



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**MELINA MOTTIN**

**DINÂMICA MOLECULAR DO RECEPTOR ATIVADOR DA  
PROLIFERAÇÃO DE PEROXISSOMOS  $\gamma$ : ASSOCIAÇÃO  
COM LIGANTES E PROTEÍNAS CORREGULATÓRIAS**

**CAMPINAS  
2015**

**MELINA MOTTIN**

**DINÂMICA MOLECULAR DO RECEPTOR ATIVADOR DA  
PROLIFERAÇÃO DE PEROXISSOMOS  $\gamma$ : ASSOCIAÇÃO  
COM LIGANTES E PROTEÍNAS CORREGULATÓRIAS**

**Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade Estadual de Campinas  
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção  
do título de Doutora em Ciências**

**Orientador: Prof. Dr. Munir Salomão Skaf**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA  
PELA ALUNA MELINA MOTTIN, E ORIENTADA PELO PROF. DR. MUNIR  
SALOMÃO SKAF.**

**CAMPINAS  
2015**

Agência de fomento: FAPESP  
Nº processo: 2011/22735-7

Ficha catalográfica Universidade  
Estadual de Campinas Biblioteca do  
Instituto de Química  
Simone Lucas Gonçalves de Oliveira – CRB 8/8144

M859d Mottin, Melina, 1981-  
Dinâmica molecular do receptor ativador da proliferação de peroxissomos  
Y: associação com ligantes e proteínas corregulatórias / Melina Mottin. --  
Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Munir Salomão Skaf.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Receptor nuclear. 2. Dinâmica molecular. 3. *Docking* proteína-proteína. 4.  
Método de força adaptativa. 5. Dinâmica molecular acelerada. I. Skaf, Munir  
Salomão. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Molecular dynamics of the peroxisome proliferator-activated receptor  
Y: association with ligands and coregulatory proteins

**Palavras-chave em inglês:**

Nuclear receptor

Molecular dynamics

Protein-protein docking

Adaptative biasing force

Accelerated molecular dynamics

**Área de concentração:** Físico-Química

**Titulação:** Doutora em Ciências

**Banca examinadora:**

Munir Salomão Skaf [Orientador]

Alessandro Silva Nascimento

Lucas Bleicher

Leandro Martínez

Nelson Henrique Morgon

**Data de defesa:** 25-09-2015

**Programa de Pós-Graduação:** Química

## **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Munir Salomão Skaf (Orientador)

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

Prof. Dr. Lucas Bleicher (ICB-UFMG)

Prof. Dr. Leandro Martínez (IQ-UNICAMP)

Prof. Dr. Nelson Henrique Morgon (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 pela aluna **MELINA MOTTIN**, aprovada pela Comissão Julgadora em 25 de setembro de 2015.

# Agradecimentos

- Aos meus pais, pelo amor, pela paciência, pelo incentivo, por compreenderem a minha ausência. Em especial, à minha querida mãe, pelo exemplo de mulher e por me ensinar a ser perseverante.
- À minha irmã, pelo carinho, pela compreensão e por cuidar dos meus pais na minha ausência.
- Ao Leandro, pelo amor, pelo incentivo, pelas conversas e pela companhia. À D. Ingrid e ao Sr. Arão, por serem minha família em Goiânia.
- Ao Munir, pela oportunidade de vir para Unicamp, pelos ensinamentos científicos e de vida que me proporcionou.
- Ao pessoal do laboratório, Clarisse, Érica, Denise, Ivana, Jorge, Paulo, Rodrigo, Susan, Tatiana e Thiago, pela companhia agradável e pelas discussões científicas.
- Ao Paulo, Rodrigo e Leandro Martínez, por disponibilizarem seus programas de análise.
- Ao Paulo, pelas discussões científicas, por ler e sugerir correções nessa Tese, pelos “vale-ciência”, pela amizade, pelas conversas e pela dança.
- À Clarisse, pela amizade, pelos conselhos, por me mostrar novas formas de olhar as coisas e pelo incentivo a vir para Campinas.
- À Ivana, pela companhia, pelas experiências extraordinárias que vivenciamos juntas, pelas conversas e pelas loucuras.
- Ao pessoal da informática, Adriano, Zanotto e Eduardo, em especial ao Adriano pela gentileza, por ajudar com cluster, compras e burocracias.

- Ao pessoal do “laboratório inimigo”, Gabriel, Tayane, Mariana, Luciano, Emília, pela companhia nos almoços e pela diversão no Metropoly. Em especial, ao Gabriel pelas conversas, pela paciência e pela correção dessa Tese.
- Aos amigos da época da Farmácia UFRGS, Cris, Pat, Marcelino e Aline, pelos encontros e pela troca de experiências.
- À minha segunda família, Shelley, Rafa, Ale e Bento.
- À amiga Lúcia, que tive o prazer e a sorte de reencontrar em Campinas, ao querido tenorzinho, Rodrigo, que alegrou minhas manhãs, ao tio Marco e tia Rúbia pelo carinho e pelo zelo.
- Aos amigos que fiz em Campinas, em especial, Mari, Ive, Ed e Ednaldo, pela companhia sempre agradável.
- Ao pessoal do forró, Guilherme, Gabriel, Beto, Clarisse, Daniel, por tantas danças.
- Aos meus amigos e vizinhos, Pri e Danilo, pelas conversas, pelos almoços, e pela companhia.
- À Isabela e à Amélia, pelo suporte e pelos ensinamentos.
- À Unicamp, seus professores e funcionários.
- À CPG, em especial, à Bel pela paciência e pelos esclarecimentos.
- À Daphne e à Ágata.
- À Fapesp, pelo suporte financeiro.

## Resumo

O Receptor Ativador da Proliferação de Peroxissomos  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) é um fator de transcrição e desempenha um papel importante na regulação do metabolismo de glicose e lipídios. Por isso, tem muitas implicações em doenças metabólicas da vida moderna como diabetes, obesidade e doenças cardiovasculares. Um dos mecanismos de modulação desse receptor é a fosforilação via a enzima quinase ciclina-dependente 5 (Cdk5). O PPAR $\gamma$  estando fosforilado, desregula um grande conjunto de genes cuja expressão é modificada na obesidade. Porém, pesquisas recentes mostram que ligantes de PPAR $\gamma$  podem bloquear essa fosforilação. Nesse contexto, utilizamos técnicas computacionais, em especial simulações de dinâmica molecular, para abordar dois problemas específicos: 1) Investigação da interação do PPAR $\gamma$  com a enzima Cdk5/p25, na qual obtivemos um modelo estrutural do complexo PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25, que é consistente com o mecanismo enzimático da reação e com características estruturais dos complexos heterodiméricos PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$  e RXR $\alpha$ -VDR ligados ao DNA. Nosso modelo mostra que, além do sítio ativo, as regiões de interação entre as duas proteínas devem envolver dois sítios de *docking* distal, compostos pelo  $\Omega$ -loop do PPAR $\gamma$  e lobo N-terminal da Cdk5 e pelas fitas  $\beta$  do PPAR $\gamma$  e o lobo C-terminal da Cdk5. Essas regiões do PPAR $\gamma$  estão relacionadas com a transativação e interação do receptor com ligantes. Nossos resultados sugerem que a estabilização das regiões de fitas  $\beta$  e  $\Omega$  loop por ligantes de PPAR $\gamma$  podem ser importantes para inibir a fosforilação mediada pela Cdk5. 2) Estudo da proposta estrutural do complexo PPAR $\gamma$ -SR1664, no qual mostramos através de simulações dinâmica molecular que esse ligante pode apresentar diferentes modos de ligação dentro da cavidade da proteína, interagindo principalmente com o resíduo R288 (H3) e S342 (fita  $\beta$ ), sendo esse último, relacionado com o bloqueio da fosforilação da S245 do PPAR $\gamma$ . Além disso, mostramos que a interação do SR1664 com o  $\Omega$  loop é bastante favorável, o que poderia ser uma forma de manter parte do  $\Omega$  loop próximo ao LBD do receptor, impedindo a interação e acomodação da enzima Cdk5.

# Abstract

The peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) is an important transcription factor that plays a major role in the regulation of glucose and lipid metabolisms and has, therefore, many implications in modern-life metabolic disorders such as diabetes, obesity, and cardiovascular diseases. One of the PPAR $\gamma$  modulation mechanisms is through the phosphorylation by the cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5). The phosphorylated-PPAR $\gamma$  deregulates a set of genes whose expression is modified in obesity. However, recent research show that PPAR $\gamma$  ligands could block the phosphorylation reaction. In this context, we use computational techniques, mainly molecular dynamics simulations, to address two specific problems: 1) Investigation of the PPAR $\gamma$  interaction with the kinase Cdk5/p25, in which we obtained PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25 structural models that are consistent with the mechanism of the enzymatic reaction and with overall structural features of the full length PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$  and RXR $\alpha$ -VDR heterodimers bound to DNA. In addition to the active site, our model shows that the interacting regions between the two proteins should involve two distal *docking* sites, comprised of the PPAR $\gamma$   $\Omega$ -loop and Cdk5 N-terminal lobe and the PPAR $\gamma$   $\beta$ -sheet and Cdk5 C-terminal lobe. These sites are related to PPAR $\gamma$  transactivation and directly interact with PPAR $\gamma$  ligands. Our results suggest that  $\beta$ -sheets and  $\Omega$ -loop stabilization promoted by PPAR $\gamma$  agonists could be important to inhibit Cdk5-mediated phosphorylation. 2) Study of the structural propose PPAR $\gamma$ -SR1664 complex, through molecular dynamics, which showed that this ligand may have different binding modes within the cavity of the protein, especially interacting with R288 (H3) and S342 residues, the latter being related to the blocking phosphorylation of S245 PPAR $\gamma$  residue. Furthermore, we show that the interaction of the ligand with the  $\Omega$  loop is quite favorable, which could be a way to keep part of the loop  $\Omega$  near to LBD receptor, preventing Cdk5 interaction and accommodation.

# Lista de Abreviaturas

ABF – Método de Força Adaptativa (*Adaptive biasing force*)

ADP - Difosfato de Adenosina (*Adenosine Diphosphate*)

AF - Função de Aativação (*Activation Function*)

aMD - Dinâmica Molecular Acelerada (*Accelerated Molecular Dynamics*)

APF – *Atomic Properties Field*

ATP - Trifosfato de Adenosina (*Adenosine Triphosphate*)

Cdk - Quinase Ciclina-Dependente (*Cyclin-Dependent Kinase*)

CX-MS - Espectrometria de Massas Acoplada a Ligação Cruzada (*Chemical Cross-linking Mass Spectrometry*)

DBD - Domínio de Ligação ao DNA (*DNA Binding Domain*)

DNA - Ácido desoxirribonucléico (*Desoxyribonucleic acid*)

ERK - Quinase Extracelular Sinal-regulada (*Extracellular Signal-regulated Kinase*)

GQ16 - 5-(5-bromo-2-metóxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-thiazolidina-2,4-diona

H/DX - Troca Isotópica Hidrogênio-Deutério por Espectrometria de Massas (*Hydrogen-Deuterium Exchange Mass Spectrometry*)

H12 - Hélice 12

LBD - Domínio de Ligação ao Ligante (*Ligand binding domain*)

LBP - Cavidade de Ligação ao Ligante (*Ligand binding pocket*)

MAPKs - Proteínas Quinase Ativadas por Mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinases*)

MEK - *MAP kinase/ERK kinase*

MD - Dinâmica Molecular (*Molecular Dynamics*)

NR - Receptor Nuclear (*Nuclear receptor*)

PDB - *Protein Data Bank*

PPAR - Receptor Ativador da Proliferação de Peroxissomos (*Peroxisome proliferator-activated receptor*)

p25 - Isoforma Proteolítica da p35 (*proteolytic isoform of p35*)

QM - Mecânica Quântica (*Quantum Mechanics*)

RAR – Receptor de Ácido Retinóico (*Retinoid Acid Receptor*)

RMN - Ressonância Magnética Nuclear (*Nuclear Magnetic Resonance*)

RMSD - Desvio Quadrático Médio (*Root Mean Squared Deviation*)

RMSF - Flutuação Quadrática Média (*Root Mean Squared Fluctuation*)

RSG - Rosiglitazona

RXR - Receptor do Ácido 9-cis Retinóico (*Retinoid X receptor*)

SANS - Espalhamento de Nêutrons a Baixo Ângulo (*Small-angle Neutron Scattering*)

SAXS - Espalhamento de Raio-X a Baixo Ângulo (*Small-angle X-ray Scattering*)

SR1664 - (S)-4'-((5-((1-(4-nitrofenil)etil)carbamoil)-1H-indol-1-il)methyl)-[1,1'-bifenil]-2-ácido carboxílico.

TZD - Tiazolidinediona (*Thiazolidinedione*)

vdW – van der Waals

# Sumário

1	Introdução.....	14
1.1	Diabetes mellitus tipo 2.....	14
1.2	Tratamento Farmacológico da Diabetes tipo 2.....	15
1.3	Receptores Nucleares.....	17
1.4	Estrutura e Mecanismo de ativação dos NRs.....	18
1.5	Receptores Ativadores da Proliferação de Peroxissomos (PPAR).....	20
1.5.1	Receptor Ativador da Proliferação de Peroxissomos $\gamma$ (PPAR $\gamma$ ).....	20
1.5.1.1	Aspectos Estruturais do PPAR $\gamma$ .....	21
1.5.1.2	Modulação do PPAR $\gamma$ .....	22
1.5.1.3	Mecanismo clássico de ativação.....	23
1.5.1.4	Mecanismo alternativos de ativação.....	24
1.5.1.4.1	Fosforilação.....	25
1.5.1.5	Ligantes de PPAR $\gamma$ .....	29
1.6	Proteína quinase ciclina-dependente 5 (Cdk5).....	31
2	Métodos Computacionais para o estudo de proteínas.....	34
2.1	Simulação Dinâmica Molecular.....	35
2.1.1	Etapas envolvidas na simulação.....	38
2.2	Simulação Dinâmica Molecular Acelerada.....	39
2.3	<i>Docking</i> Proteína-Proteína.....	42
2.4	Método da Força Adaptativa ( <i>Adaptative biasing force</i> ).....	43
3	Estudo da interação entre PPAR $\gamma$ e Cdk5/p25.....	45
3.1	Contextualização.....	45
3.2	Metodologia.....	46
3.2.1	<i>Docking</i> Proteína-proteína.....	46
3.2.2	Preparação das estruturas PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25.....	46
3.2.3	Refinamento dos modelos PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25.....	47
3.2.4	Dinâmica Molecular PPAR $\gamma$ –livre e com ligantes.....	49
3.2.5	Dinâmica Molecular Acelerada do LBD do PPAR $\gamma$ –livre e com ligantes.....	50
3.2.6	Dinâmica Molecular dos modelos PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25.....	51
3.3	Resultados e Discussão.....	51
3.3.1	Predição da estrutura PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25.....	51
3.3.2	<i>Docking</i> Proteína-Proteína.....	53
3.3.3	Refinamento das estruturas de <i>docking</i> .....	56
3.3.4	Relaxação e estabilização estrutural dos modelos PPAR $\gamma$ -Cdk5.....	61
3.3.5	Caracterização dos modelos Cdk5/p25-PPAR $\gamma$ .....	62
3.3.6	<i>Insights</i> sobre a função do PPAR $\gamma$ e a inibição da fosforilação pela Cdk5.....	67
4	Proposta de modelo estrutural para o complexo PPAR $\gamma$ - SR1664.....	70
4.1	Contextualização.....	70
4.2	Metodologia.....	71
4.2.1	<i>Docking</i> Farmacofórico PPAR $\gamma$ -SR1664.....	71
4.2.2	Parametrização do ligante SR1664.....	71

4.2.3 Simulações PPAR $\gamma$ -SR1664. ....	77
4.3 Resultados e Discussão.....	78
4.3.1 Docking Farmacofórico.....	78
4.3.2 Simulações do complexo PPAR $\gamma$ -SR1664.....	82
4.3.2.1 Relaxação e estabilização da estrutura PPAR $\gamma$ -SR1664.....	82
4.3.2.2 Interações do $\Omega$ loop na estrutura do PPAR $\gamma$ -SR1664.....	89
4.3.2.3 Comparação dos modos de ligação de ligantes de PPAR $\gamma$ .....	90
5 Conclusões e Perspectivas.....	96
Referências.....	98

# Capítulo 1

## Introdução

Nesta Tese, são reportados os principais resultados da pesquisa que desenvolvemos sobre o receptor nuclear PPAR $\gamma$  e sua interação com a enzima quinase Cdk5/p25. A fosforilação do PPAR $\gamma$  pela Cdk5/p25 tem implicações sobre ativação e atividade do receptor. Além disso, estudamos a interação entre o receptor e protótipos a fármacos com diferentes graus de agonismo, em uma tentativa de compreender a influência desses na reação de fosforilação. Os ligantes estudados foram: o agonista total rosiglitazona (RSG), o agonista parcial GQ16 e o não-agonista SR1664. Para isso, utilizamos técnicas de dinâmica molecular associadas a outras técnicas computacionais.

A Tese está dividida em 5 capítulos. No primeiro capítulo, há uma breve introdução sobre a diabetes e as opções farmacológicas para o tratamento da doença. Além disso, fazemos uma revisão bibliográfica sobre receptores nucleares, dando enfoque ao PPAR $\gamma$ , que está relacionado com a diabetes tipo 2, sua estrutura, formas de modulação e ligantes. Também será abordada nesse primeiro capítulo uma breve introdução sobre a enzima quinase Cdk5/p25, sua estrutura, substratos e locais de ação. O segundo capítulo aborda a metodologia utilizada para os estudos, baseada em simulações de dinâmica molecular. Os resultados obtidos para a predição da estrutura do complexo PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25 e proposta de modelo estrutural do sistema PPAR $\gamma$ -SR1664 serão apresentados no terceiro e quarto capítulos, respectivamente. As conclusões finais e perspectivas serão expostas no quinto capítulo.

## 1.1 Diabetes mellitus tipo 2

A diabetes *mellitus* é uma doença metabólica, caracterizada por um aumento anormal da glicose plasmática. São conhecidos vários tipos da doença, mas o mais prevalente em adultos é a diabetes tipo 2, relacionada à incapacidade de absorção de glicose pelas células musculares e adiposas. Apesar de ser uma doença assintomática em seus estágios iniciais, o tempo de exposição ao excesso de glicose plasmática pode causar diversas complicações. Doença

cardiovascular, retinopatia (principal causa de cegueira), nefropatia (ocasionando tratamentos de diálise e transplante renal) e alterações/complicações nos membros inferiores (o chamado pé diabético, que pode levar a amputações) são alguns exemplos das complicações que causam grandes prejuízos aos pacientes, tanto físicos quanto psicológicos, devido às hospitalizações, invalidez e morte prematura.<sup>1,2</sup> Além disso, está frequentemente associada à síndrome metabólica, que se caracteriza por resistência à insulina, obesidade, dislipidemia e hipertensão arterial. A síndrome metabólica é responsável pela maior mortalidade por doenças cardiovasculares, tanto em indivíduos obesos quanto em diabéticos tipo 2.<sup>2</sup>

Devido, principalmente, à alimentação baseada em produtos, que contém elevados níveis de açúcar, e à falta de atividade física, a diabetes tipo 2 tem sido considerada uma das grandes epidemias mundiais do século XXI. O tipo 2 da doença que antes só ocorria em adultos e idosos, hoje também atinge crianças e adolescentes. O número de indivíduos com diabetes nos coloca a par da magnitude do problema. Em termos mundiais, 240 milhões de pessoas apresentavam a doença em 2005 e a projeção para o ano de 2030 sobe para 366 milhões.<sup>3</sup> Por isso, a prevenção da doença e de suas complicações crônicas são questões importantes a serem estudadas.

## 1.2 Tratamento Farmacológico da Diabetes tipo 2

Várias classes de fármacos antidiabéticos estão disponíveis para o tratamento da doença. Esses agentes melhoram o metabolismo glicídico por mecanismos distintos e seus efeitos são aditivos (podem ser usados em monoterapia ou combinados). As principais opções farmacológicas atuais são: (i) secretagogos de insulina, (ii) inibidores da alfa-glicosidase, (iii) inibidores da enzima dipeptidil peptidase 4 (DPP-4), (iv) inibidores da enzima cotransportadora de sódio-glicose 2 (SGLT-2) e (v) sensibilizadores de insulina.<sup>4</sup> Na Tabela 1, apresentamos os principais fármacos dessas classes, suas ações e efeitos adversos.

Entre os medicamentos orais para o tratamento do diabetes tipo 2, a classe dos secretagogos de insulina estão entre os mais utilizados, embora a maioria das recomendações médicas preconize a utilização inicial de sensibilizadores de insulina, para diminuir a resistência do organismo à insulina e melhorar a função da célula  $\beta$  pancreática.<sup>4</sup> Os principais agentes sensibilizadores de insulina são a metformina e a classe das tiazolidinedionas.<sup>4</sup> A metformina, pertence à classe das biguanidas, e seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente esclarecido.

Sabe-se que ela melhora a captação muscular e a produção hepática de glicose. Cerca de 5% dos pacientes diabéticos não consegue utilizar esse medicamento devido a intolerância gastrointestinal. A alternativa para esses pacientes e para aqueles com resistência à insulina não totalmente controlada é a utilização das tiazolidinedionas. O mecanismo de ação dessas está relacionado a uma proteína, o receptor nuclear PPAR $\gamma$ , envolvido no metabolismo de glicose e lipídios (armazenamento de ácidos graxos), diminuindo também a liberação de citocinas inflamatórias que influenciam positivamente na sinalização insulínica.<sup>4</sup>

Tabela 1: Principais fármacos e respectiva ação no tratamento da diabetes tipo 2

<b>Classe de fármacos</b>	<b>Agente</b>	<b>Principal ação</b>	<b>Efeitos adversos</b>
secretagogos de insulina <sup>4</sup>	glibenclamida, gliclazida, repaglinida	estimulam a produção endógena de insulina pelas células $\beta$ do pâncreas	hipoglicemia e ganho de peso
inibidores da alfa-glicosidase <sup>4</sup>	acarbose	retardam a velocidade de absorção de carboidratos	flatulência, diarreia, dores abdominais e elevação das transaminases
inibidores da DPP-4 <sup>4</sup>	sitagliptina, vildagliptina	aumentam a secreção de insulina e inibem a secreção de glucagon, em situação de hiperglicemia	insuficiência cardíaca
inibidores da SGLT-2 <sup>4</sup>	dapaglifozina, empaglifozina	reduzem a reabsorção da glicose nos rins, causando excreção de glicose na urina	prejuízo da função renal, infecções do trato urinário, acidose plasmática
sensibilizadores de insulina <sup>4</sup>	metformina, rosiglitazona	diminuem a resistência do organismo à insulina e melhoram a ação da insulina no metabolismo dos carboidratos	intolerância gastrointestinal, ganho de peso, edema, insuficiência cardíaca congestiva

Os receptores nucleares (*Nuclear receptors*, NR) têm sido alvo de estudo para o tratamento de várias doenças. Eles são essenciais no crescimento embrionário, diferenciação, metabolismo e morte celular. Conseqüentemente, disfunções na sinalização desses receptores ocasionam doenças proliferativas, reprodutivas e metabólicas como câncer, infertilidade,

obesidade e diabetes. Dessa forma, agonistas e antagonistas de NRs estão entre os medicamentos mais comumente usados, exemplos disso são: tamoxifeno usado para tratamento de câncer de mama (liga-se ao receptor de estrógeno); tiazolidinedionas, para diabetes tipo 2 (liga-se ao receptor PPAR $\gamma$ ), dexametasona, para doenças inflamatórias (liga-se ao receptor glicocorticóide).<sup>5</sup>

### 1.3 Receptores Nucleares

Receptores nucleares (*nuclear receptors*, NRs) são proteínas responsáveis pela regulação da transcrição de genes no núcleo celular.<sup>6-10</sup> Na espécie humana, foram identificados 48 genes de receptores nucleares diferentes,<sup>11</sup> envolvidos no desenvolvimento, diferenciação, reprodução e homeostase de células.<sup>6-10</sup>

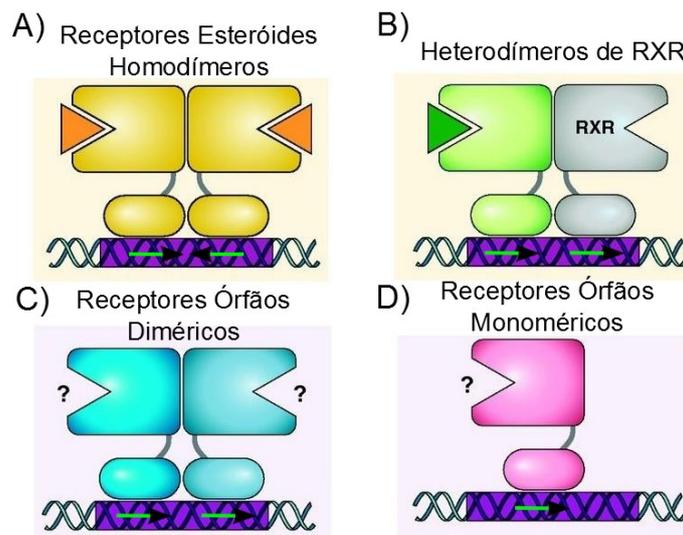


Figura 1: Classes de receptores nucleares: A) receptores esteróides, homodiméricos, ligam-se ao DNA de forma invertida; B) receptores que formam heterodímeros com RXR (receptor retinóide X), ligam-se ao DNA de forma direta; C) receptores órfãos, homodiméricos, ligam-se ao DNA de forma direta; D) receptores órfãos monoméricos. (adaptado de Imai *et al.*)<sup>12</sup>

Essas proteínas podem ser classificadas de acordo com a sua dimerização (se homo ou heterodiméricos) e com padrões de ligação ao DNA (se a ligação às sequências de DNA ocorre em orientação direta ou invertida).<sup>6</sup> Assim, formam quatro classes (Figura 1): receptores esteróides, heterodímeros RXR (receptor do ácido 9-cis retinóico), receptores órfãos diméricos e receptores órfãos monoméricos.

Na classe I, dos receptores esteróides, os receptores formam homodímeros ligante-

induzidos e ligam-se a sequências de DNA em orientação invertida. Essa classe inclui receptores mineralocorticóide (MR), glicocorticóide (GR), além de receptores de progesterona (PR), de estrógeno (ER) e de andrógeno (AR). A classe II é composta por receptores que formam heterodímeros com RXR e, em geral, ligam-se a sequências de DNA em orientação direta. Os receptores de hormônio tireoideano (TR), de vitamina D (VDR), de ácido retinóico (RAR) e receptor ativador da proliferação de peroxissomos (PPAR) pertencem a essa classe. A terceira e quarta classes incluem os receptores órfãos que foram assim denominados, pois não tiveram seus ligantes endógenos identificados quando descobertos. O terceiro grupo inclui homodímeros que se ligam a sequências diretas de DNA, como, por exemplo, fator nuclear hepatócito 4 (HNF-4 $\alpha$ ) e Rev-erb. O quarto grupo é composto por monômeros que ligam-se a fita única de DNA, e tem como exemplos receptores órfãos relacionados ao RAR (RORs).<sup>6,13</sup>

## 1.4 Estrutura e Mecanismo de ativação dos NRs

Em geral, a estrutura dos receptores nucleares é composta por domínios funcionais distintos, que incluem um domínio de transativação N-terminal (AF-1), um domínio de ligação ao DNA (DBD) e um domínio C-terminal de ligação ao ligante (LBD) - Figura 2.<sup>6,8-10,13</sup>

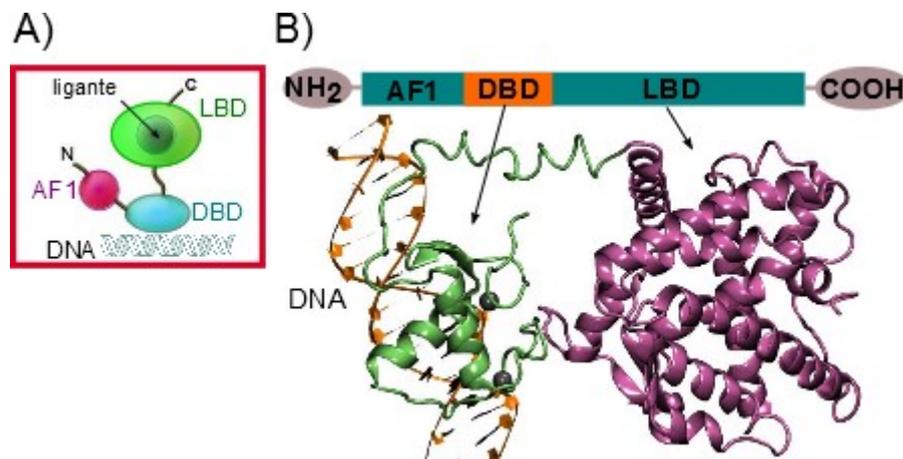


Figura 2: Composição da estrutura dos receptores nucleares: A) esquema mostrando os: domínio de ligação ao ligante (LBD), responsável pela dimerização, silenciamento, interação com ligantes, coativadores e correpressores; domínio de ligação ao DNA (DBD), responsável pelo reconhecimento e ligação à sequência de DNA e domínio de transativação N-terminal (AF-1); B) Estrutura modular dos receptores nucleares, mostrando sua composição desde o N-terminal até o C-terminal, com destaque para as estruturas do DBD, que incluem uma sequência de DNA e do LBD (correspondentes ao receptor PPAR $\gamma$ ).

Somente dois desses domínios foram bem caracterizados estruturalmente, o LBD e o DBD.<sup>13</sup>

Em geral, o domínio com maior número de resíduos é o domínio de ligação ao ligante (*Ligand Binding Domain*, LBD). Esse domínio contém a cavidade de ligação aos ligantes (*Ligand Binding Pocket* ou LBP) e também apresenta superfícies para interagir com proteínas correguladoras (segmentos coativadores e correpressores), bem como superfícies hidrofóbicas de dimerização.

A cavidade de ligação ao ligante pode variar em forma e tamanho, dependendo do NR, e, aparentemente, está correlacionada com a função do receptor.<sup>14</sup> Os receptores que interagem com diversos ligantes tendem a ter LBPs mais volumosos do que receptores que apresentam alta afinidade por poucos ligantes. Além da cavidade de ligação ao ligante, o LBD também contém uma superfície que interage com coativadores/correpressores, chamada AF-2, uma importante região de transativação induzida por ligante. O AF-2 pode adotar diferentes conformações dependendo do receptor e do ligante a que está ligado.<sup>14-16</sup>

O domínio responsável pela ancoragem do receptor em sequências específicas do DNA é conhecido como domínio de ligação ao DNA (*DNA Binding Domain*, DBD) - Figura 2.<sup>15,16</sup> O DBD possui a sequência de aminoácidos mais conservada entre os domínios dos NRs e contém duas  $\alpha$ -hélices perpendiculares entre si. Uma dessas  $\alpha$ -hélices se insere no sulco maior do DNA e é responsável pelo reconhecimento sequência-específico.<sup>17</sup> Além disso, esse domínio também contribui para o processo de dimerização<sup>15,16</sup> e há uma hipótese de que ele possa transmitir movimentos do DNA para o LBD.<sup>18</sup>

O módulo N-terminal AF-1 é uma região de ativação independente do ligante. Apesar disso, o mecanismo pelo qual essa região induz a transcrição ainda não foi compreendido.<sup>15,16,19</sup> Esse módulo é bastante variável em tamanho e composição entre os NRs de diversas espécies e é reconhecido por coativadores e/ou outros fatores de transcrição. Além do domínio AF-1, há também uma região conhecida como “dobradiça”, que se localiza entre o DBD e o LBD. Essa região funciona como via alostérica inter-domínios, podendo regular o movimento relativo do DBD e do LBD ou transmitir movimentos da região C-terminal para a N-terminal, e vice-versa.<sup>20</sup> A estrutura e a funcionalidade dessas duas regiões ainda não foram devidamente elucidadas, principalmente por serem muito móveis e pouco conservadas entre os diferentes NRs.<sup>20</sup>

## 1.5 Receptores Ativadores da Proliferação de Peroxissomos (PPAR)

Os Receptores Ativadores da Proliferação de Peroxissomos (*Peroxisome Proliferator-activated Receptor*, PPAR) são membros da família de receptores nucleares que dimerizam com o RXR (Figura 1B). Os PPARs regulam uma rede de genes envolvidos no metabolismo de lipídios e glicose, inflamação e sistema imune.<sup>21</sup> Em mamíferos, são expressos três subtipos de PPAR ( $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  e  $\gamma$ ) que diferem em *i*) distribuição nos tecidos; *ii*) especificidade em relação aos ligantes e *iii*) função biológica.<sup>22</sup> Enquanto os subtipos  $\alpha$  e  $\beta/\delta$  são expressos em diversos tecidos metabolicamente ativos (fígado, rins, músculos, entre outros), o subtipo  $\gamma$  é expresso predominantemente no tecido adiposo.<sup>22</sup>

O nome PPAR surgiu de uma observação relacionada ao PPAR $\alpha$ , que, quando ativo, em roedores, aumentava significativamente a proliferação de peroxissomos. Apesar de, em humanos, nem o PPAR $\alpha$ , nem os demais subtipos estimular a proliferação de peroxissomos, o nome permaneceu.<sup>23</sup>

Em relação à seletividade de ligantes naturais, o PPAR $\alpha$  é considerado o subtipo mais promíscuo, pois é capaz de ligar uma ampla série de ácidos graxos saturados e insaturados, enquanto o PPAR $\gamma$  é o mais seletivo e possui uma aparente preferência por ácidos graxos poliinsaturados. Enquanto o PPAR $\alpha$  é expresso predominantemente no fígado e está relacionado ao catabolismo de ácidos graxos, o PPAR $\gamma$  é expresso nos adipócitos e está relacionado ao armazenamento de ácidos graxos. Dessa forma, o PPAR $\alpha$  é utilizado no tratamento de dislipidemia, e o PPAR $\gamma$ , no tratamento da diabetes tipo 2. O fato de a maior parte dos fármacos antidiabéticos, as tiazolidinedionas (TZDs), apresentarem alta afinidade e seletividade pelo PPAR $\gamma$  sugere que esse subtipo seja o principal regulador do metabolismo da glicose.<sup>22</sup> O subtipo  $\gamma$  do PPAR será o foco dessa Tese e mais detalhes sobre ele serão discutidos a seguir.

### 1.5.1 Receptor Ativador da Proliferação de Peroxissomos $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )

O subtipo  $\gamma$  do PPAR é o mais estudado dentre os subtipos e está relacionado à formação de tecido adiposo, à sensibilização do organismo à insulina e à regulação dos níveis de glicose plasmática. Além disso, é também um regulador-chave das respostas inflamatórias e imunológicas e do ciclo celular.<sup>24</sup> Por isso, esse NR está envolvido no tratamento da diabetes tipo 2, doença cardiovascular e câncer. De fato, a importância do PPAR $\gamma$  veio à tona quando a

classe de fármacos, que é seletiva ao subtipo  $\gamma$  do PPAR, as tiazolidinedionas (TZD) ou glitazonas, foi descoberta.<sup>25</sup> Dessa forma, o PPAR $\gamma$  consiste em um alvo molecular interessante para o desenvolvimento de novos fármacos, principalmente no tratamento da diabetes tipo 2.<sup>7,23,26</sup>

### 1.5.1.1 Aspectos Estruturais do PPAR $\gamma$

A estrutura do LBD do PPAR $\gamma$  apresenta o arranjo tridimensional comum a todos os receptores nucleares: um sanduíche de  $\alpha$ -hélices, formando três camadas perpendiculares entre si, e pequenas fitas- $\beta$  (Figura 3). Apesar disso, esse receptor apresenta duas características únicas entre os NRs: uma hélice adicional entre as hélices 2 e 3, chamada de hélice 2' e uma cavidade de ligação ao ligante (LBP) acessível e muito volumosa. O grande volume do LBP do PPAR $\gamma$  (1300 Å<sup>3</sup>)<sup>27</sup> fica mais evidenciado quando comparamos ao LBP de outros NRs, como, por exemplo, o ERR3 (*Estrogen-Related Receptor 3*), o AR (*Androgen Receptor*) ou o hER $\alpha$

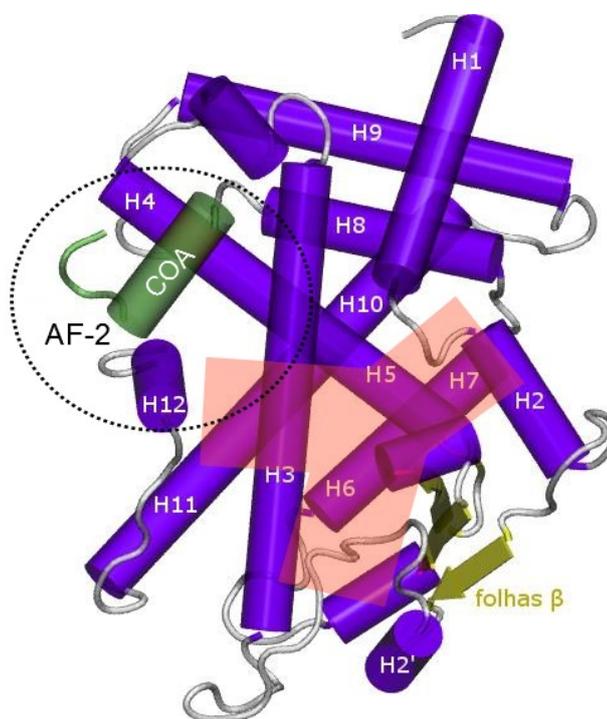


Figura 3: Arranjo tridimensional do LBD do PPAR $\gamma$  (PDB ID:1FM6), indicando a posição das hélices e fitas  $\beta$  (amarelo), peptídeo coativador (verde), superfície AF-2 (formada pelas hélices H12, H4, H3, relacionada à transcrição de genes), destacada pelo círculo pontilhado e esquema da cavidade de ligação aos ligantes ou LBP (região transparente rosa).

(*Human Estrogen Receptor  $\alpha$* ) que apresentam, respectivamente, 220 Å<sup>3</sup>, 340 Å<sup>3</sup>, 400 Å<sup>3</sup> de

volume.<sup>28</sup> Segundo alguns pesquisadores, essa cavidade volumosa sugere que o PPAR $\gamma$  seja um receptor capaz de se ligar a múltiplos ligantes, porém com moderada afinidade.<sup>27</sup>

De modo geral, a LBP dos NRs está localizada atrás da hélice 3 e na frente das hélices 7 e 10 (Figura 3). No PPAR $\gamma$ , a cavidade de ligação ao ligante (LBP) é em forma de Y, onde um dos “braços” permeia as hélices H12, H4 e H3 (região do AF-2); outro está situado entre as hélices H3 e H2 e o terceiro braço se estende da hélice H3 a H2’/fitas  $\beta$ . O LBP é essencialmente hidrofóbico, mas possui resíduos polares/carregados, principalmente situados na região do AF-2.<sup>27,29,30</sup> A superfície AF-2 no LBD é importante pela ativação da transcrição gênica e é ativada pela presença de ligantes agonistas na cavidade.

### 1.5.1.2 Modulação do PPAR $\gamma$

O mecanismo de ativação mais conhecido dos receptores nucleares é o “mecanismo da ratoeira” ou *mousetrap*.<sup>31</sup> Esse mecanismo foi proposto após observação e comparação da estrutura cristalográfica sem ligante do LBD do RXR $\alpha$  com a estrutura do RAR $\gamma$  (*Retinoid Acid Receptor  $\gamma$* ) ativado por ligante e depois generalizado a todos NRs.<sup>13</sup> Nessa proposta, o ligante induz uma alteração conformacional de uma hélice, a hélice 12 (H12) do LBD, para uma conformação fechada (Figura 4A). Essa conformação favorece a interação do receptor com proteínas coativadoras e devido ao impedimento estérico, torna mais difícil a interação com proteínas corressoras. Já na ausência de ligante (estrutura apo) a H12 encontra-se em uma conformação aberta (inativa), conforme ilustrado na Figura 4B.<sup>32</sup> Alguns autores sugerem que esse mecanismo é equivocado, principalmente em relação à conformação da H12 na estrutura

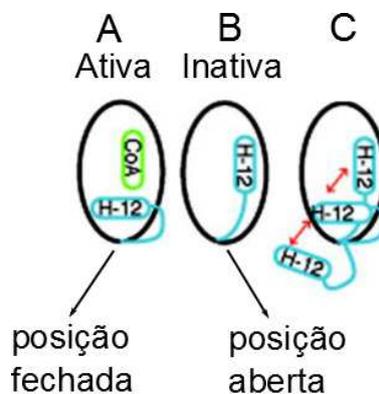


Figura 4: Mecanismo de ativação da ratoeira: A) H12 na conformação ativa (posição fechada, facilita recrutamento de coativador) e B) inativa (posição aberta); C) Mecanismo dinâmico de estabilização da H12: estrutura apo (*ensemble* de conformações da H12). Adaptado de Bruning *et al* 2010.<sup>32</sup>

apo, a qual sugerem ser um artefato e que sua posição se deva a interações de empacotamento cristalino.<sup>13</sup>

Para alguns NRs, observa-se diferenças na posição da H12 nas estruturas cristalográficas apo e holo, mas no caso do PPAR $\gamma$ , ambas estruturas apresentam a H12 em uma posição fechada (ativa). Além disso, não há diferença da conformação da H12 nas estruturas cristalográficas com agonistas parciais ou totais, em ambas a hélice está na conformação ativa, diferentemente de outros NRs, em que a posição dessa hélice é sensível ao grau de agonismo. Isso dificulta a compreensão do mecanismo molecular de ação de agonistas parciais *versus* agonistas totais de PPAR $\gamma$ .<sup>33</sup>

Um mecanismo alternativo para explicar a ativação de NRs por ligantes foi proposto através de estudos de espectroscopia de fluorescência<sup>34</sup> e suportado por ressonância magnética nuclear<sup>35</sup>, conhecido como estabilização dinâmica da H12.<sup>34</sup> Essa proposta, revela a existência de um *ensemble* de conformações da H12 (Figura 4C), na ausência de ligantes (forma apo), que é consideravelmente reduzido quando ligantes agonistas passam a interagir com o receptor. A interação com o ligante promove uma estabilidade conformacional não só da H12, mas do LBD como um todo. Como nesta proposta não há abertura e fechamento da H12, vários autores estudaram como o ligante se associa/dissocia ao NR.<sup>29,30,36-42</sup> Uma hipótese é a de que outras regiões do LBD podem servir de porta para entrada e saída de ligantes. Foram identificados outros caminhos de entrada/saída em regiões diferentes da AF-2 (H12), como, por exemplo, na região das hélices H7 e H11 ou na região das hélices H3, H2',  $\Omega$  loop, fitas  $\beta$ <sup>29,30,42</sup>.

### 1.5.1.3 Mecanismo clássico de ativação

Conforme apontado anteriormente, o mecanismo mais conhecido para ativação ligante-induzida dos NRs envolve mudanças conformacionais ou estabilização da H12.<sup>27,33</sup> Os agonistas totais de PPAR $\gamma$  interagem diretamente com a hélice 12, estabilizando-a em uma conformação ativa, responsável pela transativação do receptor.<sup>33</sup> Isso ocorre através de uma rede de ligação de hidrogênio entre o ligante e os resíduos Y473 (H12), S289 (H3), H323 (H3), H449 (H11) do PPAR $\gamma$ .<sup>33</sup> Em um estudo de 1998, Nolte *et al.* mostram que o contato direto de ligantes com a H12, estabiliza essa conformação agonista e conseqüentemente favorece o sítio de ligação com coativador (superfície AF-2).<sup>27</sup>

Antagonistas de PPAR $\gamma$ , no entanto, obstruem estericamente a conformação agonista da

H12, impedindo a ligação de coativadores ou promovendo a interação com correpressores.<sup>33,43</sup> Os agonistas parciais, em geral, estão posicionados entre a hélice 11 (H11) e a hélice 3 (H3) ou entre a H3 e as fitas  $\beta$ , de forma que não há interação direta entre agonistas parciais e a H12.<sup>44,45</sup> Um exemplo disso foi observado com o agonista parcial GQ16, alvo de estudo na minha Dissertação de Mestrado.<sup>46</sup> Esse ligante, localiza-se atrás da hélice H3, interagindo com as hélices H3, H5 e H6. Observamos através de simulações de dinâmica molecular que, apesar de distante, o GQ16 interage indiretamente com a H12 (por intermédio de uma molécula de água), mantendo-a parcialmente estável, se comparado ao sistema PPAR $\gamma$ -RSG, em que o agonista total RSG interage diretamente com a H12. Essa diferença de comportamento entre os ligantes está de acordo com os estudos funcionais que mostraram que o GQ16 atua como agonista parcial de PPAR $\gamma$ . Esse e outros estudos sugerem que o grau de estabilização da H12 é proporcional ao grau de agonismo e potência de transativação do receptor.<sup>43,46</sup>

#### 1.5.1.4 Mecanismos alternativos de ativação

Além do mecanismo clássico de ativação do PPAR $\gamma$ , existem outras formas de modulação de NRs que envolvem alterações mais globais na dinâmica desses (Figura 5). Como mencionado anteriormente, diferentemente de outros NRs, as estruturas cristalográficas apo e holo do PPAR $\gamma$  não apresentam diferenças na posição da H12 e essa hélice também não se mostra sensível ao grau de agonismo de seus ligantes.<sup>33</sup> Baseados nessas observações, alguns autores acreditam na hipótese de que as diferenças de atividade e modos de ligação ao PPAR $\gamma$  sejam controlados pela dinâmica do receptor, sendo esses efeitos dinâmicos

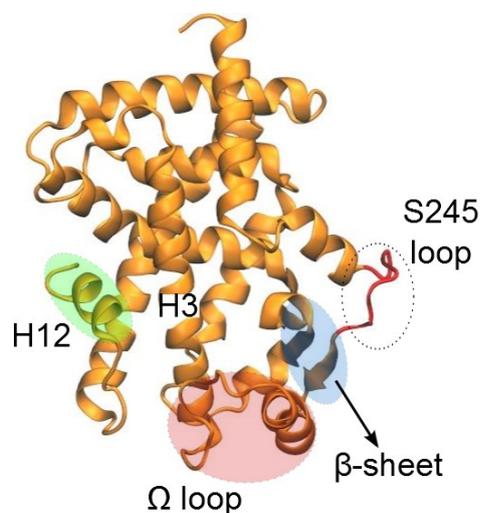


Figura 5: Estrutura do PPAR $\gamma$  destacando as principais regiões de modulação: hélice 12 (H12),  $\Omega$  loop, fitas  $\beta$  e loop da S245.

difícilmente resolvidos por estudos de cristalografia de raio-X.<sup>35</sup> Em um estudo de Waku *et al.* 2009, os autores sugerem que a conformação do  $\Omega$  loop pode ser responsável pela modulação do PPAR $\gamma$ .<sup>47</sup> Nesse trabalho, eles mostram que a interação do PPAR $\gamma$  com ácidos graxos oxidados e prostaglandina J2 promove uma aproximação do  $\Omega$ -loop à H12 e reorientação de resíduos das cadeias laterais da H3. Realizando mutações em resíduos da região do  $\Omega$ -loop/H3

reduziu-se a expressão gênica induzida pelos ligantes, o que sugere que o posicionamento do  $\Omega$ -loop possa ser importante.<sup>47</sup> Bruning e colaboradores, em um estudo de ligantes de PPAR $\gamma$  que promoviam diferentes graus de transativação, mostraram, através de experimentos de troca isotópica de hidrogênio/deutério (H/D-exchange), que somente aqueles ligantes que promoviam um alto grau de transativação (agonistas totais) estabilizavam a região da H12.<sup>43</sup> Os demais ligantes, que proporcionavam graus de transativação intermediários/baixos, somente diminuíram a exposição das fitas  $\beta$  do PPAR $\gamma$  ao solvente, sendo este resultado relacionado a uma estabilização desta região do LBD. Em um estudo mais recente,<sup>35</sup> através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), Hughes *et al* também mostraram que agonistas parciais promoveram uma maior estabilização da região das fitas  $\beta$ , H2, H2' e H7 se comparados a agonistas totais.<sup>35</sup> Os autores ainda relacionam a estabilização das fitas  $\beta$  com outro mecanismo de modulação, a fosforilação do PPAR $\gamma$  na região entre as fitas  $\beta$  e a hélice H2.

#### 1.5.1.4.1 Fosforilação

A fosforilação do PPAR $\gamma$  é o mecanismo regulatório pós-traducional mais investigado para o PPAR $\gamma$ .<sup>21,24,48</sup> Os sítios de fosforilação são os grupo funcionais hidroxila das cadeias laterais de serinas, treoninas ou tirosinas. Até o momento foram identificados dois sítios de fosforilação, em diferentes domínios do PPAR $\gamma$  (Figura 6): *i*) na serina S84, localizada no domínio N-terminal; *ii*) na serina S245, localizada em um loop que conecta as hélices H2 e H2' no LBD.

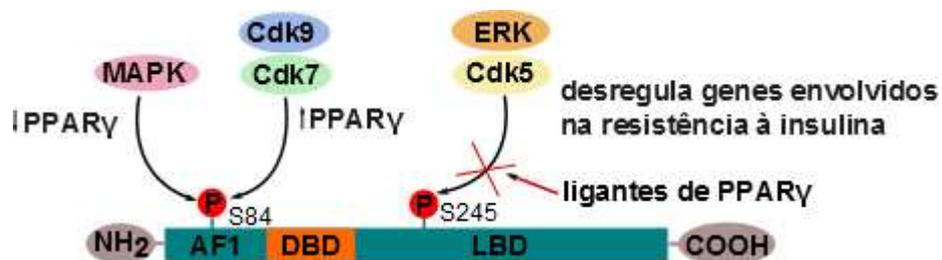


Figura 6: Esquema mostrando os sítios de fosforilação do PPAR $\gamma$ , na estrutura modular desse NR. A serina S84, no domínio AF-1, pode ser fosforilada por três enzimas diferentes, ativando ou reprimindo o receptor. Já a serina S245, localizada no LBD, pode ser fosforilada pela Cdk5 ou ERK, causando a desregulação de uma série de genes envolvidos na resistência à insulina.

O primeiro sítio, S84, pode ser fosforilado por três diferentes quinases: Proteína Quinase Ativada por Mitógenos (MAPKs) e Quinase Ciclina-dependente 7 e 9 (Cdk7 e Cdk9). A MAPK,

ao fosforilar o PPAR $\gamma$ , reprime o receptor, inibindo a ligação do ligante e alterando o recrutamento de cofator. Ao contrário, Cdk7 e Cdk9 ativam o receptor.<sup>21,48</sup> Portanto, a fosforilação do domínio N-terminal pode produzir diferentes resultados transcricionais, dependendo do contexto fisiológico e da quinase envolvida, o que é um resultado bastante intrigante do ponto de vista químico. Estudos *in vivo*, com mutação desse sítio de fosforilação, tiveram resultados discrepantes, sendo necessária uma investigação mais aprofundada para esclarecer a função desse sítio e o papel dessas quinases na regulação do PPAR $\gamma$ .<sup>21</sup>

O segundo sítio, S245, é fosforilado pela enzima quinase Ciclina-dependente 5 (Cdk5).<sup>49</sup> Os estudos relacionados a esse sítio são bastante recentes, mas mostram que a fosforilação da S245 do LBD do PPAR $\gamma$  pela Cdk5 está relacionada à obesidade e à resistência à insulina.<sup>49</sup> Choi *et al.* (2010) mostraram que a fosforilação da S245 pela Cdk5 diminui a expressão de um tipo de adipocina, a adiponectina (regulador central da sensibilidade à insulina), sem ativar ou suprimir a atividade transcricional do PPAR $\gamma$ , induzindo à obesidade.<sup>49</sup> Isso sugere que o estado fosforilado do PPAR $\gamma$  afeta o padrão de genes que são expressos, fazendo aumentar a expressão de adipocinas que induzem adipogênese e diminuir a sensibilização dos tecidos à insulina. A adipogênese tem um papel central no controle e reserva de energia, é o processo em que pré-adipócitos se diferenciam a adipócitos. O aumento do tamanho e número de adipócitos caracterizam a obesidade.

Em outro estudo, dos mesmos autores, um ligante não-agonista de PPAR $\gamma$ , que apresenta boa atividade antidiabética *in vivo*, conseguiu bloquear eficientemente a fosforilação da S245 pela Cdk5. Isso ocorreu sem induzir ganho de peso, sugerindo que é possível desenvolver ligantes agonistas de PPAR $\gamma$ , sem o mecanismo clássico de ativação, somente através do bloqueio da fosforilação do PPAR $\gamma$  pela Cdk5.<sup>50</sup> O estudo mostrou também que agonistas totais, parciais ou não-agonistas de PPAR $\gamma$  são capazes de bloquear essa reação, promovida pela quinase Cdk5.<sup>50</sup> Nesse contexto, o estudo das bases moleculares envolvidas na modulação do PPAR $\gamma$  pela Cdk5/p25 é um assunto bastante promissor atualmente. Ele permite integrar a interação enzima-proteína, possibilitando uma visão mais global do sistema.

Em um estudo deste ano (2015), Banks *et al.* descobriram que outra enzima também pode fosforilar a S245 do PPAR $\gamma$ , a enzima Quinase Extracelular sinal-regulada (ERK).<sup>51</sup> Nesse estudo *in vivo*, os pesquisadores compararam a atividade das enzimas Cdk5, ERK e MEK (*MAP kinase/ERK kinase*).<sup>51</sup> Observaram que não houve fosforilação em animais não-obesos e, em animais obesos, a S245 do PPAR $\gamma$  é fosforilada pelas enzimas Cdk5 e ERK, sendo que a ERK e a MEK são reprimidas pela Cdk5. Em animais deficientes de Cdk5 (especificamente em tecidos adiposos), não houve repressão das enzimas ERK e MEK, apesar disso, houve um

aumento da fosforilação da S245 do PPAR $\gamma$ , promovida pela quinase ERK. Os autores sugerem que a ausência da Cdk5, ativa a enzima ERK e isso ocorre via desrepressão da atividade da MEK. Além disso, os pesquisadores descobriram que tanto Cdk5 quanto ERK fosforilam ambos os sítios S84 e S245, porém ligantes de PPAR $\gamma$ , incluindo tiazolidinedionas, bloqueiam a acessibilidade apenas da S245 por ambas enzimas.<sup>51</sup>

### 1.5.1.5 Ligantes de PPAR $\gamma$

Os receptores de PPAR podem ser ativados pela interação com ácidos graxos provenientes da dieta, além de seus metabólitos oxidados (eicosanóides), que atuam como ligantes endógenos desses NRs. O subtipo  $\gamma$  do PPAR tem como principal agonista endógeno, o eicosanoide 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina 2 (Figura 7), também conhecido como 15d-PG2. Porém, a afinidade do PPAR $\gamma$  pelo 15d-PG2 é baixa, da ordem de micromolar.<sup>7,22</sup>

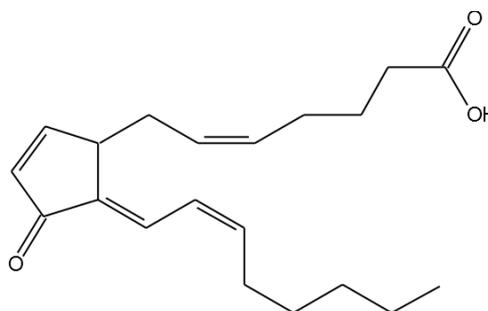


Figura 7: Estrutura do ligante endógeno 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina 2.

Paralelamente à descoberta de ligantes endógenos, ocorreu a descoberta de uma série de ligantes sintéticos capazes de ativar PPAR $\gamma$ .<sup>22,43</sup> Um aspecto muito interessante dessa descoberta é que, mesmo ligando-se ao PPAR $\gamma$  com afinidades semelhantes, esses ligantes podem produzir respostas diferentes, tanto no que diz respeito à intensidade de ativação da transcrição, como também ao padrão de genes que é ativado em cada tipo de tecido, o que por sua vez leva a perfis fisiológicos distintos.

A maioria dos ligantes de PPAR $\gamma$  estudados até hoje são sintéticos. Destaca-se a classe das tiazolidinedionas (TZD) ou glitazonas, que inclui os fármacos: troglitazona, pioglitazona e rosiglitazona (RSG) (Figura 8A, B e C, respectivamente).<sup>25</sup> Desses três exemplares, a troglitazona foi retirada do mercado em 1997 na Inglaterra e em 2000 nos EUA, por ocasionar hepatite fármaco-induzida.<sup>33</sup> Pioglitazona e rosiglitazona ainda estão disponíveis como medicamento em alguns países. A pioglitazona não está disponível na França e Alemanha, por risco de câncer na bexiga. A rosiglitazona não está a venda na Europa e EUA, por seus efeitos cardiovasculares.<sup>22,33</sup>

A rosiglitazona, representante mais estudado da classe, é um agonista total do PPAR $\gamma$  e ativa-o fortemente. Chamamos de agonista, aquele ligante que possui afinidade (capacidade de

se ligar) pelo receptor e aumenta a atividade deste acima do nível basal ou constitutivo. Classificam-se como agonistas totais ligantes que se ligam ao LBD do receptor e evocam resposta máxima do NR. Além disso, promovem uma alteração conformacional no receptor que resulta em alta afinidade de interação deste com peptídeos coativadores.<sup>52</sup> Agonistas parciais também se ligam ao receptor, mas independentemente da dose de ligante o receptor não produz resposta máxima. Esses ligantes promovem uma mudança conformacional que resulta em uma interação mais fraca do NR com coativadores.<sup>52</sup> Antagonistas são ligantes que apresentam afinidade pelo receptor, atenuam o efeito de agonistas, mas não o ativam. A literatura considera que existem dois tipos: antagonista competitivo ou não-competitivo. O antagonista competitivo ocupa a mesma cavidade do receptor que o agonista, mas não o ativa, bloqueando a ação do agonista. Porém, se em presença do antagonista competitivo, aumentarmos a dose de agonista, esse bloqueio é superável. Já o antagonista não-competitivo liga-se a um sítio alostérico (não-agonista) no receptor para impedir a ativação deste.<sup>53</sup>

O agonista total rosiglitazona ativa o PPAR $\gamma$  por interação direta com a hélice 12 (H12), estabilizando-a em uma conformação agonista, que caracteriza o chamado mecanismo clássico de ativação do PPAR $\gamma$ .<sup>27</sup> Dessa forma, apresenta ação antidiabética, reduz a resistência sistêmica à insulina e coordenadamente ativa a adipogênese, armazenando ou mobilizando adipócitos conforme necessário. Além disso, bloqueia a fosforilação mediada pela Cdk5.<sup>46</sup> Apesar de todos os benefícios, os agonistas totais causam alguns efeitos adversos, como: ganho de peso, edema e insuficiência cardíaca congestiva. Isso se deve ao aumento da adipogênese e à retenção de fluidos.<sup>27</sup>

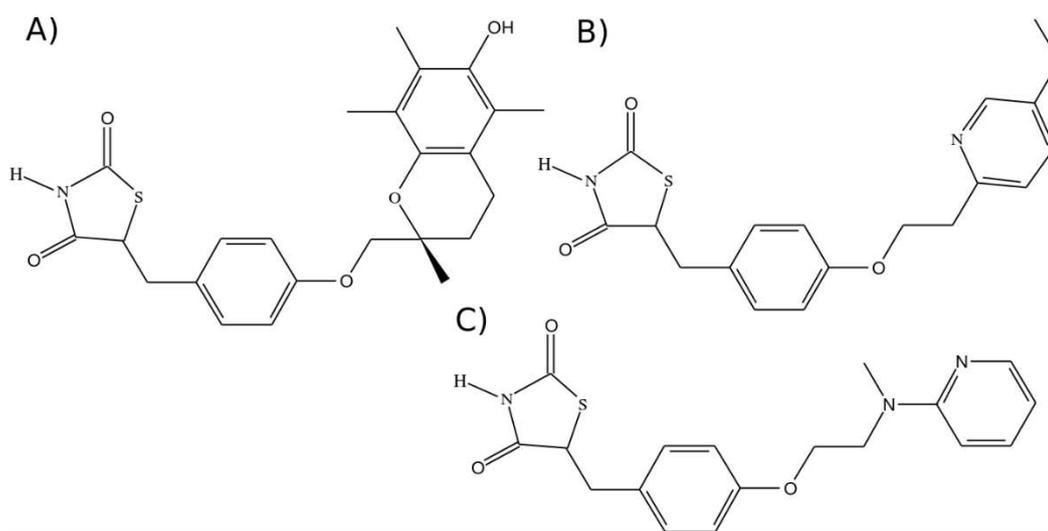


Figura 8: Estrutura molecular dos agonistas totais do PPAR $\gamma$ : A) troglitazona, B) pioglitazona e C) rosiglitazona.

Os agonistas parciais e não-agonistas de PPAR $\gamma$ , no entanto, retêm os efeitos terapêuticos de sensibilização à insulina, sem apresentar os efeitos adversos típicos de agonistas totais. Por isso, é crescente a pesquisa e desenvolvimento de ligantes que não apresentem ação agonista clássica, para contornar efeitos adversos indesejados.

Um exemplo de agonista parcial da classe das TZDs é o GQ16 (Figura 9A).<sup>46</sup> Em estudos funcionais *in vitro*, o GQ16 ativou o PPAR $\gamma$  de forma concentração-dependente, apresentando atividade máxima correspondente a 50% se comparado ao agonista total RSG. Assim como a rosiglitazona, promoveu o bloqueio da fosforilação da S245, mediada pela Cdk5, em ensaios qualitativos *in vitro*. Além disso, apresentou menores efeitos adversos: não ocasionou ganho de peso ou edema em animais.<sup>46</sup> As simulações de dinâmica molecular mostram que o GQ16 interage indiretamente com a H12, através de uma molécula de água, estabilizando-a menos efetivamente do que a RSG.<sup>46</sup>

A recente descoberta de uma nova classe de ligantes, chamados não-agonistas de PPAR $\gamma$ , permitiu desacoplar a atividade antidiabética dos ligantes da capacidade de aumentar as taxas de transcrição, que caracteriza o agonismo.<sup>50,54</sup> No artigo que apresentam essa classe, os autores utilizam o termo não-agonista para se referir a esses ligantes, mas não o definem no trabalho. Conforme apontamos anteriormente, a literatura relaciona o termo não-agonista a antagonistas não-competitivos, que se ligam a um sítio diferente do sítio dos agonistas. No caso do SR1664, para o qual os autores apresentam uma estrutura de *docking* do complexo PPAR $\gamma$ -SR1664 na qual o ligante ocupa o mesmo sítio que agonistas totais, essa definição parece inadequada. Um

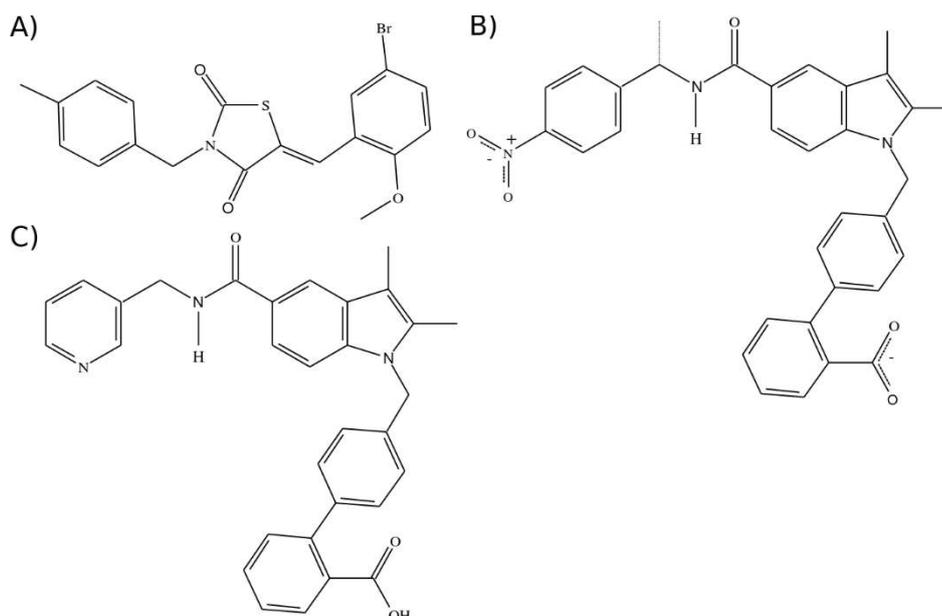


Figura 9: Estrutura molecular dos agonistas parciais e não-agonistas de PPAR $\gamma$ : A) GQ16, B) SR1664 e C) UHC1.

termo mais adequado seria o de antagonista, já que não se sabe ao certo a posição que ele ocupa na cavidade, apesar de antagonizar a ação da RSG.

O primeiro ligante descoberto dessa classe foi o chamado SR1664 (Figura 9B).<sup>50</sup> Esse ligante não apresenta atividade agonista, porém produz efeitos antidiabéticos *in vitro*, sem causar retenção de fluidos, ganho de peso e sem interferir na formação óssea. Ele age especificamente na inibição da fosforilação do PPAR $\gamma$  pela Cdk5.<sup>50</sup> Outro integrante dessa classe é o recém-descoberto UHC1 (Figura 9C).<sup>54</sup> As propriedades químicas e farmacocinéticas do UHC1 são melhores e mais promissoras para uso clínico do que as do SR1664.<sup>54</sup>

O maior desafio da descoberta de novos fármacos que agem sobre o PPAR $\gamma$  continua sendo em relação a reter os benefícios da diminuição da glicose sanguínea e ao mesmo tempo evitar os efeitos adversos indesejados. O equilíbrio entre benefícios e efeitos indesejados é fundamental e garante que o protótipo a fármaco siga as etapas até chegar ao mercado como medicamento. Apesar de vários agonistas parciais de PPAR $\gamma$  terem alcançado as fases II e III dos estudos clínicos em humanos, atualmente, nenhum está disponível no mercado, devido aos seus efeitos adversos ou sua eficácia insuficiente.<sup>33</sup> O desacoplamento entre atividade transcricional e bloqueio da fosforilação da S245 do PPAR $\gamma$  pode representar uma nova direção para discriminar entre benefícios e malefícios desses fármacos. No entanto, a intrigante ação de dois agonistas de PPAR $\gamma$ , amorfrutina B e ácido decanóico,<sup>33</sup> que ativam o PPAR $\gamma$ , sem bloquear a fosforilação da S245 podem indicar que outro mecanismo de ativação do PPAR $\gamma$  seja possível.<sup>33</sup>

Recentemente um grupo de pesquisadores sugeriu um modo de ligação alternativo ao PPAR $\gamma$ , um segundo sítio, que hiperativa o receptor e é possível mesmo quando o LBP canônico esteja covalentemente ligado a ligantes endógenos ou antagonistas irreversível.<sup>55</sup> A localização desse sítio envolve as regiões do  $\Omega$  loop, H2', fitas  $\beta$  e base da H3. Assim estabilizaria indiretamente a região AF-2, através da estabilização da H3, facilitando as interações entre H3 e loop H11/H12, particularmente na presença de um correolador, que estabiliza a posição da H12. Dessa forma, o sítio alternativo afeta tanto o agonismo clássico (aumento da transativação do receptor) quanto a eficácia antidiabética PPAR $\gamma$ -dirigida (aumento de expressão de adiponectina). Anteriormente, um segundo sítio já havia sido descoberto para o subtipo  $\alpha$  do PPAR, envolvendo também a região do  $\Omega$  loop. Neste caso, a presença do ligante nessa região a estabiliza e promove também a estabilização da H12, por pontes salinas, envolvendo o próprio ligante.<sup>56</sup> Os resultados experimentais, utilizando várias técnicas, dentre elas, RMN de <sup>19</sup>F, fluorescência resolvida no tempo, HDX e um ensaio de gene repórter, mostraram que agonistas covalentes não bloqueiam esse segundo sítio alternativo do PPAR $\gamma$ , não havendo sobreposição

com a cavidade canônica. Além disso, a ligação ao sítio alternativo leva a uma mudança conformacional do receptor que afeta sua interação com correpressores, corepressores e a transativação. Porém, ainda não há uma estrutura cristalográfica de um ligante de PPAR $\gamma$  ligado no sítio alternativo. Os resultados desse estudo lançam luz sobre as razões pelas quais os agonistas parciais antidiabéticos não entraram no mercado de medicamentos. A possível existência de um segundo sítio, que hiperativa o receptor e age também através do agonismo clássico, pode ser a causa dos efeitos adversos ainda encontrados em agonistas parciais.

## 1.6 Proteína quinase ciclina-dependente 5 (Cdk5)

A Cdk5/p25 é uma enzima pertencente à família das quinases ciclina-dependentes. Proteínas quinases ciclina-dependentes são heterodímeros, formados por uma subunidade catalítica e uma subunidade regulatória (ciclina) – Figura 10. Comparativamente às outras Cdk, a Cdk5 é considerada atípica, já que não é regulada por ativadores de ciclinas ou por autofosforilação. Ao invés disso, a Cdk5 é regulada por um ativador, a p25, que é a forma truncada do instável coativador p35.<sup>57,58</sup> A associação entre as subunidades p25 e Cdk5 no núcleo celular hiperativa essa enzima quinase.<sup>59</sup> Outra questão que a diferencia das demais Cdk é que ela não está diretamente envolvida na regulação do ciclo celular, como as outras, e dessa forma, não está relacionada a doenças como o câncer.

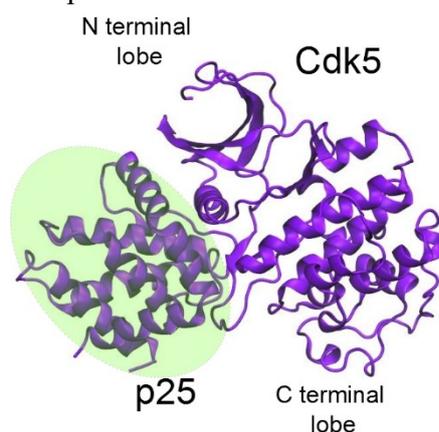


Figura 10: Estrutura da enzima Cdk5 e sua subunidade regulatória p25.

Até agora, já foram identificadas mais de 20 proteínas, de funções diversas, como sendo substratos da enzima Cdk5.<sup>57,60–62</sup> Alguns desses, também são substratos das Cdk1 e Cdk2. Apesar da sobreposição, a expressão ectópica de Cdk5 em células de mamíferos ou leveduras não promove o progresso do ciclo celular, indicando que a Cdk5 tem função distinta frente às outras Cdk mitóticas.<sup>61</sup>

A ação mais estudada da Cdk5 está relacionada ao desenvolvimento neuronal, sendo uma enzima associada a doenças neurológicas degenerativas, como Alzheimer e Esclerose Lateral Amiotrófica.<sup>57,62</sup> Além disso, desempenha um papel no tecido pancreático, estando associada a diabetes tipo 2. Estudos recentes de Choi *et al.* mostram que a Cdk5 é ativada em

ratos obesos, induzidos por dieta rica em gordura. Quando ativa, ela fosforila o PPAR $\gamma$  e, por consequência, desregula a expressão de uma série de genes relacionados à obesidade, sem alterar a capacidade adipogênica do PPAR $\gamma$ .<sup>49</sup> Os mesmos pesquisadores mostraram que agonistas do PPAR $\gamma$  são capazes de bloquear a fosforilação pela Cdk5, independentemente do agonismo clássico que está relacionado com efeitos adversos deletérios.<sup>50</sup> Esse é um aspecto muito interessante, já que os ligantes de PPAR $\gamma$ , comparados aos de Cdk5, são uma forma efetiva e menos impactante de tratar a diabetes, já que a Cdk5 está envolvida em uma série de outras funções, dentre elas o desenvolvimento adequado do sistema nervoso de mamíferos. A desregulação dessa enzima implica em várias doenças degenerativas e sua inibição completa pode também interferir nessas outras funções, sendo preferível agir através de fármacos que afetam especificamente o PPAR $\gamma$ .<sup>33</sup>

Apesar de haver estruturas cristalográficas da Cdk5/p25, ainda não existem estruturas contendo o substrato associado à Cdk5. Também existem poucos estudos em relação aos resíduos que formam o *ATP-binding pocket* da Cdk5. A maioria é sobre a quinase Cdk2, que apresenta em torno de 60% de identidade sequencial com a Cdk5. Por esta razão, pouco se sabe sobre o mecanismo de fosforilação promovido pela Cdk5, apenas que a enzima é direcionada por uma prolina (P) e fosforila uma serina/treonina em uma posição imediatamente após a prolina.<sup>61,63,64</sup> Por homologia à Cdk2, sabe-se que um aspartato da quinase, atua como base catalítica e uma serina/treonina do substrato, atua como nucleófilo.<sup>61</sup> No caso da Cdk5, trata-se do Asp126, que deverá atacar o grupo funcional hidroxila da serina do substrato. A serina desprotonada é então mais facilmente fosforilada. O mecanismo proposto para a fosforilação da serina envolveria as seguintes etapas (Figura 11): o aspartato desprotonado retira o H da hidroxila da serina, o grupo funcional O<sup>-</sup> da serina ataca o grupo funcional fosfato do ATP, forma-se a serina fosforilada e o ADP.



Figura 11: Esquema das etapas da fosforilação: Ataque do aspartato desprotonado à serina, seguido de ataque da serina desprotonada ao fosfato do ATP.

Os estudos recentes sobre interação do PPAR $\gamma$  com proteínas corregulatórias direcionam novas descobertas em relação à modulação do PPAR $\gamma$  e avanço nas pesquisas para o tratamento da diabetes tipo 2. Um dos nossos objetivos neste trabalho foi investigar a interação do PPAR $\gamma$  com a enzima Cdk5/p25 e, dessa forma, compreender as bases moleculares envolvidas no sítio de fosforilação do PPAR $\gamma$ . Para isso, utilizamos diferentes técnicas computacionais a fim de obter um modelo estrutural do complexo PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25. Também tentamos estudar a influência de ligantes, com diferentes graus de agonismo (rosiglitazona, GQ16, SR1664), na dinâmica do loop de fosforilação do PPAR $\gamma$ . Isso implica em elucidar melhor os mecanismos moleculares de inibição da reação de fosforilação promovidos por ligantes de PPAR $\gamma$ . Em relação ao não-agonista SR1664, propusemos um modelo estrutural PPAR $\gamma$ -SR1664 e analisamos os principais modos de ligação desse ligante na cavidade proteica.

## Capítulo 2

### Métodos Computacionais para o estudo de proteínas

Neste trabalho utilizamos diferentes técnicas computacionais para estudar os sistemas envolvendo o receptor nuclear PPAR $\gamma$ . A principal metodologia empregada foi a simulação computacional por dinâmica molecular (*Molecular Dynamics*, MD).

Essa metodologia vem sendo bastante utilizada para o estudo de biomoléculas. Por muitos aspectos da função biomolecular, a MD fornece detalhes importantes desse tipo de sistema, por exemplo, quais os caminhos de entrada/saída de uma molécula de oxigênio na cavidade da mioglobina? Ou de um ligante na proteína? Dessa forma, essa técnica pode ser usada para abordar questões específicas sobre propriedades de um sistema, sendo capaz de amostrar diferentes configurações desse, descrever suas propriedades estruturais e de movimento, auxiliando na compreensão de suas funções.<sup>65,66</sup>

A primeira simulação via dinâmica molecular de proteínas foi feita em 1977,<sup>66</sup> em um estudo sobre uma proteína pequena no vácuo. A partir de então, com o aumento do poder computacional, desenvolvimento de algoritmos e técnicas novas de simulação foi possível realizar simulações cada vez mais longas, de proteínas maiores e em solução. Além disso, a técnica tem se mostrado complementar a outras, utilizadas para o estudo da dinâmica de proteínas como Ressonância Magnética Nuclear, mutações sítio-dirigidas e fluorescência.

Nosso grupo tem feito importantes contribuições para o entendimento estrutural e dinâmico de proteínas, de receptores nucleares e enzimas celulósicas. Realizamos estudos que envolveram mecanismos de dissociação dos ligantes, seletividade de ligantes naturais e sintéticos, além de mecanismos de desnaturação e de difusão térmica.<sup>30,42,39</sup>

Além desta metodologia, utilizamos a técnica de *Docking* proteína-proteína, o Método da Força Adaptativa (*Adaptative biasing force*, ABF) e a Dinâmica Molecular Acelerada (*Accelerated Molecular Dynamics*, aMD), que serão explicadas a seguir.

## 2.1 Simulação Dinâmica Molecular

A simulação computacional de dinâmica molecular é uma ferramenta capaz de fornecer informações detalhadas sobre o comportamento de um sistema e sua evolução no tempo, em escala molecular. Através dessa técnica, determina-se o movimento das partículas de um sistema em nível atômico e assim obtêm-se informações do comportamento dinâmico deste. A partir das coordenadas,  $\vec{r}(t = 0)$ , e das velocidades,  $\vec{v}(t = 0)$ , iniciais dos átomos do sistema, calculam-se força e aceleração seguindo as equações das Leis de Newton,  $\vec{F} = -\nabla U(\vec{r}(t))$  e  $\vec{a} = \vec{F}/m$ , a fim de obter uma trajetória temporal. As coordenadas dos átomos podem ser obtidas através de estrutura cristalográfica, RMN ou *docking*. As velocidades são obtidas aleatoriamente de uma distribuição de Maxwell-Boltzmann. De acordo com Maxwell-Boltzmann, a energia cinética do sistema é determinada pela temperatura conforme a equação 2.1.1:

$$\frac{3}{2} N k_B T = \left\langle \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m_i \vec{v}_i^2 \right\rangle \quad (2.1.1)$$

em que  $N$  é o número de átomos,  $k_B$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura e  $m_i$  e  $\vec{v}_i$  são a massa e a velocidade escalar de cada átomo  $i$ , respectivamente.<sup>67</sup> Além disso, o símbolo  $\langle \dots \rangle$  significa média de *ensemble*. Com o conjunto de velocidades iniciais para as partículas definido, basta determinar as velocidades e coordenadas no instante  $t + \Delta t$ . O algoritmo mais simples para calcular velocidades e coordenadas no instante  $t + \Delta t$  e assim obter a evolução temporal do sistema são através das equações 2.1.2 e 2.1.3:

$$\vec{v}(t + \Delta t) = \vec{v}(t) + \vec{a}(t)\Delta t \quad (2.1.2)$$

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t)\Delta t + \frac{\vec{a}(t)\Delta t^2}{2} \quad (2.1.3)$$

Com as novas posições e velocidades, calculam-se novas forças e atualizam-se  $\vec{r}$  e  $\vec{v}$ . Esse ciclo é repetido consecutivamente gerando as trajetórias moleculares. Nossas simulações foram realizadas com o programa NAMD<sup>68</sup>.

O sistema é tratado classicamente, fornecendo aos átomos a energia potencial advinda da interação intra e intermolecular, através do chamado campo de força. O campo de força descreve a energia potencial total do sistema através de um conjunto de funções empíricas. De modo geral, a energia potencial total de um sistema químico,  $V(r)^{total}$ , pode ser separada em termos para energia potencial de átomos ligados covalentemente,  $V(r)^{ligado}$ , e não-ligados,  $V(r)^{não-ligado}$ , conforme a equação 2.1.4:

$$V(r)^{total} = V(r)^{ligado} + V(r)^{não-ligado} \quad (2.1.4)$$

Na equação 2.1.5 são mostradas as funções que modelam as interações entre os átomos covalentemente ligados no campo de força CHARMM, com o qual trabalhamos em nossas simulações. Os três primeiros termos da equação 2.1.5 são utilizados para representar estiramento de ligação química, deformação angular e torção diedral, respectivamente. Os dois últimos, presentes somente em alguns campos de força, representam as torções impróprias e as interações entre átomos separados por duas ligações químicas (potencial de Urey-Bradley).

$$\begin{aligned} V(r)^{ligado} = & \sum_{\text{ligações}} k_b (b - b_0)^2 + \sum_{\text{ângulos}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \\ & + \sum_{\text{diedros}} k_{\phi n} [1 + \cos(n\phi - \delta_n)] + \sum_{\substack{\text{diedros} \\ \text{impróprios}}} k_\omega (\omega - \omega_0)^2 \\ & + \sum_{\text{Urey-Bradley}} k_u (u - u_0)^2 \end{aligned} \quad (2.1.5)$$

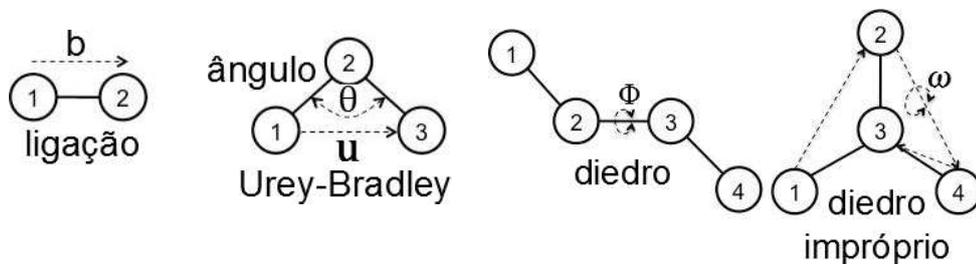


Figura 12: Esquema mostrando os termos utilizados na equação (2.1.5) para modelar interações entre átomos: estiramento de ligações químicas ( $b$ ), deformação angular entre três átomos ligados sucessivamente ( $\theta$ ), distância Urey-Bradley entre átomos 1-3 ( $u$ ), torções diedrais associadas a quatro átomos ligados sucessivamente ( $\phi$ ), torsão imprópria, para manter a planaridade ( $\omega$ ).

No primeiro termo da equação 2.1.5, que representa o estiramento de uma ligação química,  $k_b$  é a constante de força,  $b$  a distância entre os átomos 1 e 2 (Figura 12) e  $b_0$  a distância de equilíbrio entre esses átomos. No segundo termo,  $k_\theta$  representa a constante de força associada à deformação angular,  $\theta$  é o ângulo formado entre os átomos 1, 2 e 3 (Figura 12) e  $\theta_0$  é o ângulo de equilíbrio entre esses átomos. O terceiro termo da equação 2.1.5, é relativo às torções diedrais e é descrito por uma soma de cossenos, em que  $k_{\phi n}$  é a constante relacionada à altura da barreira potencial;  $n$  é a multiplicidade, que determina o número de pontos mínimos na curva, ao rotacionar a ligação completamente;  $\phi$  é o valor do ângulo diedro;  $\delta n$  é o valor do ângulo de fase, que determina quando o ângulo torsional passa por um ponto de mínimo. O quarto termo da equação 2.1.5, responsável pelas torções impróprias é usado para tratar distorções fora do plano, como as que ocorrem nos hidrogênios aromáticos, por exemplo.  $k_\omega$  é a constante de força e  $\omega - \omega_0$  é o ângulo fora do plano. O último termo do potencial interno é o Urey-Bradley, onde  $k_u$  é a constante de força e  $u$  é a distância entre os átomos 1-3 no potencial harmônico. Esse termo é usado para melhor reproduzir o espectro vibracional experimental, dado que apenas os termos harmônicos de estiramento e deformação angular de alguns átomos podem não ser suficientes.

As interações entre átomos não-ligados são descritas pelos potenciais de Lennard-Jones

$$V(r)^{\text{não-ligados}} = \sum \left( 4\varepsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi \varepsilon_0 r_{ij}} \right) \quad (2.1.6)$$

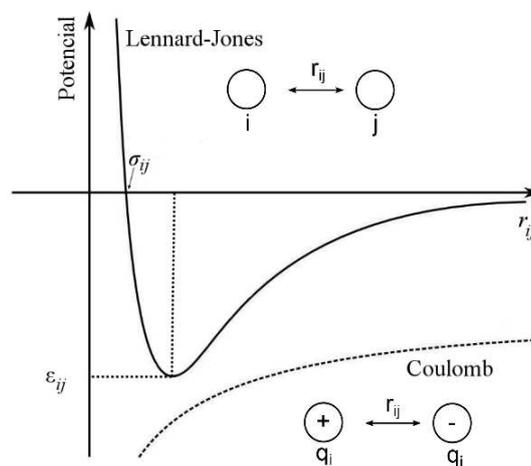


Figura 13: Representação gráfica dos potenciais de Lennard-Jones e de Coulomb, que representam as interações de van der Waals e eletrostáticas (atrativa), respectivamente.

e de Coulomb (Figura 13), conforme na equação 2.1.6. Esses são os tipos de interação mais numerosos em um sistema e é o que torna a MD mais onerosa computacionalmente.

O primeiro termo da equação 2.1.6, é o potencial de Lennard-Jones, descreve as interações de van der Waals entre dois átomos  $i$  e  $j$ , separados por uma distância  $r_{ij}$ , onde  $\sigma_{ij}$  é a distância finita em que o potencial inter-partículas é zero. O potencial de Lennard-Jones é uma combinação de um termo repulsivo com um atrativo. A parte repulsiva, por ser dependente de  $\sigma_{ij}^{-12}$ , é relevante quando a separação entre os átomos é muito pequena; a parte atrativa, dependente de  $\sigma_{ij}^{-6}$ , domina o potencial em distâncias um pouco maiores, de modo que o potencial de Lennard-Jones dá origem a um poço de potencial cuja energia é  $\epsilon_{ij}$ . O segundo termo da equação 2.1.6 descreve as interações eletrostáticas entre dois átomos  $i$  e  $j$ , com cargas parciais  $q_i$  e  $q_j$ , respectivamente, separados por uma distância  $r_{ij}$ . O potencial de Lennard-Jones decai muito mais rapidamente que o de Coulomb, sendo as interações de Lennard-Jones consideradas de curto alcance e as eletrostáticas, de longo alcance.

## 2.2.1 Etapas envolvidas na simulação

Para construir uma “caixa de simulação” de uma proteína em solução é necessário o conhecimento prévio da estrutura macromolecular do sistema. As estruturas terciárias de proteínas podem ser obtidas através de diversas técnicas experimentais, dentre elas cristalografia de raio-X, criomicroscopia eletrônica e espectroscopia de RMN, ou estudos computacionais por homologia. As estruturas de cristalografia e RMN estão acessíveis em bancos de dados como, por exemplo, o *Protein Data Bank* (PDB),<sup>69</sup> que contém as coordenadas atômicas da estrutura tridimensional de diversas moléculas biológicas, incluindo proteínas e ácidos nucleicos.

Nem sempre a estrutura cristalográfica completa de uma proteína pode ser obtida. As partes mais móveis da macromolécula, como *loops*, ou partes mais expostas ao solvente, apresentam alta incerteza, ou mesmo não são resolvidas pela técnica. Os átomos de hidrogênio também não podem ser capturados pela técnica, devido à baixa densidade eletrônica.

Portanto, para iniciar uma simulação MD é necessário reconhecer e corrigir problemas na estrutura terciária da proteína. A modelagem por homologia é uma forma de corrigir a falta de loops ou partes da cadeia lateral da proteína, a partir de estruturas primárias de proteínas homólogas. Os átomos de hidrogênio, ausentes na estrutura, são adicionados de acordo com a

geometria usual dos resíduos (comprimento de ligação, ângulos e diedros do mínimo de energia) e das condições de pH que se deseja estudar. Após garantir a estrutura completa da proteína em estudo, adicionam-se água e íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , de modo a obter concentração fisiológica e eletroneutralidade da solução aquosa.

Em geral, antes de se iniciar uma simulação de dinâmica molecular de proteínas, é necessário realizar uma minimização da energia do sistema. Esse procedimento permite aliviar “maus contatos”, da proteína com moléculas do solvente, ou originados no processo de adição de hidrogênios ou de alguns desvios da estrutura experimental em relação às geometrias de equilíbrio ditadas pelo campo de força. A minimização pode ser feita com algoritmos que variam sistematicamente as coordenadas do sistema na direção que minimiza a função energia potencial do sistema. Os algoritmos mais utilizados com esse intuito nas simulações de biosistemas são *Steepest Descent* e Método dos Gradientes Conjugados.<sup>67</sup>

Nos primeiros instantes da simulação, algumas propriedades como temperatura, pressão e energia interna variam até atingir um patamar, em torno de um valor médio, é a chamada “etapa de equilíbrio do sistema”. Quando se atinge o patamar, inicia-se a etapa de produção propriamente dita. Em nosso trabalho, as análises serão feitas em relação às etapas de produção da simulação. Os detalhes das metodologias e preparações dos sistemas serão tratados em cada seção específica.

## 2.2 Simulação Dinâmica Molecular Acelerada

A Dinâmica Molecular acelerada é uma técnica utilizada para aumentar a amostragem conformacional de um sistema e começou a ser utilizada em 2004.<sup>70-73</sup> Esse tipo de técnica tem sido desenvolvida para estudar processos que ocorrem em uma escala de tempo maior ( $\mu\text{s}$ - $\text{ms}$ ), como por exemplo, alterações conformacionais, movimentos de grande amplitude, enovelamento de proteínas.<sup>70,74-77</sup>

A paisagem de energia potencial de sistemas biomoleculares, em geral, é constituída por regiões de baixa energia, separadas por barreiras de alta energia. O tempo para atravessar essas barreiras é longo (da ordem de  $\mu\text{s}$  a  $\text{ms}$ ).<sup>73</sup> Simulações de dinâmica molecular convencional não conseguem amostrar suficientemente o sistema, pois utilizam passos de simulação da ordem de fs para integrar corretamente as equações de Newton. A técnica de Dinâmica molecular acelerada (aMD)<sup>70,71,73,77,78</sup> adiciona um potencial de impulso(*boost potential*) ao potencial

original, dado pelo campo de força, e, dessa forma, suaviza a paisagem de energia (Figura 14). Isso acelera a transição entre diferentes estados de energia. A ideia principal do método é definir uma função potencial ( $\Delta V$ ) contínua não-negativa, de tal forma que, quando o potencial original ( $V$ ) for inferior a determinado valor ( $E$ ), a trajetória é propagada usando o potencial modificado  $V^*(r)$ , segundo a expressão 2.2.1:

$$V^*(r) = \begin{cases} V(r), & \text{para } V(r) \geq E \\ V(r) + \Delta V(r), & \text{para } V(r) < E, \end{cases} \quad (2.2.1)$$

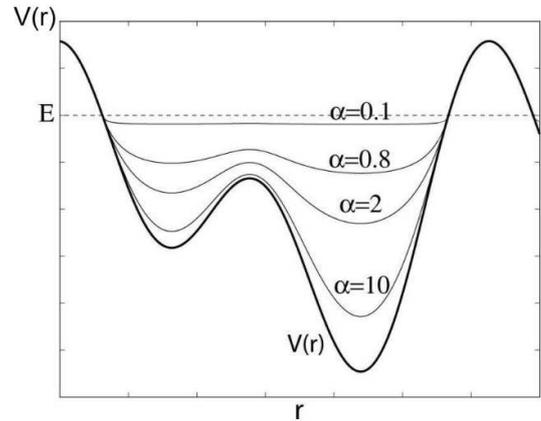


Figura 14: Gráfico unidimensional do potencial  $V(r)$  (linha sólida) e quatro potenciais modificados  $V^*(r)$ <sup>138</sup> com a mesma energia de impulso  $E$  e quatro valores diferentes de  $\alpha$ . Quanto maior o valor de  $\alpha$ , mais o  $V^*(r)$  se aproxima do potencial original. (fonte da figura <sup>138</sup>)

no qual  $E$  é a energia de impulso (*boost energy*) para sair de um mínimo local. Pode-se definir o potencial,  $\Delta V(r)$ , por:

$$\Delta V(r) = \begin{cases} 0, & \text{para } V(r) \geq E \\ f(r), & \text{para } V(r) < E, \end{cases}$$

em que

$$f(r) = \frac{[E - V(r)]^2}{\alpha + [E - V(r)]}$$

O parâmetro  $\alpha$  é um parâmetro de ajuste que determina a profundidade da bacia de energia potencial de *boost*. Quando  $\alpha$  é zero, o potencial modificado é igual a  $E$ . O parâmetro  $E$  dita a energia abaixo da qual o sistema é acelerado. Os parâmetros  $\alpha$  e  $E$  determinam o quão acelerada será a simulação, quanto menor o valor de  $\alpha$ , mais acelerada é a propagação da trajetória.

A aceleração pode ser aplicada a qualquer termo da energia potencial do sistema. É

possível aplicar somente sobre os termos de energia diedral (aMD diedral), que são os termos com maior influência sobre a determinação das conformações das proteínas. Também podemos adicionar o potencial sobre o potencial total (aMD total), que, em geral, leva a um aumento da difusividade do sistema. E há também uma forma que consiste na adição do potencial viés sobre o potencial total e sobre a potencial diedral (aMD *dual-boost*), aplicados independentemente, utilizado especialmente para explorar o espaço de fase.<sup>73</sup>

Porém, adicionar um potencial ao potencial do sistema, implica em alterar a superfície de energia livre. Para recuperar o *ensemble* de distribuição canônico original  $p(A)$  é necessário reponderar a probabilidade de distribuição  $p^*(A)$  ao longo da uma coordenada de reação selecionada  $A(r)$ , dado o potencial de *boost*  $\Delta V(r)$  para cada frame:<sup>79</sup>

$$p(A_j) = p^*(A_j) \frac{\langle e^{\beta \Delta V(r)} \rangle_j}{\sum_{j=1}^M \langle e^{\beta \Delta V(r)} \rangle_j}, j = 1, \dots, M$$

para um sistema biomolecular de  $N$  átomos, onde  $r$  são as posições atômicas  $\{r_1, \dots, r_N\}$ ,  $M$  é o número de compartimentos,  $\beta=1/k_B T$  e  $\langle e^{\beta \Delta V(r)} \rangle_j$  é a média de ensemble do fator de Boltzmann do  $\Delta V(r)$  para frames de simulação no  $j$  éximo compartimento.

O potencial de força média reponderado é calculado como:  $F(A_j) = -\left(\frac{1}{\beta}\right) \ln p(A_j)$ . A reponderação através de média exponencial (utilizando fator de Boltzmann, citado acima), gera altas flutuações energéticas (ruído), pois o fator de reponderação de Boltzmann é dominado por muitos poucos frames de alto potencial de *boost*. Por isso, também é necessário garantir uma boa amostragem do sistema antes de realizar a reponderação. Uma alternativa para calcular o termo exponencial é utilizar série de Maclaurin ou expansão cumulativa (de 1ª, 2ª ou 3ª ordem).<sup>79</sup>

No entanto, a reponderação precisa de sistemas biomoleculares grandes (proteínas com mais de 100 resíduos) ainda é um desafio. Esse tipo de sistema possui uma energia potencial total grande e para acelerá-lo é necessário aplicar um potencial de *boost* alto, com ampla distribuição.<sup>72,75,79</sup> A literatura atual apresenta poucos estudos aplicando a técnica de aMD a sistemas proteicos grandes onde a reponderação é especialmente importante para calcular a energia livre do sistema.

Já estão sendo criadas estratégias para driblar esse tipo de dificuldade, tanto no sentido da forma de aplicação do potencial adicional, quanto na questão da reponderação. Uma maneira de fazer isso é selecionar uma das partes do sistema para realizar a dinâmica acelerada, enquanto o restante do sistema é tratado por dinâmica molecular convencional.<sup>72,80</sup> Outra estratégia é

acelerar somente os graus de liberdade mais relevantes para o sistema em questão, diminuindo o potencial adicionado ao sistema e melhorando a convergência das médias de *ensembles* calculadas.<sup>72,81</sup>

Em um estudo recente, Miao e colaboradores desenvolveram um método chamado *Gaussian accelerated molecular dynamics* (GaMD), que suaviza o potencial original através da adição de um potencial harmônico.<sup>82</sup> Tal potencial segue uma distribuição próxima à distribuição Gaussiana, o que permite uma reponderação mais precisa, através da expansão cumulante de segunda ordem, e traz resultados satisfatórios inclusive para sistemas proteicos grandes.

Para estudar os sistemas PPAR $\gamma$ -livre e PPAR $\gamma$  com ligantes, realizamos simulações aceleradas aMD diedral e aMD *dual-boost*. Os parâmetros  $E$  e  $\alpha$  foram obtidos através das equações descritas em um estudo de Mucksch *et al.*,<sup>71</sup> no qual fazem simulação acelerada de um fator de crescimento ósseo (BMP-2). Para tal, utilizaram o mesmo programa e campo de força que usamos (NAMD 2.8<sup>68,78</sup> e CHARMM27<sup>83</sup>, respectivamente). As equações utilizadas para aMD diedral (equações 2.2.1 e 2.2.2) e para aMD *dual-boost* (equações 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3 e 2.2.4) são descritas abaixo:

$$E_{diedral} = \langle E_{diedral} \rangle + (4 [kcal \cdot mol^{-1} \cdot resíduo^{-1}] \times n^{\circ} resíduos) \quad (2.2.1)$$

$$\alpha_{diedral} = (4 [kcal \cdot mol^{-1} \cdot resíduo^{-1}] \times n^{\circ} resíduos)/5 \quad (2.2.2)$$

$$E_{total} = \langle E_{potencial} \rangle + (n^{\circ} átomos \cdot kcal \cdot mol^{-1}/5) \quad (2.2.3)$$

$$\alpha_{total} = (n^{\circ} átomos \cdot kcal \cdot mol^{-1})/5 \quad (2.2.4)$$

em que  $\langle E_{diedral} \rangle$  e  $\langle E_{potencial} \rangle$  são, respectivamente, os valores de energia diedral média e energia potencial média de uma simulação convencional curta.

## 2.3 Docking Proteína-Proteína

O *docking* proteína-proteína é uma ferramenta utilizada para ancorar uma proteína a outra e assim, prever a estrutura tridimensional do complexo formado. A técnica foi inicialmente utilizada para ancorar ligantes a proteínas, mas atualmente vem sendo bastante

utilizada no desafio de prever as interações entre proteínas. Em nosso trabalho, utilizamos o servidor Cluspro 2.0<sup>84-88</sup> para docar o PPAR $\gamma$  à Cdk5/p25. Este servidor realiza o *docking* de corpo rígido e gera  $10^9$  complexos, realizando movimentos de rotação e translação de uma proteína (“ligante”) em relação a outra (“receptor”, mantido fixo). As conformações de docking são classificadas de acordo com as propriedades dos seus *clusters*. Para classificar as conformações de *docking*, o programa considera o potencial de interação entre pares, a energia de dessolvatação, além das contribuições de van der Waals (atração e repulsão) e eletrostática.<sup>85</sup> Os 1000 complexos mais energeticamente favoráveis são então agrupados (10 a 30 grupos). Para agrupar as conformações de *docking* e encontrar o maior cluster representativo dos complexo o programa utiliza um método de agrupamento funcional baseado em RMSD.<sup>85</sup>

## 2.4 Método da Força Adaptativa (*Adaptative biasing force*)

Aplicamos o método da Força Adaptativa (*Adaptative biasing force*, ABF)<sup>89-91</sup> em nosso estudo para obter uma conformação do sistema em que os resíduos do sítio de fosforilação do PPAR $\gamma$  e da Cdk5 estivessem próximos o suficiente para promover a reação de fosforilação (menos de 3Å). A conformação pode ser obtida através do ABF, pois essa abordagem permite a aplicação da força de maneira bastante suave sobre o loop de fosforilação, fazendo-o se aproximar da Cdk5.

Existem na literatura alguns métodos que poderiam ser utilizados para mover o loop da S245, como *Steered Molecular Dynamics*, por exemplo. Porém, poucos o fazem de maneira suave, de forma a não causar deformações em outras partes da proteína. No método ABF, a força aplicada sobre o sistema é igual a força média que o meio exerce sobre sistema para mantê-lo em determinado ponto da superfície de energia potencial. Essa força é aplicada ao longo de uma coordenada de reação (escolhida pelo usuário) e faz o sistema difundir ao longo dessa coordenada. Em geral, o método é utilizado para ampliar a amostragem de conformações de um sistema e estimar a variação de energia livre ( $\Delta A$ ) entre estados.<sup>89,92</sup> Essa estimativa é feita através da integração da derivada de  $A$  ao longo do “caminho” que leva de um estado a outro (coordenada de reação).

Um exemplo que ilustra o ABF de forma simples é o caso em que a coordenada de reação é uma coordenada Cartesiana de um átomo em um sistema de  $N$ -átomos. Sendo  $X = (x_1, \dots, x_{3N})$  as coordenadas do sistema atômico e a coordenada de reação  $\xi$  sendo  $x_1$ , então a

energia livre do sistema será:<sup>93</sup>

$$A(x_1 \pm dx_1) = -k_B T \ln P(x_1)$$

Onde  $P(x_1)$  é a probabilidade de encontrar o sistema nas proximidades do estado  $x_1$ , e vale:

$$P(x_1) \propto \int \exp \left\{ -\frac{U(x_1, \dots, x_{3N})}{k_B T} \right\} dx_2, \dots, dx_{3N}$$

em que  $U$  corresponde a energia potencial do sistema atômico.

A diferença de energia livre pode ser escrita como:

$$A(x_1) = -k_B T \ln \int e^{-\langle U/k_B T \rangle} dx_2, \dots, dx_{3N}$$

A derivada da energia livre em relação a  $x_1$  é:

$$\frac{dA(x_1)}{dx_1} = \left\langle \frac{\int e^{-\langle U/k_B T \rangle} \frac{\partial U}{\partial x_1} dx_2, \dots, dx_{3N}}{\int e^{-\langle U/k_B T \rangle} dx_2, \dots, dx_{3N}} \right\rangle_{x_1} = \left\langle \frac{\partial U}{\partial x_1} \right\rangle_{x_1} = -\langle F_{x_1} \rangle_{x_1}$$

em que  $F_{x_1}$  é a força atuando na direção da coordenada de reação e a média é calculada a um valor específico de  $x_1$ .

Obtemos essa força, através da simulação MD e calculamos a sua média. A estimativa da força média é melhorada a medida que a MD avança. Se essa força é subtraída das forças atuantes no sistema, a força atuando na direção da coordenada de reação será em média nula. Sob essa condição, o sistema passa a ter um movimento difusivo ao longo da coordenada de reação, promovendo uma amostragem eficiente.<sup>93</sup>

## Capítulo 3

### Estudo da interação entre PPAR $\gamma$ e Cdk5/p25

#### 3.1 Contextualização

A importância da quinase Cdk5/p25 no contexto da atividade antidiabética do PPAR $\gamma$  foi descoberta recentemente.<sup>49,50</sup> No que diz respeito aos ligantes de PPAR $\gamma$ , essa descoberta teve uma interessante implicação, pois, como mencionado anteriormente na seção 1.5.1.4, a fosforilação consegue selecionar a expressão de determinados genes que permitem regular a atividade antidiabética. Além disso, a ação de ligantes de PPAR $\gamma$  com diferentes graus de agonismo, neste contexto, sugere que o mecanismo de bloqueio à fosforilação da S245 é independente do mecanismo de ativação clássico do PPAR $\gamma$ , através da H12.

Apresentaremos a seguir os resultados obtidos no estudo das interações do PPAR $\gamma$  com a quinase Cdk5/p25 (seção 3.3). Esse estudo visa elucidar de que forma a enzima Cdk5/p25 se liga ao sítio de fosforilação do PPAR $\gamma$  e quais são as adaptações nas estruturas de ambas proteínas para possibilitar a reação. Realizamos a predição da estrutura PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25, na qual obtivemos modelos de interação entre essas proteínas, mostrados na seção 3.3.1 e 3.3.2. Esses modelos foram então refinados (seção 3.3.3), para assim obtermos uma conformação do sítio ativo que possibilitasse a ocorrência da reação de fosforilação. Após isso, mostramos os resultados da etapa de relaxação das estruturas dos modelos (seção 3.3.4) e a caracterização dos modelos estáveis (seção 3.3.5). Além disso, tentamos compreender como os ligantes de PPAR $\gamma$  podem influenciar essa interação (seção 3.3.6).

## 3.2 Metodologia

### 3.2.1 *Docking* Proteína-proteína

Realizamos os *dockings* proteína-proteína a partir das estruturas cristalográficas da Cdk5/p25 (PDB ID: 1UNL)<sup>64</sup> e PPAR $\gamma$  (PDB ID: 3T03, 1PRG, 1FM6)<sup>27,46,94</sup>. Realizamos *dockings* cegos e *dockings* especificando o sítio atrativo entre as proteínas (S245-D126 e P246-V162). Esses *dockings* resultaram em 180 modelos que foram classificados de acordo com três critérios: distância S245(PPAR $\gamma$ )-D126(Cdk/p25), correta orientação da sequência consenso da Cdk5 e consistência estérica com a estrutura cristalográfica do complexo intacto PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$ -DNA.<sup>95</sup>

### 3.2.2 Preparação das estruturas PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25

Apesar do servidor Cluspro realizar uma minimização de van der Waals dos modelos, não utilizamos as estruturas minimizadas nas próximas etapas. A estrutura minimizada do PPAR $\gamma$  foi substituída pela estrutura cristalográfica (PDB ID: 3T03)<sup>46</sup> sem ligante. Escolhemos essa estrutura do PPAR $\gamma$ , pois não há diferenças significativas entre a estrutura apo-PPAR $\gamma$  disponível no PDB<sup>69</sup> e essa estrutura holo-PPAR $\gamma$  sem ligante. Somente as moléculas de água a 5 Å de distância dos resíduos do PPAR $\gamma$  foram consideradas. Alguns resíduos ausentes dessa estrutura (206-209 e 258-276) foram obtidos por analogia à estrutura 1FM6 (complexo PPAR $\gamma$ -RSG).<sup>96</sup>

Como não há estrutura cristalográfica da Cdk5/p25 com substrato, construímos uma estrutura da Cdk5/p25 com sítio ativo em uma posição apropriada para a reação de fosforilação baseada na estrutura da Cdk2 com peptídeo-substrato. A Cdk5 apresenta, aproximadamente, 60% de identidade sequencial com a Cdk2. Entretanto, se considerarmos somente o sítio ativo (resíduos a 5 Å de distância do ATP e dos íons Mg<sup>2+</sup>), a identidade entre ambas quinases é 100%, o que permite usarmos o sítio ativo da Cdk2 como padrão para modelar o sítio ativo da Cdk5. As estruturas da Cdk5/p25 (PDB ID: 1UNL)<sup>64</sup> e Cdk2/ciclina A com peptídeo (PDB ID: 3QHW)<sup>97</sup> foram utilizadas para construir o alvo para as simulações de MD. A estrutura

Cdk5/p25 (PDB ID: 1UNL) apresenta um inibidor e foi escolhida devido a alta resolução da estrutura comparada às demais disponíveis no PDB. A estrutura da Cdk2/ciclina A com peptídeo-substrato representa o complexo em um estado de transição, ligado a uma molécula de ADP,  $MgF^{3-}$  (mimetiza o fosfato  $\gamma$  do ATP), dois íons  $Mg^{2+}$  e um peptídeo-substrato. As coordenadas dos seguintes resíduos dessa última estrutura foram utilizadas como modelo para o sítio ativo da Cdk5: D126, ADP,  $MgF^{3-}$ , íons  $Mg^{2+}$ , moléculas de água próximas aos íons  $Mg^{2+}$  (importantes para a hexacoordenação do  $Mg^{2+}$ ) e a sequência do peptídeo **PKTPKKAKKL**. A molécula do ATP foi construída baseada na posição do ADP e  $MgF^{3-}$ . Da sequência do peptídeo substrato, nós utilizamos somente os 5 primeiros resíduos e mutamos para a sequência DKSPF, como a sequência do PPAR $\gamma$ . Para ambas proteínas, PPAR $\gamma$  e Cdk5/p25, os átomos de hidrogênio foram adicionados (através do programa *psfgen*)<sup>98</sup>, e os estados de protonação dos resíduos de histidina foram estimados com o servidor H++<sup>99</sup> a um pH de 7,4. A posição dos átomos de hidrogênio, nas histidinas neutras, foi definida de modo a favorecer as ligações de hidrogênio.

O sistema inteiro foi solvatado por uma camada de água de pelo menos 15 Å a partir da superfície das proteínas e o mantivemos em uma concentração fisiológica de 0,15 mol/L. Após isso realizamos uma simulação minimizando a energia e equilibrando o sistema. Todas as simulações foram feitas usando NAMD2.9<sup>68</sup> e campo de força CHARMM22/CMAP<sup>100,101</sup>. Para as moléculas de água utilizamos o modelo TIP3P implementado no CHARMM<sup>100</sup>. Realizamos 1000 passos de minimização de energia para remover mau contato entre as cadeias laterais e além de 5 ns de MD de pré-equilibração para relaxar a estrutura, mantendo as ligações e ângulos do sítio ativo fixos. Esse procedimento foi realizado para relaxar somente a região próxima ao sítio ativo, que foi adaptada da Cdk2.

As simulações de *Adaptive Biasing Force* (ABF) foram realizadas após alinhamento e substituição dos candidatos iniciais do PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25 obtidos pelo Cluspro pelas estruturas preparadas como descrito anteriormente. Os modelos PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25 foram então solvatados e eletroneutralizados pela adição de íons  $Na^+$  e  $Cl^-$  a uma concentração de 0,15 mol/L. Ao final da preparação os sistemas dos modelos continham aproximadamente 120000 átomos.

### 3.2.3 Refinamento dos modelos PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25

A técnica de ABF MD<sup>89,90,102</sup> foi utilizada para aproximar os resíduos de fosforilação a

uma distância suficiente capaz de promover a reação. Os valores de RMSD dos resíduos do sítio de fosforilação foram usados como coordenadas de reação para representar o processo de aproximação. A estrutura de referência para cálculo do RMSD se baseou nos resíduos catalíticos da estrutura modelada da Cdk5/p25-peptídeo (posição da S245 no peptídeo substrato, resíduos D126, N131, D144, V162, ATP e íons  $Mg^{2+}$ ). A coordenada de reação RMSD teve um intervalo de valores que variaram 3,5 Å (modelo inicial PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25 obtido com Cluspro) a 0 Å (modelo refinado), com constante de força de 10 kcal/mol<sup>-1</sup>Å<sup>-2</sup> como potencial de fronteira.

A rapidez com que o ABF percorre o caminho de reação pode ser controlada através de um parâmetro, relacionado com o número de passos de simulação realizada em um certo intervalo, antes de se aplicar completamente a força ABF. Quanto maior a amostragem, menor é a velocidade de aplicação da força ABF. Dessa forma, é preciso que haja um número razoável de amostras, devido às grandes flutuações da força exercida ao longo do caminho de reação. Um número insuficiente de amostras poderia levar a efeitos de não-equilíbrio na dinâmica do sistema.

Testamos três amostragens antes da aplicação da força ABF para os sistemas: 10, 100.000 e 1.000.000 amostras. Para promover um relaxamento suave das proteínas, um mínimo de 1.000.000 amostras permitiu uma amostragem suficiente para obter uma estimativa razoável da distribuição de força e, portanto, da força média, que foi subsequentemente aplicada ao longo da coordenada de reação.

Aproximadamente 110 ns de simulações ABF MD foram realizadas até que a distância entre (H)S245-(O)D126 se estabilizasse em torno de 2Å. Utilizamos condições periódicas de contorno em um *ensemble* NpT e a uma temperatura (298 K) e pressão (1 atm) foram mantidas constantes utilizando o termostato de Langevin e o barostato de Langevin/Nosé-Hoover, respectivamente. O potencial eletrostático foi calculado utilizando o algoritmo *Particle Mesh Ewald* (PME)<sup>67</sup> e interações de curto alcance foram truncadas a um raio *cutoff* de 12 Å. Todas as ligações envolvendo hidrogênios foram mantidas fixas em seus valores de equilíbrio utilizando o algoritmo SHAKE<sup>103</sup> e um *timestep* de 2.0 fs foi utilizado para a integração das equações de movimento.

O seguinte tratamento foi utilizado para preparar os sistemas para as simulações de produção: (i) 1000 passos de minimização de energia, utilizando o algoritmo de gradientes conjugado (CG) seguidos de 400 ps de MD mantendo proteína, ATP e íon  $Mg^{+2}$  fixos; (ii) 2000 passos de minimização de energia, utilizando CG seguidos de 1 ns de MD mantendo fixa a proteína (exceto os resíduos a menos de 8 Å do ATP e dos íons  $Mg^{+2}$  e resíduos modelados); (iii) 2000 passos de minimização de energia, utilizando CG seguidos de 2 ns de MD mantendo

fixo o *backbone* da proteína, exceto os resíduos a menos de 8 Å do ATP e dos íons  $Mg^{+2}$  e resíduos modelados. Após esses passos de preparação, foram geradas trajetórias de ABF MD de 110 ns para cada modelo. As estruturas finais dessas simulações foram avaliadas pelo programa PROCHECK.<sup>104,105</sup> A qualidade estereoquímica das estruturas mostrou que, em média, 92% dos resíduos se mantiveram em regiões mais favoráveis do gráfico de Ramachandran, ou seja, o *backbone* das proteínas apresentaram combinações favoráveis para os ângulos phi e psi. Para um modelos de boa qualidade, 90% dos resíduos devem estar nessas regiões.<sup>104,105</sup>

### 3.2.4 Dinâmica Molecular do PPAR $\gamma$ -livre e com ligantes

A dinâmica molecular foi utilizada para tentar compreender a influência de diferentes ligantes de PPAR $\gamma$  no loop de fosforilação e também a influência desses no bloqueio da reação de fosforilação. As simulações de dinâmica molecular convencional se basearam nas estruturas cristalográficas do apo-PPAR $\gamma$  (PDB ID:1PRG)<sup>27</sup>, PPAR $\gamma$ -RSG (PDB ID: 1FM6)<sup>94</sup> e PPAR $\gamma$ -GQ16 (PDB ID:3T03).<sup>46</sup> Alguns resíduos ausentes da estrutura PPAR $\gamma$ -GQ16 (206-209 e 258-276) foram obtidos por analogia à estrutura 1FM6 (complexo PPAR $\gamma$ -RSG), alinhando o *backbone* das estruturas com o programa lovoalign.<sup>106</sup> Os átomos de hidrogênio foram adicionados e os estados de protonação das histidinas foram estimados através do servidor H++ em pH=7,4.<sup>99</sup> Para as histidinas neutras, a posição do hidrogênio foi definida de forma a favorecer ligações de hidrogênio. Os sistemas foram solvatados, com uma camada de água de pelo menos 15Å a partir da proteína. Adicionamos íons  $Na^+$   $Cl^-$  até atingir concentração fisiológica de 0,15 mol/L. O sistema final contém em torno de 58000 átomos. Todas as simulações foram realizadas utilizando o programa NAMD2.<sup>968</sup> e o campo de força CHARMM22/CMAP<sup>100,101</sup> para proteína e o modelo de água TIP3P.<sup>107</sup> Os ligantes rosiglitazona e GQ16 foram parametrizados pelo nosso grupo<sup>108</sup> de maneira consistente com o procedimento de parametrização do campo de força CHARMM. Realizamos as simulações utilizando condições periódicas de contorno, em *ensemble* NpT a temperatura de 300K e pressão de 1 atm, controlados pelos termostato de Langevin e pistão Langevin/Nosé-Hoover, respectivamente. O potencial eletrostático foi calculado usando algoritmo *Particle Mesh Ewald*<sup>67</sup> e as interações de curto alcance foram truncadas a um raio de corte de 12 Å. Todas as ligações envolvendo hidrogênios apolares foram restritas a seus valores de equilíbrio, usando o algoritmo SHAKE<sup>103</sup>

e o *timestep* de 2.0 fs foi utilizado para a integração das equações de movimento. A preparação dos sistemas seguiu as seguintes etapas: (i) 2000 passos de minimização de energia usando algoritmo de gradientes conjugados (CG) seguidos de 200 ps de MD mantendo ligante e proteína fixos, exceto os resíduos modelados; (ii) 1000 passos de minimização de energia usando CG seguidos de 200 ps de MD mantendo somente os C $\alpha$  fixos (exceto os resíduos modelados); (iii) 600 ps de MD sem restrições. Após essas etapas de preparação, trajetórias MD de 100 ns de cada sistema foram geradas para análise.

### 3.2.5 Dinâmica Molecular Acelerada do LBD do PPAR $\gamma$ livre e com ligantes

Assim como a dinâmica molecular convencional, a utilização dessa metodologia visou comparar a influência dos ligantes na reação de fosforilação. Além disso, a aMD foi usada para promover uma maior amostragem de conformações desses sistemas PPAR $\gamma$ -livre e na presença de ligantes. As simulações de dinâmica molecular aceleradas (aMD) foram realizadas para a estrutura cristalográfica do PPAR $\gamma$ -RSG (PDB ID: 1FM6),<sup>94</sup> PPAR $\gamma$ -GQ16 (PDB ID: 3T03)<sup>46</sup> e PPAR $\gamma$  (PDB ID: 3T03),<sup>46</sup> em que o ligante foi removido. Optamos por essa estrutura, pois a estrutura apo-PPAR $\gamma$  disponível apresenta características estruturais, principalmente na região AF-2, muito semelhante a estruturas holo.<sup>33</sup> Todas as simulações foram realizadas utilizando o programa NAMD2.<sup>968</sup> e o campo de força CHARMM22/CMAP<sup>100,101</sup> para proteína e o modelo de água TIP3P.<sup>107</sup> Os ligantes rosiglitazona e GQ16 foram parametrizados pelo nosso grupo<sup>108</sup> de maneira consistente com o procedimento de parametrização do campo de força CHARMM. As simulações foram realizadas utilizando condições periódicas de contorno em ensemble NVT a uma temperatura de 298 K, usando termostato de Langevin para controle de temperatura. O sistema, composto de aproximadamente 58000 átomos, foi solvatado com uma camada de água de pelo menos 15 Å de distância da proteína, tendo o sistema final em torno de 58000 átomos. O LBD do PPAR $\gamma$  foi preparado pelas seguintes etapas: (i) 500 passos de minimização de energia usando algoritmo de gradiente conjugado (CG), seguido de 20 ps de MD mantendo ligante e proteína fixos; (ii) 500 passos de minimização de energia, seguidos de 20 ps de MD mantendo somente os resíduos modelados fixos (iii) 500 passos de minimização de energia, seguidos de 20 ps de MD mantendo somente os C $\alpha$  da proteínas fixos. Após esses passos de preparação, uma trajetória de 200 ns de aMD foi gerada para análise. Realizamos as simulações

de dinâmica molecular aceleradas (aMD) de duas maneiras, aplicando o *boost*: *i*) somente aos diedros do sistema (aMD diedral) e *ii*) aos diedros e ao potencial total (menos o potencial diedral), na chamada aMD *dual-boost*. Os parâmetros de *boost* foram determinados com base na energia média diedral calculada a partir de simulações MD convencional curtas. Utilizamos para a aMD diedral os seguintes parâmetros:  $E_{diedral} = 2128 \text{ kcal mol}^{-1}$  e  $\alpha_{diedral} = 217,6 \text{ kcal mol}^{-1}$ , de acordo com a literatura.<sup>73,77</sup> Para a aMD *dual-boost*, utilizamos os parâmetros:  $E_{diedral} = 2128 \text{ kcal mol}^{-1}$ ,  $\alpha_{diedral} = 870,4 \text{ kcal mol}^{-1}$ ,  $E_{total} = -177470,7 \text{ kcal mol}^{-1}$  e  $\alpha_{total} = 11723,6 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

### 3.2.6 Dinâmica Molecular dos modelos PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25

Essa metodologia foi utilizada com intuito de monitorar o comportamento dos modelos PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25 propostos e promover o relaxamento estrutural desses. As estruturas iniciais das simulações de MD dos modelos PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25 foram obtidas a partir das simulações de ABF, usando como critério a distância (H)S245-(O)D126, que deveria ser menor do que 2,5 Å, e o RMSD médio do loop da S245 (PPAR $\gamma$ ), que deveria ser menor que 2Å. Nós realizamos 300 ns de simulações MD convencional para cada modelo. Nos primeiros 10 ns de simulação, adicionamos um termo de energia adicional de ligação (restrição *extraBond* do NAMD) na interação (H) S245 – (O) D126 e um termo de energia adicional de ligação e de ângulo para manter a hexacoordenação do íon Mg<sup>2+</sup> (usamos uma constante de força de 10 kcal·mol<sup>-1</sup>·Å<sup>-2</sup>, uma distância de ligação de equilíbrio de referência de 2Å e um ângulo de equilíbrio de referência de 90° ou 180°). Após a equilibração, mantivemos fixos somente os parâmetros para manter fixa a hexacoordenação do Mg<sup>2+</sup>. Utilizamos o mesmo ensemble, temperatura, pressão e condições eletrostáticas das simulações de ABF.

## 3.3 Resultados e Discussão

### 3.3.1 Predição da estrutura PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25

Utilizamos uma série de técnicas computacionais para predizer os modelos estruturais

do complexo PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25 (Figura 15). A primeira técnica utilizada foi a de *docking* proteína-proteína, da qual obtivemos vários modelos. Em seguida, fizemos uma seleção dos modelos baseada na bioquímica da reação de fosforilação e em dados experimentais de interação PPAR $\gamma$ -proteínas.

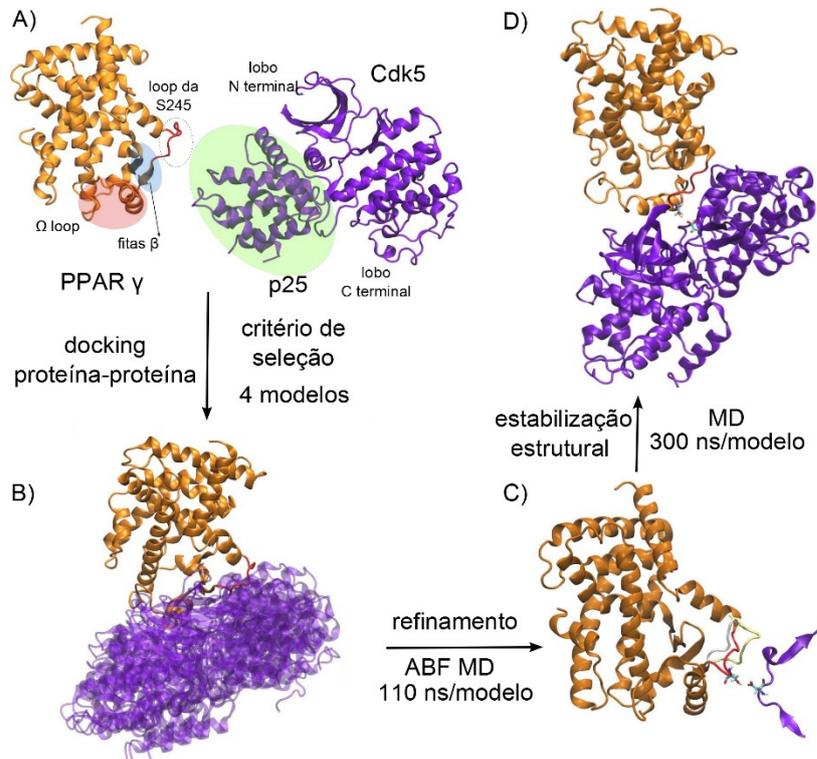


Figura 15: Esquema de modelagem do complexo PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25: A) Estruturas cristalográficas/modeladas iniciais da Cdk5/p25 e LBD PPAR $\gamma$ ; B) *Docking* proteína-proteína e seleção baseada na bioquímica da fosforilação e na estrutura cristalográfica heterodimérica do PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$ ; C) Modelos refinados via simulações ABF MD a fim de obter uma configuração molecular do sítio de fosforilação adequada para reação de fosforilação; D) Validação da estabilidade dos modelos PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25 via simulação MD.

Quatro modelos foram selecionados. Porém, a distância entre os resíduos do sítio de fosforilação não era suficiente para que a reação ocorresse. Dessa forma, foi necessário fazer um refinamento dos modelos através da técnica da Força Adaptativa ou *Adaptive biasing force* (ABF), pela qual obtivemos modelos refinados, com os resíduos S245 e D126 a aproximadamente 3Å de distância um do outro. O comportamento dos modelos e as interações proteína-proteínas foram avaliados, através de simulações de dinâmica molecular, que permitiram a relaxação das estruturas. Fizemos uma caracterização dos modelos que apresentaram estabilidade e mantiveram a Cdk5 próxima ao PPAR $\gamma$ . Por fim, tentamos compreender a influência dos ligantes de PPAR $\gamma$  na dinâmica do loop da S245 e no bloqueio

da reação de fosforilação, através de simulações MD e aMD do LBD do PPAR $\gamma$  com e sem ligantes.

### 3.3.2 Docking Proteína-Proteína

Realizamos os *dockings* proteína-proteína da Cdk5/p25-PPAR $\gamma$  através do servidor Cluspro 2.0.<sup>84,85,87,88</sup> Para isso, utilizamos as estruturas cristalográficas do PPAR $\gamma$ -sem ligante, PPAR $\gamma$ -GQ16, PPAR $\gamma$ -RSG e da Cdk5. Foram feitas 6 tentativas de *docking* (com 30 modelos cada), das quais 4 modelos foram aceitos nos critérios de seleção, sendo, também, distinguíveis entre si. Os critérios utilizados para seleção dos modelos foram utilizados em sequência: (i) distância entre S245 (PPAR $\gamma$ ) e D126 (CDK), menor que 15 Å; (ii) direção correta do *docking*, baseado na sequência consenso de reconhecimento de substratos pela Cdk5 (X<sub>-1</sub> S/T<sub>0</sub> P<sub>+1</sub>) (Figura 16); (iii) menor/nenhuma sobreposição no alinhamento dos modelos com complexo intacto PPAR $\gamma$ -RXR-DNA (Figura 17).<sup>95</sup>

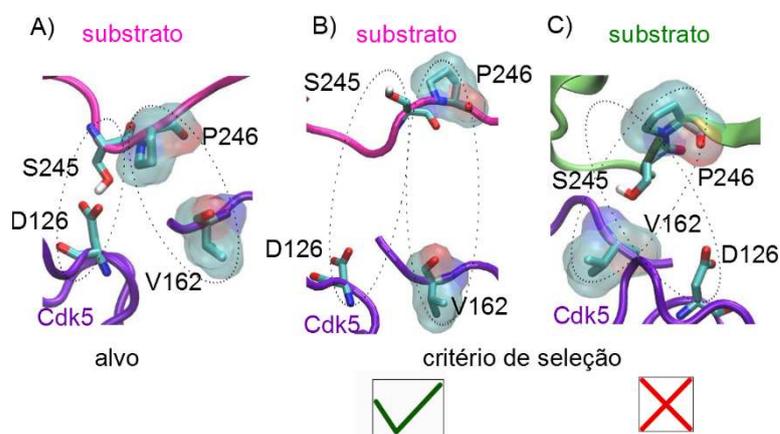


Figura 16: A) Sequência consenso do PPAR $\gamma$  (S245 e P246) reconhecida pela Cdk5/p25 (D126 e V162 - roxo): A) Conformação ótima de interação entre o peptídeo substrato e a Cdk5; B) Orientação correta da sequência do substrato (rosa) em relação à Cdk5 (roxo), S245 pode interagir com D126, enquanto P246 pode interagir com V162; C) Orientação invertida da sequência do substrato (verde), os resíduos não podem interagir.

O primeiro critério diz respeito a distância entre os resíduos do sítio ativo. O segundo, garante consistência com a sequência consenso da Cdk5. A direção de *docking* correta é indicada pela interação entre os resíduos Val162 (Cdk5) e Pro246 (PPAR $\gamma$ ) (Figura 16).<sup>109</sup> O resíduo hidrofóbico Val162 (Cdk5) acomoda o resíduo prolina do substrato (em analogia a Cdk2)

e direciona a ligação da quinase.<sup>109</sup> O terceiro critério de seleção engloba ambas possibilidades da forma de encontrar o PPAR $\gamma$  na célula. Dentro do núcleo, o PPAR $\gamma$  forma um heterodímero com o RXR $\alpha$  (*Receptor of 9-cis Retinoic acid  $\alpha$* ). Essa estrutura do complexo PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$  ancorado ao DNA foi obtida por cristalografia de raio X.<sup>95</sup> No citoplasma, o PPAR $\gamma$  está livre, não dimerizado ou ancorado ao DNA. Permanece ainda obscuro em que lugar da célula ocorre a reação de fosforilação do PPAR $\gamma$  promovida pela Cdk5. A literatura relata que a Cdk5 pode estar localizada tanto no núcleo quanto no citoplasma.<sup>62,110</sup> Em relação ao PPAR $\gamma$ , a maioria dos estudos tem mostrado que ele pode ser localizado no núcleo celular, mas há evidências de que ele possa ser encontrado também no citoplasma, devido a interações com proteínas citosólicas/de membrana (por exemplo, HSP90 e caveolin-1).<sup>111,112</sup> Dos 180 modelos iniciais, 12 modelos passaram pelo primeiro critério (distância), 10 modelos passaram pelo segundo critério (sequência consenso) e 4 modelos passaram pelo terceiro critério (complexo intacto).

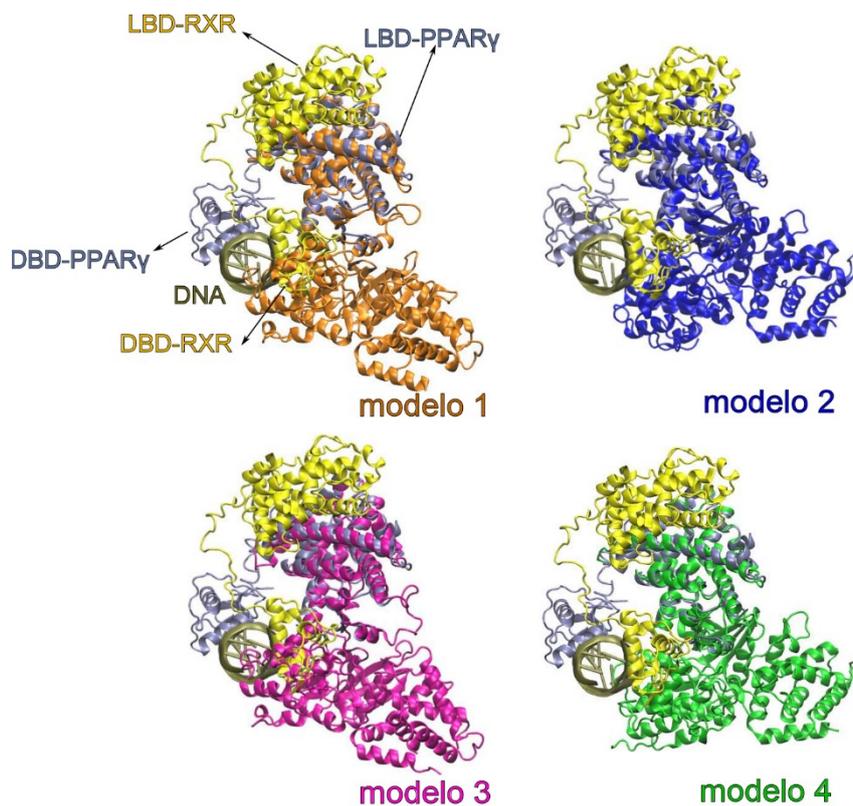


Figura 17: Modelos PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25 alinhados ao complexo intacto PPAR $\gamma$ -RXR-DNA (PDB ID:3DZY): LBD e DBD do PPAR $\gamma$  (amarelo), LBD e DBD do RXR (azul claro), DNA (bronze), modelos PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25 representados de uma única cor, sem diferenciação entre PPAR $\gamma$  e Cdk5/p25.

Apesar de todos os modelos serem distintos entre si, eles apresentam um arranjo similar da Cdk5/p25 em relação ao PPAR $\gamma$ . Para interagir com o PPAR $\gamma$  e respeitar a sequência

consenso da Cdk5 (Figura 16A-C), o lobo C-terminal da Cdk5 deve estar direcionado para a região das fitas  $\beta$  do PPAR $\gamma$ , enquanto o lobo N-terminal da Cdk5 e a p25 devem estar direcionados para o  $\Omega$  loop. Os modelos também mostram que as principais regiões de contato do PPAR $\gamma$  com Cdk5/p25 são o  $\Omega$  loop, H2', as fitas  $\beta$  e o loop da S245. O alinhamento dos modelos com a estrutura do complexo intacto PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$ -DNA, mostrou mínima sobreposição em relação ao DNA e DBD do RXR $\alpha$  (Figura 17). Isso permite validar os modelos também no caso de a fosforilação ocorrer no núcleo celular.

Alguns autores acreditam que há uma arquitetura quaternária (considerando LBDs e DBDs dos dímeros) comum a todos os NRs heterodiméricos.<sup>113</sup> Essa hipótese foi proposta devido a uma série de estruturas de heterodímeros obtidos em solução por SAXS/SANS e criomicroscopia eletrônica, que inclui as estruturas RXR-RAR, RXR-VDR, PPAR $\gamma$ -RXR, USP/EcR.<sup>113-115</sup> As estruturas quaternárias desses NRs apresentaram uma organização multidomínios semelhante entre si, porém a estrutura PPAR $\gamma$ -RXR obtida em solução se apresenta muito diferente da estrutura cristalográfica previamente obtida.<sup>113-115</sup> As estruturas apresentam uma conformação mais aberta e com LBDs afastados dos DBDs, comparando-se com a estrutura cristalográfica do PPAR $\gamma$ -RXR.<sup>95</sup>

Uma dessas estruturas, a do complexo RXR $\alpha$ -VDR-DNA,<sup>115</sup> que não está disponível em banco de dados, nos foi disponibilizada por um dos autores, Bruno Klaholz. Partindo do pressuposto da semelhança entre os domínios das estruturas, utilizamos a estrutura RXR $\alpha$ -VDR-DNA como terceiro filtro de seleção. Realizamos o alinhamento do RXR $\alpha$  da estrutura do RXR $\alpha$ -VDR com o PPAR $\gamma$  dos modelos PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25, partindo dos 10 modelos previamente selecionados pelo segundo critério (sequência consenso). Dos 10 modelos, 9 passaram pelo critério da estrutura RXR $\alpha$ -VDR-DNA. Comparativamente à estrutura do PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$ -DNA, a estrutura do RXR $\alpha$ -VDR-DNA é mais aberta e o loop de fosforilação está bem mais exposto do que na estrutura PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$ -DNA,<sup>95</sup> não havendo impedimento estérico com outros domínios ou DNA. Enquanto a estrutura RXR $\alpha$ -VDR-DNA permite muito mais possibilidades de *docking*, a estrutura PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$ -DNA é mais restritiva para permitir a aproximação da Cdk5/p25. Os alinhamentos entre RXR $\alpha$ -VDR-DNA e PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25 são apresentados na Figura 18 e podemos notar que houve mais modelos que passaram no critério de seleção usando essa estrutura RXR $\alpha$ -VDR-DNA do que usando a estrutura PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$ -DNA. No entanto, utilizamos os quatro modelos selecionados pela estrutura do complexo cristalográfico PPAR $\gamma$ -RXR-DNA para dar prosseguimento a etapa de refinamento, pois essa é a única estrutura publicamente disponibilizada no PDB. Destaca-se ainda que tivemos acesso privativo à estrutura RXR $\alpha$ -VDR-DNA apenas muito recentemente.

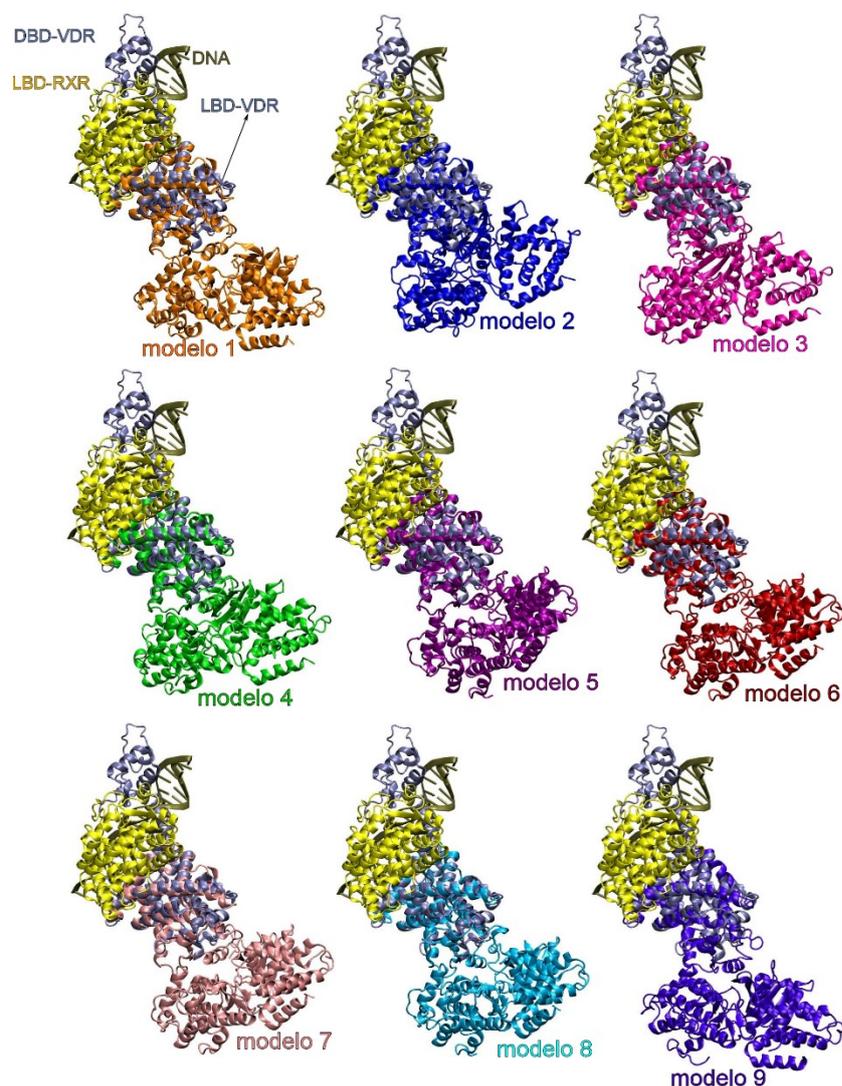


Figura 18: Modelos PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25 alinhados ao complexo intacto RXR $\alpha$ -VDR-DNA: LBD e DBD do VDR (amarelo), LBD e DBD do RXR (azul claro), DNA (bronze), modelos PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25 representados de uma única cor, sem diferenciação entre PPAR $\gamma$  e Cdk5/p25.

### 3.3.3 Refinamento das estruturas de *docking*

O *docking* e os critérios de seleção permitiram-nos identificar algumas características globais do complexo. No entanto, essa abordagem não concedeu flexibilidade às estruturas de forma que se acomodassem e aproximassem os resíduos do sítio ativo mais do que 8-15 Å. O método de ABF MD foi escolhido para obtermos modelos refinados, com resíduos do sítio de fosforilação a uma distância suficiente para promover a reação (aproximadamente 2 Å). Para isso, uma força generalizada muito suave foi aplicada nos resíduos do loop da S245 (PPAR $\gamma$ )

em direção ao sítio catalítico da Cdk5. Isso permite não somente a aproximação do loop da S245 ao resíduo D126 (Cdk5) mas também a adaptação das estruturas do PPAR $\gamma$  e da Cdk5/p25 como um todo.

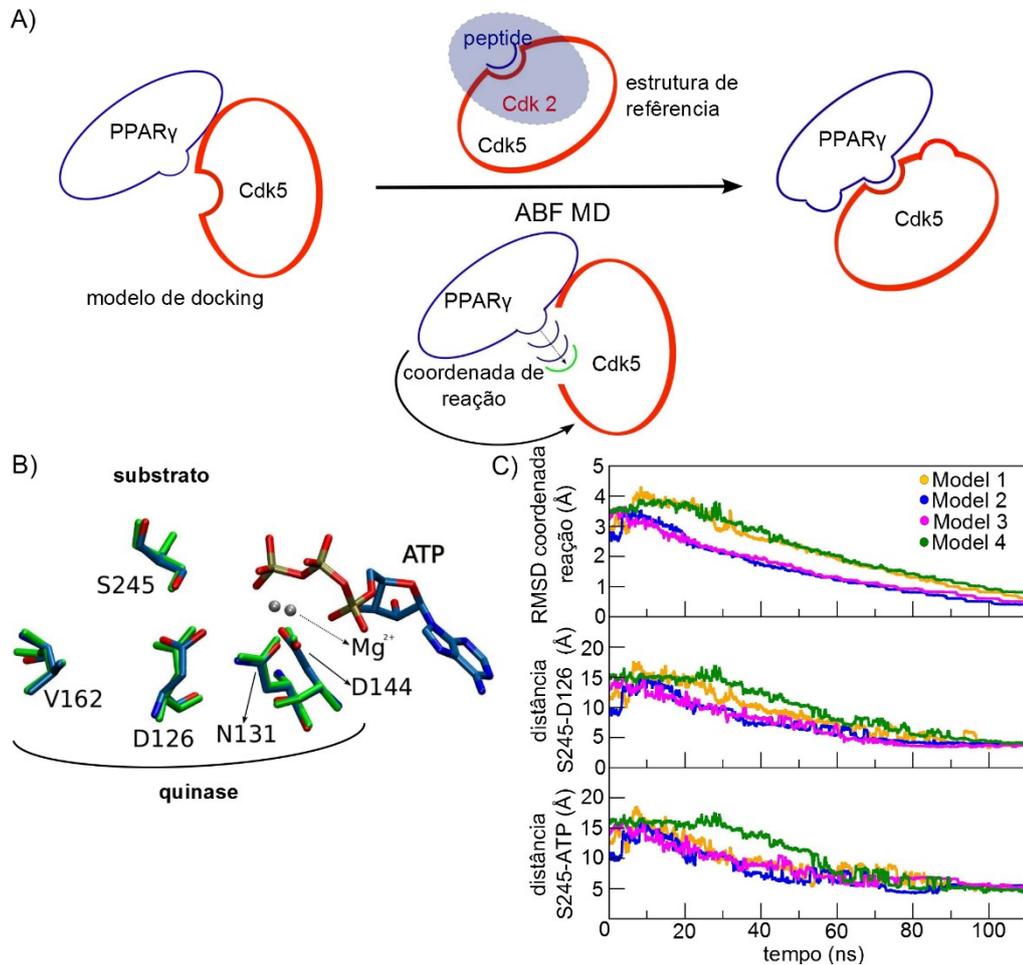


Figura 19: Esquema de como foram feitas as simulações de ABF. As estruturas iniciais foram as obtidas do *docking* proteína-proteína. Para realizar as simulações, utilizamos como coordenada de reação o RMSD dos resíduos do sítio de fosforilação. A estrutura de referência para o RMSD foi baseada na posição dos resíduos catalíticos da estrutura modelada da Cdk5/p25-peptídeo. O modelo refinado foi obtido, estando o resíduo S245 (PPAR $\gamma$ ) próximo da D126 (Cdk5) e as estruturas do PPAR $\gamma$  e da Cdk5/p25 adaptadas uma a outra; B) Aplicando uma força muito suave no loop da S245, através do sítio catalítico da Cdk5, aproximamos os resíduos S245-D126 durante a simulação de ABF (escala de cores baseada no passo de tempo da trajetória, indo de azul para vermelho); C) Variação da coordenada de reação (RMSD dos resíduos do sítio de fosforilação: ATP e Mg<sup>2+</sup> íons; S245 do PPAR $\gamma$ ; D126, N131, D144, V162 da Cdk5); D) Distância entre (O) S245 – (C) D126 durante as simulações ABF.

A Figura 19A mostra esquematicamente como foram realizadas as simulações de ABF. A partir das estruturas de docking, realizamos 110 ns de simulações de ABF para cada modelo.

Utilizamos como coordenada de reação o RMSD dos resíduos do sítio de fosforilação, que representa o processo de aproximação do PPAR $\gamma$  em relação a Cdk5/p25 (Figura 19B-C). A estrutura de referência para o RMSD foi baseada nas posições do resíduo serina S245 do PPAR $\gamma$  e nos resíduos do sítio catalítico da Cdk5/p25.

Utilizamos os últimos 10 ns de simulação ABF para realizar as análises, já que nessa parte da trajetória os resíduos do sítio de fosforilação estão a uma distância de, aproximadamente, 3 Å um do outro. Na Figura 20A podemos observar as estruturas no início (*docking* proteína-proteína) e final da simulação ABF, alinhadas em relação ao PPAR $\gamma$ . Observamos que, ao final do ABF, os modelos 1 e 3 se mostraram bastante semelhantes, assim como os modelos 2 e 4. O cálculo de RMSD do *backbone* de um modelo em relação ao outro

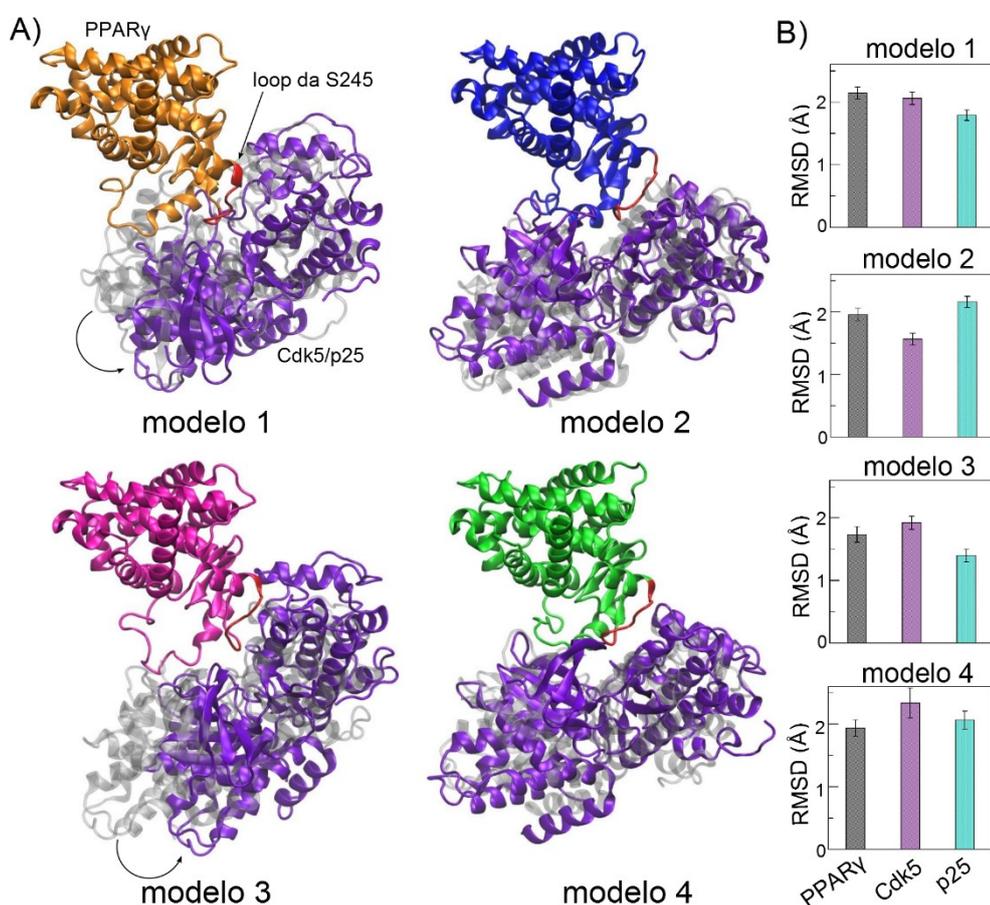


Figura 20: Comportamento das proteínas durante a etapa de refinamento: A) modelos PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25 no início (após *docking* proteína-proteína – cinza) e final das simulações ABF, alinhados pelo PPAR $\gamma$  (modelo 1, laranja; modelo 2, azul; modelo 3, rosa; modelo 4, verde), Cdk5/p25 – roxo, B) RMSD médio do PPAR $\gamma$  (barra cinza), Cdk5 (barra lilás), p25 (barra azul) nos últimos 10 ns de simulação ABF dos modelos (*backbone*; estrutura cristalográfica como referência), mostrando que não há desvios significativos das estruturas cristalográficas (cerca de 2 Å).

pode quantificar isso. O RMSD do modelo 1 em relação aos modelos 2, 3 e 4 é 7,410 Å; 3,683

Å e 7,335 Å, respectivamente. O RMSD do modelo 2 em relação aos modelos 3 e 4 é 6,697 Å e 2,852 Å, respectivamente. E o RMSD do modelo 3 em relação ao modelo 4 é 6,742 Å.

Na Figura 20A, vemos que os modelos 1 e 3 sofreram maiores transformações (rotação e translação) durante o processo, comparativamente aos outros modelos. Observamos que durante as simulações ABF dos modelos 1 e 3, houve uma aproximação da Cdk5/p25 em direção às fitas  $\beta$  do PPAR $\gamma$ . Além disso, houve uma mudança conformacional no  $\Omega$ -loop para manter a interação com Cdk5/p25. A importância dessas regiões será discutida na seção de caracterização dos modelos. Ao compararmos a dinâmica do PPAR $\gamma$ , Cdk5 e p25 com as estruturas cristalográficas, não observamos grandes desvios em relação a suas respectivas estruturas cristalográficas (Figura 20B). Isso pode ser observado pelo desvio médio quadrático (RMSD) do *backbone* dessas proteínas que flutuou em torno de 2Å (a referência utilizada foi a estrutura cristalográfica) (Figura 20B). Esses resultados mostram que não houve mudanças globais significativas nas estruturas com a aproximação do resíduo ao sítio de fosforilação.

Para analisar localmente o sítio de fosforilação, comparamos as simulações de ABF do complexo PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25 com: (i) aMD do PPAR $\gamma$ -livre, a estrutura do LBD do PPAR na ausência de ligante e de Cdk5; (ii) estrutura cristalográfica do LBD do PPAR $\gamma$  ligada a um agonista parcial.<sup>46</sup> A simulação de MD acelerada do PPAR $\gamma$  foi feita para melhor amostrar a mobilidade do loop da S245 sem a influência de ligante ou da enzima Cdk5. Por outro lado, o propósito de comparar os modelos com a estrutura do PPAR $\gamma$  ligado a um agonista parcial foi o de verificar como o loop da S245 desse receptor teria que se distorcer para se associar com a Cdk5. Os resultados de ABF revelaram que há algumas diferenças entre os modelos na flutuação estrutural da região do loop da S245 e das fitas  $\beta$ , dado o RMSD dessa região em relação a estrutura cristalográfica (Figura 21A). No modelo 1, essa região desvia da referência mais que nos outros (~6,4 Å). Os modelos 2, 3 e 4 também desviam da estrutura cristalográfica para promover a aproximação da S245 (PPAR $\gamma$ ) ao D126 (Cdk5). Entretanto, as estruturas desviam menos (de 2,8 a 4 Å) do que na simulação de aMD do PPAR $\gamma$ -livre (~5 Å).

Para avaliar se o loop da S245 estava se afastando do cerne do LBD do PPAR $\gamma$ , calculamos a porcentagem de contatos entre o loop da S245 e os outros resíduos do PPAR $\gamma$  (Figura 21B). Consideramos interagentes as cadeias laterais que estavam a menos de 3 Å uma da outra, baseando-nos na estrutura cristalográfica. Observamos que, no modelo 1, o loop da S245 perdeu mais de 50% dos contatos com PPAR $\gamma$ , sugerindo que o loop da S245 estava se afastando da superfície. Dentre os outros modelos, o modelo 4 permaneceu fazendo contatos substanciais com PPAR $\gamma$  (~75%). A Figura 21C mostra a mobilidade da região entre H2- loop

da S245- fitas  $\beta$  na aMD do PPAR $\gamma$ -livre e compara com a estrutura cristalográfica e a estrutura dos modelos PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25 pós-ABF. Observamos que a estrutura secundária das fitas  $\beta$  foi mantida, apesar das mudanças conformacionais no loop da S245 (Figura 21C). Esse é um aspecto importante a se destacar, pois poderíamos pensar que para aproximar o loop da S245 da Cdk5, seria necessário desestruturar a fita  $\beta$  adjacente. No modelo 1, vemos que o loop da S245 atinge uma conformação que não foi amostrada na simulação aMD do PPAR $\gamma$ -livre. Levando em consideração esses resultados e os apresentados nas Figura 21A-C para o modelo 1, sugerimos que o processo de aproximação envolve um mecanismo de *fit* induzido para esse modelo.<sup>116,117</sup> Nesse caso, a interação da Cdk5 com o PPAR $\gamma$  induz uma mudança conformacional na região do loop da S245 para promover a reação de fosforilação. Nos outros casos, os *snapshots* dos modelos de ABF 2, 3 e 4 estão em conformações de equilíbrio dinâmico preexistente comparando com PPAR $\gamma$ -livre (Figura 21C).<sup>117</sup>

Esses resultados também indicam que, para a maioria dos modelos PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25, não são necessárias mudanças substanciais na conformação do loop da S245 para a interação

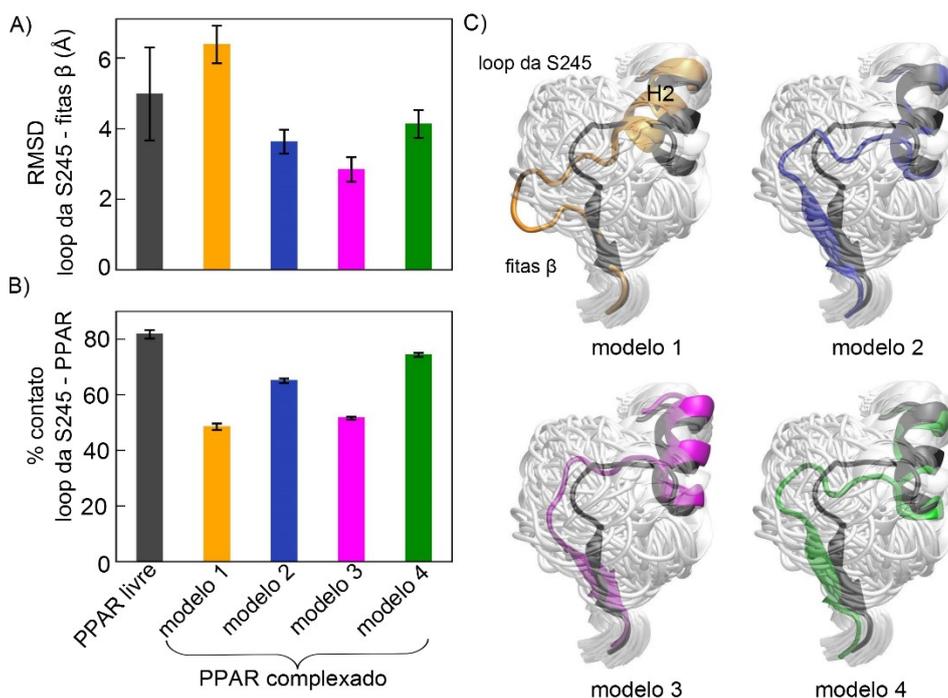


Figura 21: Mudanças locais no sítio ativo durante o refinamento: A) RMSD médio do *backbone* da região do loop da S245 – fita  $\beta$  do PPAR $\gamma$  complexado (últimos 10 ns da ABF MD) e do PPAR $\gamma$ -livre (durante os 200 ns de aMD), usando a estrutura cristalográfica (PDB ID: 3T03) como referência, B) Porcentagem de contatos (relativo a estrutura cristalográfica do PPAR $\gamma$  (PDB ID: 3T03) entre loop da S245 e o cerne do LBD, C) Região do loop da S245 – fita  $\beta$ : na estrutura cristalográfica (preta) (PDB ID: 3T03), em um snapshot da simulação ABF dos modelos (1, laranja; 2, azul; 3, rosa; 4, verde) e na simulação aMD do LBD-PPAR $\gamma$  (superfície branca transparente).

com Cdk5. Como podemos observar na Figura 21C, nesses modelos, os loops ficaram em uma conformação parecida com a observada na estrutura cristalográfica do PPAR $\gamma$  ligada ao agonista. Somente o modelo 1 segue a hipótese de que o loop da S245 é instável na ausência do ligante e se afasta da superfície do PPAR $\gamma$  para interagir com a Cdk5. Essa hipótese é suportada por Choi e colaboradores baseada nos altos níveis de incorporação de deutério na região.<sup>49</sup> Para verificar qual mecanismo de *docking* (e, conseqüentemente, qual modelo) melhor representa o complexo PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25 foi necessário testar sua estabilidade.

### 3.3.4 Relaxação e estabilização estrutural dos modelos PPAR $\gamma$ -Cdk5

Realizamos simulações de MD de cada modelo PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25, durante 300 ns, para relaxar os complexos e verificar a estabilidade das interações proteína-proteína. A Figura 22A mostra o comportamento do sítio de fosforilação durante essas simulações através da evolução temporal da distância entre H-S245 (PPAR $\gamma$ ) e O-D126 (Cdk5). Nos primeiros 10 ns de simulação mantivemos fixas as distâncias entre H-S245 (PPAR $\gamma$ ) e O-D126 (Cdk5). Nos modelos 1 e 2, o loop da S245 afastou do sítio de fosforilação da Cdk5 no início da simulação (logo após 10 ns) e o resíduo serina se voltou em direção ao LBD do PPAR $\gamma$  (Figura 22A, 22B, 22C). No modelo 1, esse passou a interagir com o *backbone* do resíduo Q345 (resíduo na região das fitas  $\beta$  do próprio PPAR $\gamma$ ) e no modelo 2, S245 interage com moléculas de água. Após 125 ns, a S254 do modelo 4 (Figura 22D), se afasta do D126 e primeiro interage com o resíduo K261 do próprio PPAR $\gamma$  e depois com moléculas de água. Somente no modelo 3 os resíduos do sítio de fosforilação permaneceram próximos um do outro, algumas vezes a S245 interage com o resíduo E161 (Cdk5), mas permanece próxima do D126 para eventuais interações (Figura 22E). Por isso, esse modelo pode ser um bom candidato para representar as interações PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25. Entretanto, não podemos descartar totalmente o modelo 4, porque além de ser similar ao modelo 3, não sabemos quanto tempo Cdk5/p25 precisa ficar perto do PPAR $\gamma$  para que a reação ocorra. Existem, no entanto, algumas similaridades e diferenças principalmente entre os modelos 3 e 4, que serão discutidas na próxima seção, na qual caracterizaremos as principais interações e mudanças conformacionais envolvidas na associação entre PPAR $\gamma$  e Cdk5/p25.

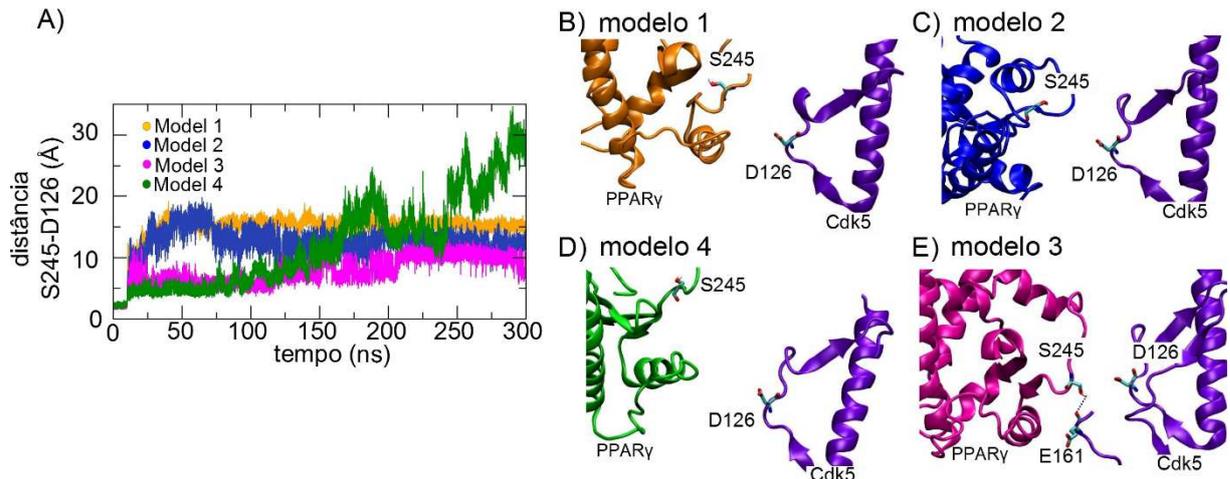


Figura 22: Estabilização dos modelos PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25 durante os 300 ns de simulação MD  
 A) Evolução temporal da distância entre os resíduos de fosforilação, hidrogênio da S245 (PPAR $\gamma$ ) e oxigênio da D126 (Cdk5). Nos modelos 1 e 2, S245-D126 se afastam nos primeiros 10 ns; no modelo 4, após 125 ns e no modelo 3, permanecem próximos e S245 passa a interagir, eventualmente, também com *backbone* do resíduo E161 (Cdk5). As Figuras B), C), D) e E) mostram o sítio ativo dos modelos PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25 no final das simulações MD (modelo 1, laranja, modelo 2, azul, modelo 4, verde e modelo 3 rosa).

### 3.3.5 Caracterização dos modelos Cdk5/p25-PPAR $\gamma$

A caracterização molecular do modelo 3, após simulação ABF mostra que a interface PPAR $\gamma$  – Cdk5/p25 pode ser subdividida em três regiões de *docking*: sítio  $\Omega$ -loop ( $\Omega$ -loop do PPAR $\gamma$  e lobo N-terminal da Cdk5), sítio ativo (loop S245 do PPAR $\gamma$  e sítio ativo da Cdk5) e sítio fitas- $\beta$  (fitas- $\beta$  do PPAR $\gamma$  e lobo C-terminal da Cdk5).

Todos os modelos apresentam esses três sítios, mas para alguns há mudanças nos resíduos

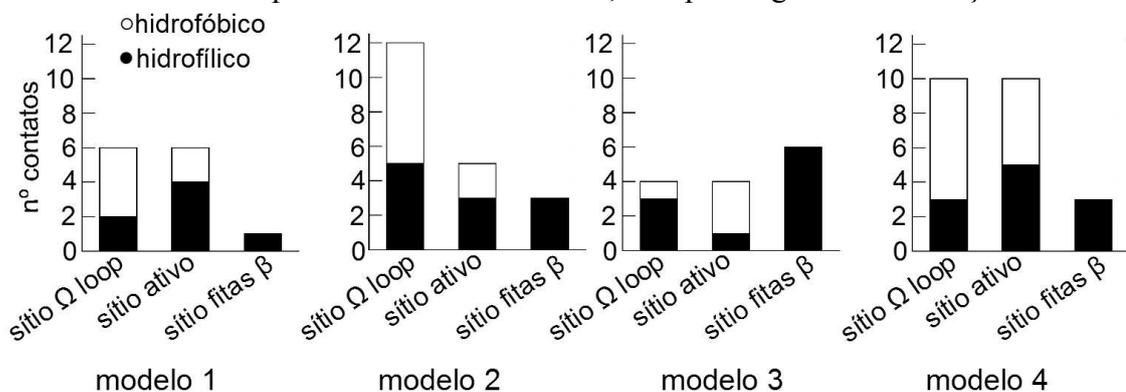


Figura 23: Número contatos hidrofóbicos e hidrofilicos nos sítios de *docking* (estrutura pós-ABF) em cada um dos modelos.

interagentes, no número e tipo de interações (Figura 23). Os sítios  $\Omega$ -loop e as fitas- $\beta$  podem ser descritos como exemplos de sítios de *docking* distal, ou seja, motivos de ligação adicionais espacialmente separados do sítio ativo. Suas funções podem aumentar a afinidade e especificidade por substratos. Assim, eles podem aumentar a concentração de substrato local e, por isso, aumentar a taxa de fosforilação.<sup>118</sup>

Os sítios de *docking* distal têm sido identificados em várias quinases, incluindo a Cdk2.<sup>119–121</sup> No caso da Cdk2, esse sítio de *docking* distal está localizado na ciclina A, a cerca de 40 Å do sítio ativo e envolve uma região hidrofóbica que interage com um peptídeo motivo RXL. O sítio  $\Omega$ -loop do PPAR $\gamma$  parece estar em uma posição similar a do peptídeo motivo RXL e envolve interações com a p25 (parceira da Cdk5) como mostrado no modelo 3 (Figura 24A). Entretanto, a região do  $\Omega$  loop está localizada próxima do sítio ativo (a cerca de 25Å) e pode envolver tanto interações hidrofóbicas quanto hidrofílicas. As Figuras 24B-D mostram em detalhe as interações entre os resíduos nos sítios ativo e distais. No sítio  $\Omega$ -loop (Figura 24B), K265 ( $\Omega$ -loop do PPAR $\gamma$ ) interage através de ligação de hidrogênio com E42 ( $\beta$ 3- $\alpha$ C loop da Cdk5) e K261 ( $\Omega$ -loop da PPAR $\gamma$ ) faz uma ponte salina com E240 ( $\alpha$ 3- $\alpha$ 4 loop da p25) e E161 ( $\beta$ 9- $\alpha$ F loop da Cdk5). O resíduo M257, também no  $\Omega$ -loop do PPAR $\gamma$ , faz um contato

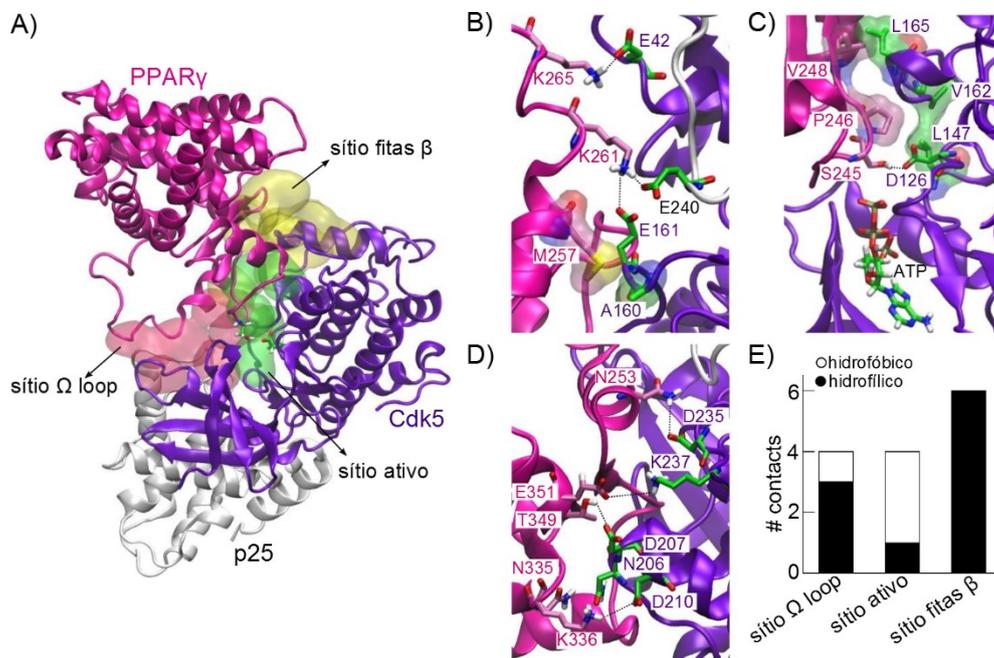


Figura 24: Caracterização do modelo 3 PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25: A) estrutura enfatizando as três regiões de *docking* entre PPAR $\gamma$  (rosa), Cdk5 (violeta) e p25 (branco): sítio  $\Omega$ -loop (superfície transparente vermelha), sítio ativo (superfície transparente verde) e sítio folha  $\beta$  (superfície transparente amarela). Resíduos interativos do PPAR $\gamma$  e da Cdk5/p25 (ligações de hidrogênio representadas pelas linhas pontilhadas e interações hidrofóbicas, pela superfície transparente): no sítio do  $\Omega$ -loop (B); no sítio ativo (C); no sítio das folhas  $\beta$  (D). Número de contatos hidrofílicos e hidrofóbicos nos sítios para o modelo 3 (E).

hidrofóbico com A160 ( $\beta 9$ -  $\alpha F$  loop da Cdk5). No sítio ativo (Figura 24C), S245 PPAR $\gamma$  interage por ligação de hidrogênio com D126 ( $\beta 6$ - $\beta 7$  loop da Cdk5) e com uma molécula de ATP. As outras interações desse sítio são hidrofóbicas, destacando-se o resíduo P246, do loop da S245 do PPAR $\gamma$ , que faz um cluster hidrofóbico com V162 ( $\beta 9$ - $\alpha F$  loop da Cdk5) e L147 ( $\beta 8$ - $\beta 9$  loop da Cdk5). O terceiro sítio é o sítio das fitas  $\beta$ , formado somente por contatos hidrofílicos. Na região da K336 ( $\beta 2$ - $\beta 3$  loop do PPAR $\gamma$ ) que interage com D210 da  $\alpha G$  da Cdk5, forma-se um cluster salino. O resíduo adjacente D337 ( $\beta 2$ - $\beta 3$  loop do PPAR $\gamma$ ) mantém a posição da K336 e um resíduo R214 na  $\alpha G$  da Cdk5 mantém a posição do D210 (não representados na Figura 24D). Próximo a esses resíduos está o N335 ( $\beta 2$ - $\beta 3$  loop) do PPAR $\gamma$  que faz uma interação do tipo polar com N206 ( $\alpha F$ - $\alpha G$  loop) da Cdk5. O resíduo T349 ( $\beta 4$ ) do PPAR $\gamma$  faz uma ligação de hidrogênio com D207 ( $\alpha F$ - $\alpha G$  loop) da Cdk5 e o resíduo E351 ( $\beta 4$ ) do PPAR $\gamma$  interage com K237 ( $\alpha G$ - $\alpha H$  loop) da Cdk5. Os resíduos N253 (H2') do PPAR $\gamma$  e D235 ( $\alpha G$ - $\alpha H$  loop) da Cdk5 interagem por ligação de hidrogênio. Para discriminar a quantidade e tipo de interação em cada sítio, contabilizamos o número de contatos hidrofílicos e hidrofóbicos (Figura 24E).

As complementariedades das interações descritas acima podem contribuir para a seletividade da Cdk5 por certos substratos em relação a outros membros da família Cdk. A Cdk2, por exemplo, tem o mesmo sítio ativo que a Cdk5 e a especificidade por sequência de aminoácidos do substrato ( $X_{-1} S/T_0 P_{+1} X_{+2} (K,R_{+3})$ ) idêntica à da Cdk5. Alinhando a sequência primária da Cdk5 e Cdk2, e olhando para as regiões de *docking*, vemos que as principais diferenças ocorrem entre resíduos dos sítios  $\Omega$  loop e fitas  $\beta$  (Tabela 2). Nessas regiões, percebemos que alguns aminoácidos de mesma posição nas sequências da Cdk5 e Cdk2, são diferentes em relação à classe química. Isso altera a interação com o PPAR $\gamma$ . Como exemplo, citamos o aminoácido da posição 160, que na Cdk5 corresponde ao resíduo hidrofóbico A160 e na Cdk2, ao resíduo básico H161; o resíduo ácido D207 na Cdk5, que na Cdk2 corresponde ao resíduo não carregado S207 e o resíduo polar não carregado N206 na Cdk5 que corresponde ao resíduo ácido D206 na Cdk2. A posição 160, que na Cdk5 é ocupada por uma alanina, na Cdk2, não apresenta resíduos hidrofóbicos na região equivalente, que compensem a interação com o resíduo M257 do PPAR $\gamma$ , o que causaria penalidades no caso de uma hipotética associação PPAR $\gamma$ -Cdk2. Essas são indicações de que as regiões de *docking* distais do modelo 3 podem ser pelo menos parcialmente responsáveis pela seletividade da Cdk5 por certos substratos.

Tabela 2: Resíduos dos três sítios de *docking* ( $\Omega$ -loop, sítio ativo e fitas  $\beta$ ) no PPAR $\gamma$ , Cdk5 e os resíduos correspondentes da Cdk2 (após alinhamento das sequências primárias), os aminoácidos de mesma posição em ambas quinases com diferentes classes químicas estão destacados em amarelo. Os aminoácidos estão coloridos com base na polaridade da cadeia lateral: apolar (verde), polar não-carregado (roxo), positivamente carregado (azul) e negativamente carregado (vermelho).

Sítio $\Omega$ loop			Sítio Ativo			Sítio das fitas $\beta$		
PPAR $\gamma$	Cdk5	Cdk2	PPAR $\gamma$	Cdk5	Cdk2	PPAR $\gamma$	Cdk5	Cdk2
M257	A160	H161	S245	D126	D127	N253	D235	D235
K261	E161	E162	P246	V162	V163	N335	N206	D206
K261	S159	T160	P246	L147	L148	K336	D210	D210
K265	E42	E42	V248	L165	L166	D337	R214	R214
						T349	D207	S207
						E351	K237	K237

A principal alteração estrutural observada no modelo 3, relativa as estruturas cristalográficas, é na região do  $\Omega$  loop do PPAR $\gamma$ , que se afasta do cerne do LBD do PPAR $\gamma$  para preservar os contatos entre PPAR $\gamma$  e Cdk5/p25. Isso não é observado nos demais modelos. Na região do sítio ativo, as interações entre P246-V162 e S245-D126 e principalmente as orientações desses contatos, são importantes para o reconhecimento do substrato pela Cdk5. Estudos mostram que, como estratégia, quinases prolina-direcionadas criam um *pocket* apolar para acomodar esse resíduo prolina.<sup>119</sup> Assim como na Cdk2, no modelo 3, a V162 (Cdk5) faz um contato hidrofóbico com P246 (PPAR $\gamma$ ). Observamos nessa região que PPAR e Cdk5 apresentam outros resíduos hidrofóbicos complementares: V248 (PPAR $\gamma$ ), L147 (Cdk5) e L165 (Cdk5). Assim, vemos que a Cdk5 promove um ambiente hidrofóbico para acomodar o resíduo P246 do PPAR $\gamma$  possibilitando interações não somente com V162.

O modelo 3 sugere que todas as três regiões de *docking* podem ser importantes para preservar a Cdk5 próxima ao PPAR $\gamma$ . A região das fitas  $\beta$  do PPAR $\gamma$  parece ser a região mais rígida de *docking*, que pode servir para alinhar a Cdk5 precisamente com o sítio de fosforilação S245. Entretanto, o  $\Omega$ -loop do PPAR $\gamma$  é uma região adaptável que pode mudar a sua conformação para permitir e conservar a interação com a Cdk5. A flexibilidade do  $\Omega$ -loop pode permitir a docagem da Cdk5 ao PPAR $\gamma$  de maneiras levemente diferentes. Já que a Cdk5/p25 age em uma gama de substratos, é plausível que as interações enzima-substrato sejam capazes de se adaptar levemente dependendo do substrato.

Conforme mencionamos anteriormente, existem semelhanças do modelo 3 com o modelo 4. Como, no modelo 4, a Cdk5 permanece interagindo com o PPAR $\gamma$  durante 125 ns, decidimos caracterizá-lo também (Figura 25), comparando com o modelo 3 (Figura 24). As principais diferenças entre os modelos 3 e 4 são: i) o sítio do  $\Omega$ -loop e o sítio ativo e o no modelo 4 (Figura 25B-C) tem mais interações que no modelo 3, especialmente contatos hidrofóbicos; ii) há menos interações no sítio das fitas  $\beta$  no modelo 4 (Figura 25D) do que no modelo 3. O sítio de fitas  $\beta$  no modelo 4 é composto por dois contatos hidrofílicos. Enquanto isso, no modelo 3, esse sítio é constituído de um cluster salino, que não é observado em nenhum

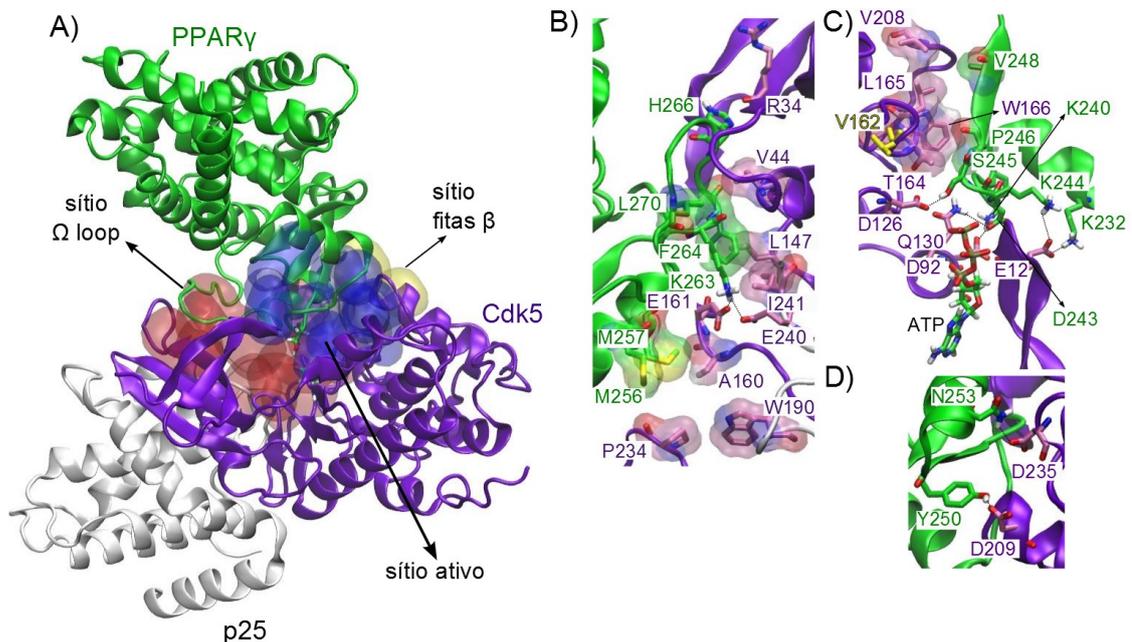


Figura 25: Caracterização do modelo 4: (A) Estrutura do modelo 4 enfatizando as três regiões de *docking* entre PPAR $\gamma$  (verde) e Cdk5 (roxo) e p25 (branco) – sítio  $\Omega$ -loop (superfície vermelha transparente), sítio ativo (superfície azul transparente) e sítio das fitas  $\beta$  (superfície amarela transparente); resíduos interagentes entre PPAR $\gamma$  e Cdk5/p25 (ligações de H representadas por linhas pontilhadas e interações hidrofóbicas por superfície transparente) no sítio  $\Omega$ -loop (B), sítio ativo (C), e no sítio das fitas  $\beta$  (D).

outro modelo. De fato, o sítio das fitas  $\beta$  no modelo 3 é o principal diferencial sobre os outros modelos, e pode ter um papel importante na estabilização estrutural do complexo.

Há também diferenças estruturais entre esses modelos relacionadas a região do  $\Omega$ -loop e sítio ativo do PPAR $\gamma$ . No modelo 4, há uma adaptação do  $\Omega$ -loop do PPAR $\gamma$  para interagir com a Cdk5 (com lobo N-terminal), mas ele se mantém próximo ao cerne do LBD do PPAR $\gamma$  (Figura 25A-B). No modelo 3, como o lobo N-terminal da Cdk5 está mais longe do PPAR $\gamma$ , o  $\Omega$ -loop adquire uma configuração aberta para preservar os contatos com a Cdk5. Na região do sítio ativo do modelo 4, a valina V162 (Cdk5) está longe da prolina P246 (PPAR $\gamma$ ), e a sua parte hidrofóbica aponta para a direção oposta da P246 (Figura 25C). Isso pode impossibilitar em

parte o reconhecimento do substrato pela Cdk5, já que essa é uma quinase prolina dependente e uma cavidade apolar acomoda melhor a prolina P246. No modelo 3, entretanto, o resíduo V162 faz contatos hidrofóbicos com o resíduo P246 (Figura 25C), assim como na Cdk2.

### **3.3.6 *Insights* sobre a função do PPAR $\gamma$ e a inibição da fosforilação pela Cdk5**

Uma característica interessante dos nossos modelos PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25 é que os sítios interativos, sítio fitas  $\beta$  e sítio  $\Omega$ -loop, são relatados na literatura como regiões ativadoras de PPAR $\gamma$ <sup>43,47</sup> e ainda não tinham sido relacionadas com a fosforilação da Cdk5. Apesar de o mais conhecido mecanismo de ativação do PPAR $\gamma$  ser através da mudança conformacional na hélice 12<sup>27</sup>, outras regiões no LBD do PPAR $\gamma$  também são importantes para a sua ativação. Bruning *et al.* mostraram que as fitas  $\beta$  e o  $\Omega$ -loop podem ser mediadores da resposta transcricional do PPAR $\gamma$ , dependente do grau de agonismo do ligante.<sup>43</sup> Experimentos de troca hidrogênio-deutério (HDX) comparando agonistas totais, parciais do PPAR $\gamma$  mostraram que, diferentemente dos agonistas totais, agonistas parciais protegem tanto ou mais a troca na região das fitas  $\beta$ , sugerindo uma estabilização da região.<sup>43</sup> Segundo estudos, mudanças conformacionais no  $\Omega$ -loop ativam o PPAR $\gamma$  via metabólitos de ácidos graxos. Além disso, mutações no  $\Omega$ -loop e em regiões próximas a ele anulam completamente a ativação<sup>47</sup> do PPAR $\gamma$ . Essa região também tem sido relacionada a ativação de outros isotipos do PPAR<sup>56</sup> e outros NRs, em que foi indicada como um possível caminho de associação/dissociação de ligantes.<sup>29,30,36–38,41,42</sup> Recentemente foi descoberto que agonistas parciais reduzem a dinâmica das fitas  $\beta$  e do loop da S245, deixando esta última em uma configuração menos favorável para o ataque da Cdk5.<sup>49</sup> Dessa forma, o principal foco de estudos para o tratamento da diabetes tipo 2, relacionado ao PPAR $\gamma$ , nesses últimos anos, está relacionado a inibição da fosforilação pela Cdk5.

O bloqueio da reação de fosforilação pode ser feito de duas formas: via enzima ou substrato. A Cdk5 é uma enzima pleiotrópica, envolvida em vários processos celulares, incluindo transporte de membrana, adesão celular, migração neuronal, dinâmica de actina, estrutura sináptica e plasticidade e miogênese.<sup>61</sup> O bloqueio desta enzima pode causar sérias consequências em diferentes domínios celulares. Portanto, a alternativa menos impactante e mais viável é através de mudanças conformacionais no PPAR $\gamma$ , que impede a ação da enzima.

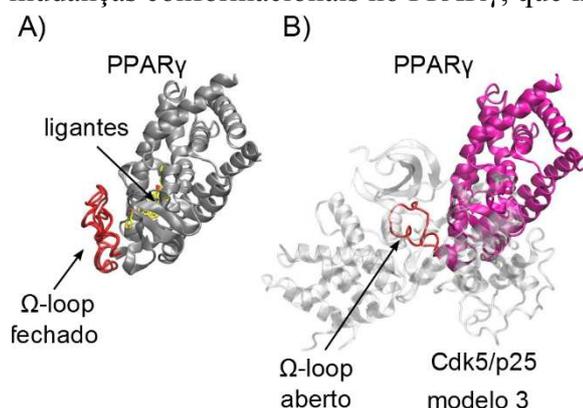


Figura 26: A) Estruturas cristalográficas do holo-PPAR $\gamma$  alinhadas (2ATH.pdb, 2F4B.pdb, 2I4Z.pdb, 3B3K.pdb), mostrando a região do  $\Omega$ -loop (vermelho) próxima ao cerne do LBD PPAR $\gamma$ ; B) modelo 3 do PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25 mostrando o  $\Omega$ -loop (vermelho) em uma configuração aberta.

Observando as mudanças conformacionais no LBD do PPAR $\gamma$  do nosso modelo, fizemos uma comparação com estruturas cristalográficas do holo-PPAR $\gamma$ . Na Figura 26, alinhamos as estruturas cristalográficas do PPAR $\gamma$  com agonistas totais (PDB ID: 2ATH,<sup>122</sup> 2F4B<sup>123</sup>) e do PPAR $\gamma$  com agonistas parciais (PDB ID: 2I4Z,<sup>124</sup> 3B3K<sup>125</sup>) com o modelo 3 do PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25. Não houve mudanças significativas no loop da S245, somente em outras regiões de *docking*, especialmente no  $\Omega$ -loop do PPAR $\gamma$ . Observamos que a configuração do  $\Omega$ -loop nas estruturas cristalográficas fica fechada, próxima ao cerne do LBD do PPAR $\gamma$  (Figura 26A). Em nosso modelo, observamos que o  $\Omega$ -loop adquire uma configuração aberta (Figura 26B), não observada nos outros modelos. Isso permite a interação entre o  $\Omega$ -loop do PPAR $\gamma$  e a Cdk5 e pode explicar a inibição da fosforilação promovida pelos ligantes de PPAR $\gamma$ . Os ligantes de PPAR $\gamma$  podem induzir mudanças conformacionais no LBD, especialmente nas regiões de folha  $\beta$  e  $\Omega$ -loop.<sup>43,47,49</sup> Essas modificações mantêm o  $\Omega$ -loop em uma configuração fechada, que pode prevenir o modo de ligação descrito pelo nosso modelo e consequentemente reduzir/bloquear a fosforilação.

Apesar de os modelos não apontarem mudanças na região do loop da S245, simulações de dinâmica acelerada comparando os sistemas PPAR $\gamma$ -livre e PPAR $\gamma$  com os ligantes RSG e GQ16, mostram que a presença de ligantes pode estabilizar o loop de fosforilação. Analisamos o RMSD do loop da S245 (*backbone*) das trajetórias, em relação à estrutura média das simulações, que na Figura 27 é apresentado na forma de distribuição de probabilidade. Nessa análise, vemos que nas simulações MD convencional e aMD *dual boost*, não há diferenças significativas na mobilidade do loop da S245. No entanto, na simulação aMD diedral, as curvas de distribuição de RMSD ficam deslocadas para a direita (valores de RMSD maiores), indicando que esse loop explorou mais conformações nessas simulações. Além disso,

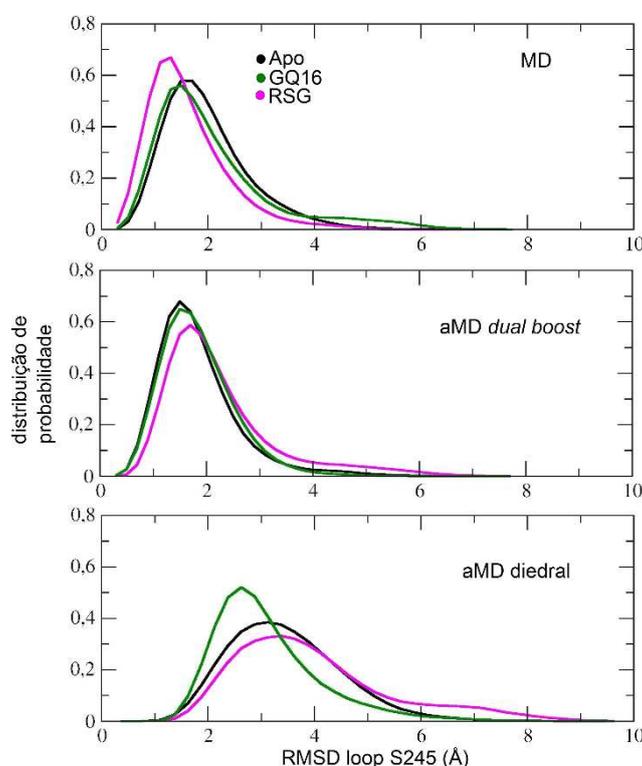


Figura 27: Distribuição de probabilidade do RMSD do backbone do loop da S245 (em relação a estrutura média da simulação) nas simulações MD convencional, aMD dual-boost e aMD diedral, para os sistemas PPAR $\gamma$ -livre (preto), PPAR $\gamma$ -RSG (rosa) e PPAR $\gamma$ -GQ16 (verde).

percebemos que o loop da S245 fica menos móvel em presença de GQ16, enquanto em presença de RSG a amostragem do loop é ampla. Estudos experimentais mostram que ligantes de PPAR $\gamma$  estabilizam algumas regiões do receptor, incluindo a região do loop da S245.<sup>46</sup> Além disso, o agonista parcial GQ16, comparativamente ao agonista total rosiglitazona, permite uma estabilização maior dessa região do receptor. Os resultados para as demais regiões importantes para a interação PPAR $\gamma$ -Cdk5, como  $\Omega$  loop e fitas  $\beta$ , não foram conclusivos.

## Capítulo 4

### Proposta de modelo estrutural para o complexo PPAR $\gamma$ - SR664

#### 4.1 Contextualização

O primeiro integrante da classe dos não-agonistas de PPAR $\gamma$  descoberto. Foi o ligante SR1664. Ele possui características não-triviais para ligantes de PPAR $\gamma$ , já que: (i) apresenta alta afinidade pelo receptor, (ii) antagoniza o agonismo transcricional do agonista total RSG, em ensaios de competição<sup>33,50</sup> (iii) bloqueia a reação de fosforilação da S245 mediada pela Cdk5 (*in vitro* e *in vivo*), (iv) tem ação antidiabética, porém (v) não ativa o PPAR $\gamma$  (não ativa a atividade transcricional do receptor).<sup>50</sup>

O desacoplamento entre agonismo clássico e atividade antidiabética, que se iniciou através dessa classe de ligantes, possibilita diminuir os efeitos adversos ocasionados por ligantes de PPAR $\gamma$ . Esses efeitos estão associados ao mecanismo clássico de ativação do receptor. Dessa forma, o SR1664 tornou-se um alvo de estudo interessante. Novos membros dessa classe estão sendo estudados, como o ligante UHC1, anteriormente citado na seção 1.5.1.5. Ainda há poucas informações sobre a forma de interação desse ligante com o receptor, pois não há uma estrutura cristalográfica disponível do complexo PPAR $\gamma$ -SR1664.

Nesse estudo, propomos um modelo estrutural para o complexo PPAR $\gamma$ -SR1664, através de *docking* farmacofórico da cavidade de ligação do receptor e simulação de dinâmica molecular. O *docking* farmacofórico é uma metodologia nova, diferente dos métodos de *docking* tradicionais, baseada em propriedades físico-químicas de diferentes classes de ligantes, que será melhor explicado na próxima seção. Após obter o modelo de docking, relaxamos a estrutura e verificamos a estabilidade do modo de ligação proposto, através da simulação de dinâmica molecular.

## 4.2 Metodologia

### 4.2.1 Docking Farmacofórico PPAR $\gamma$ -SR1664

A estrutura do complexo PPAR $\gamma$ -SR1664 foi obtida através do método de *docking* farmacofórico tridimensional, implementado no programa ICM, conhecido como *Atomic Property Fields*, APF,<sup>126</sup> Esse método, desenvolvido pela ex-integrante do grupo, Dra. Clarisse G. Ricci, é bastante diferenciado dos demais métodos de *docking* e baseia-se nas propriedades físico-químicas de ligantes que foram co-cristalizados no receptor para gerar potenciais. Esses potenciais refletem preferências espaciais da cavidade de ligação, como por exemplo, tamanho, lipofilia, eletronegatividade, aromaticidade. Os mapas farmacofóricos tridimensionais são construídos a partir da orientação espacial de um conjunto de ligantes, cujas estruturas foram obtidas pelo PDB e alinhadas pelo *backbone* da proteína. Cada átomo do ligante recebe uma pontuação para cada propriedade atômica e o modelo farmacofórico final consiste de sete mapas tridimensionais: grupos aceptores ou doadores de ligações de hidrogênio, hibridização sp<sup>2</sup>, lipofilia, tamanho, carga, eletronegatividade.<sup>126</sup>

A partir disso, realiza-se a docagem do ligante ao qual se deseja conhecer o modo de interação. Utiliza-se o algoritmo de Monte Carlo para encontrar a orientação que melhor representa o encaixe das propriedades físico-químicas do ligante nos mapas. A função de escore é a medida de sobreposição farmacofórica. O subpocket do SR1664 foi gerado a partir de dois subpockets: dos ácidos graxos e do GQ16. A estrutura do PPAR $\gamma$  utilizada foi a estrutura cristalográfica do receptor (PDB ID 3HOD),<sup>127</sup> obtida com um agonista de PPAR $\alpha/\gamma$ , derivado do ácido propanóico.<sup>128</sup>

### 4.2.2 Parametrização do ligante SR1664

Utilizamos uma metodologia de parametrização para o SR1664, baseada no campo de força CHARMM<sup>68,83</sup>, aplicada anteriormente pelo grupo,<sup>108,129</sup> para parametrização dos ligantes rosiglitazona<sup>108</sup> e GQ16. Alguns conjuntos de parâmetros do campo de força são transferíveis de uma molécula para outra, que tenha características semelhantes. Esse é o caso de parâmetros relacionados a graus de liberdade como estiramento de ligação e deformação angular, pois influenciam pouco a acurácia do campo de força, do ponto de vista das interações

intermoleculares. Os parâmetros de van der Waals (vdW) também podem ser utilizados para a maioria dos átomos do mesmo elemento. Assim, foi possível transferir as constantes de força de estiramento de ligação, deformação angular dos arquivos de parâmetros de proteínas e ácidos nucleicos do CHARMM22 para a molécula do SR1664, por analogia a grupos similares. Alguns parâmetros, como os dos anéis bifenil, nitrobenzeno e carboxilato, foram obtidos a partir do CHARMM General Force Field36 (versão 2b7)<sup>130</sup>.

Realizamos cálculos quânticos para definir os parâmetros de três diedros do SR1664 que não eram transferíveis e foram necessários cálculos quânticos para definir seus parâmetros (mostrados na Figura 28). O diedro T1 é um diedro relacionado a um anel heterocíclico, o diedro T2 é semelhante a uma ligação peptídica, porém os carbonos pertencem a um anel benzênico e o diedro T3 é um diedro que envolve N, C, um carbono de carboxila e um carbono aromático, nenhum desses apresentam parâmetros semelhantes no campo de força. Para isso, a molécula foi dividida em fragmentos, a fim de facilitar a obtenção dos diedros e diminuir os custos computacionais. Construímos a molécula do ligante e seus fragmentos, utilizando o *plugin* do *VMD Molefacture*<sup>131</sup>. Através desse *plugin*, atribuímos a numeração e os tipos atômicos dos átomos (fazendo analogia aos tipos atômicos do campo de força CHARMM22 *all-atom*<sup>100</sup> para proteínas) e dessa forma, obtivemos os arquivos de topologia.

A arquitetura dos arquivos de parâmetros foi gerada utilizando o *plugin* do *VMD Force Field Tool Kit*.<sup>132</sup> Por analogia a parâmetros de átomos já existentes no campo de força CHARMM, obtivemos os parâmetros de estiramento de ligação, ângulo, diedros e Lennard-Jones.

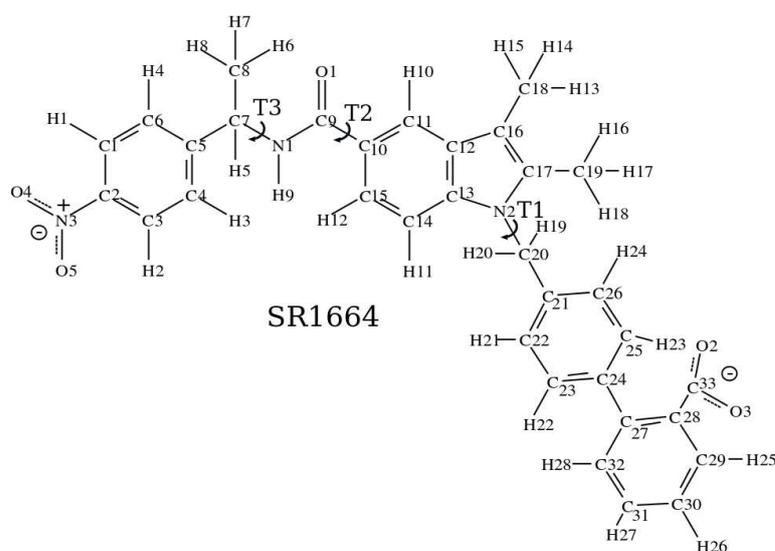


Figura 28: Estrutura molecular do ligante SR1664, destacando os diedros (T1, T2, T3) que foram parametrizados

Após construir as estruturas do ligante e dos fragmentos, fizemos a otimização de

geometria desses, utilizando o programa Gaussian 03.<sup>133</sup> Por ser uma molécula grande, conseguimos otimizar a estrutura do SR1664 inteiro somente na teoria *Hartree-Fock* (HF). Já para os fragmentos, otimizamos primeiro em RHF/6-31G(d) e depois em MP2/6-31G(d). Assim obtivemos os valores das constantes de distância de equilíbrio e de ângulo de ligação.

As cargas atômicas parciais dos fragmentos e da molécula inteira foram obtidas considerando o potencial eletrostático (método Merz-Kollman),<sup>134,135</sup> carga líquida total e dipolo da molécula usando MP2/6-31G(d).<sup>133</sup> Para átomos equivalentes, consideramos a simetria da molécula e fizemos a média entre eles. A carga total do SR1664 é -1, devido ao grupo funcional carboxilato que está desprotonado em condições fisiológicas. No campo de força CHARMM, assim como a maioria dos campos de força, é preciso definir um tipo atômico para cada átomo do sistema, pois os parâmetros são expressos em termos deles. Na Tabela 3, estão listados os tipos atômicos e cargas parciais da molécula do SR1664 (segundo a numeração de átomos da Figura 28A).

Para o estudo dos diedros em questão, fizemos cálculos quânticos (*Quantum Mechanics*, QM) da varredura da energia de rotação de cada diedro (de 20 em 20°). Cada varredura consiste em uma série de relaxações estruturais, em que somente o ângulo em estudo é mantido fixo. Após obter a curva quântica, calculamos a curva clássica (*Molecular Mechanics*, MM), usando o NAMD2.7 via *plug-in* NAMD Energy do VMD, através dos potenciais de todos os outros diedros da molécula (exceto o que se quer descobrir). A diferença dessas duas curvas, gera uma terceira curva somente com os potenciais do diedro em questão. Ajusta-se a essa terceira curva uma equação formada por uma soma de cossenos e se obtém os parâmetros diedrais  $K_{\Phi_n}$ ,  $\delta$  e  $n$  (equação 2.1.5 da seção 2.1). As curvas resultantes (diferença de energia entre QM e MM) refletem fatores como hibridização dos átomos envolvidos e/ou ressonância eletrônica.

Na Figura 29 podemos observar pela curva da diferença QM-MM (curva pontilhada preta) do diedro T2, que os mínimos são encontrados em 0° e 180°, uma conformação planar. Essa conformação é relativa à estrutura planar da ligação peptídica (caráter parcial de dupla ligação entre C-N, ressonância entre C da carbonila e nitrogênio). A curva da diferença para a torção T3 mostra barreiras em 0°, 90° e 180°, configurações em que há impedimento estérico entre o anel e os átomos de nitrogênio ou oxigênio da ligação peptídica. Na Tabela 4, mostramos as constantes, multiplicidade e ângulo de fase dos diedros T1, T2 e T3 que foram parametrizados.

Tabela 3: Definição dos tipos atômicos e cargas parciais dos átomos do SR1664 (numerados segundo a Figura 28)

Átomo	Tipo Atômico	Carga (u.a.)	Átomo	Tipo Atômico	Carga (u.a.)
C1	CG2R61	-0.22	H14	HA	0.09
H1	HGR61	0.23	C15	CA	-0.05
N1	NTG	-0.88	H15	HA	0.09
O1	O	-0.78	C16	CY	-0.51
C2	CG2R61	0.14	H16	HA	0.14
H2	HGR61	0.23	C17	CA	0.08
N2	NY	-0.41	H17	HA	0.14
O2	OG2D2	-0.87	C18	CT3	-0.27
C3	CG2R61	-0.22	H18	HA	0.14
H3	HGR61	0.19	C19	CT3	-0.42
N3	NG2O1	0.72	H19	HA	0.01
O3	OG2D2	-0.87	C20	CT2	0.31
C4	CG2R61	-0.16	H20	HA	0.01
H4	HGR61	0.19	C21	CG2R61	0.30
O4	OG2N1	-0.47	H21	HGR61	0.17
C5	CTG3	0.02	C22	CG2R61	-0.37
H5	HA	0.00	H22	HGR61	0.12
O5	OG2N1	-0.47	C23	CG2R61	-0.10
C6	CG2R61	-0.16	H23	HGR61	0.12
H6	HA	0.11	C24	CG2R67	-0.05
C7	CT1	0.59	H24	HGR61	0.17
H7	HA	0.11	C25	CG2R61	-0.10
C8	CT3	-0.54	H25	HGR61	0.15
H8	HA	0.11	C26	CG2R61	-0.37
C9	C	0.89	H26	HGR61	0.13
H9	H	0.41	C27	CG2R67	-0.02
C10	CA	-0.17	H27	HGR61	0.14
H10	HP	0.29	C28	CG2R61	-0.04
C11	CTG	-0.25	H28	HGR61	0.12
H11	HP	0.29	C29	CG2R61	-0.27
C12	CPT	0.37	C30	CG2R61	-0.15
H12	HP	0.23	C31	CG2R61	-0.20
C13	CPT	0.31	C32	CG2R61	-0.16
H13	HA	0.09	C33	CG2O3	0.84
C14	CA	-0.25			

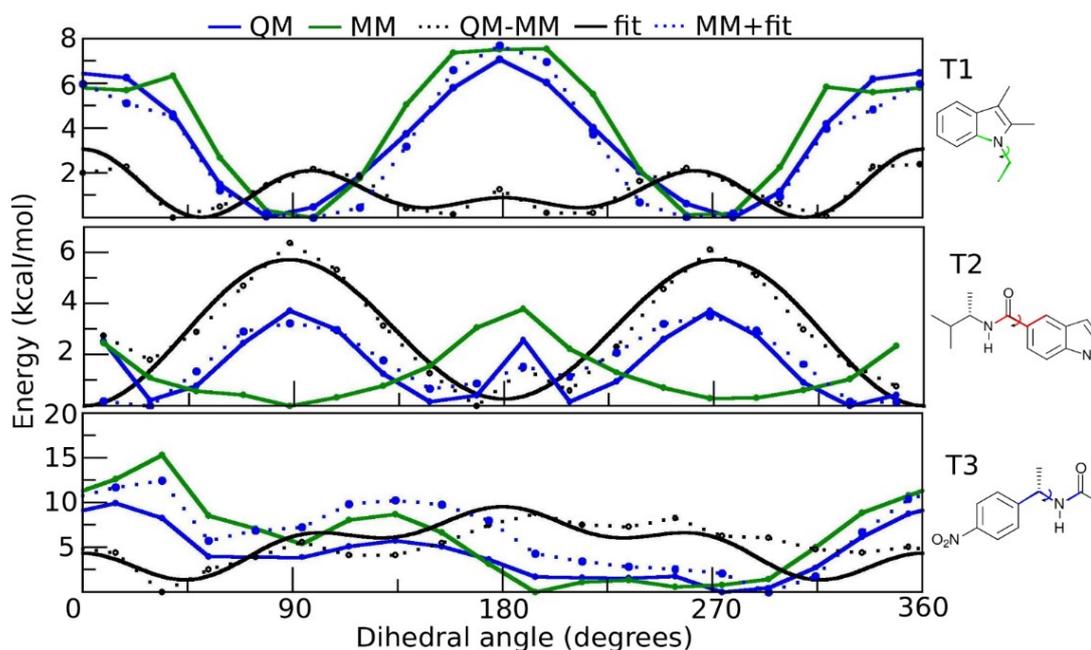


Figura 29: Curvas de energia potencial geradas para os diedros T1, T2 e T3. Em azul, curva de energia potencial obtida quanticamente (QM) na varredura dos diedros. A curva em verde representa a energia potencial dos diedros utilizando o potencial clássico (MM). A diferença entre as energias quântica (QM) e clássica (MM) está representada na linha preta pontilhada. A curva em preto (linha cheia) é o ajuste dessa diferença, de onde obtêm-se os parâmetros diedrais para o campo de força. A curva pontilhada em azul representa a energia potencial clássica somada à curva de ajuste, que deve ser parecida à curva obtida quanticamente. Ao lado de cada gráfico, estão representados os fragmentos moleculares utilizados para realizar a varredura de energia da rotação dos diedros.

Os fragmentos do SR1664, otimizados quanticamente no nível da teoria MP2, são mostrados na Figura 30A-C. Realizamos também uma minimização clássica desses fragmentos. Observamos que há grande semelhança entre as estruturas minimizadas quântica e classicamente. Na Figura 31, além das estruturas minimizadas, alinhamos os *snapshots* extraídos de simulações MD no vácuo, que mostram uma variação aceitável dos diedros parametrizados.

Tabela 4: Parâmetros para as rotações torcionais T1, T2 e T3 determinados pelo ajuste das curvas de energia potencial mostradas na Figura 29.

Diedro		$K_{n,d}$ (kcal/mol)	N	$\delta$ (°)
T1	C13 N2 C20 C21	0.1795	1	0.0
		0.3623	3	0.0
		0.4022	4	0.0
T2	N1 C9 C10 C11	0.1000	1	180.0
		0.7100	2	180.0
T3	C5 C7 N1 C9	1.5000	1	180.0
		0.1900	2	0.0
		0.2000	3	0.0
		0.7000	4	0.0

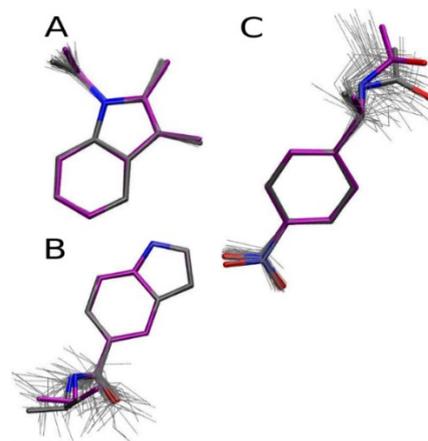


Figura 30: Estruturas dos fragmentos do SR1664, minimizadas quanticamente em MP2 (traços espessos cinza) e classicamente (traços espessos roxos) sobrepostas a snapshots das simulações no vácuo (linhas cinza) para observar comportamento dos diedros T1 (A), T2 (B) e T3 (C).

A Figura 31A mostra as estruturas do SR1664 inteiro, otimizadas por RHF e MM. Realizamos simulações do ligante no vácuo e em água para monitorar o comportamento dos diedros parametrizados. Os *snapshots* das simulações do SR1664 no vácuo e em água estão

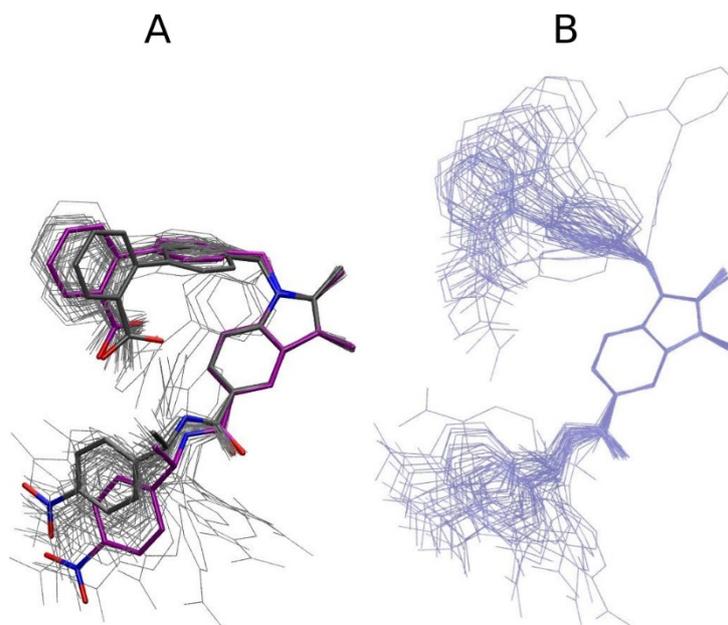


Figura 31: Sobreposição das estruturas minimizadas quanticamente RHF (traços espessos cinza) e classicamente (traços espessos roxos): A) sobrepostas a *snapshots* das simulações no vácuo (linhas cinza), B) *snapshots* das simulações em água (linhas azuis).

sobrepostos às estruturas minimizadas na Figura 31B. Podemos observar que a torção T1, que tem uma barreira energética baixa, não varia muito nas MDs em vácuo (Figura 31A), devido às interações intermoleculares entre o carboxilato e o resíduo nitrogênio (N1). Já nas simulações em água, as interações intermoleculares não são tão frequentes, há maior interação com a água e esse diedro passa a varrer uma ampla gama de configurações (Figura 31B).

Após verificar o comportamento dos diedros no vácuo e em água, monitoramos os potenciais de torção obtidos, por meio de minimização de energia do ligante no vácuo e em presença de PPAR $\gamma$ . A variação dos ângulos dos diedros não foi muito significativa. As configurações adquiridas na minimização do ligante em presença do PPAR $\gamma$ , se diferem um pouco das adquiridas no vácuo, mas isso se justifica devido às interações com resíduos do ambiente proteico.

### 4.2.3 Simulações PPAR $\gamma$ -SR1664

Para o sistema PPAR $\gamma$ -SR1664, como não partimos de uma estrutura cristalográfica, realizamos algumas etapas de preparação, utilizando a estrutura do complexo PPAR $\gamma$ -SR1664 proposto pelo nosso grupo (descrita na próxima seção). Primeiramente, minimizamos a energia do sistema, para remover colisões entre átomos de cadeias laterais. Em seguida, o sistema passou pela etapa de equilíbrio, para relaxar a estrutura da proteína e permitir que ela se adaptasse ao ligante.

A sequência de etapas de preparação realizada foi a seguinte: (i) 1000 passos de minimização de energia, seguidos de 4 ns de equilíbrio, mantendo fixos o ligante e a proteína; (ii) 700 passos de minimização de energia, seguidos de 1 ns de equilíbrio, mantendo fixos o ligante e os carbonos  $\alpha$  da proteína (para que os resíduos da proteína se adaptassem ao ligante); (iii) 2000 passos de minimização de energia, seguidos de 2 ns de equilíbrio, mantendo fixo somente o ligante; (iv) 300 passos de minimização de energia, seguidos de 5 ns de equilíbrio, deixando todo o sistema livre. Após essas etapas, trajetórias de 100 ns de simulação MD foram geradas para análise. Esse protocolo foi repetido cinco vezes, para melhor amostrar as conformações adquiridas pelo sistema. Duas das simulações que apresentaram valores de energia de interação ligante-proteína mais favoráveis foram estendidas a 450 ns.

## 4.3 Resultados e Discussão

### 4.3.1 *Docking* Farmacofórico

A literatura apresenta propostas de *docking* PPAR $\gamma$ -SR1664, utilizando métodos de *docking* receptor-ligante tradicionais.<sup>50,54</sup> No entanto, observando as estruturas (Figura 32A e 32B) percebe-se que há algumas diferenças em relação aos resíduos interagentes em cada uma das propostas, apesar de ambas terem sido preditas pelo mesmo grupo de pesquisa e utilizarem a mesma estrutura cristalográfica do PPAR $\gamma$  (PDB ID: 2HFP).

A primeira estrutura de *docking* proposta (Figura 32A) utilizou o programa Schrödinger Glide, realizando um *docking* ligante flexível e usando como restrição o ligante estar próximo ao resíduo R288 ou S342 (estudos de HDX mostram que essa interação é importante). A seleção foi feita a partir de um conjunto de estruturas do PPAR $\gamma$  co-cristalizado com ligantes, sendo baseada na similaridade entre SR1664 e os ligantes. Após isso, as estruturas de *docking* foram pontuadas em função da afinidade de ligação. Através de experimentos de HDX do PPAR $\gamma$  com os ligantes RSG, MRL24, SR1664 e SR1824, Choi *et al* apontaram três principais regiões de interação entre SR1664 e PPAR $\gamma$ : fitas  $\beta$  (já observado em outras estruturas de agonistas parciais),<sup>33,43</sup> hélice H3 (interações hidrofóbicas) e segmento da H11 (próximo à H12). Consistente com os experimentos, a primeira estrutura de *docking* proposta mostra a interação do grupo funcional carboxilato do ligante com os resíduos S342 (fita  $\beta$ 3) e K265 ( $\Omega$  loop) do PPAR $\gamma$ . Além disso, nessa proposta, a região da H3 (C285, I281, F282, G284) interage com a parte hidrofóbica do ligante. O ligante apresenta o grupo funcional nitrobenzeno voltado para região da H11/H12, que se choca com resíduos hidrofóbicos da H11 (L452, L453) e do loop H11/H12 (L459, L465). Segundo os autores, isso explicaria a falta de estabilização da H12 e desestabilização da região da H11 perto do resíduo H449, observados por HDX.<sup>50</sup>

A segunda estrutura de *docking* PPAR $\gamma$ -SR1664 (Figura 32B),<sup>54</sup> utilizando o programa Discovery Studio 1.7, foi proposta no trabalho em que outro não-agonista foi apresentado, o UHC1 (Figura 32C). O protocolo do programa definiu as cavidades de ligação ao ligante a partir das cavidades do receptor. As principais interações desse modelo são entre o grupo funcional carboxilato do SR1664 e os resíduos K265 ( $\Omega$  loop) e E291 (H3) do PPAR $\gamma$ , do grupo amida do SR1664 com os resíduos S289 (H3) e K367 (H8). O grupo nitro, assim como no primeiro modelo proposto, fica voltado para a região da H12. É interessante notar que o ligante UHC1, outro não-agonista de PPAR $\gamma$ , que apresenta grande semelhança estrutural com SR1664,

tem um modo de ligação bem diferente ao do SR1664. Enquanto o grupo carboxilato do SR1664 fica próximo as fitas  $\beta$  no LBP (Figura 32B), garantindo a interação com a S342, no PPAR $\gamma$ -UHC1 esse mesmo grupo funcional do ligante fica próximo a região da H8 (Figura 32C).

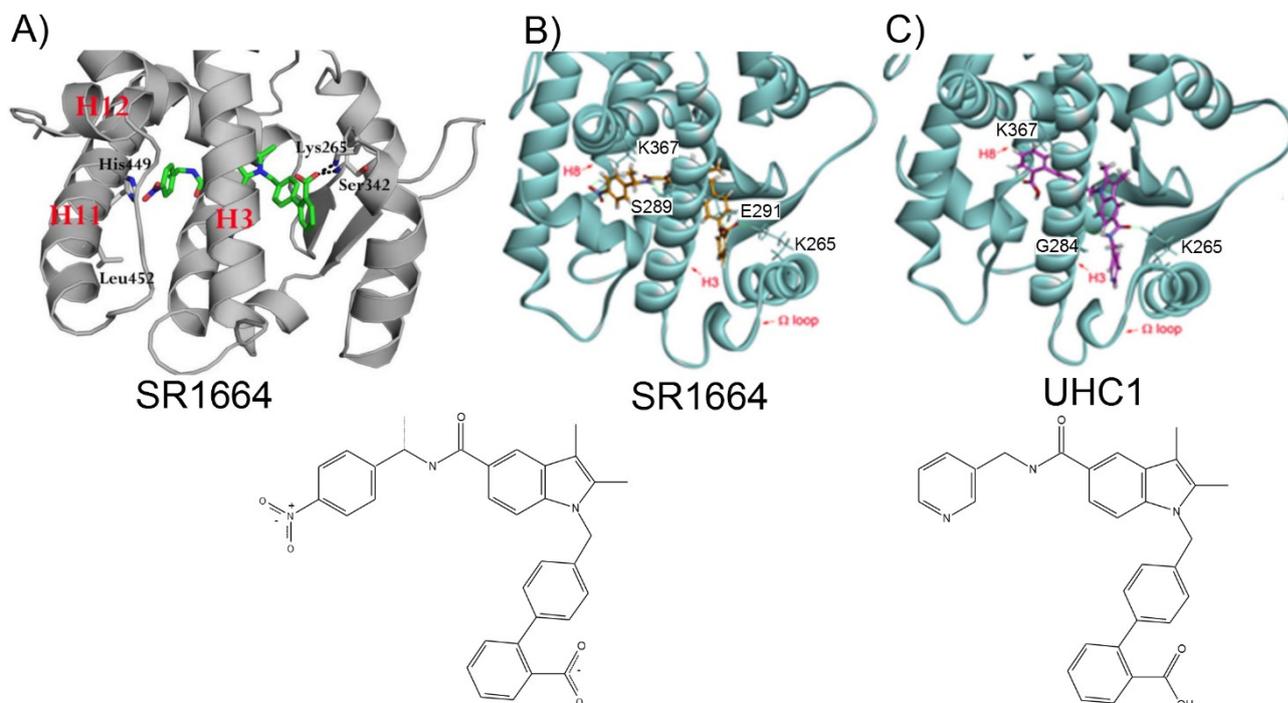


Figura 32: Propostas de estruturas, previstas através de *docking* receptor-ligante dos sistemas: A) PPAR $\gamma$ -SR1664 obtida do artigo Choi *et al* 2011; B) PPAR $\gamma$ -SR1664 obtida do artigo Choi *et al* 2014; C) PPAR $\gamma$ -UHC1 obtida do artigo Choi *et al* 2014. Abaixo as estruturas moleculares dos ligantes SR1664 e UHC1. Adaptado de Choi *et al* 2011 e Choi *et al* 2014.

Ambas propostas de estrutura PPAR $\gamma$ -SR1664 apresentadas<sup>50,54</sup> são intrigantes no que se refere a proximidade do grupo funcional nitrobenzeno do SR1664 à região da H12 do PPAR $\gamma$ . Essa região é a mais hidrofílica do LBP e conforme já mostrado, agonistas totais interagem com resíduos Y473, S289, H449 dessa região pelo mecanismo clássico de ativação do receptor.

Sabe-se que a ligação de ligantes a proteínas envolve uma série de adaptações/alterações conformacionais complexas, não sendo um processo estático. Além disso, um ligante flexível pode mudar de conformação após ligar-se a seu alvo.<sup>35</sup> Por isso, seria plausível a hipótese, também devido a ampla cavidade de ligação a ligantes do PPAR $\gamma$ , de que poderia haver uma migração do SR1664, especialmente do grupo funcional nitrobenzeno do ligante, para a região polar AF-2 do LBP. Porém, isso levaria a uma interação clássica, de agonistas totais, que não faz sentido para um não-agonista, como o SR1664, que não interage com a H12.

Métodos de docking tradicionais, em sua maioria, utilizam algoritmo de busca e função

de escore para prever as interações ligante-receptor. O algoritmo de busca explora o espaço configuracional acessível ao ligante para descobrir modos de ligação compatíveis com a cavidade de ligação do receptor. A função de escore avalia a complementariedade entre ligante e receptor, baseada em dados experimentais de energia de interação conhecidos para um grupo de sistemas ligante-receptor (conjunto de calibração). Isso pode ser complicado para o processo de *docking* de proteínas diferentes desse conjunto de calibração. Dessa forma, a função de escore pode se tornar dependente do conjunto de dados experimentais utilizados para a calibração.

Devido à complexidade intrínseca do processo de associação dos ligantes, esses componentes de predição apresentam algumas limitações. O algoritmo de busca tem como desafio a flexibilidade do receptor, que dificulta a exploração sistemática e completa do espaço configuracional de interação. Já a função de escore tem como desafio as interações intermoleculares não triviais (cátions  $\pi$ , ligações de hidrogênio fracas) ou mesmo efeitos entrópicos decorrentes da perda de mobilidade conformacional e reorganização do solvente.<sup>128</sup> Para contornar a questão da amostragem, os programas, em geral, utilizam métodos que exploram o espaço configuracional de forma aleatória.

O *docking* farmacofórico pode ser uma forma alternativa de lidar com as limitações dos *dockings* tradicionais. Através dele, o ambiente criado pela cavidade do receptor não é considerado, e sim as propriedades farmacofóricas de ligantes com mecanismos de interação conhecidos experimentalmente. Dessa forma, minimiza-se a dificuldade de exploração do espaço configuracional.

Para prever a estrutura PPAR $\gamma$ -SR1664, utilizamos uma nova metodologia de *docking*, em que os ligantes são docados em mapas tridimensionais que representam propriedades farmacofóricas (características eletrônicas e estéricas) de ligantes, anteriormente descrita na seção 4.2.1. Essa parte do trabalho foi realizada pela ex-integrante do grupo, Dra. Clarisse G. Ricci. Na Figura 33, mostramos as principais interações entre o ligante e a proteína, previstas pela estrutura de *docking* farmacofórico. Observamos que o grupo carboxilato do SR1664 interage com o *backbone* do resíduo S342 (fita  $\beta$ ) e cadeia lateral da arginina R288 (H3) do PPAR $\gamma$ . O grupo nitrito do SR1664 interage com o *backbone* do resíduo E343 (fita  $\beta$ ), por ligação de hidrogênio e o anel nitrobenzeno interage através de  $\pi$ -*stacking* com a arginina R288. Há também uma interação do tipo  $\pi$ -*stacking* do anel do grupo ácido benzóico do SR1664 com F264 ( $\Omega$  loop do PPAR $\gamma$ ) e uma interação entre o anel heterocíclico do SR1664 com M364 (H6). Além disso, formam-se interações hidrofóbicas entre a região do anel heterocíclico do SR1664 com os resíduos F282, F363, C285, L353, I281 do PPAR $\gamma$  (não mostradas na figura).

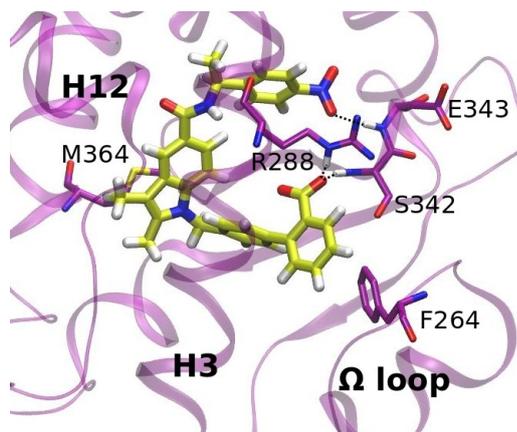


Figura 33: Interações PPAR $\gamma$ -SR1664 previstas pelo *docking* farmacofórico tridimensional: SR1664 (estrutura com carbonos em amarelo) e proteína (resíduos com carbonos em roxo).

Comparando as propostas de estrutura PPAR $\gamma$ -SR1664 descritas em artigos anteriores e a nossa, observamos que o grupo funcional carboxilato do PPAR $\gamma$ , adquire uma posição semelhante em todos os modelos. No primeiro modelo (Figura 32A), assim como no nosso, o grupo funcional faz interação com o resíduo S342 (fitas  $\beta$ ), no HDX não há diferença de incorporação de deutério significativa, comparando os diferentes ligantes. Já o grupo carboxilato, no segundo modelo, interage com resíduos da H3 (E291) e  $\Omega$  loop (K265). A parte apolar da molécula do SR1664 nos dockings descritos previamente na literatura fica voltada em direção às fitas  $\beta$ , enquanto no nosso modelo essa região do ligante fica voltada para a H12, e assim, mais afastada da região AF-2. Em ambos os casos, a parte hidrofóbica interage com a H3, algo previsto pelo HDX. Enquanto os dois modelos de docking tradicionais apresentam o grupo funcional nitro voltado para a H11/H12, nosso modelo apresenta esse grupo funcional voltado para as fitas  $\beta$ . Sendo o SR1664 um não-agonista de PPAR $\gamma$ , parece fazer mais sentido que ele não esteja próximo à H12, região de interação com proteínas corregulatórias, que caracteriza o agonismo clássico, conforme o nosso modelo apresenta.

A partir dessa estrutura de *docking* farmacofórico, realizamos simulações dinâmicas moleculares do PPAR $\gamma$ -SR1664, para investigarmos a estabilidade do ligante no LBP e relaxarmos a estrutura proposta. Para isso, o ligante foi previamente parametrizado, a fim de que o campo de força reproduzisse suas propriedades estruturais e termodinâmicas, assim como as da proteína, nas simulações.

### 4.3.2 Simulações do complexo PPAR $\gamma$ -SR1664

As simulações MD do sistema PPAR $\gamma$ -SR1664 possibilitaram uma maior amostragem das conformações adquiridas pelo ligante dentro da cavidade de ligação à proteína. Também nos permitiu relaxar a estrutura e verificar a estabilidade das interações ligante-proteína. Analisando os 100 ns das trajetórias das cinco simulações realizadas, percebemos que foi possível amostrar diferentes conformações do ligante no LBP. A cavidade de ligação a ligantes do PPAR $\gamma$  é grande se comparada a outros NRs,<sup>27,28</sup> além disso, o SR1664 é um ligante grande e flexível, permitindo maior mobilidade do ligante dentro do *pocket*.

#### 4.3.2.1 Relaxação e estabilização da estrutura PPAR $\gamma$ -SR1664

Inicialmente, analisamos o comportamento do SR1664 durante as trajetórias das simulações, comparativamente à estrutura inicial de *docking*. Realizamos a análise do RMSD do ligante em relação à estrutura do *docking*, alinhando a trajetória em relação à proteína e ao ligante. O alinhamento em relação à proteína permite avaliar se o ligante migrou para outra posição dentro da cavidade proteica. Já o alinhamento em relação ao próprio ligante, fornece informações sobre modificações internas na conformação do próprio ligante. Dessa forma, nas MDs 2 e 3, o ligante desviou menos da sua posição inicial dentro da cavidade (em média  $2,8 \pm 0,5$  Å e  $3,2 \pm 0,8$  Å, respectivamente), se comparado às MDs 1, 4 e 5 (em média  $6,4 \pm 0,2$  Å,  $6,2 \pm 0,5$  Å e  $6,4 \pm 0,4$  Å, respectivamente). Houve um maior desvio do ligante em relação a sua estrutura inicial nas MDs 2 e 5 (em média  $2,2 \pm 0,3$  Å e  $2,2 \pm 0,3$  Å, respectivamente), comparativamente em relação às MDs 1, 3, 4 (em média  $1,7 \pm 0,1$  Å,  $1,7 \pm 0,3$  Å e  $1,8 \pm 0,3$  Å, respectivamente).

Na Figura 34, mostramos o gráfico do RMSD do SR1664, alinhado em relação à proteína versus o RMSD do SR1664, alinhado em relação ao próprio ligante. Fazendo essa relação, é possível verificar que se formam alguns *clusters* e isso permite diferenciar os modos de ligação do SR1664 durante a trajetória. Observamos que as simulações MD2 e MD3, localizadas à esquerda no gráfico (valores menores de RMSD do ligante, quando alinhado à proteína), amostram conformações mais parecidas com a configuração inicial do *docking* (Figura 34A), e parecidas entre si. Isso pode ser observado nos *snapshots* das simulações mostrados abaixo dos gráficos (Figura 34B-E).

Na MD3, o SR1664 amostra conformações bem próximas às do *docking* inicial e depois o grupo funcional nitrito adquire outra orientação (Figura 34D). Já as MD1, MD4 e MD5, mais à direita do gráfico (valores maiores de RMSD do ligante, quando alinhado à proteína) amostram conformações parecidas entre si, em que o ligante migrou em direção às fitas  $\beta$  do PPAR $\gamma$  (Figura 34B, 34D, 34E). Na MD1, o SR1664 amostrou basicamente um único modo de

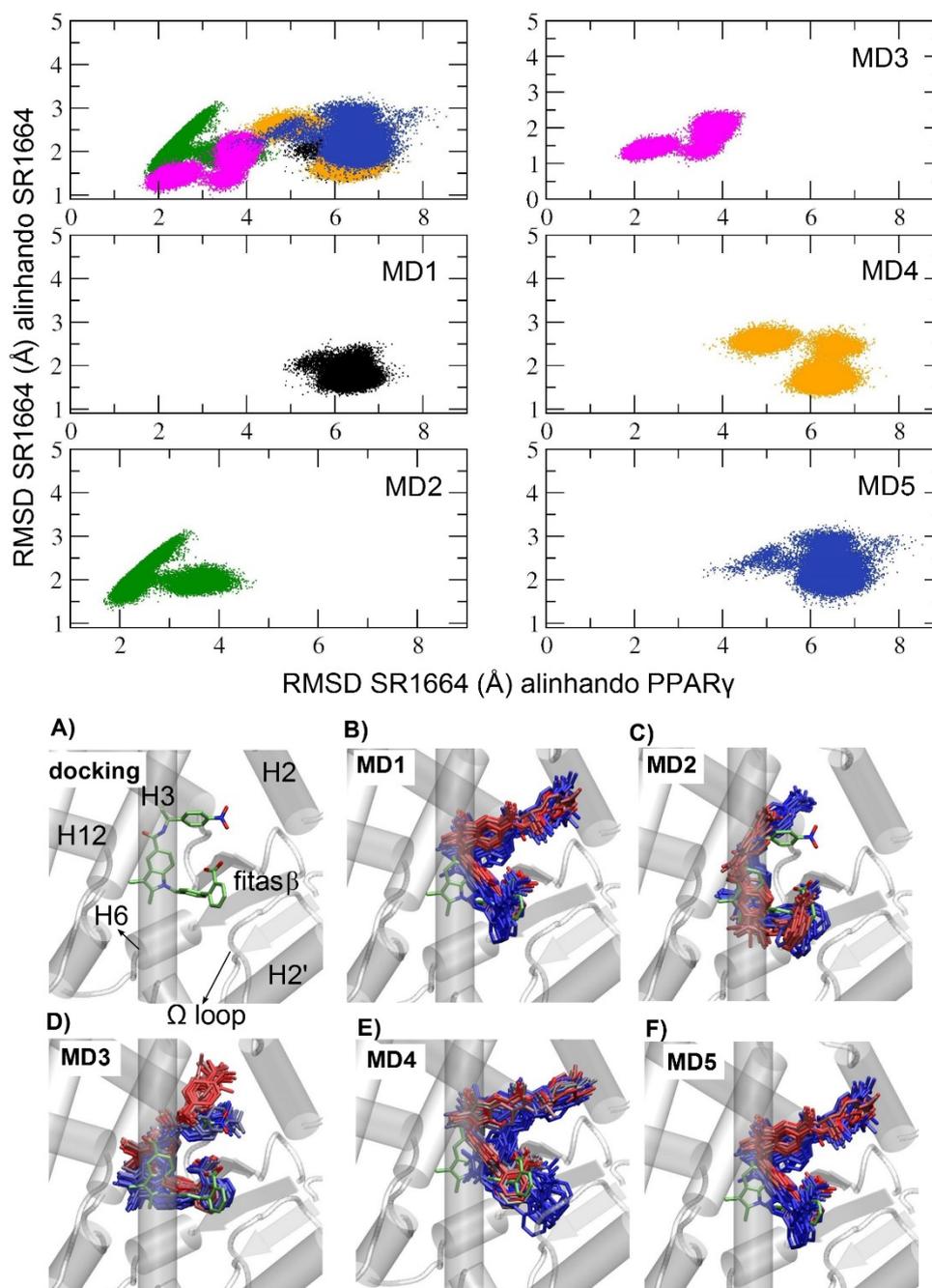


Figura 34: Gráfico de RMSD do SR1664, alinhado ao PPAR $\gamma$  versus RMSD do SR1664, alinhado ao próprio ligante, ambos em relação à estrutura de *docking*, das simulações de 100 ns. É possível identificar dois clusters principais, um formado pelas MD2 e MD3, outro pelas MD1, MD4 e MD5. Abaixo, *snapshots* do ligante na cavidade proteica nas MDs (escala BGryR: início da MD em azul, final em vermelho), tendo como comparativo a posição do ligante inicial (estrutura com carbono em verde), originada do *docking*.

ligação, em que a grupo funcional nitrito está mais voltado para H2. Isso também acontece nas MD4 e MD5, sendo que nessas simulações ele amostra também conformações em que o nitrito não está tão próximo da H2.

As simulações do modelo de *docking* farmacofórico permitiram amostrar diferentes posições e conformações do SR1664, após a relaxação das estruturas. Observamos que há múltiplos modos de ligação do SR1664, o que está de acordo com a idéia de que sítios grandes como o do PPAR $\gamma$  e ligantes flexíveis, como o SR1664, possibilitam várias formas de interação ligante-proteína.

Algumas interações entre o ligante e a proteína da estrutura original do *docking* (mostradas anteriormente na Figura 28B), se mantiveram durante as simulações (Figura 35). Observamos que a interação entre o carboxilato do SR1664 e a serina S342 (fita  $\beta$ ) se manteve nas simulações MD1, MD3, MD4 e na MD5 (a partir dos 60 ns). Também se manteve a interação carboxilato do SR1664 - R288 (H3), nas simulações MD2 e MD3, sendo que na MD3 o carboxilato mantém interações com ambos resíduos (Figura 35). A interação de ligantes com o resíduo S342 (fita  $\beta$ ) já havia sido observada anteriormente em estruturas cristalográficas do PPAR $\gamma$  com ligantes sintéticos (MRL24,<sup>43</sup> BVT.13,<sup>96</sup> nTZDpa<sup>43</sup>) e ácidos graxos (8-oxoETE, 15-oxoETE).<sup>47</sup> Em geral, são os grupos carboxilato dos ligantes que interagem com essa serina da fita  $\beta$ . Estudos de RMN do PPAR $\gamma$  com o agonista parcial MRL24, comparativamente aos agonistas totais RSG e MRL20, sugerem que essa interação pode estar associada ao potencial de bloqueio da fosforilação da S245, já que observaram que quanto mais forte a interação com a S342, mais efetivo o bloqueio.<sup>33,35</sup> Além disso, a proximidade de ligantes à S342 estabiliza o loop entre as hélices H2 e H2', onde está localizado o sítio de fosforilação (S245).<sup>49,50</sup>

Os contatos hidrofóbicos entre M364 (H6) e os anéis centrais do SR1664 se mantiveram nas simulações em que o ligante se manteve em uma posição próxima a do *docking* (MD2 e MD3). Nas demais simulações, os anéis centrais passam a interagir com outros resíduos hidrofóbicos. O resíduo F264 ( $\Omega$  loop) se manteve próximo ao anel com carboxilato em algumas simulações, interagindo via  $\pi$ -stacking. Em algumas simulações (MD2 e MD5), observamos que se formam novos contatos, como, por exemplo, entre o carboxilato do ligante e a lisina K263 ou K265 ( $\Omega$  loop), respectivamente. Essas interações conferem uma energia eletrostática bastante negativa e são as principais responsáveis por uma energia de interação total ligante – proteína mais favorável. O grupo funcional nitrito do SR1664, que na estrutura de *docking* interage com o *backbone* do resíduo E343, se mantém em contato com esse resíduo somente em uma parte da simulação MD3 (até 45 ns). O grupo funcional nitrito não é carregado, por isso, no SR1664, faz interações por meio de dipolos. Como está localizado em uma região

predominantemente hidrofóbica da proteína, faz contatos temporários com o *backbone* de alguns resíduos e principalmente com moléculas de água. Essas interações não são suficientes para mantê-lo na posição inicial de *docking*.

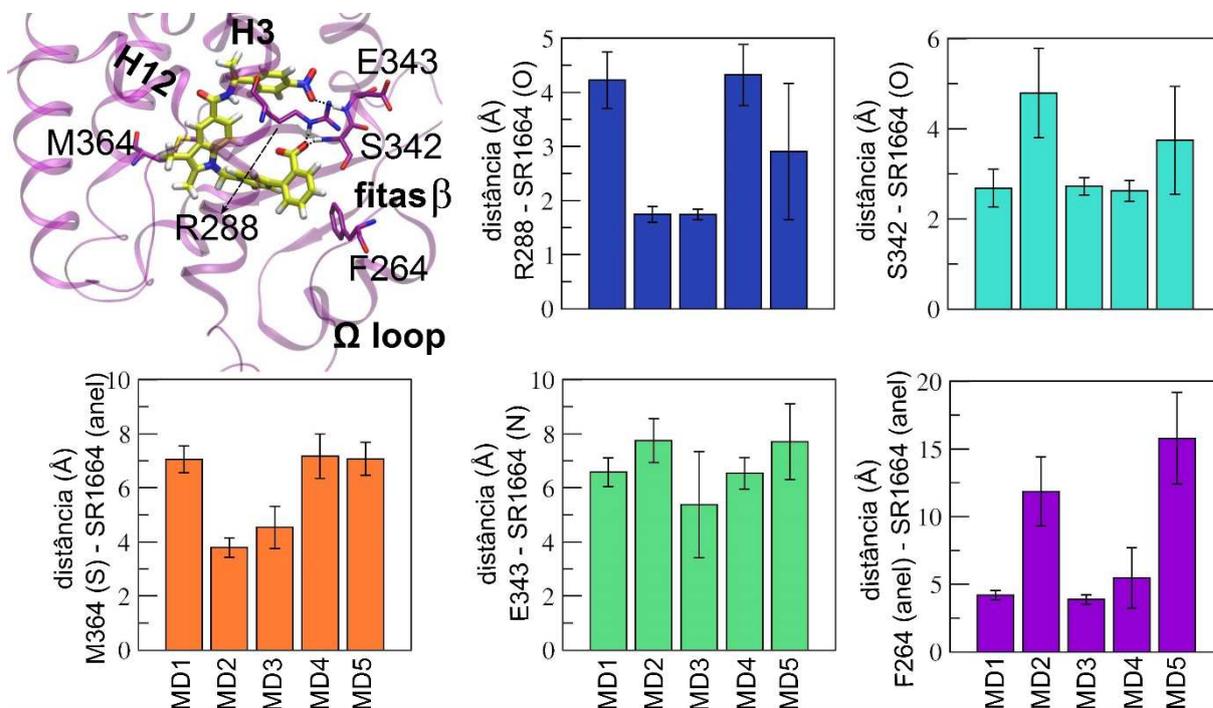


Figura 35: Principais interações entre SR1664 e resíduos do PPAR $\gamma$  observadas na estrutura de *docking* e nas as simulações MD de 100 ns. Distância média (dos 100 ns de simulação) entre: oxigênio do grupo carboxilato do SR1664 e átomo mais próximo do resíduo R288 (H3); oxigênio do grupo carboxilato do SR1664 e átomo mais próximo do resíduo S342 (fita  $\beta$ ); anel heterocíclico do SR1664 e enxofre do resíduo M364 (H6); nitrogênio do grupo nitro do SR1664 e átomo mais próximo do resíduo E343 (fita  $\beta$ ); o anel do grupo carboxilato e anel do resíduo F264 ( $\Omega$  loop).

O cálculo de energia de interação ligante-proteína nos auxiliou a avaliar quais conformações adquiridas pelo ligante dentro da cavidade da proteína são mais favoráveis. Em alguns casos, calculamos também a energia de interação de cada resíduo com o ligante. Analisando a energia de interação entre SR1664 e PPAR $\gamma$  em cada uma das 5 simulações MD (Figura 36), vemos que, as simulações MD2 e MD3 apresentaram a energia (total) de interação mais favorável entre proteína e ligante (energia média  $\sim -100,0$  kcal/mol). Essas simulações também foram as que o ligante permaneceu mais próximo da sua posição do *docking*. Se observarmos a evolução temporal de energia total na MD2, vemos que, entre 50 e 80 ns, ela diminuiu significativamente. Essa contribuição ocorre através da energia eletrostática, mais especificamente da energia envolvida entre o grupo funcional carboxilato do SR1664 e a lisina

K263 ( $\Omega$  loop). Na MD3, a energia que contribui mais são as contribuições de vdW, interação do ligante com os resíduos C285, R288, M364. Nas demais MDs, a energia (total) média de interação SR1664 – PPAR $\gamma$  variou entre -90,0 a -70,0 kcal/mol. Na MD5, os picos de energia mais negativa em 20, 30 e 40 ns, correspondem a contribuições eletrostáticas da interação do grupo carboxilato do SR1664 com os resíduos R288 e K265. Na Tabela 5, mostramos as médias das energias de interação entre o ligante SR1664 e o PPAR $\gamma$  (total, eletrostática e van der Waals), durante os 100 ns de simulação.

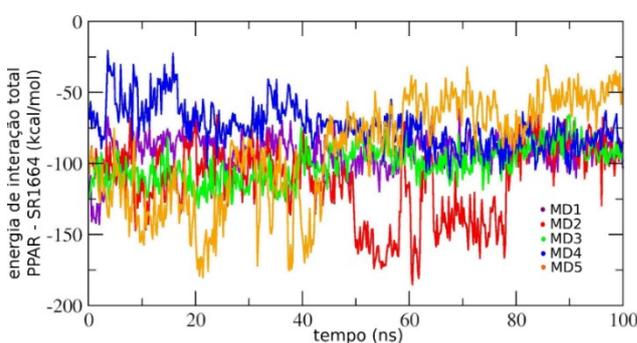


Figura 36: Energia total de interação entre SR1664 e PPAR $\gamma$  durante as simulações.

Tabela 5: Valores médios de energia de interação entre o ligante SR1664 e o PPAR $\gamma$ .

	Energia média (Kcal/mol)		
	eletrostática	vdW	total
MD1	-30,1	-61,2	-91,3
MD2	-54,0	-58,6	-112,6
MD3	-35,7	-65,0	-100,8
MD4	-12,4	-61,6	-74,0
MD5	-32,7	-58,0	-90,7

As simulações que apresentaram energia de interação ligante-proteína mais negativa (MD2 e MD3), ou seja, nas quais os modos de ligação se mostraram mais favoráveis, foram estendidas a 450 ns. Por apresentarem energias de interação mais favoráveis, essas simulações poderiam conter modos de ligação mais frequentes que os demais modos.

Da mesma forma que fizemos para as simulações de 100ns, realizamos as análises de RMSD do SR1664, alinhado ao PPAR $\gamma$  versus RMSD do SR1664, alinhado ao próprio SR1664 para monitorar os modos de ligação das simulações estendidas. Na Figura 37, mostramos esse mapa de RMSDs e abaixo dele, mostramos os principais *snapshots* do ligante durante os 450 ns de simulação. Vemos que, na simulação MD2, o ligante amostra regiões muito parecidas às amostradas até 100 ns (Figura 37B e 37C – MD2). Já na simulação MD3, o ligante amostra mais conformações e após 250 ns, forma um novo modo de ligação (Figura 37C e 37D – MD3), não amostrado nas demais MDs, em que o grupo funcional nitrito volta-se para a região dos resíduos E291, E295, R288, E343 e interage com moléculas de água (Figura 37D – MD3). Ao calcularmos o RMSD médio do SR1664 em relação à estrutura do *docking* dessas simulações,

alinhando a trajetória em relação à proteína e ao ligante, vemos que na MD2 o ligante desvia menos de sua estrutura inicial, comparativamente a MD3 (valores de RMSD  $1,9 \pm 0,3 \text{ \AA}$  e  $2,3 \pm 0,5 \text{ \AA}$ , respectivamente nas MD2 e MD3). Em relação à posição inicial do ligante dentro da cavidade, observamos que na simulação MD3 houve uma maior migração do ligante após 100 ns ( $2,2 \pm 0,4 \text{ \AA}$  e  $4,5 \pm 1,1 \text{ \AA}$ , respectivamente nas MD2 e MD3).

Também medimos as distâncias médias do ligante em relação aos principais resíduos de interação com PPAR $\gamma$  (Figura 38) durante os 450 ns. Em ambas simulações o carboxilato do ligante permanece interagindo com o resíduo R288 (distância média inferior a  $2 \text{ \AA}$ ). No caso da interação carboxilato do SR1664-S342, ela se mantém somente na MD3. A interação do grupo nitrito com o *backbone* do resíduo E343 não se mantém (distâncias médias SR1664-E343  $\sim 8 \text{ \AA}$ ). As interações do anel do carboxilato do SR1664 com a fenilalanina F264 e dos anéis centrais

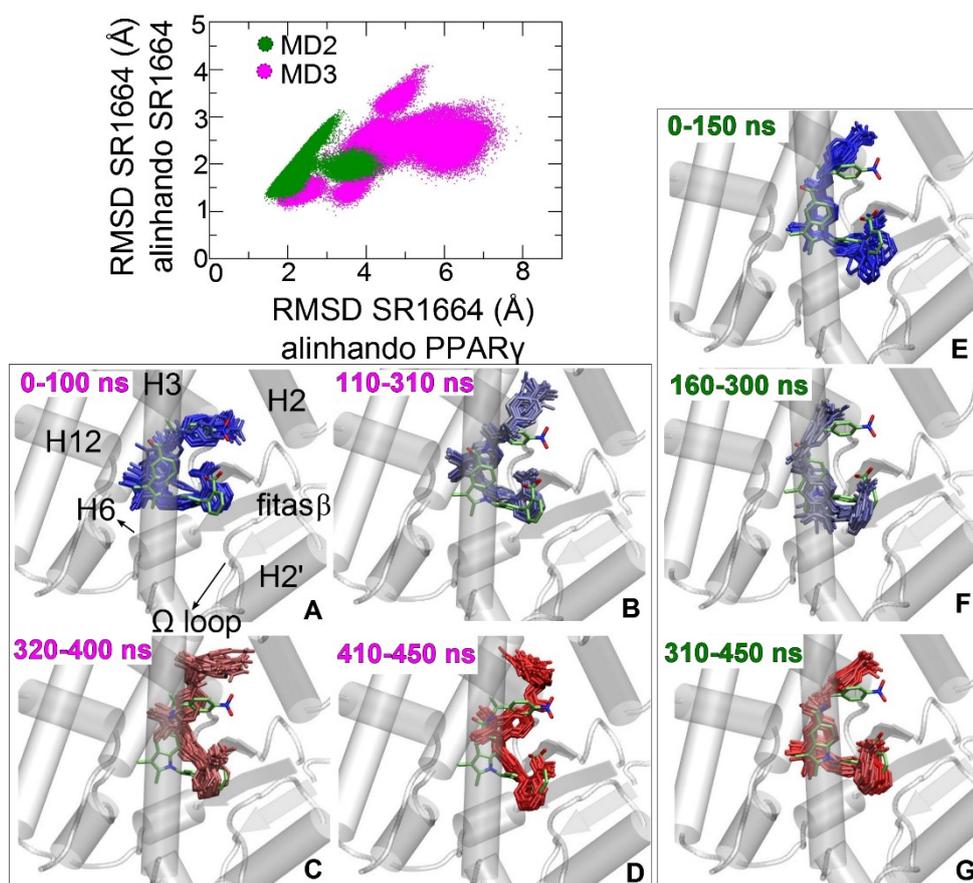


Figura 37: Mapa de RMSD do SR1664, alinhado ao PPAR $\gamma$  versus RMSD do SR1664, alinhado ao próprio ligante, ambos em relação à estrutura de *docking*, das simulações estendidas (450ns). Abaixo, *snapshots* do ligante na cavidade proteica nas MDs (escala BGryR: início da MD em azul, final em vermelho), tendo como comparativo a posição do ligante inicial (estrutura com carbono em verde), originada do *docking*. Modos de ligação observados na MD3 (A-D) e na MD2 (E-G).

do SR1664 com a metionina M364 se mantem estáveis apenas na simulação MD2 (distância

média  $\sim 4$  Å).

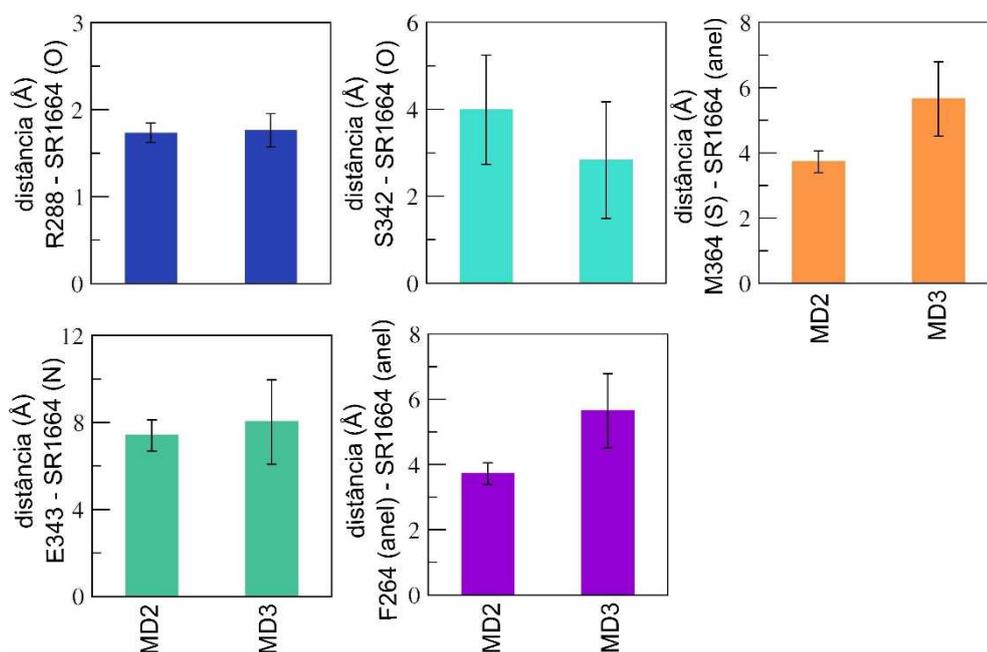


Figura 38: Principais interações entre SR1664 e resíduos do PPAR $\gamma$  observadas na estrutura de *docking* e nas simulações MD de 450 ns. Distância média (dos 450 ns de simulação) entre: oxigênio do grupo carboxilato do SR1664 e átomo mais próximo do resíduo R288 (H3); oxigênio do grupo carboxilato do SR1664 e átomo mais próximo do resíduo S342 (fita  $\beta$ ); anel heterocíclico do SR1664 e enxofre do resíduo M364 (H6); nitrogênio do grupo nitro do SR1664 e átomo mais próximo do resíduo E343 (fita  $\beta$ ); o anel do grupo carboxilato e anel do resíduo F264 ( $\Omega$  loop).

As energias médias de interação ligante-proteína durante os 450 ns de simulação foram  $-99,1 \pm 19,4$  kcal/mol (maior contribuição das interações de vdW) e  $-121,0 \pm 24,7$  kcal/mol (maior contribuição eletrostática) para as MD2 e MD3, respectivamente. Na simulação MD3, observamos que as energias PPAR $\gamma$ -SR1664 mais negativas ocorrem entre 225 e 240 ns e entre 260 e 275 ns (Figura 39). Observando o que ocorre durante esses períodos da trajetória, vemos que há uma aproximação do resíduo K263 ( $\Omega$  loop) ao ligante. Analisando as energias de interação entre SR1664 e K263, vemos que o padrão do gráfico é semelhante ao do gráfico PPAR $\gamma$ -SR1664 (Figura 39). Esse resultado, juntamente com os resultados anteriores das MD2 e MD5, em que a energia de interação PPAR $\gamma$ -SR1664 também fica mais favorável quando o resíduo K263 ou K265 se aproxima do ligante, reforçam o fato de que interação do ligante com o  $\Omega$  loop é importante e bastante favorável.

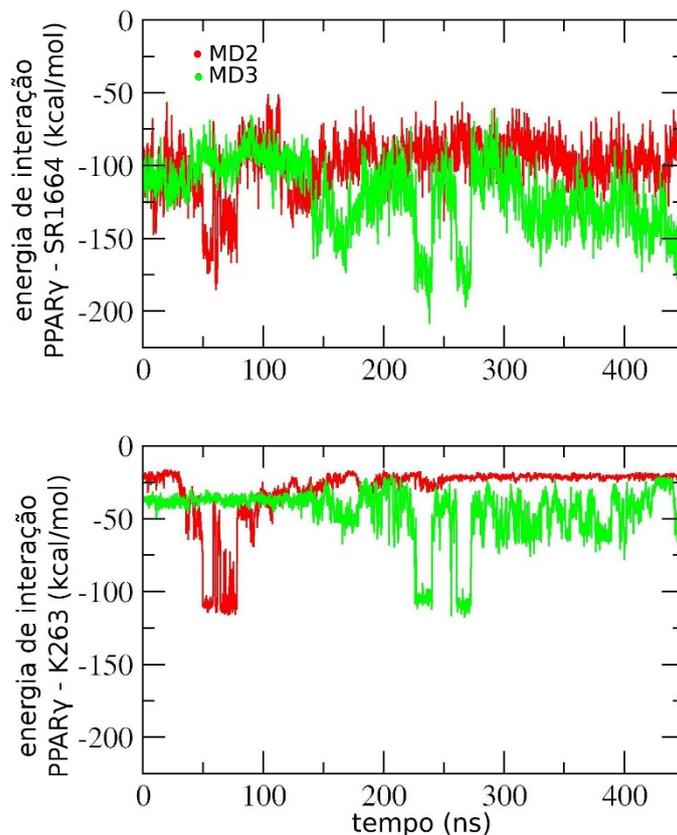


Figura 39: Energia total de interação entre SR1664 e PPAR $\gamma$  (gráfico acima) e entre SR1664 e o resíduo K263 (gráfico abaixo) durante as simulações estendidas.

#### 4.3.2.2 Interações do $\Omega$ loop na estrutura do PPAR $\gamma$ -SR1664

Em nossa proposta de *docking* farmacofórico PPAR $\gamma$ -SR1664, o SR1664 ocupa uma posição atrás da H3 na altura da arginina R288. Por se tratar de um ligante grande, ele promove o deslocamento do resíduo arginina R288 para a parte mais externa do LBP, próximo do grupo funcional carboxilato do SR1664. Isso altera o padrão de interações na região H3 -  $\Omega$  loop, dificultando alguns contatos que mantém essa parte do  $\Omega$  loop próximo ao LBD, principalmente entre F287 (H3) e P269 ( $\Omega$  loop) e entre F287 (H3) e L270 ( $\Omega$  loop). No entanto, as interações do  $\Omega$  loop com as fitas  $\beta$  são mantidas e, eventualmente, reforçadas pela interação do ligante com o  $\Omega$  loop. Em uma das simulações PPAR $\gamma$ -SR1664 (MD3), ilustrada na Figura 40A, observamos uma rede de interações bastante estáveis, que se mantém durante a simulação, entre os resíduos hidrofílicos da H3 (R288, E291, E295) -  $\Omega$  loop (K265) - loop das fitas  $\beta$  (E343).

Fizemos o mapeamento das interações que mantém o  $\Omega$  loop fechado e interagindo com as hélices H3 e com as fitas  $\beta$  (Figura 40B) na estrutura do PPAR $\gamma$ -RSG, que possui esse loop completo na estrutura cristalográfica. Observamos que há uma rede de interações que mantem

o  $\Omega$  loop como um todo fechado (próximo ao cerne do LBD). A parte hidrofílica da rede envolve resíduos da H3 (E295, R288, E291),  $\Omega$  loop (K263, K265, H266) e loop fita  $\beta$  (E343). A parte hidrofóbica, envolve resíduos da H3 (I281, V277, F287), H2' (M257, L255, I262, M252, F269, L270), fita  $\beta$  (F247, I249, M348, I341). Conforme nosso modelo PPAR-Cdk5/p25, apresentado na seção 3.3.5, os resíduos importantes para interação com Cdk5/p25 são: K261, K265, M257 (região do  $\Omega$  loop mais próxima às fitas  $\beta$  do que à H3). Dessa forma, parece que a interação do grupo funcional carboxilato do SR1664 com o  $\Omega$  loop do PPAR $\gamma$  ajuda a manter essa porção do loop próxima ao LBD do receptor, o que poderia impedir a interação e acomodação da enzima Cdk5, conforme a hipótese levantada no Capítulo 3.

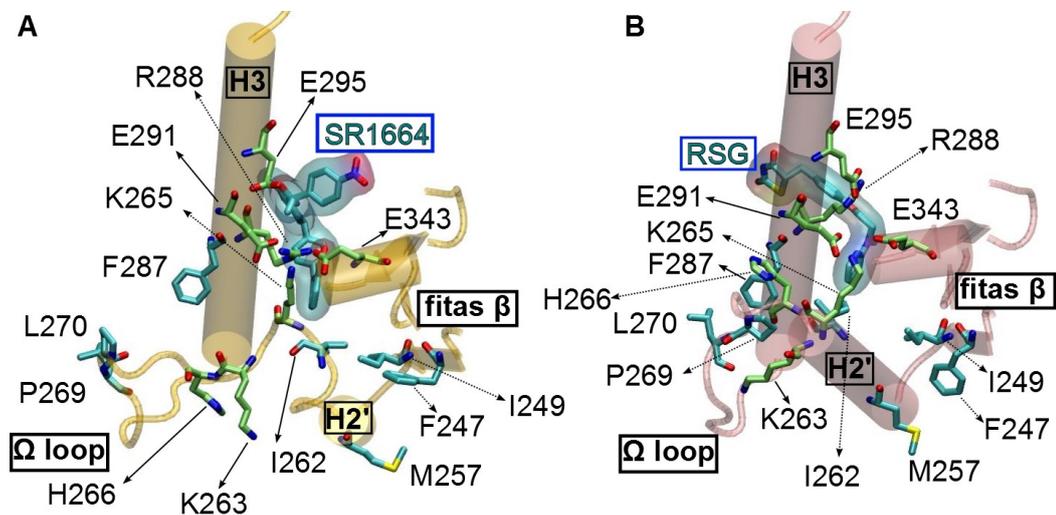


Figura 40: Contatos do  $\Omega$  loop com as hélices H3 e fitas  $\beta$  de um *snapshot* final das trajetórias de MD dos complexos: A) PPAR $\gamma$ -SR1664 (100 ns da MD3) e B) PPAR $\gamma$ -RSG (100 ns). Destacados em verde os resíduos carregados que interagem entre si, formando uma rede de interações do  $\Omega$  loop com H3 e fitas  $\beta$ .

### 4.3.2.3 Comparação dos modos de ligação de ligantes de PPAR $\gamma$

Conforme já mencionamos anteriormente a ligação de um ligante a um receptor pode envolver alterações conformacionais, sendo que um ligante flexível pode ainda alterar sua conformação após se ligar ao alvo.<sup>35</sup> Por isso, monitoramos as conformações adquiridas pelos ligantes RSG, GQ16 e SR1664 durante as simulações MD de 100 ns para observar como cada um deles se comporta no mesmo tempo de amostragem.

Na simulação do PPAR $\gamma$  com a rosiglitazona, observamos que o ligante se mantém estável, em sua posição inicial (em torno da H3). A RSG interage com a H12, através do resíduo Y473, durante 91% do tempo de simulação e forma uma rede de interações hidrofílicas com resíduos das hélices H3 (S289) e H11 (H449). As demais interações são hidrofóbicas, com resíduos das hélices H3, H5, H6 e fita  $\beta$ . Na Figura 41 mostramos as principais interações ligante-proteína e as distâncias médias entre a rosiglitazona e os resíduos hidrofílicos.

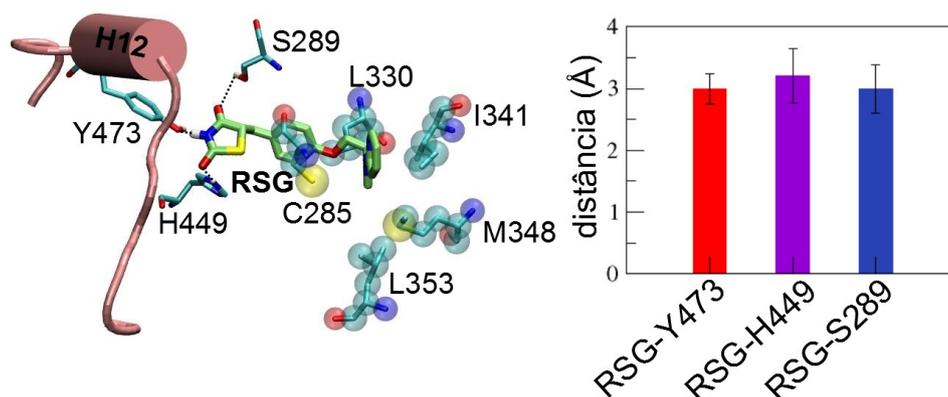


Figura 41: Modo de ligação do agonista total rosiglitazona: principais interações: contatos hidrofílicos com resíduos Y473 (H12), S289 (H3) e H449 (H11); demais contatos hidrofóbicos com resíduos das hélices H3, H5, H6 e fita  $\beta$ . Distância média entre: hidrogênio da RSG e oxigênio do resíduo Y437 (H12), oxigênio da RSG e oxigênio do resíduo S289 (H3) e oxigênio da RSG e nitrogênio do resíduo H449 (H11), durante 100 ns das simulações.

Já na simulação do PPAR $\gamma$ -GQ16 observamos dois modos de ligação diferentes, que estão relacionados, principalmente, com a região hidrofílica AF-2 (Figura 42A). No início da simulação, o ligante interage com o resíduo Y473 da H12 por intermédio de uma molécula de água e isso ocorre em 31% do tempo de simulação (Figura 42B). Além disso, o GQ16 interage por contatos hidrofóbicos com resíduos das hélices H3, H5, H6 e fita  $\beta$ . Não observamos uma interação do ligante com o resíduo S342. Durante a simulação, o GQ16 se aproxima da H12, interagindo diretamente com a tirosina Y473 e com a serina S289 (Figura 42C). Uma molécula de água permanece próxima ao ligante durante toda a simulação. Forma-se uma rede de interações hidrofílicas, que inclui os resíduos H449 (H11), Q286 (H3), Y327 (não incluída na figura, interage com histidina H449) e água (Figura 42D). Ao final dos 100 ns, a tirosina Y473 não participa da rede de contatos (Figura 42E). A menor interação do GQ16 com a H12, interagindo indiretamente, ou mesmo, não interagindo com a Y473, trazem como consequência a maior mobilidade da H12 e instabilidade da posição fechada da H12. Isso poderia desfavorecer a interação com coativadores e explicaria a atividade agonista parcial do GQ16. A análise comparativa da mobilidade da H12 em presença de GQ16 e de RSG já havia sido realizada em nosso trabalho anterior, mostrando que a RSG estabiliza mais a H12 do que o

GQ16.<sup>46</sup> Nesse trabalho, realizamos simulações mais curtas (25 ns) e observamos apenas o modo de ligação em que o GQ16 interage com o resíduo Y473 através de uma molécula de água.<sup>46</sup>

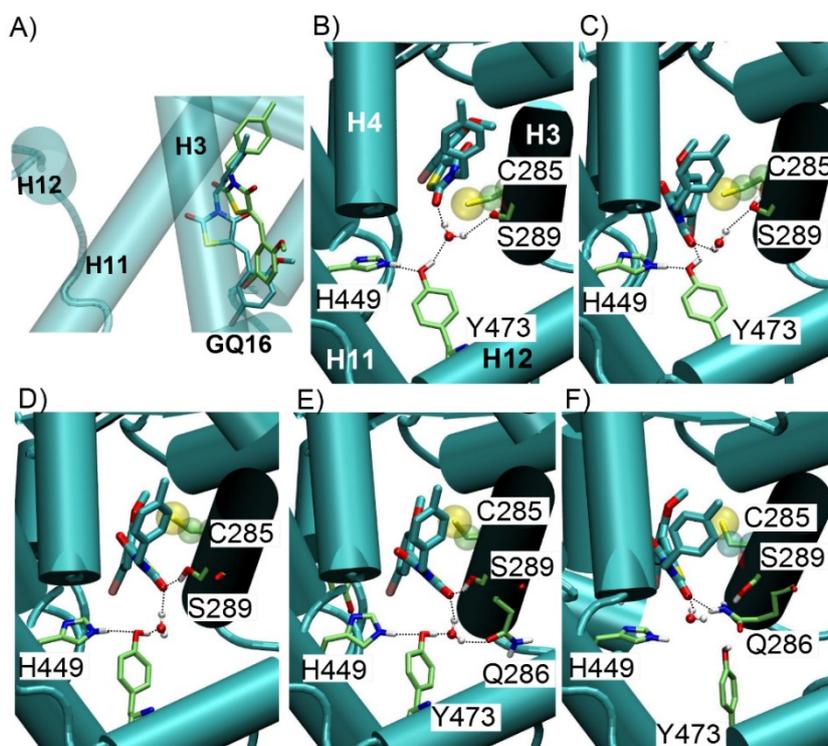


Figura 42: Modos de ligação do GQ16 e principais interações do ligante com o PPAR $\gamma$ : A) Os dois modos de ligação observados na MD de 100 ns são apresentados de um ângulo de visão, para facilitar a diferenciação entre eles: modo de ligação I: interação através de uma molécula da água com resíduo Y473 da H12 (verde), modo de ligação II: migração do ligante para mais próximo da H12 (azul); As interações PPAR $\gamma$ -SR1664 são apresentadas de um outro ângulo de visão para destacar os contatos: B) no início da simulação, o ligante interage com a Y473 da H12 por intermédio de uma molécula de água, ainda há interação dos resíduos H449-Y473 e S289-água; C) deslocamento do ligante na direção da H12, interação direta com Y473; D) interação do SR1664 com resíduo S289 (H3); E) aumento da rede de interações hidrofílicas, interação do SR1664 com Q286, por intermédio de molécula de água; F) Y473 se afasta da rede de interações do GQ16.

Nas simulações de 100 ns do SR1664-PPAR $\gamma$ , vemos que o ligante amostrou diferentes configurações no LBP (Figura 43A). Apesar disso, o contato entre o grupo funcional carboxilato do SR1664 e os resíduos da hélice H3 e das fitas  $\beta$ , serve de âncora, havendo variações de posição em relação ao restante da estrutura do ligante. De modo geral, o carboxilato do ligante interage com os resíduos R288 (H3) ou S342 (fitas  $\beta$ ) ou com ambos. Já o grupo funcional nitrito do SR1664,

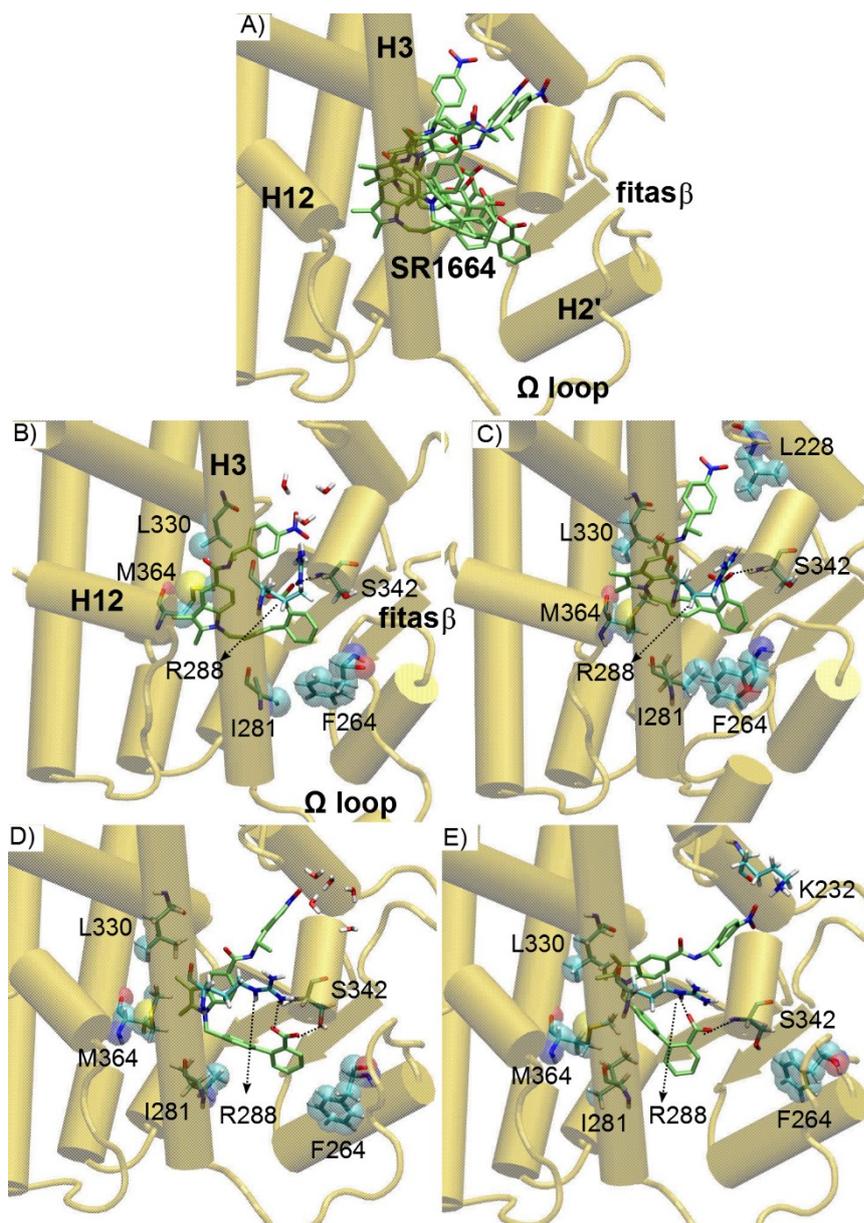


Figura 43: A) Modos de ligação do SR1664 observados nas simulações e principais interações PPAR $\gamma$ -SR1664: B) grupo carboxilato do SR1664 interage com os resíduos S342 e R288, grupo nitrito do SR1664 interage com moléculas de água, região hidrofóbica do SR1664 interage com L330, M364, I281; anel do carboxilato do SR1664 interage com fenilalanina F264; C) configuração em que o grupamento nitrito interage com o *backbone* da leucina L228; D) o grupo carboxilato do SR1664 interage com os resíduos R288 e S342 e o grupamento nitrito interage com o resíduo E343 e com moléculas de água; E) interação do grupo carboxilato com ambos resíduos R288 e S342, grupo nitrito interagindo com o resíduo K232 (H2), desfaz-se a interação entre F264 e anel do carboxilato.

interage principalmente com moléculas de água (Figura 43B e D), mas também faz interações eventualmente com o *backbone* de alguns resíduos (L228 – Figura 43C) e com cadeias laterais dos resíduos K232 (Figura 43E) e R288 (Figura 43B). Na Figura 43, mostramos os principais modos de ligação do ligante e as respectivas interações ligante-proteína.

As simulações da estrutura proposta por *docking* farmacofórico indicam que o SR1664 apresenta vários modos de ligação. Das cinco simulações MD realizadas, três mostram o ligante migrando para uma conformação diferente do docking inicial. Outras duas, permanecem por um tempo amostrando a estrutura inicial, mas acabam amostrando também outros modos de ligação. A ampla cavidade de ligação ao ligante que o PPAR $\gamma$  possui, possibilita outras conformações do ligante e já havia sido observado com outros ligantes. Os ligantes MRL20 e MRL24, por exemplo, apresentam múltiplas populações de conformações dentro do *pocket* do receptor,<sup>35</sup> suportado por dados experimentais de RMN.

Dentre os três ligantes estudados, a rosiglitazona é a que fica mais próxima à hélice H12, seguida do GQ16 e do SR1664. A interação de ligantes com a hélice H12 ocorre através do contato com o resíduo Y473, sendo esse um contato importante para a estabilidade da H12. Algumas vezes essa interação não é direta, como no caso do GQ16, em que uma molécula de água intermedia o contato com o resíduo. Dessa forma, tanto o contato de ligantes com o resíduo Y473, quanto a solvatação desse resíduo, podem influenciar na estabilização da H12 e consequentemente no agonismo clássico.

Analizamos a solvatação do resíduo Y473 em cada um dos sistemas PPAR $\gamma$  em presença ou ausência de ligantes. A Figura 44 mostra a comparação da solvatação média da Y473 em cada um dos sistemas durante as simulações de dinâmica convencional, no caso do SR1664,

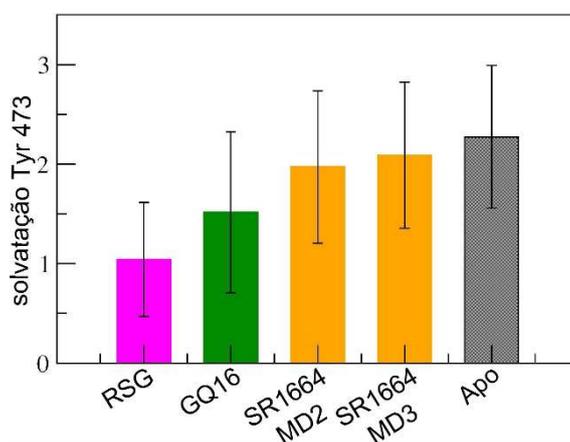


Figura 44: Solvatação média do resíduo da região AF-2, Y473, nos sistemas PPAR $\gamma$ -RSG, PPAR $\gamma$ -GQ16, PPAR $\gamma$ -SR1664 (nas MD2 e MD3 de 100 ns) e no apo-PPAR $\gamma$ .

mostramos a solvatação da Y473 em duas das simulações. Percebemos que há uma tendência de aumento da solvatação do resíduo Y473 conforme diminui a interação do ligante com a H12. A região da cavidade do PPAR $\gamma$  próxima à H12 em presença da RSG, apresenta poucas moléculas de água próximas ao resíduo Y473, já que a interação é direta com esse resíduo. Em

presença de GQ16, ocorre a entrada de água, em média, uma molécula, que fica solvatando a tirosina Y473 e, por vezes, interagindo com o ligante ao mesmo tempo. Em presença do SR1664, que não possui grupos polares voltados para a região da H12, e também na ausência de ligantes (PPAR $\gamma$ -livre), mais moléculas de água solvatam a Y473. Essas águas de solvatação, interagem também com os resíduos S289 (H3), H449 (H11) e Y327.

## Capítulo 5

### Conclusões e Perspectivas

Esta Tese de Doutorado aborda, através de diversas técnicas computacionais, principalmente, dinâmica molecular, aspectos estruturais da interação do PPAR $\gamma$  com a enzima corregulatória Cdk5/p25 e com ligantes de diferentes graus de agonismo. Utilizando uma nova metodologia computacional, obtivemos modelos estruturais do complexo PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25, apresentados no Capítulo 3. Nossos modelos mostram que, além do sítio ativo, há mais duas regiões de interação entre as proteínas: o sítio  $\Omega$  loop e o sítio das fitas  $\beta$ , regiões que interagem diretamente com ligantes e estão relacionadas com a transativação do PPAR $\gamma$ . Esses resultados sugerem que a estabilização promovida pelos ligantes de PPAR $\gamma$  às regiões de  $\Omega$  loop e fitas  $\beta$  podem ser importantes para a inibição da fosforilação pela Cdk5/p25. Através de simulações de dinâmica molecular acelerada, vimos que o agonista parcial GQ16 possibilita uma maior estabilização do loop da S245 comparativamente ao agonista parcial rosiglitazona e ao PPAR $\gamma$  livre.

Estudos futuros podem ser realizados para, experimentalmente, validar os modelos PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25 propostos e verificar a importância dos sítios de fitas  $\beta$  e  $\Omega$ -loop do PPAR $\gamma$  para a reação de fosforilação. Experimentos de espalhamento de raio-X de baixo ângulo (SAXS) poderiam fornecer informações da estrutura tridimensional do PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25. O uso do método ABF como ferramenta para estudos de *docking* proteína-proteína é inovador e permite o refinamento do *docking* rígido, já que adiciona flexibilidade para ambas cadeias laterais e *backbone* da proteína. Tais características são essenciais em estudos da associação de enzimas a substratos proteicos. Porém, o uso desse método depende da existência de dados experimentais, para indicar a posição dos resíduos no sítio ativo. Novos dados cristalográficos da Cdk5 contendo pequenos peptídeos, associados não só ao sítio ativo, mas também a regiões de *docking* distal, podem futuramente melhorar o modelo estrutural de PPAR $\gamma$ -Cdk5/p25. Outra possibilidade seria uso de técnicas de *cross-linking* químico e espectrometria de massas, permitindo adicionar novas informações sobre a proximidade de diferentes resíduos no complexo enzima-substrato.<sup>136,137</sup> Também seria importante realizar experimentos de fosforilação, mutando resíduos nas fitas  $\beta$  e na região do  $\Omega$ -loop da estrutura do apo-PPAR $\gamma$ . Baseado nesses resultados, se as mutações inibirem a reação, poderíamos validar não somente os modelos mas também essa nova proposta de mecanismo de inibição. Esse entendimento seria

de grande contribuição para o desenvolvimento de fármacos antidiabéticos.

O estudo da interação do PPAR $\gamma$  com o não-agonista SR1664, apresentado no Capítulo 4, iniciou a partir da proposta de modelo estrutural obtido pela ex-aluna do grupo Dra. Clarisse G. Ricci, que combina *subpockets* de agonista parcial e ácido graxo. Há algumas adaptações do receptor para acomodar o ligante, dentre elas a alteração do padrão de contatos entre  $\Omega$  loop e H3, com manutenção da interação entre  $\Omega$  loop e fitas  $\beta$ , reforçadas pela interação do ligante com o  $\Omega$  loop. As simulações de MD dessa estrutura de *docking* indicam que o SR1664 apresenta vários modos de ligação e isso é possível tanto pela ampla cavidade de ligação do receptor, quanto pela flexibilidade do ligante. As simulações também revelam que a interação do SR1664 com o  $\Omega$  loop se mostra bastante favorável. Essa poderia ser uma forma de o SR1664 ajudar a manter parte do  $\Omega$  loop próximo ao LBD do receptor, o que poderia impedir a interação e acomodação da enzima Cdk5. Durante as MDs, observamos que o contato do SR1664 com os resíduos R288 (H3) e S342 (fitas  $\beta$ ) do PPAR $\gamma$  é bastante estável e funciona como uma âncora para os diferentes modos de ligação que este apresenta. A interação de ligantes com o resíduo S342 (fitas  $\beta$ ) já havia sido anteriormente observada e está relacionada com a capacidade de bloqueio da reação de fosforilação da S245. Comparando a solvatação do resíduo Y473 da H12 nos sistemas PPAR $\gamma$ -RSG, PPAR $\gamma$ -GQ16, PPAR $\gamma$ -SR1664 e PPAR $\gamma$ -livre, observamos uma tendência de aumento da solvatação a medida que diminui a interação H12-ligante, estando o resíduo mais solvatados em ausência de ligante. O contato de ligantes com o resíduo Y473 ou a solvatação desse resíduo, podem influenciar na estabilização da H12 e conseqüentemente no agonismo clássico do PPAR $\gamma$ . Como estudo futuro seria interessante realizar novas simulações do PPAR $\gamma$ -SR1664 partindo dos modos de ligação mais favoráveis das simulações, para estudar a estabilidade desses.

## Referências

- (1) Barceló, A., Aedo, C., Rajpathak, S., and Robles, S. (2003) The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean. *Bull. World Health Organ.* 81, 19–27.
- (2) Norman, M., and Kaplan, M. (1989) The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med* 149, 1514–1520.
- (3) Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., and King, H. (2004) Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27, 1047–1053.
- (4) Valencia, W. M., and Florez, H. (2014) Pharmacological treatment of diabetes in older people. *Diabetes, Obes. Metab.* 16, 1192–1203.
- (5) Gronemeyer, H., Gustafsson, J.-A., and Laudet, V. (2004) Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 950–964.
- (6) Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schittq, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., and Evan, R. M. (1995) The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade. *Cell* 83, 835–839.
- (7) Lehrke, M., and Lazar, M. A. (2005) The many faces of PPARgamma. *Cell* 123, 993–999.
- (8) Chawla, a, Repa, J. J., Evans, R. M., and Mangelsdorf, D. J. (2001) Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294, 1866–1870.
- (9) Olefsky, J. M. (2001) Nuclear Receptor Minireview Series. *J. Biol. Chem.* 276, 36863–36864.
- (10) Francis, G. a, Fayard, E., Picard, F., and Auwerx, J. (2003) Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* 65, 261–311.
- (11) Maglich, J. M., Sluder, A., Guan, X., Shi, Y., McKee, D. D., Carrick, K., Kamdar, K., Willson, T. M., and Moore, J. T. (2001) Comparison of complete nuclear receptor sets from the human, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* genomes. *Genome Biol.* 2, 1–7.
- (12) Imai, Y., Youn, M.-Y., Inoue, K., Takada, I., Kouzmenko, A., and Kato, S. (2013) Nuclear Receptors in Bone Physiology and Diseases. *Physiol. Rev.* 93, 481–523.
- (13) Rastinejad, F., Ollendorff, V., and Polikarpov, I. (2015) Nuclear receptor full-length architectures: confronting myth and illusion with high resolution. *Trends Biochem. Sci.* 40, 16–24.
- (14) Li, Y., Lambert, M. H., and Xu, H. E. (2003) Activation of nuclear receptors: a perspective from structural genomics. *Structure* 11, 741–746.

- (15) Steinmetz, A. C. U., Renaud, J.-P., and Moras, D. (2001) Binding of Ligands and Activation of Transcription by Nuclear Receptors. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30, 329–359.
- (16) Kumar, R., Johnson, B. H., and Thompson, E. B. (2004) Overview of the structural basis for transcription regulation by nuclear hormone receptors. *Essays Biochem.* 40, 26–39.
- (17) Khorasanizadeh, S., and Rastinejad, F. (2001) Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends Biochem. Sci.* 26, 384–390.
- (18) Lefstin, J. a., and Yamamoto, K. R. (1998) Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators. *Nature* 392, 885–888.
- (19) Kumar, R., and Thompson, E. B. (1999) The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 64, 310–319.
- (20) Bain, D. L., Heneghan, A. F., Connaghan-Jones, K. D., and Miura, M. T. (2007) Nuclear Receptor Structure: Implications for Function. *Annu. Rev. Physiol* 69, 201–220.
- (21) Ahmadian, M., Suh, J. M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A. R., Downes, M., and Evans, R. M. (2013) PPAR $\gamma$  signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat. Med.* 19, 557–566.
- (22) Willson, T. M., Brown, P. J., Sternbach, D. D., and Henke, B. R. (2000) The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J. Med. Chem.* 43, 527–550.
- (23) Desvergne, B., and Wahli, W. (1999) Peroxisome Proliferator-Activated Receptors : Nuclear Control of Metabolism. *Endocr. Rev.* 20, 649–688.
- (24) Luconi, M., Cantini, G., and Serio, M. (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ): Is the genomic activity the only answer? *Steroids* 75, 585–94.
- (25) Willson, T. M., and Wahli, W. (1997) Peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1, 235–241.
- (26) Lazar, M. A. (2002) Becoming fat Becoming fat. *Genes Dev.* 16, 1–5.
- (27) Nolte, R. T., Wisely, G. B., Westin, S., Cobb, J. E., Lambert, M. H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M. G., Willson, T. M., Glass, C. K., and Milburn, M. V. (1998) Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* 395, 137–143.
- (28) Greschik, H., Wurtz, J. M., Sanglier, S., Bourguet, W., Van Dorsselaer, A., Moras, D., and Renaud, J. P. (2002) Structural and functional evidence for ligand-independent transcriptional activation by the estrogen-related receptor 3. *Mol. Cell* 9, 303–313.
- (29) Martínez, L., Polikarpov, I., and Skaf, M. S. (2008) Only subtle protein conformational adaptations are required for ligand binding to thyroid hormone receptors: simulations using a novel multipoint steered molecular dynamics approach. *J. Phys. Chem. B* 112, 10741–10751.

- (30) Martínez, L., Sonoda, M. T., Webb, P., Baxter, J. D., Skaf, M. S., and Polikarpov, I. (2005) Molecular dynamics simulations reveal multiple pathways of ligand dissociation from thyroid hormone receptors. *Biophys. J.* *89*, 2011–2023.
- (31) Renaud, J., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995) Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* *378*, 681–689.
- (32) Bruning, J. B., Parent, A. a, Gil, G., Zhao, M., Nowak, J., Pace, M. C., Smith, C. L., Afonine, P. V, Adams, P. D., Katzenellenbogen, J. a, and Nettles, K. W. (2010) Coupling of receptor conformation and ligand orientation determine graded activity. *Nat. Chem. Biol.* *6*, 837–843.
- (33) Garcia-Vallvé, S., Guasch, L., Tomas-Hernández, S., del Bas, J. M., Ollendorff, V., Arola, L., Pujadas, G., and Mulero Abellan, M. (2015) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) and ligand choreography: newcomers take the stage. *J. Med. Chem.* *58*, 5381–5394.
- (34) Kallenberger, B. C., Love, J. D., Chatterjee, V. K. K., and Schwabe, J. W. R. (2003) A dynamic mechanism of nuclear receptor activation and its perturbation in a human disease. *Nat. Struct. Biol.* *10*, 136–140.
- (35) Hughes, T. S., Chalmers, M. J., Novick, S., Kuruvilla, D. S., Chang, M. R., Kamenecka, T. M., Rance, M., Johnson, B. a., Burris, T. P., Griffin, P. R., and Kojetin, D. J. (2012) Ligand and receptor dynamics contribute to the mechanism of graded PPAR $\gamma$  agonism. *Structure* *20*, 139–150.
- (36) Carlsson, P., Burendahl, S., and Nilsson, L. (2006) Unbinding of Retinoic Acid from the Retinoic Acid Receptor by Random Expulsion Molecular Dynamics. *Biophys. J.* *91*, 3151–3161.
- (37) M, P. (2009) Ligand unbinding pathways from the vitamin D receptor studied by molecular dynamics simulations. *Eur. Biophys. J.* *38*, 185–198.
- (38) Shen, J., Li, W., Liu, G., Tang, Y., and Jiang, H. (2009) Computational insights into the mechanism of ligand unbinding and selectivity of estrogen receptors. *J Phys Chem B* *113*, 10436–10444.
- (39) Martínez, L., Nascimento, A. S., Nunes, F. M., Phillips, K., Aparício, R., Dias, S. M. G., Figueira, A. C. M., Lin, J. H., Nguyen, P., Apriletti, J. W., Neves, F. A. R., Baxter, J. D., Webb, P., Skaf, M. S., and Polikarpov, I. (2009) Gaining ligand selectivity in thyroid hormone receptors via entropy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *106*, 20717–20722.
- (40) Kosztin, D., Izrailev, S., and Schulten, K. (1999) Unbinding of retinoic acid from its receptor studied by steered molecular dynamics. *Biophys. J.* *76*, 188–197.
- (41) Tamrazi, A., KE, C., Daniels, J., Hurth, K., and Katzenellenbogen, J. (2002) Estrogen receptor dimerization: ligand binding regulates dimer affinity and dimer dissociation rate. *Mol. Endocrinol.* *16*, 2706–2719.

- (42) Martínez, L., Webb, P., Polikarpov, I., and Skaf, M. S. (2006) Molecular dynamics simulations of ligand dissociation from thyroid hormone receptors: evidence of the likeliest escape pathway and its implications for the design of novel ligands. *J. Med. Chem.* *49*, 23–26.
- (43) Bruning, J. B., Chalmers, M. J., Prasad, S., Busby, S. A., Kamenecka, T. M., He, Y., Nettles, K. W., and Griffin, P. R. (2007) Partial agonists activate PPAR $\gamma$  using a helix 12 independent mechanism. *Structure* *15*, 1258–1271.
- (44) Oberfield, J. L., Collins, J. L., Holmes, C. P., Goreham, D. M., Cooper, J. P., Cobb, J. E., Lenhard, J. M., Hull-Ryde, E. a, Mohr, C. P., Blanchard, S. G., Parks, D. J., Moore, L. B., Lehmann, J. M., Plunket, K., Miller, a B., Milburn, M. V, Kliewer, S. a, and Willson, T. M. (1999) A peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits adipocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 6102–6106.
- (45) Pochetti, G., Mitro, N., Lavecchia, A., Gilardi, F., Besker, N., Scotti, E., Aschi, M., Re, N., Fracchiolla, G., Laghezza, A., Tortorella, P., Montanari, R., Novellino, E., Mazza, F., Crestani, M., and Loiodice, F. (2010) Structural insight into peroxisome proliferator-activated receptor gamma binding of two ureidofibrate-like enantiomers by molecular dynamics, cofactor interaction analysis, and site-directed mutagenesis. *J. Med. Chem.* *53*, 4354–4366.
- (46) Amato, A. A., Rajagopalan, S., Lin, J. Z., Carvalho, B. M., Figueira, A. C. M., Lu, J., Ayers, S. D., Mottin, M., Silveira, R. L., Souza, P. C. T., Mourão, R. H. V, Saad, M. J. A., Togashi, M., Simeoni, L. A., Abdalla, D. S. P., Skaf, M. S., Polikarpov, I., Lima, M. C. A., Galdino, S. L., Brennan, R. G., Baxter, J. D., Pitta, I. R., Webb, P., Phillips, K. J., and Neves, F. A. R. (2012) GQ-16, a novel peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) ligand, promotes insulin sensitization without weight gain. *J. Biol. Chem.* *287*, 28169–28179.
- (47) Waku, T., Shiraki, T., Oyama, T., Fujimoto, Y., Maebara, K., Kamiya, N., Jingami, H., and Morikawa, K. (2009) Structural Insight into PPAR $\gamma$  Activation Through Covalent Modification with Endogenous Fatty Acids. *J. Mol. Biol.* *385*, 188–199.
- (48) Pang, X., Shu, Y., Niu, Z., Zheng, W., Wu, H., Lu, Y., and Shen, P. (2014) PPAR $\gamma$ 1 phosphorylation enhances proliferation and drug resistance in human fibrosarcoma cells. *Exp. Cell Res.* *322*, 30–38.
- (49) Choi, J. H., Banks, A. S., Estall, J. L., Kajimura, S., Boström, P., Laznik, D., Ruas, J. L., Chalmers, M. J., Kamenecka, T. M., Blüher, M., Griffin, P. R., and Spiegelman, B. M. (2010) Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPAR $\gamma$  by Cdk5. *Nature* *466*, 451–456.
- (50) Choi, J. H., Banks, A. S., Kamenecka, T. M., Busby, S. a, Chalmers, M. J., Kumar, N., Kuruvilla, D. S., Shin, Y., He, Y., Bruning, J. B., Marciano, D. P., Cameron, M. D., Laznik, D., Jurczak, M. J., Schürer, S. C., Vidović, D., Shulman, G. I., Spiegelman, B. M., and Griffin, P. R. (2011) Antidiabetic actions of a non-agonist PPAR $\gamma$  ligand blocking Cdk5-mediated phosphorylation. *Nature* *477*, 477–481.
- (51) Banks, A. S., Mcallister, F. E., Camporez, P. G., Zushin, P. H., Jurczak, M. J., Laznik-Bogoslavski, D., Shulman, G. I., Gygi, S. P., and Spiegelman, B. M. (2015) An ERK/Cdk5 axis controls the diabetogenic actions of PPAR $\gamma$ . *Nature* *517*, 391–395.

- (52) Heuvel, J. P. Vanden. [nrresource.org/general\\_information/nr-profiling-white-paper.pdf](http://nrresource.org/general_information/nr-profiling-white-paper.pdf)  
Acessado em: 26-07-2015.
- (53) Loring, D. INS Dictionary of Neuropsychology and Clinical Neurosciences 2<sup>a</sup> edition.  
Oxford University Press.
- (54) Choi, S., Kim, E. S., Koh, M., Lee, S., Lim, D., Yang, Y. R., Jang, H., Seo, K., Min, S., Lee, I. H., Park, S. B., Suh, P., and Choi, J. H. (2014) A Novel Non-agonist Peroxisome Proliferator-activated Receptor ( PPAR gamma ) Ligand UHC1 Blocks PPAR gamma Phosphorylation by Cyclin-dependent Kinase 5 ( CDK5 ) and Improves Insulin Sensitivity 289, 26618–26629.
- (55) Hughes, T. S., Giri, P. K., de Vera, I. M. S., Marciano, D. P., Kuruvilla, D. S., Shin, Y., Blayo, A.-L., Kamenecka, T. M., Burris, T. P., Griffin, P. R., and Kojetin, D. J. (2014) An alternate binding site for PPAR $\gamma$  ligands. *Nat. Commun.* 5, 1–13.
- (56) Bernardes, A., Souza, P. C. T., Muniz, J. R. C., Ricci, C. G., Ayers, S. D., Parekh, N. M., and Godoy, A. S. (2013) Molecular Mechanism of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  Activation by WY14643 : a New Mode of Ligand Recognition and Receptor Stabilization. *J. Mol. Biol.* 425, 2878–2893.
- (57) Ahmed, D., and Sharma, M. (2011) Cyclin-Dependent Kinase 5/p35/p39: A Novel and Imminent Therapeutic Target for Diabetes Mellitus. *Int. J. Endocrinol.* 2011, 1–10.
- (58) Patrick, G. N., Zukerberg, L., Nikolic, M., Monte, S. De, Dikkes, P., and Tsai, L. (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402, 615–622.
- (59) Shukla, V., Zheng, Y. L., Mishra, S. K., Amin, N. D., Steiner, J., Grant, P., Kesavapany, S., and Pant, H. C. (2013) A truncated peptide from p35, a Cdk5 activator, prevents Alzheimer's disease phenotypes in model mice. *FASEB J.* 27, 174–186.
- (60) Wang, C. X., Song, J. H., Song, D. K., Yong, V. W., Shuaib, A., and Hao, C. (2006) Cyclin-dependent kinase-5 prevents neuronal apoptosis through ERK-mediated upregulation of Bcl-2. *Cell Death Differ.* 13, 1203–1212.
- (61) Dhavan, R., and Tsai, L. H. (2001) A decade of CDK5. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 749–759.
- (62) Arif, A. (2012) Extraneuronal activities and regulatory mechanisms of atypical cyclin dependent kinase Cdk5. *Biochem. Pharmacol.* 84, 985–993.
- (63) Tarricone, C., Dhavan, R., Peng, J., Areces, L. B., Tsai, L., Musacchio, A., and Unit, S. B. (2001) Structure and Regulation of the CDK5-p25. *Mol. Cell* 8, 657–669.
- (64) Mapelli, M., Massimiliano, L., Crovace, C., Seeliger, M. A., Tsai, L. H., Meijer, L., and Musacchio, A. (2005) Mechanism of CDK5/p25 binding by CDK inhibitors. *J. Med. Chem.* 48, 671–679.

- (65) Karplus, M., and McCammon, J. A. (2002) Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat. Struct. Biol.* *9*, 646–52.
- (66) McCammon, J. A., Gelin, B.R., Karplus, M. (1977) Dynamics of folded proteins. *Nature* *267*, 585–590.
- (67) Leach, A. R. (2001) Leach. Molecular modelling: principles and applications. 2nd ed. Prentice Hall, Harlow, New York.
- (68) Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kalé, L., and Schulten, K. (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* *26*, 1781–1802.
- (69) Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., and Bourne, P. E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* *28*, 235–242.
- (70) Hamelberg, D., Mongan, J., and McCammon, J. A. (2004) Accelerated molecular dynamics: a promising and efficient simulation method for biomolecules. *J. Chem. Phys.* *120*, 11919–11929.
- (71) Mücksch, C., and Urbassek, H. M. (2013) Enhancing protein adsorption simulations by using accelerated molecular dynamics. *PLoS One* *8*, e64883.
- (72) Doshi, U., and Hamelberg, D. (2015) Towards fast, rigorous and efficient conformational sampling of biomolecules: Advances in accelerated molecular dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* *1850*, 878–888.
- (73) Wereszczynski, J., McCammon, J. A. (2012) Computational Drug Discovery and Design. Methods in Molecular Biology (Baron, R., Ed.). Humana Press, New York.
- (74) Hamelberg, D., Shen, T., and McCammon, J. A. (2005) Phosphorylation effects on cis/trans isomerization and the backbone conformation of serine-proline motifs: Accelerated molecular dynamics analysis. *J. Am. Chem. Soc.* *127*, 1969–1974.
- (75) Miao, Y., Feixas, F., Eun, C., and McCammon, J. A. (2015) Accelerated molecular dynamics simulations of protein folding. *J. Comput. Chem.* *36*, 1536–1549.
- (76) Tikhonova, I. G., Selvam, B., Ivetac, A., Wereszczynski, J., and McCammon, J. A. (2013) Simulations of biased agonists in the  $\beta_2$  adrenergic receptor with accelerated molecular dynamics. *Biochemistry* *52*, 5593–5603.
- (77) Pierce, L. C. T., Salomon-Ferrer, R., Augusto F de Oliveira, C., McCammon, J. A., and Walker, R. C. (2012) Routine Access to Millisecond Time Scale Events with Accelerated Molecular Dynamics. *J. Chem. Theory Comput.* *8*, 2997–3002.
- (78) Wang, Y., and Harrison, C. (2011) Implementation of accelerated molecular dynamics in NAMD. *Comput. Sci. Discov.* *4*, 1–14.

- (79) Miao, Y., Sinko, W., Pierce, L., Bucher, D., Walker, R. C., and Mccammon, J. A. (2014) Improved Reweighting of Accelerated Molecular Dynamics Simulations for Free Energy Calculation. *J. Chem. Theory Comput.* *10*, 2677–2689.
- (80) Doshi, U., McGowan, L. C., Ladani, S. T., and Hamelberg, D. (2012) Resolving the complex role of enzyme conformational dynamics in catalytic function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 5699–5704.
- (81) Wereszczynski, J., and Mccammon, J. A. (2010) Using Selectively Applied Accelerated Molecular Dynamics to Enhance Free Energy Calculations *6*, 3285–3292.
- (82) Miao, Y., Feher, V. a., and McCammon, J. A. (2015) Gaussian Accelerated Molecular Dynamics: Unconstrained Enhanced Sampling and Free Energy Calculation. *J. Chem. Theory Comput.* *11*, 3584–3595.
- (83) Brooks, B. R., Brooks, C. L., Mackerell, A. D., Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflich, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., Im, W., Kuczera, K., M. (2009) CHARMM: the biomolecular simulation program. *J. Comput. Chem.* *30*, 1545–1614.
- (84) Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S., and Camacho, C. J. (2004) ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. *Nucleic Acids Res.* *32*, W96–W99.
- (85) Kozakov, D., Beglov, D., Bohnuud, T., Mottarella, S. E., Xia, B., Hall, D. R., and Vajda, S. (2013) How good is automated protein docking? *Proteins* *81*, 2159–2166.
- (86) Kozakov, D., Brenke, R., Comeau, S. R., and Vajda, S. (2006) PIPER: an FFT-based protein docking program with pairwise potentials. *Proteins* *65*, 392–406.
- (87) Kozakov, D., Hall, D. R., Beglov, D., Brenke, R., Comeau, S. R., Shen, Y., Li, K., Zheng, J., Vakili, P., Paschalidis, I. C., and Vajda, S. (2010) Achieving reliability and high accuracy in automated protein docking: ClusPro, PIPER, SDU, and stability analysis in CAPRI rounds 13-19. *Proteins* *78*, 3124–3130.
- (88) Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S., and Camacho, C. J. (2003) ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics* *20*, 45–50.
- (89) Faller, C. E., Reilly, K. A., Hills, R. D., and Guvench, O. (2013) Peptide backbone sampling convergence with the adaptive biasing force algorithm. *J. Phys. Chem. B* *117*, 518–26.
- (90) Héning, J., Fiorin, G., Chipot, C., and Klein, M. L. (2010) Exploring Multidimensional Free Energy Landscapes Using Time-Dependent Biases on Collective Variables. *J. Chem. Theory Comput.* *6*, 35–47.
- (91) Comer, J., Gumbart, James c, Henin, J., Lelièvre, T., Pohorille, A., and Chipot, C. (2015) The Adaptive Biasing Force Method: Everything You Always Wanted To Know but Were Afraid To Ask. *J. Phys. Chem. B* *119*, 1129–1151.

- (92) M. S. Shell, A. Panagiotopoulos, A. P. (2007) The Adaptive Biasing Force Method, in *Free energy calculations Theory and Applications in Chemistry and Biology* (Chipot, C., and Pohorille, A., Eds.), pp 136–143. Springer-Verlag, Berlin.
- (93) Domene, C., and Furini, S. (2009) Adaptive Biasing Force, in *Methods in Enzymology - Biothermodynamics Part B* (Johnson, M. L., Holt, J. M., and Ackers, G. K., Eds.), pp 164–167. Elsevier, London.
- (94) Gampe Jr., R. T., Montana, V. G., Lambert, M. H., Miller, A. B., Bledsoe, R. K., Milburn, M. V., Kliewer, S. A., Willson, T. M., and Xu, H. E. (2000) Asymmetry in the PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. *Mol. Cell* 5, 545–555.
- (95) Chandra, V., Huang, P., Hamuro, Y., Raghuram, S., Wang, Y., Burris, T. P., and Rastinejad, F. (2008) Structure of the intact PPAR- $\gamma$ -RXR- nuclear receptor complex on DNA. *Nature* 456, 350–356.
- (96) Ostberg, T., Svensson, S., Selén, G., Uppenberg, J., Thor, M., Sundbom, M., Sydow-Bäckman, M., Gustavsson, A.-L., and Jendeborg, L. (2004) A new class of peroxisome proliferator-activated receptor agonists with a novel binding epitope shows antidiabetic effects. *J. Biol. Chem.* 279, 41124–41130.
- (97) Bao, Z. Q., Jacobsen, D. M., and Young, M. A. (2011) Briefly bound to activate: transient binding of a second catalytic magnesium activates the structure and dynamics of CDK2 kinase for catalysis. *Structure* 19, 675–690.
- (98) <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/plugins/psfgen/> Acessado em: 11-07-2015.
- (99) Gordon, J. C., Myers, J. B., Folta, T., Shoja, V., Heath, L. S., and Onufriev, A. (2005) H<sup>++</sup>: a server for estimating pK<sub>a</sub>s and adding missing hydrogens to macromolecules. *Nucleic Acids Res.* 33, W368–W371.
- (100) MacKerell, A. D. J., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack Jr, R. L., Evanseck, J. D., Field, M. J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Brooks, B., Brooks, C., Mackerell, A., Nilsson, L., Petrella, R., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., Im, W., Kuczera, K., and Karplus, M. (1998) All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B* 5647, 3586–3616.
- (101) Mackerell, A. J., Feig, M., and Brooks, C. (2004) 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.* 25, 1400–1415.
- (102) Darve, E., Rodríguez-Gómez, D., and Pohorille, A. (2008) Adaptive biasing force method for scalar and vector free energy calculations. *J. Chem. Phys.* 128, 144120.
- (103) Ryckaert, J.-P., Ciccotti, G., and Berendsen, H. J. . (1977) Numerical integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes. *J. Comput. Phys.* 23, 327–341.

- (104) Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993) PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* *26*, 283–291.
- (105) Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R., and Thornton, J. M. (1996) AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR* *8*, 477–496.
- (106) Martínez, L., Andreani, R., and Martínez, J. M. (2007) Convergent algorithms for protein structural alignment. *BMC Bioinformatics* *8*, 1–15.
- (107) Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., and Klein, M. L. (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* *79*, 926–935.
- (108) Hansson, A., Souza, P. C. T., Silveira, R. L., Skaf, M. S., and Marti, L. (2011) CHARMM Force Field Parameterization of Rosiglitazone. *Int. J. Quantum Chem.* *111*, 1346–1354.
- (109) Johnson, L. N., and Lewis, R. J. (2001) Structural basis for control by phosphorylation. *Chem. Rev.* *101*, 2209–2242.
- (110) Contreras-Vallejos, E., Utreras, E., and Gonzalez-Billault, C. (2012) Going out of the brain: non-nervous system physiological and pathological functions of Cdk5. *Cell. Signal.* *24*, 44–52.
- (111) Burgermeister, E., Schnoebelen, A., Flament, A., Benz, J., Stihle, M., Gsell, B., Rufer, A., Ruf, A., Kuhn, B., Märki, H. P., Mizrahi, J., Sebokova, E., Niesor, E., and Meyer, M. (2006) A novel partial agonist of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) recruits PPARgamma-coactivator-1alpha, prevents triglyceride accumulation, and potentiates insulin signaling in vitro. *Mol. Endocrinol.* *20*, 809–830.
- (112) Thuillier, P., Baillie, R., Sha, X., and Clarke, S. D. (1998) Cytosolic and nuclear distribution of PPAR $\gamma$ 2 in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J. Lipid Res.* *39*, 2329–2338.
- (113) Rochel, N., Ciesielski, F., Godet, J., Moman, E., Roessle, M., Peluso-Iltis, C., Moulin, M., Haertlein, M., Callow, P., Mély, Y., Svergun, D. I., and Moras, D. (2011) Common architecture of nuclear receptor heterodimers on DNA direct repeat elements with different spacings. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 564–570.
- (114) Maletta, M., Orlov, I., Roblin, P., Beck, Y., Moras, D., Billas, I. M. L., and Klaholz, B. P. (2014) The palindromic DNA-bound USP/EcR nuclear receptor adopts an asymmetric organization with allosteric domain positioning. *Nat. Commun.* *5*, 4139.
- (115) Orlov, I., Rochel, N., Moras, D., and Klaholz, B. P. (2012) Structure of the full human RXR/VDR nuclear receptor heterodimer complex with its DR3 target DNA. *EMBO J.* *31*, 291–300.
- (116) Tsai, C. J., Kumar, S., Ma, B., and Nussinov, R. (1999) Folding funnels, binding funnels, and protein function. *Protein Sci.* *8*, 1181–1190.

- (117) Xu, Y., Colletier, J. P., Jiang, H., Silman, I., Sussman, J. L., and Weik, M. (2008) Induced-fit or preexisting equilibrium dynamics? Lessons from protein crystallography and MD simulations on acetylcholinesterase and implications for structure-based drug design. *Protein Sci.* 17, 601–605.
- (118) Ubersax, J. A., and Ferrell, J. E. (2007) Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 530–541.
- (119) Adams, P. D., Sellers, W.R., Sharma, S.K., Wu, A. D., Nalin, C. M., Kaelin, W. G. J. (1996) Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol Cell Biol.* 16, 6623–6633.
- (120) Schulman, B. A., Lindstrom, D. L., Harlow, E. (1998) Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 10453–10458.
- (121) Cheng, K. Y., Noble, M. E., Skamnaki, V., Brown, N. R., Lowe, E. D., Kontogiannis, L., Shen, K., Cole, P. A., Siligardi, G., Johnson, L. N. (2006) The role of the phospho-CDK2/cyclin A recruitment site in substrate recognition. *J Biol Chem.* 281, 23167–23179.
- (122) Mahindroo, N., Huang, C. F., Peng, Y. H., Wang, C. C., Liao, C. C., Lien, T. W., Chittimalla, S. K., Huang, W. J., Chai, C. H., Prakash, E., Chen, C. P., Hsu, T. A., Peng, C. H., Lu, I. L., Lee, L. H., Chang, Y. W., Chen, W. C., Chou, Y. C., Chen, C. T., Goparaju, C. M. V., Chen, Y. S., Lan, S. J., Yu, M. C., Chen, X., Chao, Y. S., Wu, S. Y., and Hsieh, H. P. (2005) Novel indole-based peroxisome proliferator-activated receptor agonists: design, SAR, structural biology, and biological activities. *J. Med. Chem.* 48, 8194–8208.
- (123) Mahindroo, N., Wang, C. C., Liao, C. C., Huang, C. F., Lu, I. L., Lien, T. W., Peng, Y. H., Huang, W. J., Lin, Y. T., Hsu, M. C., Lin, C. H., Tsai, C. H., Hsu, J. T. A., Chen, X., Lyu, P. C., Chao, Y. S., Wu, S. Y., and Hsieh, H. P. (2006) Indol-1-yl acetic acids as peroxisome proliferator-activated receptor agonists: design, synthesis, structural biology, and molecular docking studies. *J. Med. Chem.* 49, 1212–1216.
- (124) Pochetti, G., Godio, C., Mitro, N., Caruso, D., Galmozzi, A., Scurati, S., Loiodice, F., Fracchiolla, G., Tortorella, P., Laghezza, A., Lavecchia, A., Novellino, E., Mazza, F., and Crestani, M. (2007) Insights into the mechanism of partial agonism: crystal structures of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand-binding domain in the complex with two enantiomeric ligands. *J. Biol. Chem.* 282, 17314–17324.
- (125) Montanari, R., Saccoccia, F., Scotti, E., Crestani, M., Godio, C., Gilardi, F., Loiodice, F., Fracchiolla, G., Laghezza, A., Tortorella, P., Lavecchia, A., Novellino, E., Mazza, F., Aschi, M., and Pochetti, G. (2008) Crystal structure of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligand binding domain complexed with a novel partial agonist: a new region of the hydrophobic pocket could be exploited for drug design. *J. Med. Chem.* 51, 7768–7776.
- (126) Totrov, M. (2008) Atomic property fields: generalized 3D pharmacophoric potential for automated ligand superposition, pharmacophore elucidation and 3D QSAR. *Chem. Biol. Drug Des.* 71, 15–27.

- (127) Fracchiolla, G., Laghezza, A., Piemontese, L., Tortorella, P., Mazza, F., Montanari, R., Pochetti, G., Lavecchia, A., Novellino, E., Pierno, S., Camerino, D. C., and Loiodice, F. (2009) New 2-aryloxy-3-phenyl-propanoic acids as peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha/\gamma$  dual agonists with improved potency and reduced adverse effects on skeletal muscle function. *J. Med. Chem.* *52*, 6382–6393.
- (128) Ricci, C. G. (2014) Tese de doutorado: Simulações por dinâmica molecular de sistemas envolvendo o receptor ativador da proliferação de peroxissomos.
- (129) Prates, E. T., Souza, P. C. T. Pickholz, M., and Skaf, M. S. (2011) CHARMM-Based Parameterization of Neutral Articaine—A Widely Used Local Anesthetic. *Int. J. Quantum Chem.* *111*, 1339–1345.
- (130) Vanommeslaeghe, K., Hatcher, E., Acharya, C., Kundu, S., Zhong, S., Shim, J., Darian, E., Guvench, O., Lopes, P., Vorobyov, I., and MacKerell Jr., A. D. (2010) CHARMM General Force Field (CGenFF): A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J. Comput. Chem.* *31*, 671–690.
- (131) Freddolino, P., Strumpfer, J., Saam, J., and Chipot, C. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/plugins/molefactory/> Acessado em: 11-07-2015.
- (132) Mayne, C. G., Saam, J., Schulten, K., Tajkhorshid, E., and Gumbart, J. C. (2013) Rapid parameterization of small molecules using the force field toolkit. *J. Comput. Chem.* *34*, 2757–2770.
- (133) M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Pet, J. A. P. (2004) Gaussian 03, Revision C.02.
- (134) Singh, U., and Kollman, P. (1984) An approach to computing electrostatic charges for molecules. *J. Comput. Chem.* *5*, 129–145.
- (135) Besler, B. H., Merz, K. M., and Kollman, P. a. (1990) Atomic charges derived from semiempirical methods. *J. Comput. Chem.* *11*, 431–439.
- (136) Leitner, A., Walzthoeni, T., Kahraman, A., Herzog, F., Rinner, O., Beck, M., and Aebersold, R. (2010) Probing native protein structures by chemical cross-linking, mass spectrometry, and bioinformatics. *Mol. Cell. Proteomics* *9*, 1634–1649.
- (137) Walzthoeni, T., Leitner, A., Stengel, F., and Aebersold, R. (2013) Mass spectrometry supported determination of protein complex structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *23*, 252–260.
- (138) <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/2.9/ug/node63.html> Acessado em: 11-07-2015.