ Considerando que esta enzima é uma esterase, com aplicações na produção de ésteres alquílicos (biodiesel), pode-se estudar a influência do solvente utilizado na camada orgânica na difusão dos produtos formados no sítio catalítico. Neste caso o produto formado poderia migrar para a fase hidrofóbica ou hidrofílica de acordo com sua afinidade.
-

Referências

Referências

1. Brockman HL, Momsen WE, Tsujita T. Lipid-Lipid Complexes - Properties and Effects on Lipase Binding to Surfaces. *J Am Oil Chem Soc.* 1988;65(6):891-896. doi:Doi 10.1007/Bf02544505.
2. Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol.* 2006;39(2):235-251. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.10.016.
3. Reis P, Holmberg K, Watzke H, Leser ME, Miller R. Lipases at interfaces: a review. *Adv Colloid Interface Sci.* 2009;147-148:237-250. doi:10.1016/j.cis.2008.06.001.
4. Gandhi NN. Applications of lipase. *J Am Oil Chem Soc.* 1997;74(6):621-634. doi:DOI 10.1007/s11746-997-0194-x.
5. Suh MJ, Clark DJ, Parmer PP, Fleischmann RD, Peterson SN, Pieper R. Using chemical derivatization and mass spectrometric analysis to characterize the post-translationally modified *Staphylococcus aureus* surface protein G. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1804(6):1394-1404. doi:10.1016/j.bbapap.2010.02.006.
6. Reetz MT, Prasad S, Carballeira JD, Gumulya Y, Bocola M. Iterative saturation mutagenesis accelerates laboratory evolution of enzyme stereoselectivity: rigorous comparison with traditional methods. *J Am Chem Soc.* 2010;132(26):9144-9152. doi:10.1021/ja1030479.
7. Liu Y, Meng Z, Shi R, et al. Effects of temperature and additives on the thermal stability of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *J Microbiol Biotechnol.* 2015;25(1):33-43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25179903>.

Referências

-
8. Gangadhara, Ramesh Kumar P, Prakash V. Influence of polyols on the stability and kinetic parameters of invertase from *Candida utilis*: correlation with the conformational stability and activity. *Protein J.* 2008;27(7-8):440-449. doi:10.1007/s10930-008-9154-z.
9. Govan JRW, Hughes JE, Vandamme P. *Burkholderia cepacia*: Medical, taxonomic and ecological issues. *J Med Microbiol.* 1996;45(6):395-407. doi:10.1099/00222615-45-6-395.
10. BURKHOLDER WH. Sour skin, a bacterial rot of {Onion} bulbs. *Phytopathology.* 1950;40(1):115--117.
11. Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, et al. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and Transfer of Seven Species of the Genus *Pseudomonas* Homology Group II to the New Genus, with the Type Species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol Immunol.* 1992;36(12):1251-1275. doi:10.1111/j.1348-0421.1992.tb02129.x.
12. Treichel H, de Oliveira D, Mazutti MA, Di Luccio M, Oliveira JV. A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technol.* 2010;3(2):182-196. doi:10.1007/s11947-009-0202-2.
13. Salum TFC, Villeneuve P, Barea B, et al. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. *Process Biochem.* 2010;45(8):1348-1354. doi:10.1016/j.procbio.2010.05.004.
14. Gilbert EJ. *Pseudomonas* lipases: biochemical properties and molecular cloning. *Enzym Microb Technol.* 1993;15(8):634-645. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7763958>.
15. Andrade LH, Rebelo LP, Netto CGCM, Toma HE. Kinetic resolution of a drug precursor by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized by different methodologies on superparamagnetic nanoparticles. *J Mol Catal B-Enzymatic.* 2010;66(1-2):55-62. doi:10.1016/j.molcatb.2010.03.002.
-

Referências

-
16. Azizi A, Ranjbar B, Khajeh K, et al. Effects of trehalose and sorbitol on the activity and structure of *Pseudomonas cepacia* lipase: Spectroscopic insight. *Int J Biol Macromol.* 2011;49(4):652-656. doi:10.1016/j.ijbiomac.2011.06.025.
 17. Fernandez RE, Bhattacharya E, Chadha A. Covalent immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase on semiconducting materials. *Appl Surf Sci.* 2008;254(15):4512-4519. doi:10.1016/j.apsusc.2008.01.099.
 18. Schulz T, Pleiss J, Schmid RD. Stereoselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase toward secondary alcohols: A quantitative model. *Protein Sci.* 2000;9(6):1053-1062.
 19. You QH, Yin XL, Zhao YP, Zhang Y. Biodiesel production from jatropha oil catalyzed by immobilized *Burkholderia cepacia* lipase on modified attapulgite. *Bioresour Technol.* 2013;148:202-207. doi:10.1016/j.biortech.2013.08.143.
 20. Ollis DL, Cheah E, Cygler M, et al. The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng.* 1992;5(3):197-211. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1409539>.
 21. Kim KK, Song HK, Shin DH, Hwang KY, Suh SW. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure.* 1997;5(2):173-185. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9032073>.
 22. Mezzetti A, Schrag JD, Cheong CS, Kazlauskas RJ. Mirror-image packing in enantiomer discrimination molecular basis for the enantioselectivity of *B.cepacia* lipase toward 2-methyl-3-phenyl-1-propanol. *Chem Biol.* 2005;12(4):427-437. doi:10.1016/j.chembiol.2005.01.016.
 23. PDB. Protein Data Bank. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>.
 24. Trodler P, Schmid RD, Pleiss J. Modeling of solvent-dependent conformational transitions in *Burkholderia cepacia* lipase. *BMC Struct Biol.* 2009;9:38. doi:10.1186/1472-6807-9-38.
-

Referências

25. Barbe S, Lafaquiere V, Guieysse D, Monsan P, Remaud-Simeon M, Andre I. Insights into lid movements of *Burkholderia cepacia* lipase inferred from molecular dynamics simulations. *Proteins.* 2009;77(3):509-523. doi:10.1002/prot.22462.
 26. Burney PR, Pfaendtner J. Structural and Dynamic Features of *Candida rugosa* Lipase 1 in Water, Octane, Toluene, and Ionic Liquids BMIM-PF6 and BMIM-NO3. *J Phys Chem B.* 2013;117(9):2662-2670. doi:10.1021/jp312299d.
 27. Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN. Living with Water-Stress - Evolution of Osmolyte Systems. *Science (80-).* 1982;217(4566):1214-1222. doi:DOI 10.1126/science.7112124.
 28. Singh LR, Poddar NK, Dar TA, Kumar R, Ahmad F. Protein and DNA destabilization by osmolytes: The other side of the coin. *Life Sci.* 2011;88(3-4):117-125. doi:10.1016/j.lfs.2010.10.020.
 29. Murphy KP. *Protein Structure, Stability, and Folding.* Totowa, NJ: Human Press; 2001.
 30. Khan SH, Ahmad N, Ahmad F, Kumar R. Naturally occurring organic osmolytes: From cell physiology to disease prevention. *IUBMB Life.* 2010;62(12):891-895. doi:10.1002/iub.406.
 31. Davis-Searles PR, Saunders AJ, Erie DA, Winzor DJ, Pielak GJ. Interpreting the effects of small uncharged solutes on protein-folding equilibria. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2001;30:271-306. doi:10.1146/annurev.biophys.30.1.271.
 32. Usha R, Ramasami T. Stability of collagen with polyols against guanidine denaturation. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces.* 2008;61(1):39-42. doi:10.1016/j.colsurfb.2007.07.005.
 33. Yancey PH. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp Biol.* 2005;208(15):2819-2830. doi:10.1242/jeb.01730.
-

Referências

-
34. Canchi DR, Garcia AE. Cosolvent effects on protein stability. *Annu Rev Phys Chem.* 2013;64:273-293. doi:10.1146/annurev-physchem-040412-110156.
35. Bennion BJ, Daggett V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(9):5142-5147. doi:10.1073/pnas.0930122100.
36. Rani A, Venkatesu P. Insights into the interactions between enzyme and co-solvents: stability and activity of stem bromelain. *Int J Biol Macromol.* 2015;73:189-201. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.10.068.
37. Rosgen J, Pettitt BM, Bolen DW. Protein folding, stability, and solvation structure in osmolyte solutions. *Biophys J.* 2005;89(5):2988-2997. doi:10.1529/biophysj.105.067330.
38. Borgohain G, Paul S. Model Dependency of TMAO's Counteracting Effect Against Action of Urea: Kast Model versus Osmotic Model of TMAO. *J Phys Chem B.* 2016;120(9):2352-2361. doi:10.1021/acs.jpcb.5b10968.
39. Kumar A, Attri P, Venkatesu P. Effect of polyols on the native structure of alpha-chymotrypsin: A comparable study. *Thermochim Acta.* 2012;536:55-62. doi:10.1016/j.tca.2012.02.027.
40. Xie G, Timasheff SN. Mechanism of the stabilization of ribonuclease a by sorbitol: Preferential hydration is greater for the denatured than for the native protein. *Protein Sci.* 1997;6(1):211-221. doi:10.1002/pro.5560060123.
41. Fonseca LC, Resende Corr??a NC, Garrote-Filho MDS, Da Cunha CC, Penha-Silva N. Efeito da composi????o do solvente sobre a estabilidade de prote??nas em solu????es aquosas. *Quim Nova.* 2006;29(3):543-548. doi:10.1590/S0100-40422006000300024.
42. Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, Karplus M. Charmm - a Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *J Comput Chem.* 1983;4(2):187-217. doi:DOI 10.1002/jcc.540040211.
-

Referências

-
43. MacKerell AD, Bashford D, Bellott M, et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J Phys Chem B.* 1998;102(18):3586-3616.
44. Jorgensen WL, Maxwell DS, TiradoRives J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J Am Chem Soc.* 1996;118(45):11225-11236. doi:Doi 10.1021/Ja9621760.
45. Hermans J, Berendsen HJC, Vangunsteren WF, Postma JPM. A Consistent Empirical Potential for Water-Protein Interactions. *Biopolymers.* 1984;23(8):1513-1518. doi:DOI 10.1002/bip.360230807.
46. Weiner SJ, Kollman PA, Case DA, et al. A New Force-Field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic-Acids and Proteins. *J Am Chem Soc.* 1984;106(3):765-784. doi:Doi 10.1021/Ja00315a051.
47. Verlet L. Computer Experiments on Classical Fluids .I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Phys Rev.* 1967;159(1):98-+. doi:Doi 10.1103/Physrev.159.98.
48. Phillips JC, Braun R, Wang W, et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem.* 2005;26(16):1781-1802. doi:10.1002/jcc.20289.
49. Silveira RL, Martinez J, Skaf MS, Martinez L. Enzyme Microheterogeneous Hydration and Stabilization in Supercritical Carbon Dioxide. *J Phys Chem B.* 2012;116(19):5671-5678. doi:10.1021/jp3017858.
50. Zou Q, Bennion BJ, Daggett V, Murphy KP. The molecular mechanism of stabilization of proteins by TMAO and its ability to counteract the effects of urea. *J Am Chem Soc.* 2002;124(7):1192-1202. doi:10.1021/ja004206b.
51. Bennion BJ, Daggett V. Counteraction of urea-induced protein denaturation by trimethylamine N-oxide: a chemical chaperone at atomic resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(17):6433-6438. doi:10.1073/pnas.0308633101.
-

Referências

-
52. Liu FF, Ji L, Zhang L, Dong XY, Sun Y. Molecular basis for polyol-induced protein stability revealed by molecular dynamics simulations. *J Chem Phys.* 2010;132(22):225103. doi:10.1063/1.3453713.
53. Paul S, Paul S. Exploring the Counteracting Mechanism of Trehalose on Urea Conferred Protein Denaturation: A Molecular Dynamics Simulation Study. *J Phys Chem B.* 2015;119(30):9820-9834. doi:10.1021/acs.jpcb.5b01576.
54. Martinez L, Andrade R, Birgin EG, Martinez JM. PACKMOL: A Package for Building Initial Configurations for Molecular Dynamics Simulations. *J Comput Chem.* 2009;30(13):2157-2164. doi:10.1002/jcc.21224.
55. Guvench O, Mallajosyula SS, Raman EP, et al. CHARMM Additive All-Atom Force Field for Carbohydrate Derivatives and Its Utility in Polysaccharide and Carbohydrate-Protein Modeling. *J Chem Theory Comput.* 2011;7(10):3162-3180. doi:10.1021/ct200328p.
56. Mackerell Jr. AD, Feig M, Brooks 3rd CL. Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *J Comput Chem.* 2004;25(11):1400-1415. doi:10.1002/jcc.20065.
57. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J Chem Phys.* 1983;79(2):926-935. doi:Doi 10.1063/1.445869.
58. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph.* 1996;14(1):27-28-38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8744570>.
59. Song W, Biswas R, Maroncelli M. Intermolecular interactions and local density augmentation in supercritical solvation: A survey of simulation and experimental results. *J Phys Chem A.* 2000;104(30):6924-6939. doi:Doi 10.1021/Jp000888d.
60. Martínez L. MDAnalysis. Version 17.138. Institute of Chemistry. University of Campinas. 2017. <http://leandro.iqm.unicamp.br>.
-

Referências

61. Parajuli R. Does the recent IUPAC definition on hydrogen bonding lead to new intermolecular interactions? *Curr Sci.* 2016;110(4):495-498.
 62. Pauling L. *The Nature of the Chemical Bond and the Structure of Molecules and Crystals; an Introduction to Modern Structural Chemistry*. 3d ed. Ithaca, N.Y.: Cornell University Press; 1960.
 63. Luzar A, Chandler D. Hydrogen-bond kinetics in liquid water. *Nature*. 1996;379(6560):55-57. doi:Doi 10.1038/379055a0.
 64. Chi MC, Wu TJ, Chen HL, Lo HF, Lin LL. Sorbitol counteracts temperature- and chemical-induced denaturation of a recombinant alpha-amylase from alkaliphilic *Bacillus* sp TS-23. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2012;39(12):1779-1788. doi:10.1007/s10295-012-1183-0.
 65. Venkatesu P, Lee MJ, Lin HM. Osmolyte Counteracts Urea-Induced Denaturation of alpha-Chymotrypsin. *J Phys Chem B*. 2009;113(15):5327-5338. doi:10.1021/jp8113013.
 66. Warepam M, Singh LR. Osmolyte mixtures have different effects than individual osmolytes on protein folding and functional activity. *Arch Biochem Biophys*. 2015;573:77-83. doi:10.1016/j.abb.2015.03.017.
 67. Bolen DW. Effects of naturally occurring osmolytes on protein stability and solubility: issues important in protein crystallization. *Methods*. 2004;34(3):312-322. doi:10.1016/j.ymeth.2004.03.022.
 68. Chaitanya PK, Prabhu NP. Stability and activity of porcine lipase against temperature and chemical denaturants. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014;174(8):2711-2724. doi:10.1007/s12010-014-1220-8.
 69. Lang DA, Mannesse ML, de Haas GH, Verheij HM, Dijkstra BW. Structural basis of the chiral selectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase. *Eur J Biochem*. 1998;254(2):333-340. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9660188>.
-

Referências

-
70. Cai YD, Zhou GP, Jen CH, Lin SL, Chou KC. Identify catalytic triads of serine hydrolases by support vector machines. *J Theor Biol.* 2004;228(4):551-557. doi:10.1016/j.jtbi.2004.02.019.
71. Bhattacharyya M, Ghosh S, Vishveshwara S. Protein Structure and Function: Looking through the Network of Side-Chain Interactions. *Curr Protein Pept Sci.* 2016;17(1):4-25. doi:10.2174/138920371666150923105727.
72. Kumar S, Nussinov R. Close-range electrostatic interactions in proteins. *ChemBioChem.* 2002;3(7):604-617. doi:10.1002/1439-7633(20020703)3:7<604::AID-CBIC604>3.0.CO;2-X.
73. Eisenberg D, McLachlan a D. Solvation energy in protein folding and binding. *Nature.* 1986;319(6050):199-203. doi:10.1038/319199a0.
74. Rossky PJ. Protein denaturation by urea: slash and bond. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(44):16825-16826. doi:10.1073/pnas.0809224105.
75. Canchi DR, Paschek D, García AE. Equilibrium study of protein denaturation by urea. *J Am Chem Soc.* 2010;132(7):2338-2344. doi:10.1021/ja909348c.
76. Oliveira IP, Martínez L. Molecular basis for competitive solvation of the Burkholderia cepacia lipase by sorbitol and urea. *Phys Chem Chem Phys.* 2016;18(31):21797-21808. doi:10.1039/C6CP01789D.
77. Ahmad B, Rathar GM, Varshney A, Khan RH. pH-Dependent urea-induced unfolding of stem bromelain: unusual stability against urea at neutral pH. *Biochem.* 2009;74(12):1337-1343. doi:BCM74121642 [pii].
78. Mine Y, Fukunaga K, Itoh K, Yoshimoto M, Nakao K, Sugimura Y. Enhanced enzyme activity and enantioselectivity of lipases in organic solvents by crown ethers and cyclodextrins. *J Biosci Bioeng.* 2003;95(5):441-447. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)80042-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1389-1723(03)80042-7).
-

Referências

-
79. Liu Y, Zhang X, Tan H, Yan Y, Hameed BH. Effect of pretreatment by different organic solvents on esterification activity and conformation of immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase. *Process Biochem.* 2010;45(7):1176-1180. doi:10.1016/j.procbio.2010.03.023.
80. Ritonja A, Rowan AD, Buttle DJ, Rawlings ND, Turk V, Barrett AJ. Stem bromelain: Amino acid sequence and implications for weak binding of cystatin. *FEBS Lett.* 1989;247(2):419-424. doi:10.1016/0014-5793(89)81383-3.
81. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/> acesso em 2017.
82. Kirkwood JG, Buff FP. The Statistical Mechanical Theory of Solutions. I. *J Chem Phys.* 1951;19(6):774. doi:10.1063/1.1748352.
83. NEWMAN KE. Kirkwood-Buff solution theory: derivation and applications. *Chem Soc Rev.* 1994;23(1):31-40. doi:10.1039/CS9942300031.
84. Barnett G V., Razinkov VI, Kerwin BA, et al. Osmolyte Effects on Monoclonal Antibody Stability and Concentration-Dependent Protein Interactions with Water and Common Osmolytes. *J Phys Chem B.* 2016;120(13):3318-3330. doi:10.1021/acs.jpcb.6b00621.
85. Shimizu S, Matubayasi N. Preferential solvation: Dividing surface vs excess numbers. *J Phys Chem B.* 2014;118(14):3922-3930. doi:10.1021/jp410567c.
86. Pierce V, Kang M, Aburi M, Weerasinghe S, Smith PE. Recent applications of Kirkwood-Buff theory to biological systems. *Cell Biochem Biophys.* 2008;50(1):1-22. doi:10.1007/s12013-007-9005-0.
87. Shimizu S, Matubayasi N. Preferential hydration of proteins: A Kirkwood-Buff approach. *Chem Phys Lett.* 2006;420(4-6):518-522. doi:10.1016/j.cplett.2006.01.034.
-

Referências

-
88. Deshpande RA, Khan MI, Shankar V. Equilibrium unfolding of RNase Rs from Rhizopus stolonifer: pH dependence of chemical and thermal denaturation. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics.* 2003;1648(1-2):184-194. doi:10.1016/S1570-9639(03)00133-X.
89. Meersman F, Bowron D, Soper AK, Koch MHJ. Counteraction of urea by trimethylamine N-oxide is due to direct interaction. *Biophys J.* 2009;97(9):2559-2566. doi:10.1016/j.bpj.2009.08.017.
90. Lang D a, Mannesse ML, de Haas GH, Verheij HM, Dijkstra BW. Structural basis of the chiral selectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase. *Eur J Biochem.* 1998;254(2):333-340. doi:066/6.
91. Tomić S, Ramek M. Quantum mechanical study of *Burkholderia cepacia* lipase enantioselectivity. *J Mol Catal B Enzym.* 2006;38(3-6):139-147. doi:10.1016/j.molcatb.2005.12.005.
92. Gilbert EJ. *Pseudomonas* lipases: Biochemical properties and molecular cloning. *Enzyme Microb Technol.* 1993;15(8):634-645. doi:10.1016/0141-0229(93)90062-7.
93. Gupta V, Prakash NAU, Lakshmi V, et al. Recognition of active and inactive catalytic triads: A template based approach. *Int J Biol Macromol.* 2010;46(3):317-323. doi:10.1016/j.ijbiomac.2010.01.011.
94. Ionescu RM, Eftink MR. Global analysis of the acid-induced and urea-induced unfolding of staphylococcal nuclease and two of its variants. *Biochemistry.* 1997;36(5):1129-1140. doi:10.1021/bi9609681.
95. Pace CN, Laurens D V, Erickson RE. Urea denaturation of barnase: pH dependence and characterization of the unfolded state. *Biochemistry.* 1992;31(1990):2728-2734. doi:10.1021/bi00125a013.
96. Parsegian VA. Protein-water interactions. *Int Rev Cytol.* 2002;215:1-31. doi:10.1016/S0074-7696(02)15003-0.
-

Referências

-
97. Sapir L, Harries D. Is the depletion force entropic? Molecular crowding beyond steric interactions. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2015;20(1):3-10. doi:10.1016/j.cocis.2014.12.003.
98. Stumpe MC, Grubmüller H. Interaction of Urea with Amino Acids: Implications for Urea-Induced Protein Denaturation. *J Am Chem Soc.* 2007;129(51):16126-16131. doi:10.1021/ja076216j.
99. Warren GL, Do TD, Kelley BP, Nicholls A, Warren SD. Essential considerations for using protein-ligand structures in drug discovery. *Drug Discov Today.* 2012;17(23-24):1270-1281. doi:10.1016/j.drudis.2012.06.011.
100. Finkelstein A V., Galzitskaya O V. Physics of protein folding. *Phys Life Rev.* 2004;1(1):23-56. doi:10.1016/j.plrev.2004.03.001.
101. Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol.* 2006;39(2):235-251. doi:10.1016/j.enzmotec.2005.10.016.
102. Singh AK, Mukhopadhyay M. Overview of fungal lipase: A review. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012;166(2):486-520. doi:10.1007/s12010-011-9444-3.
103. Rehm S, Trodler P, Pleiss J. Solvent-induced lid opening in lipases: A molecular dynamics study. *Protein Sci.* 2010;19(11):2122-2130. doi:10.1002/pro.493.
104. Darve E, Rodríguez-Gómez D, Pohorille A. Adaptive biasing force method for scalar and vector free energy calculations. *J Chem Phys.* 2008;128(14). doi:10.1063/1.2829861.
105. Comer J, Gumbart JC, Hénin J, Lelievre T, Pohorille A, Chipot C. The adaptive biasing force method: Everything you always wanted to know but were afraid to ask. *J Phys Chem B.* 2015;119(3):1129-1151. doi:10.1021/jp506633n.
106. Hénin J, Fiorin G, Chipot C, Klein ML. Exploring multidimensional free energy landscapes using time-dependent biases on collective variables. *J Chem Theory Comput.* 2010;6(1):35-47. doi:10.1021/ct9004432.
-

Referências

-
107. Chipot C, Pohorille A. *Free Energy Calculations-Theory and Applications in Chemistry and Biology*. Vol 86.; 2007.
108. Pohorille A, Jarzynski C, Chipot C. Good practices in free-energy calculations. *J Phys Chem B*. 2010;114(32):10235-10253. doi:10.1021/jp102971x.
109. Batista MRB. Diversidade Conformatinal da Hélice 12 do Receptor PPARgama e suas Implicações Funcionais. Tese Doutorado - Unicamp - Instituto de Química - Campinas/SP. 2016.
110. Secundo F, Carrea G. Mono- and disaccharides enhance the activity and enantioselectivity of Burkholderia cepacia lipase in organic solvent but do not significantly affect its conformation. *Biotechnol Bioeng*. 2005;92(4):438-446. doi:10.1002/bit.20604.
111. Pan S, Liu X, Xie Y, et al. Esterification activity and conformation studies of Burkholderia cepacia lipase in conventional organic solvents, ionic liquids and their co-solvent mixture media. *Bioresour Technol*. 2010;101(24):9822-9824. doi:10.1016/j.biortech.2010.07.107.
112. Ou W Bin, Park YD, Zhou HM. Effect of osmolytes as folding aids on creatine kinase refolding pathway. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002;34(2):136-147. doi:10.1016/S1357-2725(01)00113-3.
113. Viner RI, Clegg JS. Influence of trehalose on the molecular chaperone activity of p26, a small heat shock/alpha-crystallin protein. *Cell Stress Chaperones*. 2001;6(2):126-135.
114. Melo EP, Chen LY, Cabral JMS, Fojan P, Petersen SB, Otzen DE. Trehalose favors a cutinase compact intermediate off-folding pathway. *Biochemistry*. 2003;42(24):7611-7617. doi:10.1021/bi034267x.
115. Romero CM, Albis A, Lozano JM, Sancho J. Thermodynamic study of the influence of polyols and glucose on the thermal stability of holo-bovine α -lactalbumin. *J Therm Anal Calorim*. 2009;98(1):165-171. doi:10.1007/s10973-009-0138-9.
-

Referências

-
116. Zeldovich KB, Shakhnovich EI. Understanding Protein Evolution: From Protein Physics to Darwinian Selection. *Annu Rev Phys Chem.* 2008;59(1):105-127. doi:10.1146/annurev.physchem.58.032806.104449.
117. Tejo BA, Salleh AB, Pleiss J. Structure and dynamics of *Candida rugosa* lipase: The role of organic solvent. *J Mol Model.* 2004;10(5-6):358-366. doi:10.1007/s00894-004-0203-z.
118. Watt MJ, Steinberg GR. Regulation and function of triacylglycerol lipases in cellular metabolism. *Biochem J.* 2008;414(3):313-325. doi:10.1042/BJ20080305.
119. Jaeger K ???E, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, van Heuvel M, et O. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev.* 1994;15(1):29-63. doi:10.1111/j.1574-6976.1994.tb00121.x.
120. Aloulou A, Rodriguez JA, Fernandez S, van Oosterhout D, Puccinelli D, Carrière F. Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2006;1761(9):995-1013. doi:10.1016/j.bbalip.2006.06.009.
121. Schmid RD, Verger R. Lipases : Interfacial Enzymes with Attractive Applications. *Angew Chem Int Ed.* 1998;37(12):1608-1633. doi:10.1002/(SICI)1521-3757(19980619)110:12<1694::AID-ANGE1694>3.0.CO;2-3.
122. Stauch B, Fisher SJ, Cianci M. Open and closed states of *Candida antarctica* lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation. *J Lipid Res.* 2015;56:2348-2358. doi:10.1194/jlr.M063388.
123. Verger R, de Haas GH. Enzyme reactions in a membrane model 1: A new technique to study enzyme reactions in monolayers. *Chem Phys Lipids.* 1973;10(2):127-136. doi:10.1016/0009-3084(73)90009-1.
124. Chapus C, Sémériva M, Bovier-Lapierre C, Desnuelle P. Mechanism of pancreatic lipase action. 1. Interfacial activation of pancreatic lipase. *Biochemistry.* 1976;15(23):4980-4987. doi:10.1021/bi00668a006.
-

Referências

-
-
125. Maruyama T, Nakajima M, Uchikawa S, Nabetani H, Furusaki S, Seki M. Oil-water interfacial activation of lipase for interesterification of triglyceride and fatty acid. *J Am Oil Chem Soc.* 2000;77(11):1121-1127. doi:10.1007/s11746-000-0176-4.
 126. Reis P, Miller R, Krägel J, et al. Lipases at interfaces: Unique interfacial properties as globular proteins. *Langmuir.* 2008;24(13):6812-6819. doi:10.1021/la704044k.
 127. Derewenda ZS, Sharp AM. News from the interface: the molecular structures of triacylglyceride lipases. *Trends Biochem Sci.* 1993;18(1):20-25. doi:066/6.
 128. Louwrier A, Drtina GJ, Klibanov AM. On the issue of interfacial activation of lipase in nonaqueous media. *Biotechnol Bioeng.* 1996;50(1):1-5. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19960405)50:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-L.
 129. Kapoor M, Gupta MN. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochem.* 2012;47(4):555-569. doi:10.1016/j.procbio.2012.01.011.