



**Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química**

MELINA MOTTIN

**SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR DO
RECEPTOR ATIVADOR DA PROLIFERAÇÃO DE PEROXISSOMOS γ
COM O AGONISTA PARCIAL GQ16**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
APRESENTADA AO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
QUÍMICA NA ÁREA DE FÍSICO-QUÍMICA.

ORIENTADOR: PROF. DR. MUNIR SALOMÃO SKAF

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

Assinatura do Orientador

Campinas, 2012.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

M859s Mottin, Melina (1981-).
Simulações de dinâmica molecular do receptor
ativador da proliferação de peroxissomos γ com o
agonista parcial GQ16 / Melina Mottin. – Campinas, SP:
[s.n.], 2012.

Orientador: Munir Salomão Skaf.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Química.

1. Dinâmica molecular. 2. Receptores nucleares.
3. PPAR gama. 4. GQ16. I. Skaf, Munir Salomão.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Molecular dynamics simulation of the peroxisome proliferator-activated
receptor γ with the partial agonist GQ16

Palavras-chave em inglês:

Molecular dynamics
Nuclear receptor
PPAR gamma
GQ16

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Mestre em Química na área de Físico-Química

Banca examinadora:

Munir Salomão Skaf [Orientador]
Pedro Antonio Muniz Vazquez
Alessandro Silva Nascimento

Data de defesa: 23/02/2012

Programa de pós-graduação: Química

*Dedico esta dissertação aos meus pais,
Carlos Alberto e Maria Lucia
e a minha irmã, Leticia.*

Agradecimentos

- Agradeço ao Prof. Munir pela orientação, pelo incentivo e por toda a contribuição na minha formação.
- Agradeço também ao seu excelente grupo de pesquisa: Clarisse, Denise, Érica, Ivana, Jorge, Júlio, Leandro, Lucas, Paulo, Rodrigo, Susan, Tatiana e Thiago colegas que tornaram-se amigos no decorrer destes dois anos, que me receberam muito bem e com quem tive uma convivência muito boa. Faço um agradecimento especial ao Paulo e ao Rodrigo, pela amizade, pelos ensinamentos e pela participação muito positiva na minha formação.
- Aos membros da banca e suplentes: Prof. Pedro Vazquez, Prof. Alessandro Nascimento, Prof. Ricardo Aparício e Prof. José Barreto Carvalheira.
- Aos professores da banca de qualificação: Prof. Rogério Custódio e Prof. Ricardo Aparício.
- À Unicamp e ao Instituto de Química.
- À CAPES pelo financiamento.
- A minha família, principalmente aos meus pais, que me apoiaram e incentivaram durante todo o mestrado. Aos meus amigos do Sul: Shelley, Ale, Rafa, Bento, Ana Luisa, Débora, Cris, Marce e Pat que fizeram as minhas idas a Porto Alegre muito mais alegres. A Ágata e Daphne por fazerem os momentos de lazer mais relaxantes, em especial à Daphne por me fazer companhia durante a escrita desta Dissertação.

Curriculum Vitae

Informações Pessoais

Nome: Melina Mottin
Nascimento: 23/09/1981

Formação universitária

Graduação em Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003 - 2006.

Mestrado em Química, Universidade Estadual de Campinas, 2010 - 2012.

Simulações de Dinâmica Molecular do Receptor Ativador da Proliferação de Peroxissomos γ com o agonista parcial GQ16

Orientador: Prof. Dr. Munir Salomão Skaf (IQ-Unicamp)

Instituição: Instituto de Química - Unicamp

Ingresso: 03/2010 Defesa: 23/02/2012

Prêmios e distinções

1. Destaque de Sessão do XX Salão de Iniciação Científica, PROPESC, 2008
2. Destaque de Sessão do XVII Salão de Iniciação Científica, PROPESC, 2005

Projetos de Iniciação Científica

1. **2008 – 2009:** Estudos computacionais da interação entre DNA e ligantes via docking e dinâmica molecular. Orientador: Paulo Augusto Netz, Instituição: UFRGS, Bolsa: CNPq/PIBIC/UFRGS.
2. **2006 – 2008:** Simulação Dinâmica Molecular do Fármaco Antitumoral Ecteinascidina e suas interações com DNA e proteínas. Orientador: Paulo Augusto Netz, Instituição: UFRGS, Bolsa: CNPq/PIBIC/UFRGS.
3. **2005 – 2006:** Carbonilação de Alilaminoálcoois e Aziridinas derivadas do limoneno catalisada por complexo de ródio. Orientador: Ricardo Gomes da Rosa, Instituição: UFRGS, Bolsa: FAPERGS.
4. **2004 – 2005:** Síntese e Carbonilação de Alilaminoálcoois catalisada por complexo de ródio. Orientador: Ricardo Gomes da Rosa, Instituição: UFRGS, Bolsa: FAPERGS-BIC/UFRGS.

Artigo submetido:

1. Amato, A.A., Rajagopalan, S., Carvalho, B. M., Figueira, A. C. M., Ayers, S. D., Mottin, M., Silveira, R. L., Souza, P. C. T., Mourão, R. H. V., Saad, M. J. A., Carruthers, C. W., 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., Neves, F. A. R. GQ-16, A Novel PPAR γ Ligand, Promotes Insulin Sensitization Without Weight Gain. *J. Biol. Chem.* (2012).

Artigos completos publicados em periódicos:

1. Ricci, C. G., Andrade, A. S. C., Mottin, M., Netz, P. A. Molecular Dynamics of DNA: Comparison of Force Fields and Terminal Nucleotide Definition". *J.Phys. Chem.B*, v.114, p.9882 - 9893, 2010.
2. Limberger, J., Mottin, M., Nachtigall, F., Castellano, E., Da Rosa, R. Rhodium-catalyzed carbonylation of allylaminoalcohols: Catalytic synthesis of N-(2-hydroxy-alkyl)-gamma-lactams and bicyclic oxazolidines. *J. Mol. Catal. A- Chem.*, v.294, p.82 - 92, 2008.

Trabalhos Apresentados em congressos:

1. Mottin, M, Souza, P. C. T., Silveira, R. L., Skaf, M. S. Investigation of a new PPAR gamma partial agonist by Molecular Dynamics Simulations In: 7th International Conference of the Brazilian Association for Bioinformatics and Computational Biology - X-Meeting, 2011, Florianópolis.
2. Ricci, C. G., Andrade, A. S. C., Netz, P. A., Mottin, M. Dinâmica e Estabilidade de Oligonucleotídeos em Simulações Longas: Comparação de Campos de Forças e Condições dos Nucleotídeos Terminais In: XV Simpósio Brasileiro de Química Teórica, 2009, Poços de Caldas. **Livro de Resumos do XV SBQT.**
3. Mottin, M., Ricci, C. G., Netz, P. A. Reatividade de saframincinas frente ao DNA estudada via docking molecular In: XV Simpósio Brasileiro de Química Teórica, 2009, Poços de Caldas. **Livro de Resumos.**
4. Mottin, M., Andrade, A. S. C., Netz, P. A., de Amorim, H. L. N. Simulação via Dinâmica Molecular das interações entre o Fármaco Antitumoral Ecteinascidina e Oligonucleotídeos In: IV Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos (apresentação oral e de pôster), 2008, Petrópolis – RJ. **Anais do Congresso.**
5. Mottin, M., Andrade, A. S. C., de Amorim, H. L. N., Netz, P. A. Simulação Dinâmica Molecular de Complexos entre o Fármaco Antitumoral ET743 e DNA: Análise das alterações estruturais induzidas e formação do complexo covalente In: XX Salão de Iniciação Científica (apresentação oral e de pôster), 2008, Porto Alegre. **Livro de Resumos do XIX Salão de Iniciação Científica, 2008.**
6. Mottin, M., Andrade, A. S. C., de Amorim, H. L. N., Netz, P. A. Estudo das Interações e alterações estruturais induzidas em complexos DNA-Ecteinascidina via Dinâmica Molecular In: XIX Salão de Iniciação Científica (apresentação oral e de pôster), 2007, Porto Alegre. **Livro de Resumos do XIX Salão de Iniciação Científica.**
7. Netz, P. A., Andrade, A. S. C., Mottin, M. Estudo das interações e alterações estruturais induzidas em complexos DNA-Ecteinascidina via Dinâmica Molecular. In: XIV Simpósio Brasileiro de Química Teórica, 2007, Poços de Caldas. **Livro de Resumos do XIV SBQT.**
8. Netz, P. A., Andrade, A. S. C., Mottin, M. Simulação da interação de oligonucleotídeos com o fármaco antitumoral ecteinascidina: caracterização estrutural e termodinâmica. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia. **"SBQ 30 anos".**
9. Da Rosa, R, Mottin, M., Limberger, J. Síntese Quimiosseletiva e Carbociclicização de Alilaminoálcool derivado do 3-fenil-glicidato de etila Catalisada por Complexo de Ródio In: 28ª Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas-MG. **Química para o Desenvolvimento Sustentável e Inclusão Social.**
10. Mottin, M., Limberger, J, Da Rosa, R. Síntese Quimiosseletiva e Carbociclicização de Alilaminoálcool derivado do 3-fenil-glicidato de etila Catalisada por Complexo de Ródio In: XVII Salão de Iniciação Científica, 2005, Porto Alegre. **Livro de Resumos do XVII Salão de Iniciação Científica.**

Resumo

O Receptor Ativador da Proliferação de Peroxissomos γ (PPAR γ) é membro de uma família de receptores nucleares cuja atividade é regulada por ligantes. O PPAR γ atua no metabolismo de lipídios e promove a sensibilização sistêmica à insulina, sendo, portanto, um alvo em potencial para o desenvolvimento de fármacos antidiabéticos. Dentre os ligantes desse receptor, o mais conhecido é a rosiglitazona (RSG), um agonista total que tem a utilização limitada por seus efeitos adversos: toxicidade cardiovascular, ganho de peso e retenção hídrica. A utilização de agonistas parciais é uma alternativa promissora para a redução desses efeitos, já que, apesar de apresentarem menor efeito farmacológico, conseguem desacoplar a sensibilização à insulina do acúmulo de triglicérides. Neste trabalho, realizamos simulações de dinâmica molecular do PPAR γ ligado a um agonista parcial recentemente descoberto, o GQ16. O complexo PPAR γ - RSG também foi simulado e utilizado como comparativo, para estudar os modos de ligação dos ligantes e suas influências sobre a dinâmica do PPAR γ . O mecanismo clássico de ativação do receptor é através da estabilização de uma de suas hélices (H12). Analisando-se a estabilidade da H12 durante as simulações observamos que esta permaneceu mais estável em presença da RSG em relação ao GQ16. As simulações revelaram que enquanto a RSG interage diretamente com um resíduo da H12, o GQ16 interage através de uma molécula de água, estabilizando mais fracamente a H12. Essa diferença de comportamento entre os ligantes pode estar por trás da menor ativação promovida pelo GQ16 em relação à RSG, o que está de acordo com os estudos funcionais que mostraram que o GQ16 atua como agonista parcial. Estudos recentes mostram que características estruturais do receptor são importantes na ativação ligante-específica. Um desses fatores auxiliares da ativação do PPAR γ está relacionado à fosforilação de uma serina (S245) do receptor, mediada por uma proteína quinase, a Cdk5. As simulações revelaram que há uma maior estabilização do loop que contém a S245 em presença do GQ16. Além disso, vimos que o resíduo K244, vizinho ao alvo da fosforilação pela Cdk5, varre um espaço conformacional menor em relação ao complexo PPAR γ -RSG. Esses resultados sugerem que o GQ16 possibilitaria um bloqueio mais efetivo da fosforilação, ao estabilizar esse loop como um todo, incluindo o resíduo K244 e deixando a S245 menos suscetível a ação da Cdk5.

Abstract

The Peroxisome Proliferator-Activated Receptors gamma (PPAR γ) is a member of a family of nuclear receptors whose activity is regulated by ligands. The PPAR γ acts on lipid metabolism and promotes systemic insulin sensitization, therefore being a potential target for the development of antidiabetic agents. Among the ligands of this receptor, the most popular is rosiglitazone (RSG), a full agonist which has restricted use by its side effects: cardiovascular toxicity, weight gain and water retention. The use of partial agonists is a promising alternative to reduce these effects because they can uncouple insulin sensitization from the triglyceride accumulation. In this work, we performed molecular dynamics simulation to investigate the dynamics of PPAR γ in presence of a partial agonist recently discovered, GQ16 and rosiglitazone (RSG). The classic mechanism of receptor activation is through the stabilization of one of its helices (H12). Analyzing the stability of H12 during the simulations we found that it remained more stable in the presence of RSG in relation to GQ16. The simulations revealed that while RSG interacts directly with a residue of H12, GQ16 interacts through a water molecule, thus destabilizing somewhat the productive conformation of H12. This difference in behavior promoted by the ligands may underlie the lower GQ16-induced activation in relation to the RSG, which is consistent with the functional studies that showed that GQ16 acts as partial agonist. Recent studies show that structural characteristics are important in receptor ligand-specific activation. One of these auxiliary factors of the activation of PPAR γ is related to the phosphorylation of a serine (S245) receptor mediated by a protein kinase, Cdk5. The simulations revealed that there is a greater stabilization of the loop containing the S245 in the presence of GQ16. In addition, we found that the residue K244, neighboring the target of phosphorylation by Cdk5, sweeps a narrower conformational space in relation to complex PPAR γ -RSG. These results suggest that GQ16 enable a more effective blocking of the phosphorylation by stabilizing this loop as a whole, including the residue K244, letting S245 less susceptible to the action of Cdk5.

Sumário

Lista de Abreviaturas.....	xii
Lista de Tabelas.....	xiii
Lista de Figuras.....	xiv
1 Introdução	1
1.1 Receptores Nucleares.....	4
1.2 Domínios estruturais dos Receptores Nucleares.....	5
1.3 Proteínas Correguladoras.....	7
1.4 Objetivos.....	8
2 Receptores ativadores da proliferação de peroxissomos	9
2.1 Receptor ativador da proliferação de peroxissomos γ	9
2.1.1 Aspectos estruturais.....	10
2.2 Mecanismos de ativação do PPAR γ	11
2.3 Fatores auxiliares da ativação.....	12
2.3.1 Fosforilação da serina 245 do PPAR γ	13
2.3.2 Proteína quinase ciclina-dependente: Cdk5-p25.....	14
2.4 Ligantes de PPAR γ	16
2.4.1 Ligantes sintéticos.....	17
2.5 O agonista parcial GQ16.....	20
3 Simulações de dinâmica molecular	22
3.1 Configurações e velocidades iniciais.....	23
3.2 Potenciais de Interação.....	24
3.3 Equações de movimento.....	27
3.4 Etapas envolvidas na simulação.....	28

3.5	Dinâmica de amostragem ampliada.....	29
3.6	Detalhes específicos das simulações.....	30
4	Parametrização dos Ligantes	35
4.1	Cargas Parciais atômicas.....	36
4.2	Parâmetros de Torção.....	36
5	Estudos dos complexos PPARγ-RSG e PPARγ-GQ16	42
5.1	Análise dos modos de ligação.....	42
5.2	Interação com a hélice 12.....	46
5.3	Interação com regiões importantes do LBD.....	48
5.4	Influência do coativador na estrutura do complexo.....	52
5.5	Comportamento dos resíduos K244 e S245 nas simulações DMAA.....	56
6	Conclusões	58
A	Nomenclatura e estrutura dos aminoácidos	60

Lista de Abreviaturas

AF	Função de ativação
COA	coativador
DBD	<i>DNA-binding domain</i>
DMAA	Dinâmica molecular com amostragem ampliada
DNA	Ácido desoxirribonucléico
GQ16	5-(5-bromo-2-metóxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-thiazolidina-2,4-diona
LBD	<i>Ligand-binding domain</i>
MD	<i>Molecular Dynamics</i>
NR	<i>Nuclear receptor</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PPAR	Receptor ativador da proliferação de peroxissomos
QM	<i>Quantum Mechanics</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	<i>root mean squared deviation</i>
RMSF	<i>root mean squared fluctuation</i>
RSG	Rosiglitazona
RXR	Receptor do ácido 9-cis retinóico
SRC-1	<i>Steroid Receptor Coactivator 1</i>
TZD	Tiazolidinediona

Lista de Tabelas

4.1	Definição dos tipos atômicos e cargas parciais para os átomos do GQ16.....	37
-----	----------------------------------------------------------------------------	----

Lista de Figuras

1.1	Classes de receptores nucleares (adaptado de Mangelsdorf <i>et al.</i> , 1995).....	4
1.2	Esquema da estrutura modular dos receptores nucleares - A/B: transativação, C: reconhecimento/ligação ao DNA; D: região flexível; A/B e E/F: dimerização, interação com o ligante, ligação a correpressores e coativadores, silenciamento.	6
1.3	Estrutura do LBD do PPAR γ (PDB ID: 1FM6) indicando a posição das hélices, folhas β e peptídeo coativador.....	6
1.4	Estrutura do DBD do receptor de andrógeno ligado ao DNA.....	7
2.1	Estruturas do A) Heterodímero de PPAR γ com RXR α e DNA (PDB ID: 3DZY); B) LBD do PPAR γ (PDB ID: 1FM6), em destaque as principais hélices, folhas β , Ω -loop e o domínio AF-2.	11
2.2	Regiões importantes como fatores auxiliares para ativação do PPAR γ : hélice 12 – agonismo clássico; folhas β , Ω -loop, serina 245.....	12
2.3	Estrutura da proteína quinase ciclina-dependente Cdk5 - p25 (PDB ID:1UNH).....	14
2.4	Representações do sítio catalítico da estrutura da Cdk5 (PDB ID: 1UNH) onde foram docados ATP e Ser245 do PPAR γ através da sobreposição com a estrutura da Cdk2 (PDB ID: 1HCK) e de um peptídeo inibidor (PDB ID: 1ATP): A) Cdk5, evidenciando Asp126 e loop H2-folha β do PPAR γ , evidenciando Ser245 e ATP; B) superfície de van der Waals da Cdk5, evidenciando Asp 126, loop H2-folha β do PPAR γ evidenciando Ser245 e ATP; C) Etapas do mecanismo de fosforilação da serina.....	15
2.5	Estruturas moleculares de ligantes naturais do PPAR γ	16
2.6	Estruturas moleculares dos agonistas totais de PPAR γ : A) rosiglitazona, B) pioglitazona, C) troglitazona ²⁵	17
2.7	Estruturas moleculares de: A e C) agonistas parciais, GW0072 e MRL-24 ^{25,31} e B) não-agonista de PPAR γ , SR1664 ³⁸	18
2.8	Estrutura do LBD do PPAR γ com 10 diferentes agonistas parciais superpostos. Ampliação da imagem, destacando os ligante, agonistas parciais disponíveis no PDB e GQ16...19	19

2.9	Estrutura molecular do GQ16, 5-(5-bromo-2-metóxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-thiazolidina-2,4-diona (A), originado da estrutura base 5-benzilideno-3-(4-metil-benzil)-thiazolidina-2,4-dionas (B).....	21
2.10	A) Gráfico da taxa de ativação dose-dependente do PPAR γ pelo logaritmo da concentração do GQ16 e da rosiglitazona; B) Efeito do DMSO (controle), do GQ16 e da RSG sobre a adipogênese de células mesenquimais C3H10T1/2. (extraído de Amato, A.A. <i>et al.</i> , 2012).....	21
3.1	Esquema mostrando os termos utilizados para modelar interações entre átomos: estiramento de ligações químicas (b), deformação angular entre três átomos ligados sucessivamente (θ), torções diedrais associadas a quatro átomos ligados sucessivamente (Φ) e distância entre átomos não ligados covalentemente (r_{ij}). (adaptado de Becker, O.M., MacKerrel Jr., A.D., Roux, B. & Watanabe, 2001).....	25
3.2	Representação gráfica dos potenciais de Lennard-Jones e de Coulomb.....	26
3.3	Estruturas cristalográficas do (A) complexo PPAR γ com GQ16, (B) complexo PPAR γ com RSG. As estruturas do LBD do PPAR γ em ambos os complexos foram dispostas na mesma orientação.....	31
3.4	Estrutura molecular A) do GQ16 e B) da rosiglitazona.....	32
4.1	Sobreposição das estruturas cristalográfica e otimizada do GQ16.....	36
4.2	Estrutura molecular do GQ16 com numeração dos átomos.....	37
4.3	Estrutura molecular do GQ16, indicando os diedros parametrizados.....	38
4.4	Estruturas moleculares redesenhadas do GQ16, utilizadas para realizar a varredura de energia, enfatizando o A) diedro 4, B) diedro 10 e C) diedro 11.....	38
4.5	Curvas de potencial geradas para o diedro 4. Os pontos circulosados nas curva em azul são os valores de energia potencial obtidos quanticamente (QM) na varredura destes diedros, ao passo que os pontos da curva em vermelho foram obtidos na varredura destes diedros usando 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. Ao lado estrutura molecular utilizada para realizar a varredura de energia da rotação do diedro 4.....	39
4.6	Curvas de potencial geradas para o diedro 10. A curva em azul representa valores de energia potencial obtidos quanticamente (QM) na varredura destes diedros, ao passo que a curva	

em vermelho representa diedros usando 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. Ao lado estrutura molecular utilizada para realizar a varredura de energia da rotação do diedro 10.....	39
4.7 Curvas de potencial geradas para o diedro 11. A curva em azul representa valores de energia potencial obtidos quanticamente (QM) na varredura destes diedros, ao passo que a curva em vermelho representa diedros usando 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. Ao lado estrutura molecular utilizada para realizar a varredura de energia da rotação do diedro 11.....	40
4.8 Sobreposição da estrutura otimizada do GQ16 em relação aos: A) <i>frames</i> da simulação do GQ16 no vácuo, B) <i>frames</i> da simulação do GQ16 em água e C) <i>frames</i> da simulação do GQ16 na proteína. Todas as estruturas foram alinhadas em relação ao anel de 5 membros.....	41
5.1 Probabilidade de tempo em que há formação de contato entre o LDB e os ligantes: RSG e GQ16	43
5.2 (a) Energia eletrostática média de interação entre cada resíduo e o GQ16; (b) Energia de van der Waals média de interação entre cada resíduo e o GQ16.....	44
5.3 Interação de van der Waals entre (A) o anel A do GQ16 e R288 (π -stacking); (B) o anel B do GQ16 e os resíduos M364 e C285, através do átomo de enxofre. (C) interação eletrostática dipolo-dipolo entre anel B do GQ16 e K367.....	44
5.4 (a) Energia eletrostática média de interação entre cada resíduo e a rosiglitazona; (b) Energia de van der Waals média de interação entre cada resíduo e a rosiglitazona.....	45
5.5 Interação de van der Waals entre (A) o anel B da RSG e C285, através do átomo de enxofre. (B) interação eletrostática entre anel A da RSG e os resíduos Y473, S289 e H449.....	45
5.6 Distribuição de RMSDs da H12 em relação à estrutura média da simulação. (A) complexo LBD-ligante sem coativador (B) complexo LBD-ligante com coativador.....	46
5.7 Estrutura do LBD do PPAR γ enfatizando os modos de interação da rosiglitazona (A) e do GQ16 (B) com a hélice 12.	47
5.8 <i>Root mean squared fluctuation</i> (RMSF) dos carbonos α de cada resíduo dos complexos: PPAR γ -RSG sem COA; PPAR γ -RSG com COA; PPAR γ -GQ16 sem COA; PPAR γ -GQ16 com COA.....	48

5.9	Estruturas do complexo PPAR γ -GQ16 sem (A) e com (B) coativador colorida em relação à diferença de RMSF (-0,5 a 0,5 Å) entre o complexo PPAR γ -GQ16 e PPAR γ -RSG.....	49
5.10	Estruturas dos LBDs nos complexos sem coativador (A) PPAR γ -GQ16 e (B) PPAR γ -RSG e com coativador (C) PPAR γ -GQ16 e (D) PPAR γ -RSG, dando ênfase à superfície volumétrica de ocupação e alguns <i>frames</i> da MD da K244.....	51
5.11	Sobreposição da superfície volumétrica de ocupação e alguns <i>frames</i> da S245 nas simulações A) dos complexos sem coativador e B) dos complexos com coativador.....	52
5.12	A) Estrutura do PPAR γ com coativador (lilás), enfatizando os resíduos E471 e K301, que formam o <i>charge clamp</i> . B) Probabilidade de ocorrência das distâncias entre dos átomos da cadeia lateral dos resíduos E471 e K301 no complexo sem coativador; B) e com coativador.....	53
5.13	A) Probabilidade de ocorrência das distâncias entre os resíduos E471 e I689; B) K301 e L694, ambos nos complexos com coativador em presença de RSG e de GQ16. As linhas verticais representam as distâncias entre os resíduos na estrutura cristalográfica.....	53
5.14	Probabilidade de ocorrência das distâncias entre os resíduos E471 e I689; E471 e H687; E471 e K474 nos complexos A) PPAR γ -GQ16 e B) PPAR γ -RSG. As linhas verticais representam as distâncias entre os resíduos na estrutura cristalográfica.....	54
5.15	Evolução temporal da energia de interação entre COA-K301, COA-E471 e COA-LBD.....	55
5.16	RMSD dos carbonos α do coativador nos complexos PPAR γ -GQ16 e PPAR γ -RSG.....	55
5.17	Estruturas dos LBDs nos complexos PPAR γ -GQ16 (A) e PPAR γ -RSG (B), dando ênfase à superfície volumétrica de ocupação e alguns <i>frames</i> da DMAA da K244.....	56
5.18	Sobreposição da superfície volumétrica de ocupação e alguns <i>frames</i> da S245 na simulação de DMAA.....	57

Capítulo 1

Introdução

A diabetes *mellitus* tipo 2 e a obesidade tornaram-se doenças amplamente disseminadas em sociedades ocidentais e ameaçam a saúde da população. A obesidade é o maior fator de risco de resistência à insulina, hiperglicemia, perfis anormais de lipídios no sangue e hipertensão, contribuindo para o aparecimento de doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e câncer.¹ A diabetes tipo 2 é uma doença silenciosa que não costuma apresentar sintomas no seu início e, por isso, pode passar despercebida por anos. Os sintomas só são evidentes quando os níveis glicêmicos estão muito elevados e as complicações advindas disso podem ser graves.^{2,3}

Estudos relacionados a novas terapias para o tratamento de obesidade, diabetes, câncer e infertilidade, consideram algumas proteínas como sendo alvos importantes, devido à relação destas com doenças metabólicas, proliferativas e reprodutivas.⁴ Os receptores nucleares (NR, para *Nuclear Receptor*) são um exemplo dessas proteínas. Eles são responsáveis por regular a transcrição de genes no interior do núcleo, através da interação direta com o DNA.⁵⁻⁸

Os agonistas ou antagonistas capazes de interagir com receptores nucleares estão entre os fármacos mais utilizados hoje em dia⁴. Recentemente, um exemplo importante de NR, o receptor ativador da proliferação de peroxissomo gama (PPAR γ , *Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma*), vem recebendo atenção da comunidade científica em razão da sua interferência na diferenciação e maturação de adipócitos,⁹ além de estar envolvido nas respostas inflamatórias e imunes.¹ O PPAR γ ganhou destaque quando uma classe de fármacos específica para este receptor foi descoberta, as tiazolidinedionas (TZDs). As TZDs são uma classe de fármacos antidiabéticos que vem sendo bastante utilizada atualmente como agente hipoglicemiante no tratamento de diabetes *mellitus* tipo 2. O foco desta Dissertação é o estudo de dois ligantes que apresentam ação antidiabética. Por isso, inicialmente faremos uma discussão a respeito da diabetes e as opções de tratamento desta.

A diabetes *mellitus* é uma doença metabólica, caracterizada por um aumento anormal da glicose plasmática. Apesar de a glicose fornecer a energia necessária para manter as funções corporais, em excesso, pode causar diversas complicações. São conhecidos vários tipos de diabetes, sendo os principais: diabetes tipo 1, que é uma doença auto-imune, caracterizada pela

destruição das células beta produtoras de insulina; diabetes tipo 2, relacionada à incapacidade de absorção de insulina pelas células musculares e adiposas; diabetes gestacional, em que os níveis de glicose se elevam durante o período da gravidez.^{2,3} Em adultos, a diabetes tipo 2 (DM2) é responsável por 90 a 95% dos casos de diabetes diagnosticados. A diabetes tipo 2 está associada à idade avançada, obesidade, fatores hereditários, histórico de diabetes gestacional, metabolismo de glicose debilitado, inatividade física e raça/etnia.³

O tipo 2 da doença é considerado uma das grandes epidemias mundiais do século XXI. As crescentes incidência e prevalência são atribuídas ao envelhecimento populacional, aos avanços terapêuticos no tratamento da doença, mas, especialmente, ao estilo de vida atual, caracterizado por inatividade física e hábitos alimentares que predispõem ao acúmulo de gordura corporal.¹⁰ Complicações atribuídas à DM2 estão relacionadas à doença cardiovascular; retinopatia, principal causa de cegueira; nefropatia, levando à diálise e amputações de membros inferiores, que geram grandes gastos ao sistema de saúde pública.^{3,10}

O número de indivíduos com diabetes dá uma ideia da magnitude do problema, em termos mundiais: 135 milhões apresentavam a doença em 1995; 240 milhões em 2005 e há projeção para atingir 366 milhões em 2030, sendo que dois terços habitarão países em desenvolvimento.¹⁰ De 2007 a 2009 foi constatado que entre adultos norte-americanos com diabetes diagnosticada (tipo 1 ou 2): 12% utilizam insulina, 14% utilizam insulina e antidiabéticos orais, 58% utilizam somente antidiabéticos orais e 16% não utilizam nenhuma dessas medicações.³

Por isso, a prevenção da DM2 e de suas complicações crônicas é uma questão importante a ser estudada. As opções farmacológicas para tratamento da diabetes tipo 2 são: secretagogos de insulina, inibidores da alfa-glicosidase e sensibilizadores de insulina. A classe dos secretagogos de insulina é representada pelas sulfoniluréias e biguanidas. Essa classe estimula a produção endógena de insulina pelas células beta do pâncreas e tem como principais complicações a hipoglicemia e o ganho de peso.¹¹ Já os inibidores da enzima alfa-glicosidase retardam a velocidade de absorção de monossacarídeos, mas a intensidade do controle glicêmico dessa classe de antidiabéticos é pequena se comparada aos demais agentes¹.

Dentre os medicamentos sensibilizadores de insulina, os principais agentes antidiabéticos são a metformina e a classe das tiazolidinedionas. Ambos diminuem a resistência do organismo à

¹ Veja por exemplo em <http://www.diabetesebook.org.br/modulo-4>

insulina e, dessa forma, melhoram a ação da insulina no metabolismo dos carboidratos. A metformina pertence a classe das biguanidas, seu mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido, mas sabe-se que ela melhora a captação muscular e a produção hepática de glicose. Os efeitos adversos mais comuns são diarreia, náuseas, vômitos e distensão abdominal, além de diminuir o apetite. Cerca de 5% dos pacientes não consegue utilizar esse medicamento devido a intolerância gastrointestinal.¹¹

A alternativa para esses pacientes e para pacientes com resistência à insulina não totalmente controlada é a utilização das tiazolidinedionas. O mecanismo de ação dessas está relacionado ao receptor nuclear PPAR γ , envolvido na diferenciação de células primordiais do tecido adiposo em adipócitos. Isso diminui a liberação de ácidos graxos e de citocinas inflamatórias que influenciam positivamente na sinalização insulínica. Os principais efeitos adversos dessa classe de fármacos são a retenção hídrica com formação de edema e a possibilidade de induzir insuficiência cardíaca em indivíduos suscetíveis.¹¹ Esses efeitos estão mais relacionados a agonistas totais do PPAR γ . Agonistas parciais, por apresentarem um menor efeito farmacológico, ocasionam menores efeitos adversos e por isso o estudo deste tipo de ligante torna-se uma alternativa promissora para o tratamento de pacientes com DM2 sem os efeitos deletérios dos agonistas totais.

Nesta Dissertação, são reportados os principais resultados da pesquisa realizada em relação ao receptor nuclear PPAR γ e sua interação com ligantes. Um dos ligantes estudados foi a rosiglitazona (RSG), um agonista total do receptor, fármaco amplamente conhecido para o tratamento de diabetes tipo 2, mas que possui alguns efeitos adversos. O outro ligante foi o agonista parcial GQ16, recentemente sintetizado pelo grupo do Prof. Ivan da Rocha Pitta (UFPE),¹² que apresentou resultados promissores sem alguns dos efeitos indesejados da RSG. Para isso, modernas técnicas de dinâmica molecular foram utilizadas.

A Dissertação está dividida em 6 capítulos. No primeiro capítulo, há uma breve introdução sobre diabetes, suas características, tipos e prevalência na população. Além disso, é apresentada a importância dos estudos de fármacos utilizados para o tratamento de diabetes tipo 2, seguida de uma revisão bibliográfica atual sobre receptores nucleares. O segundo capítulo trata especificamente do PPAR, incluindo seus diferentes subtipos, além do PPAR γ e seu mecanismo de ativação e ligantes. O terceiro e quarto capítulos abordam a metodologia utilizada para simulações de dinâmica molecular e para parametrização dos ligantes, respectivamente. Os

resultados obtidos em relação aos complexos PPAR γ - RSG e PPAR γ -GQ16 serão apresentados no quinto capítulo e as conclusões finais serão expostas no sexto capítulo.

1.1 Receptores Nucleares

Os receptores nucleares (NRs) são proteínas localizadas no núcleo celular responsáveis pela regulação da transcrição de genes envolvidos no desenvolvimento, diferenciação, reprodução e homeostase de células eucarióticas.¹³ A superfamília de receptores nucleares pode ser dividida em quatro classes (Figura 1.1), com base em sua dimerização e em propriedades de ligação ao DNA.¹⁴

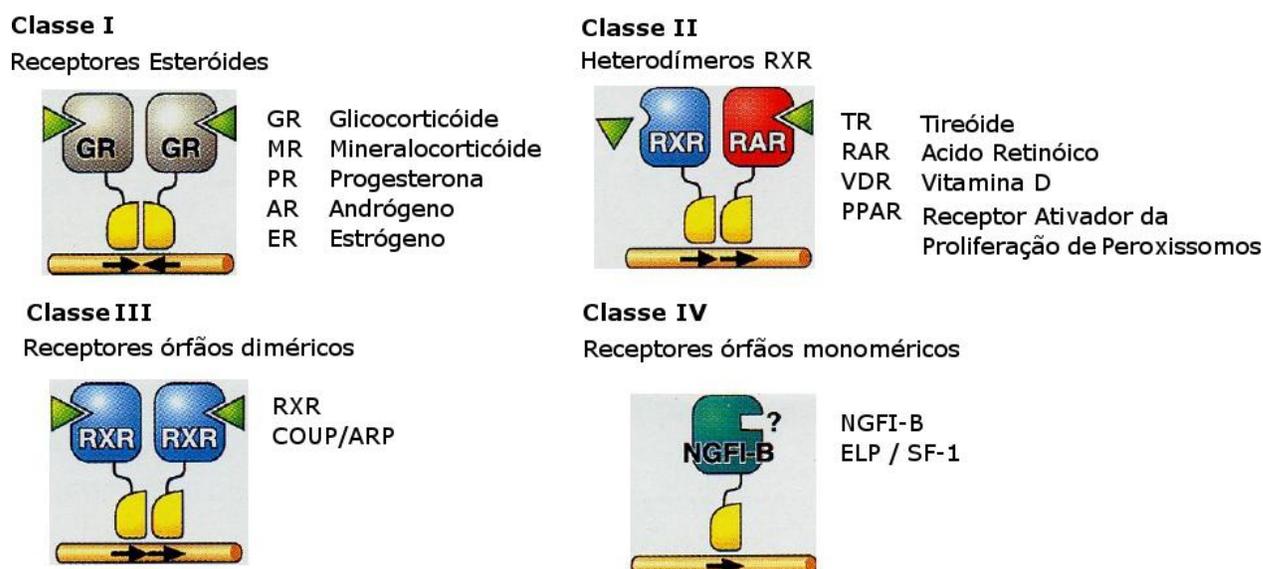


Figura 1.1. Classes de receptores nucleares (adaptado de Mangelsdorf *et al.*, 1995)

Os receptores da classe I incluem os receptores de hormônios esteróides, que funcionam como 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 (receptor do ácido 9-cis retinóico) e, tipicamente, 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 formam, respectivamente, dímeros e monômeros.¹⁴ Os receptores órfãos foram assim denominados, quando descobertos, pois não tiveram seus ligantes endógenos identificados. Recentemente, alguns desses ligantes de receptores órfãos foram identificados, como é o caso dos ácidos biliares.¹³

A ativação da transcrição promovida pelos receptores nucleares depende da associação de proteínas correguladoras e da formação de um amplo maquinário protéico. Esse processo costuma ser desencadeado pelos ligantes desses NRs. Os ligantes são pequenas moléculas lipofílicas, como hormônios ou ácidos graxos, que ao ligarem-se promovem alterações conformacionais nestes, regulando a expressão dos genes alvo. Já o mecanismo de regulação da transcrição pelos NRs depende fundamentalmente da associação do receptor a sequências específicas do DNA, conhecidas como elementos de resposta.¹⁵

1.2 Domínios estruturais dos Receptores Nucleares

A estrutura dos receptores nucleares geralmente é composta por cinco a seis domínios (Figura 1). O domínio com maior número de resíduos e funções mais diversificadas é o LBD (*Ligand Binding Domain*) – Figura 1.2, domínio **E/F** no esquema – exceto para NRs esteroidais. Além de conter a cavidade de ligação dos ligantes (*Ligand Binding Pocket* ou LBP), o LBD apresenta superfícies para a interação com proteínas correguladoras, bem como superfícies hidrofóbicas de dimerização, que são importantes para a formação de dímeros com a outra subunidade.

A cavidade de ligação ao ligante ou LBP, geralmente, está localizada atrás da hélice 3 e na frente das hélices 7 e 10 (Figura 1.3). A forma e o tamanho do LBP variam para cada NR e aparentemente estão correlacionados com a função do receptor.¹⁶ Receptores órfãos que interagem com diversos ligantes tendem a ter LBPs mais volumosos que o receptor de esteróide, por exemplo, que apresenta alta afinidade com poucos ligantes.¹³

O LBD também contém um importante domínio de transativação induzida pelo ligante, chamado AF-2, necessário para o recrutamento de várias proteínas correguladoras. O AF-2 é composto pelo loop entre as hélices 3 (H3) e 4 (H4), extremidade C-terminal das hélices 11

(H11) e 12 (H12) (Figura 1.3 e mais detalhes adiante na Figura 2.1) e pode adotar múltiplas conformações dependendo do ligante que está ligado.^{7,17,18}

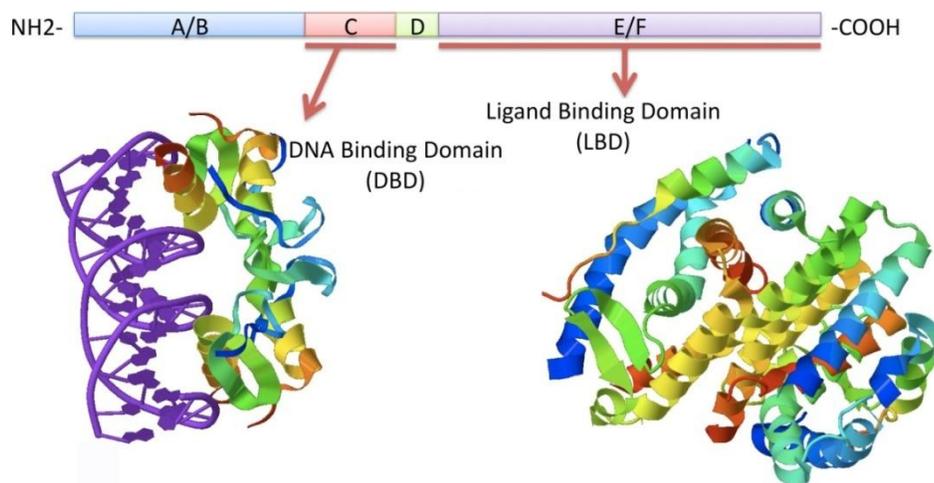


Figura 1.2. Esquema da estrutura modular dos receptores nucleares - A/B: transativação, C: reconhecimento/ligação ao DNA (roxo); D: região flexível; A/B e E/F: dimerização, interação com o ligante, ligação a correpressores e coativadores, silenciamento.

O módulo conhecido como DBD (*DNA Binding Domain*) - Figura 1.2, domínio C no esquema - é o domínio responsável pela ancoragem do receptor em seqüências específicas do DNA.^{7,18} O DBD possui a seqüência de aminoácidos mais conservada entre os domínios dos NRs e consiste de dois dedos de zinco contendo 4 cisteínas que coordenam átomos de zinco (Figura 1.4).^{7,18} Cada DBD contém duas α -hélices perpendiculares entre si, sendo que uma delas se insere no sulco maior do DNA e é responsável pelo reconhecimento seqüência-específico.¹⁹ Além disso, esse domínio também contribui para o processo de dimerização^{7,20} e pode transmitir movimentos do DNA para o LBD, de acordo com a hipótese de que o DNA tem um papel ativo na modulação da atividade dos NRs.²¹

Já a estrutura e a funcionalidade dos outros módulos ainda não foram devidamente elucidadas, principalmente por serem regiões muito

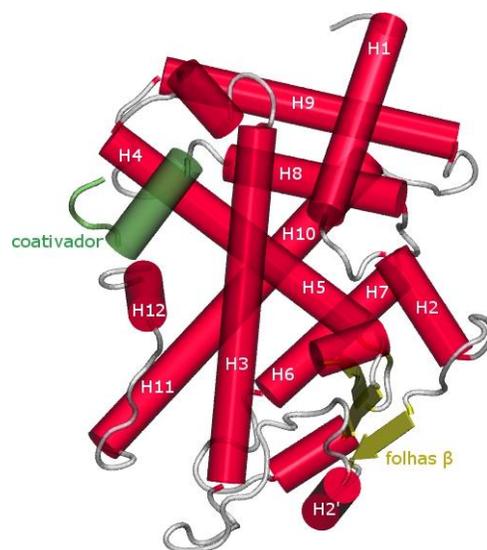


Figura 1.3. Estrutura do LBD do PPAR γ (PDB ID: 1FM6) indicando a posição das hélices, fitas β (amarelo) e peptídeo coativador (verde).

móveis e pouco conservadas entre os diferentes NRs. Sabe-se que na região N-terminal há uma região de ativação independente do ligante, denominada AF-1 – Figura 1.2, domínio **A/B** do esquema, mas o mecanismo pelo qual essa região induz a transcrição ainda não foi

compreendido.^{7,17,18} Estudos feitos com receptores de hormônios esteróides mostraram que essa região tende a ser desestruturada, mas que a interação com outras proteínas ou com o DNA pode induzir a formação de estruturas secundárias.¹³

Além disso, essa região é bastante variável entre os NRs de diversas espécies, tanto em tamanho como em composição.¹⁸ Também foi sugerido que o módulo conhecido como “dobradiça” – Figura 1.2, domínio **D** do esquema - pode regular o movimento relativo do DBD e do LBD ou transmitir movimentos da região C-terminal para a N-terminal, e vice-versa, servindo como uma via para alosterias inter-domínios.¹³

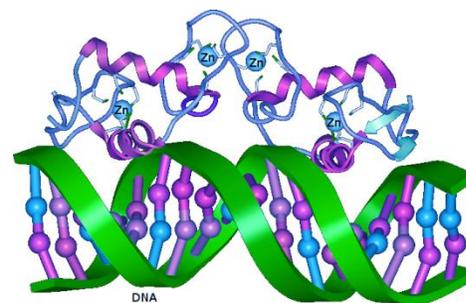


Figura 1.4. Estrutura do DBD do receptor de andrógeno ligado ao DNA

1.3 Proteínas Correguladoras

A capacidade que os receptores nucleares apresentam de alternar entre ativação ou repressão em resposta a estímulos moleculares específicos é atribuída às proteínas conhecidas como correguladoras. Essas proteínas podem ser correpressoras ou coativadoras. Em geral, a forma inativa dos receptores nucleares é formada por um complexo com correpressores, que inibem a atividade transcricional dos NRs. A ativação do receptor pela ligação do ligante induz a uma mudança conformacional deste. O correpressor então se dissocia do complexo e o coativador é recrutado, facilitando a transcrição de genes alvo.¹⁵

Os coativadores contêm múltiplas sequências conservadas que fazem interações hidrofóbicas com o domínio AF-2 do LBD dos NRs e que podem ser generalizadas como LXXLL. Estruturas cristalográficas do LBD de vários receptores nucleares ligados a agonistas e peptídeos contendo a sequência LXXLL revelaram que o modo de interação com o LBD é conservado. As estruturas mostram que o peptídeo coativador se liga ao receptor através do domínio AF-2, que é composto pelas hélices H3, H4, H11 e H12 (Figura 1.3). A hélice 12 é a

única das quatro hélices que compõem o AF-2 que adota diferentes conformações em função do ligante.¹⁶ Antagonistas do receptor podem inibir a ligação desses coativadores, bloqueando estericamente a capacidade da hélice 12 de se aproximar da estrutura central do LBD ou induzindo a H12 a se ligar ao sulco hidrofóbico da interface do AF-2, mimetizando um falso coativador.¹³ Dessa forma, fica bastante claro que uma posição particular da H12 é essencial para o LBD interagir com o coativador.

Para alguns receptores nucleares, tais como os receptores ativadores da proliferação de peroxissomos (PPAR), os correpressores podem impedir o recrutamento do coativador. Como os correpressores também possuem motivos LXXLL, eles são capazes de reconhecer os resíduos hidrofóbicos que formam o AF-2 e impedir que a H12 adquira uma conformação ativa, que desencadearia o processo de transativação. O complexo LBD-correpressor pode, ainda, ser estabilizado pela presença de antagonistas, que não só impede que a hélice 12 adquira uma conformação ativa, mas, sobretudo, cria uma maior superfície de ligação para o motivo LXXLL do correpressor.¹³

1.4 Objetivos

Neste trabalho, aplicamos simulação computacional de dinâmica molecular para investigar o modo de interação de um novo agonista parcial, o GQ16, com o PPAR γ usando como referência a rosiglitazona. Para isso, estudamos complexos do PPAR γ em presença e ausência de coativador, com o agonista parcial (GQ16) e com o agonista total (RSG).

Dessa forma, foi possível: (1) comparar o modo de interação entre os ligantes e o LBD; (2) elucidar as bases estruturais e dinâmicas do agonismo parcial do GQ16; (3) investigar a influência do coativador na ação dos ligantes e (4) observar o comportamento dinâmico da S245 (resíduo alvo da fosforilação) e assim auxiliar na compreensão de como o GQ16 e a rosiglitazona podem promover um bloqueio eficiente da fosforilação da S245.

Capítulo 2

Receptores ativadores da proliferação de peroxissomos

Os receptores ativadores da proliferação de peroxissomos ou PPARs (*peroxisome proliferator receptor-activated*) são membros da família de receptores nucleares pertencentes à classe II, dos receptores que formam heterodímeros com o RXR (Figura 2.1A). Nos humanos, são expressos três subtipos de PPAR (α , β/δ e γ) que diferem em i) distribuição nos tecidos; ii) especificidade em relação aos ligantes e iii) função biológica.^{22,23} Enquanto os subtipos α e β/δ são expressos em diversos tecidos metabolicamente ativos (fígado, rins, músculos, entre outros), o subtipo γ é expresso predominantemente no tecido adiposo.

Em relação à seletividade de ligantes naturais, o PPAR α é considerado o subtipo mais promíscuo, pois é capaz de ligar uma ampla série de ácidos graxos saturados e insaturados, enquanto o PPAR γ é o mais seletivo e possui uma aparente preferência por ácidos graxos poliinsaturados. O fato de a maior parte dos fármacos anti-diabetes, as tiazolidinedionas (TZDs), apresentarem seletividade pelo PPAR γ sugere que esse subtipo seja o principal regulador do metabolismo da glicose. O subtipo γ do PPAR é o foco do nosso trabalho, mais detalhes sobre ele serão discutidos a seguir.

2.1 Receptor ativador da proliferação de peroxissomos γ

O subtipo γ do PPAR é o mais estudado atualmente e está associado à sensibilização para a insulina, regulação dos níveis de glicose plasmática e captação/armazenamento de lipídeos em órgãos periféricos (músculos esqueléticos, tecidos hepático e adiposo). Além desse seu papel bem conhecido, recentemente, ele também emergiu como um regulador-chave das respostas inflamatórias e imunológicas, bem como de diferenciação, proliferação e apoptose em células normais e tumorais.²⁴

De fato, a importância do PPAR γ veio à tona quando a classe de fármacos que atua diretamente sobre o PPAR γ , as tiazolidinedionas (TZD) ou glitazonas, foi descoberta.²⁵ Sendo

assim, o subtipo γ do PPAR consiste em um importante alvo molecular para o desenvolvimento de novos fármacos no tratamento para diabetes tipo 2.

Existem duas isoformas de PPAR γ humano que decorrem do *splicing* alternativo do gene que codifica esse receptor nuclear: a isoforma 1 (PPAR γ 1), que possui um padrão de expressão diversificado, incluindo células de macrófagos, epitélio do cólon e endotélio e a isoforma 2 (PPAR γ 2), que é expressa predominantemente em adipócitos²². Assim como outros receptores nucleares, o PPAR γ atua na forma de heterodímero com o receptor do ácido 9-cis-retinóico (RXR α , *Retinoid X Receptor alpha*) (Figura 2.1A).

2.1.1 Aspectos estruturais

A primeira estrutura do LBD do PPAR γ foi obtida por cristalografia de raio-X em 1998.²⁶ A estrutura do LBD (Figura 2.1B) apresenta o mesmo arranjo tridimensional comum a todos os receptores nucleares: um sanduíche de α -hélices, formando três camadas perpendiculares entre si, e pequenas fitas- β .

Embora a estrutura global se assemelhe a de outros NRs, 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 acessível e muito volumosa (1300 Å³).^{26,27} De acordo com Nolte *et al.*, essa última característica sugere que, diferentemente de outros receptores nucleares como o receptor do hormônio da tireóide ou receptores de hormônios esteróides, o PPAR γ seja um receptor capaz de se ligar a múltiplos ligantes, porém com moderada afinidade.²⁶ A literatura ainda sugere um possível sítio de entrada do ligante que situa-se entre a H3 e as fitas β , cuja superfície é composta por aminoácidos de cadeias laterais hidrofílicas.^{26,28-30}

O PPAR γ possui uma cavidade de ligação (LBP) em forma de Y, onde um dos “braços” se estende no espaço entre as hélices H12, H4 e H10/11 (região do AF-2); outro está situado entre as hélices H3 e H2 e o terceiro braço se estende da hélice H3 a H2'/fita β . O LBP é essencialmente hidrofóbico, mas possui resíduos polares/carregados, principalmente situados na região do AF-2.

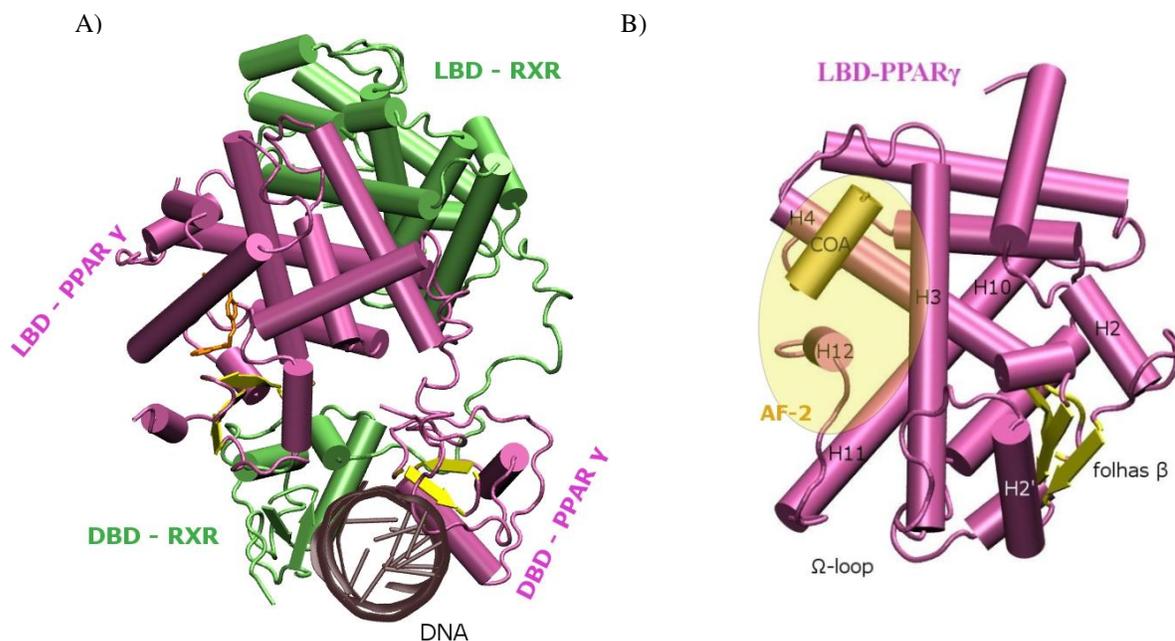


Figura 2.1. Estruturas do A) Heterodímero de PPAR γ com RXR α e DNA (PDB ID: 3DZY); B) LBD do PPAR γ (PDB ID: 1FM6) (lilás), em destaque as principais hélices, fitas β (amarelo), Ω -loop e o domínio AF-2 (sombreado em amarelo).

2.2 Mecanismos de ativação do PPAR γ

Embora haja vários estudos a respeito dos mecanismos que ativam o PPAR γ , ainda não foram compreendidas as bases moleculares dessa ativação por diferentes ligantes. Tradicionalmente, os mecanismos propostos para ativação ligante-induzida dos NRs envolvem mudanças conformacionais ou estabilização da H12, que compõe o domínio de ativação AF-2.

Atualmente, o modelo mais aceito é o de que o agonismo total do PPAR γ requer o contato direto do ligante com a hélice 12, dessa forma estabilizando-a em uma conformação agonista através da ligação de hidrogênio entre a tirosina Y473 da H12 e o ligante. 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).²⁶ Contrariamente, antagonistas de PPAR γ obstruem estericamente a conformação agonista da H12.³¹

Esta também é considerada a causa da diferença entre agonismo total e parcial.³² Estruturas cristalográficas de agonistas parciais ligados ao PPAR γ não mostram interação direta entre o ligante e a H12,³³ podendo estar posicionados entre a hélice 11 (H11) e a hélice 3 (H3) ou entre a H3 e as fitas β .³⁴ Isso poderia sugerir que o grau de estabilização da H12 é proporcional ao grau de agonismo e potência de transativação para agonistas totais.³¹

2.3 Fatores auxiliares da ativação

Alguns autores, no entanto, refutam a hipótese do mecanismo clássico de ativação do PPAR γ , via H12, e demonstram que outras características estruturais são importantes na ativação ligante-específica do receptor (Figura 2.2).³¹ Chalmers *et al.* (2006) realizaram um estudo de troca isotópica de hidrogênio/deutério por espectrometria de massas (H/D-exchange) com diversos ligantes, que promoviam diferentes níveis de transativação no receptor.³⁵ O estudo mostrou que somente os ligantes que promoviam um alto nível de transativação – agonistas totais – estabilizavam a região da H12. Os demais ligantes, que promoviam níveis intermediários a baixos de transativação, diminuíram a exposição somente das fitas β do PPAR γ ao solvente, sendo este resultado relacionado a uma estabilização desta região do LBD.

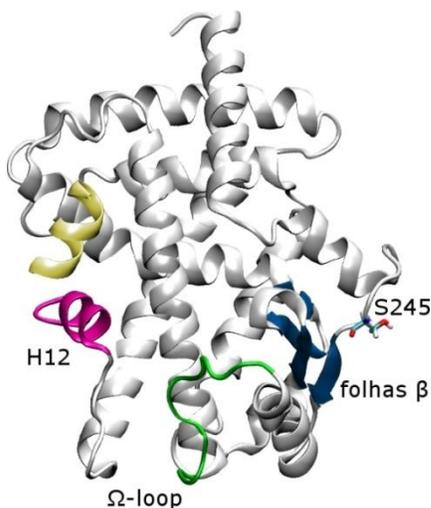


Figura 2.2. Regiões importantes como fatores auxiliares para ativação do PPAR γ : hélice 12 (rosa) – agonismo clássico; fitas β (azul), Ω -loop (verde), serina 245 (representação em bastão)

Em um trabalho recente, Waku *et al.* (2009) mostram que no caso de metabólitos de ácidos graxos oxidados, que funcionam como ligantes endógenos desse receptor, nem sempre a

interação com a H12 é requerida para a ativação do PPAR γ .³⁶ Os autores observaram que a interação do PPAR γ com ácidos graxos oxidados e prostaglandina J₂ ocasiona uma aproximação do Ω -loop à H12 e reorientação de resíduos das cadeias laterais da H3. Mutações em resíduos da região do Ω -loop/H3 reduziram a expressão gênica induzida pelos ligantes, o que sugere que o posicionamento do Ω -loop possa ser importante.

2.3.1 Fosforilação da serina 245 do PPAR γ

Outras modificações no PPAR γ podem levar a uma alteração no padrão de regulação de vários genes, cuja expressão é alterada na obesidade. Um importante estudo de Choi *et al.* (2010) mostrou recentemente que a fosforilação da S245 do PPAR γ (vide Figura 2.2) por uma quinase (Cdk5) diminuiu a expressão de adiponectina (regulador central da sensibilidade à insulina), sem ativar ou suprimir a atividade transcricional do PPAR γ , induzindo à obesidade.³⁷ Neste estudo, os autores observaram que um agonista parcial (MRL-24, Figura 2.7C), que mostrou pouca atividade transcricional comparado à RSG, conseguiu bloquear efetivamente a fosforilação da S245. Os autores sugerem que é possível que o baixo grau de agonismo possa aumentar ainda mais os benefícios do bloqueio da fosforilação do PPAR γ pela Cdk5 e com isso, aumentar a atividade anti-diabética de agonistas (parciais) desses receptores sem tantos efeitos adversos.

Um outro estudo dos mesmos autores³⁸ mostrou que o ligante SR1664 (Figura 2.7B) apesar de não apresentar agonismo clássico (relacionado à alteração conformacional e cinética de H/D-exchange da H12), promovia o bloqueio da fosforilação mediada pela Cdk5 e da resistência à insulina.³⁸ Apesar de o SR1664 apresentar potente atividade antidiabética, sem causar retenção de fluidos ou ganho de peso e não interferir na formação óssea, ele possui propriedades farmacocinéticas indesejáveis, que desfavorecem fortemente que este seja administrado a pacientes. Os autores propõem que uma nova classe de fármacos possa ser desenvolvida visando especificamente a fosforilação do PPAR γ mediada pela Cdk5, sem ser necessário o agonismo clássico, já que muitos efeitos adversos das TZDs ocorrem como consequência deste tipo de agonismo.

A literatura reporta alguns mecanismos para regular a ação do PPAR γ , dentre eles está a fosforilação.²⁴ A fosforilação é o mecanismo regulatório pós-traducional mais investigado para o PPAR γ . Os sítios de fosforilação são os grupamentos hidroxila das cadeias laterais de serinas,

treoninas ou tirosinas. A fosforilação da Ser84 do domínio AF-1 do PPAR γ mediada por uma MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*), por exemplo, resulta na inibição da atividade de transativação tanto ligante-dependente como ligante-independente do receptor.

Já a proteína quinase ERK5 quando se liga à hélice 1 do PPAR γ , promove a liberação do corressor SMRT e induz a ativação completa do PPAR γ . Vários mecanismos têm sido propostos para explicar como fosforilações do receptor poderiam afetar a atividade transcricional do PPAR γ , já que muitas vezes o sítio fosforilado não se encontra próximo do LBP. Uma das hipóteses é a de que exista a comunicação entre o domínio AF-1 e o LBP, por exemplo, ou que a fosforilação pode afetar a interação do LBD com corressores e coativadores.²⁴

2.3.2 Proteína quinase ciclina-dependente: Cdk5-p25

Estudos recentes sobre a fosforilação da Ser245 do PPAR γ mencionam a proteína quinase Cdk5 como sendo a mediadora desse processo.^{37,38} Nesta subseção, falaremos brevemente sobre essa proteína, sua estrutura e sítio catalítico.

Proteínas quinases ciclina-dependentes são heterodímeros formados por uma subunidade catalítica e por uma subunidade regulatória (ciclina). Em geral, as quinases necessitam de dois passos para ativação: i) ligação da ciclina à subunidade catalítica: faz com que um loop, conhecido como loop T, desobstrua o sítio de ligação da proteína ao substrato; ii) fosforilação do loop de ativação.³⁹

A Cdk5-p25 (Figura 2.3) é uma quinase ciclina-dependente em que a Cdk5 é a subunidade catalítica e a p25, é a regulatória. Essa proteína é uma quinase prolina direcionada, que fosforila uma serina ou treonina em uma posição imediatamente após a prolina. No entanto, para a Cdk5, somente a ligação da ciclina (p25) já ativa a proteína, ou seja, ela é ativada em um só passo.^{39,40}

Existem poucos estudos em relação aos resíduos que formam o *ATP-binding pocket* da Cdk5, a maioria é sobre a quinase Cdk2,⁴¹ que apresenta 70% de identidade com a Cdk5,

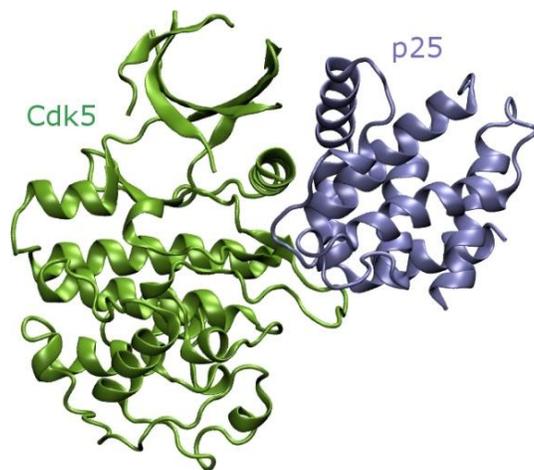


Figura 2.3. Estrutura da proteína quinase ciclina-dependente Cdk5 (verde) - p25 (azul) (PDB ID:1UNH).

indicando que elas são homólogas. Por esta razão, pouco se sabe sobre o mecanismo de fosforilação promovido pela Cdk5. Por homologia à Cdk2, sabe-se que um aspartato protonado da quinase, atua como base catalítica e uma serina/treonina do substrato, atua como nucleófilo.⁴⁰ No caso da Cdk5, trata-se do Asp126, que deverá atacar o grupamento hidroxila da serina do substrato (Figura 2.4). A serina protonada é então mais facilmente fosforilada. O mecanismo proposto para a fosforilação da serina envolveria basicamente duas etapas: uma em que o aspartato protonado retira o H da hidroxila da serina e outra em que haveria o ataque do grupamento O⁻ da serina ao grupamento fosfato do ATP, conforme mostrado na Figura 2.4C.

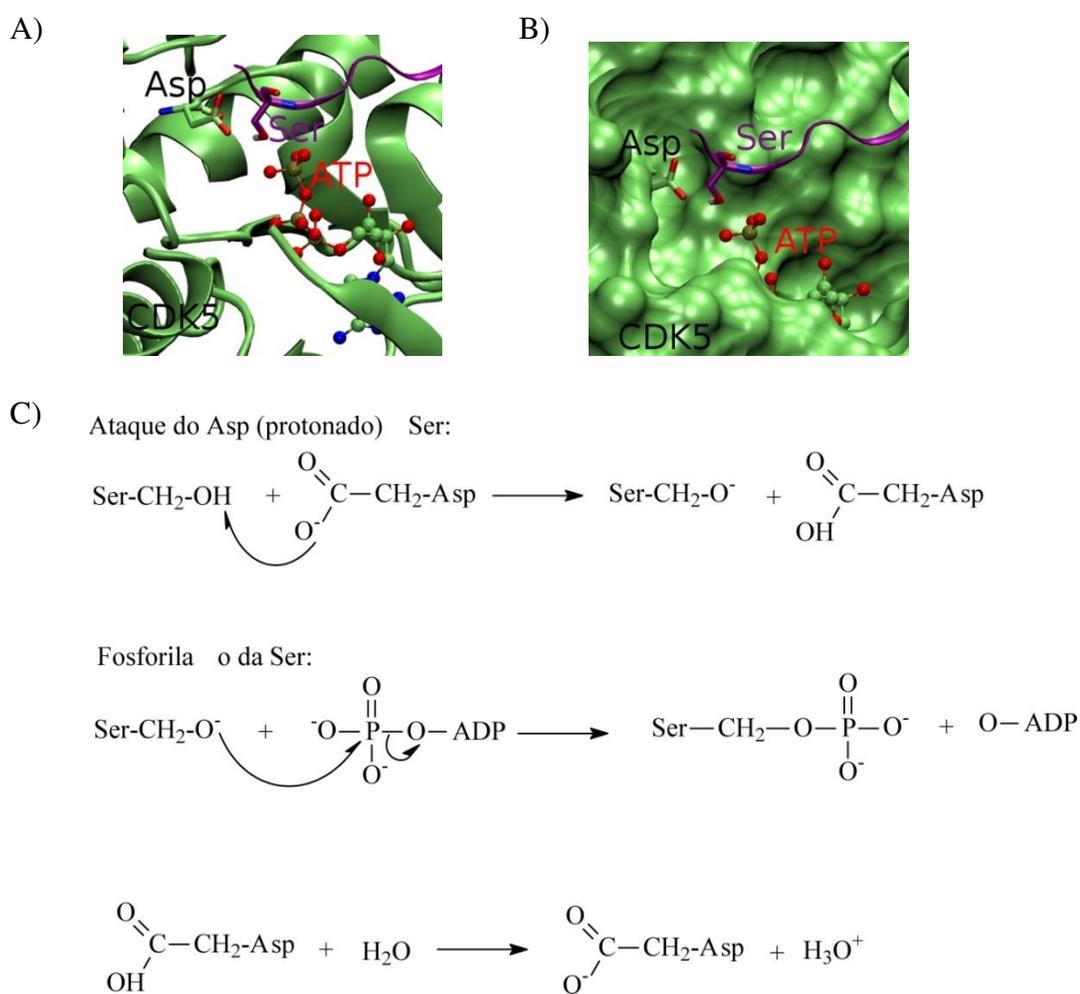


Figura 2.4. Representações do sítio catalítico da estrutura da Cdk5 (PDB ID: 1UNH) onde foram docados ATP e Ser245 do PPAR γ através da sobreposição com a estrutura da Cdk2 (PDB ID: 1HCK) e de um peptídeo inibidor (PDB ID: 1ATP): A) Cdk5(verde), evidenciando Asp126 e loop H2-fita β do PPAR γ (violeta), evidenciando Ser245 e ATP (ball-stick); B) superfície de van der Waals da Cdk5 (verde), evidenciando Asp 126, loop H2-fita β do PPAR γ (violeta) evidenciando Ser245 e ATP; C) Etapas do mecanismo de fosforilação da serina.

2.4 Ligantes de PPAR γ

Estudos relacionados a ligantes endógenos não deixam claro se há algum que apresente afinidade suficiente para ativar o PPAR γ em concentrações fisiológicas¹. Portanto, do ponto de vista fisiológico, o PPAR γ ainda pode ser considerado pertencente à classe dos receptores órfãos, uma vez que ainda não foi caracterizado um ligante natural com alta e específica afinidade pelo receptor.²⁴

A busca por um ligante natural específico para esse receptor levou à descoberta de diversos derivados de ácidos graxos e eicosanóides (Figura 2.5), capazes de se ligar ao PPAR γ em concentrações na faixa do micromolar.^{22,42} No entanto, a maioria dessas moléculas encontra-se em concentrações fisiológicas inferiores, de modo que cada vez mais tem-se pensado na possibilidade de que vários ácidos graxos liguem-se ao PPAR γ .^{22,27,43}

Essa hipótese foi recentemente corroborada por duas evidências: uma delas consiste que o PPAR γ pode acomodar mais de um ácido graxo simultaneamente na sua cavidade de ligação, e que, além disso, a presença de dois ligantes pode resultar em um efeito sinérgico na indução da transcrição.^{28,32,44} Sendo assim, a concentração total dos ácidos graxos disponíveis no ambiente fisiológico passa a ser importante (não a concentração individual de cada ligante).

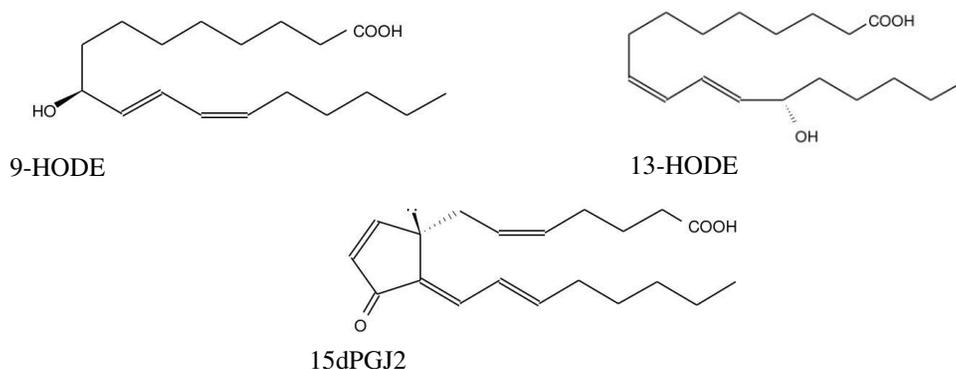


Figura 2.5. Estruturas moleculares de ligantes naturais do PPAR γ

A segunda evidência que contribui para se pensar nos ácidos graxos e eicosanóides como ligantes naturais de PPAR γ consiste na descoberta recente de que ácidos graxos oxidados e a prostaglandina J2 se ligam covalentemente ao PPAR γ através da Cys285, localizada na hélice

3.^{36,44} Sendo assim, mesmo em baixas concentrações, uma vez que esses ligantes entram na cavidade de ligação, forma-se um complexo covalente de longa duração capaz de ativar a transcrição por muito mais tempo. Sem dúvida, esses resultados ressaltam o papel central do PPAR γ no metabolismo, pois, sendo um sensor fisiológico de ácidos graxos, o PPAR γ fornece o elo pelo qual ácidos graxos provenientes da alimentação (como os ácidos eicosapentanoico e araquidônico) afetam a adipogênese, o metabolismo da glicose e processos inflamatórios.

2.4.1 Ligantes sintéticos

Paralelamente à descoberta de ligantes endógenos, também foi descoberta uma série de ligantes sintéticos capazes de ligar e ativar PPAR γ (Figura 2.6 e 2.7).^{12,22,31,38} Um aspecto muito interessante que se tornou evidente é que, mesmo ligando-se ao PPAR γ 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.

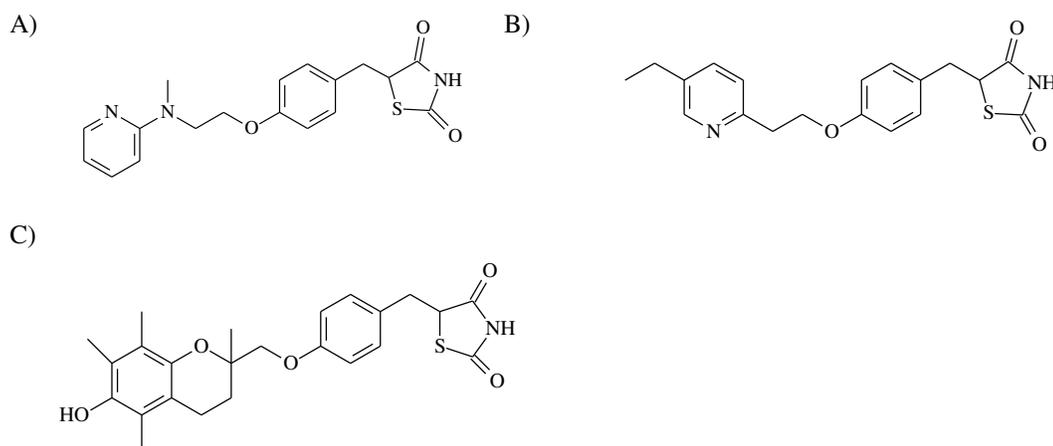


Figura 2.6. Estruturas moleculares dos agonistas totais de PPAR γ : A) rosiglitazona, B) pioglitazona, C) troglitazona²²

Uma das mais importantes classes de ligantes sintéticos de PPAR γ são as TZDs - Figura 2.6 - que incluem os fármacos: troglitazona, pioglitazona e rosiglitazona. Em 1997, a troglitazona (Figura 2.6C) foi lançada, mas teve que ser retirada do mercado nos EUA por causar

insuficiência hepática. Desde 1999, pioglitazona e rosiglitazona (Figura 2.6 A e B) estavam disponíveis na Europa com uso restrito em associação a outros medicamentos e nos EUA, seus usos podem ser feitos em monoterapia ou em associação¹². Em 2010 a rosiglitazona foi retirada do mercado europeu, norte americano e brasileiro por estar associada à alta probabilidade de ocorrência de distúrbios cardíacos.

O principal membro das TZDs é a rosiglitazona (RSG) (Figura 2.6A), que ativa fortemente o PPAR γ por interação direta com a H12. A RSG é um agonista total do PPAR γ , apresenta ação antidiabética, reduzindo a resistência sistêmica à insulina e coordenadamente ativa a adipogênese. Apesar de todos os benefícios proporcionados pelos agonistas totais, estes causam alguns efeitos adversos devido ao aumento da adipogênese e à retenção de fluidos. Os principais são: ganho de peso, edema e insuficiência cardíaca congestiva.^{1,45}

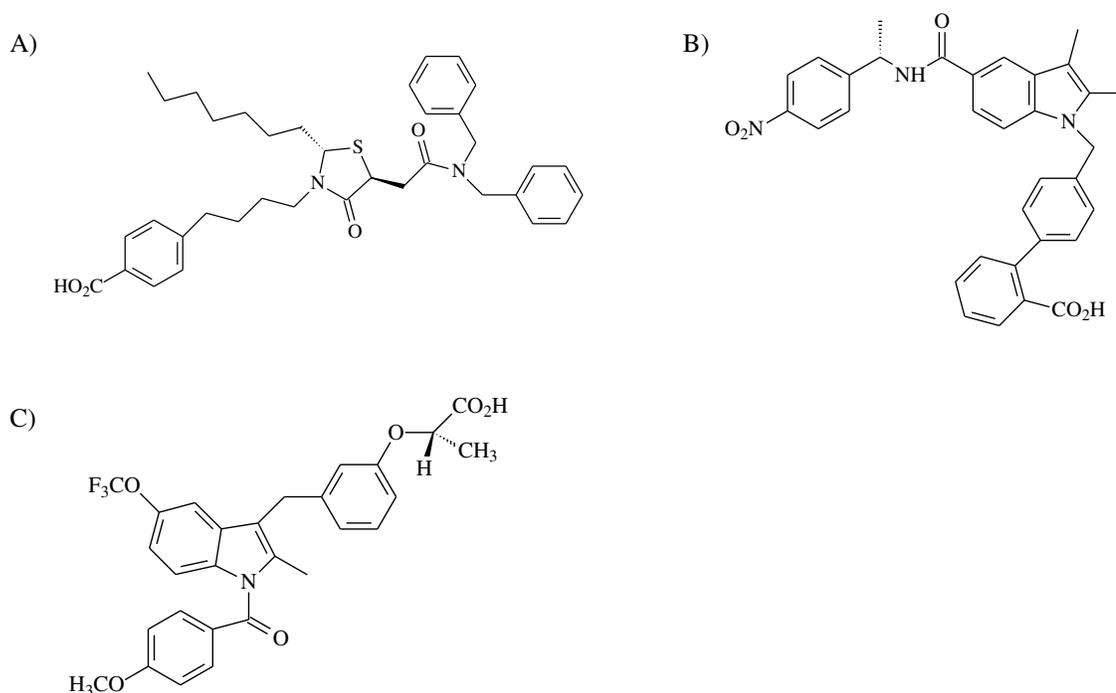


Figura 2.7. Estruturas moleculares de: A e C) agonistas parciais, GW0072 e MRL-24^{22,31} e B) não-agonista de PPAR γ , SR1664³⁸

Atualmente, uma grande atenção está voltada para os chamados agonistas parciais – ligantes que retêm os efeitos terapêuticos de sensibilização a insulina, porém sem apresentar os efeitos colaterais típicos de agonistas totais, como ganho de peso e retenção de líquido.^{33,46–49} Uma das hipóteses para justificar o desacoplamento entre efeito de sensibilização a insulina e

ganho de peso, proporcionado por esses ligantes, podem estar relacionados ao tipo de coativador recrutado.^{46,49} Estudos realizados por Burgesmeister *et al.*, por exemplo, mostraram que os agonistas parciais GW0072 (Figura 2.7A) e PA-082 são seletivos para o coativador PGC1- α , e de acordo com os autores, essa seletividade seria o fator responsável pelo efeito de sensibilização a insulina estar desacoplado do ganho de peso para esses ligantes.

Muitas estruturas cristalográficas de complexos PPAR γ com agonistas parciais estão disponíveis no banco de estruturas de biomoléculas determinadas experimentalmente, *Protein Data Bank* (PDB).⁵⁰ Uma busca neste banco de dados com a palavra chave “*partial agonist and PPAR gamma*”, resulta em 29 estruturas, que datam desde 1999, havendo mais resultados a partir do ano de 2007. Através de algumas dessas estruturas do PDB, foi possível sobrepor vários agonistas parciais, dentre eles 3H0A, MRL24, SR145, PA-082, SPPAR γ M2, INT131, LT160 e GQ16 (ligante alvo do trabalho, que será descrito posteriormente)^{12,31,46,47,49,51-53} em um mesmo LBD do PPAR γ , como mostra a Figura 2.8. Estruturas do PPAR γ ligado a agonistas parciais mostram que há duas classes desses ligantes: aqueles que ocupam posições entre a H11 e a H3, podendo interagir diretamente com a H12 e aqueles que não interagem com a H12, posicionados entre a H3 e as fitas β .³⁴ Na Figura 2.8 podemos verificar essas duas classes, uma interagindo com a H12 e outra mais próxima da região H3/fitas β .

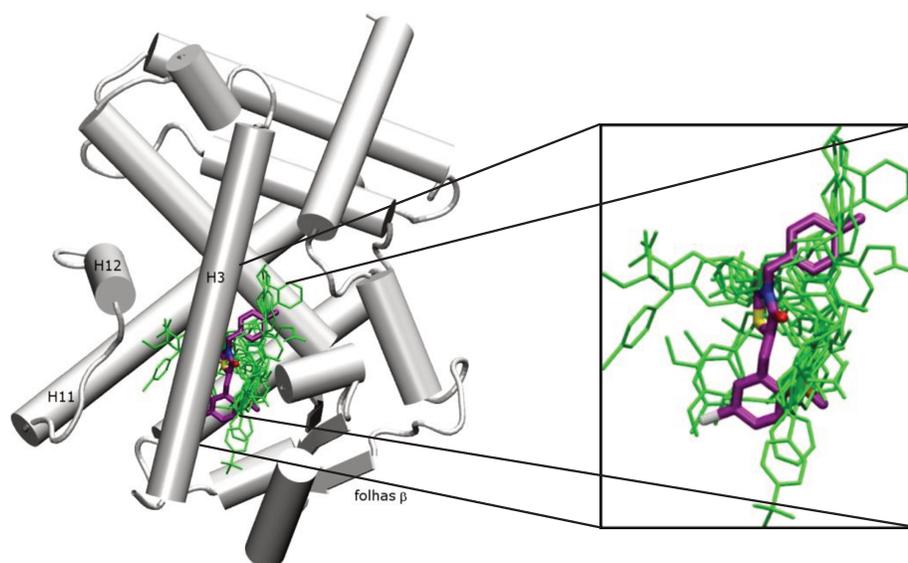


Figura 2.8. Estrutura do LBD do PPAR γ com 10 diferentes agonistas parciais superpostos. Ampliação da imagem, destacando os ligante, em verde agonistas parciais disponíveis no PDB e em roxo GQ16.

Apesar da disponibilidade de estruturas cristalográficas para os complexos com a maioria desses ligantes no *Protein Data Bank* (PDB), a análise estática dessas estruturas nem sempre fornece uma explicação para os mecanismos pelos quais diferentes ligantes geram diferentes respostas biológicas. Considerando que esses mecanismos podem estar fortemente vinculados ao comportamento dinâmico da proteína, envolvendo movimentos correlacionados entre diferentes regiões ou domínios, a simulação dinâmica molecular tem se mostrado uma metodologia promissora para melhor compreendê-los.

2.5 O agonista parcial GQ16

Neste trabalho, investigamos um ligante de PPAR γ , que diferentemente das TZDs clássicas é um agonista parcial, além de ser específico para este subtipo. O ligante é o 5-(5-bromo-2-metóxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-thiazolidina-2,4-diona, ou GQ16 (Figura 2.9A), que foi sintetizado em 2005 na Universidade Federal de Pernambuco, pelo grupo do Prof. Dr. Ivan Pitta.¹² O grupo sintetizou uma série de 8 compostos derivados da 5-benzilideno-3-(4-metil-benzil)-thiazolidina-2,4-diona (Figura 2.9B), que em estudo com ratos diabéticos apresentaram capacidade de redução da glicose.

Em 2008, foram realizados estudos farmacológicos com essa série de benzilideno-thiazolidinedionas na Universidade de Brasília, pelo grupo do Prof. Dr. Francisco Neves.^{54,55} Em uma parceria entre a UnB e o Prof. Dr. Mário Saad, da FCM-Unicamp também foram realizados estudos funcionais *in vitro* e em animais nos anos de 2010 e 2011. Os compostos foram investigados quanto à sua atividade agonista em PPAR γ , por meio de ensaios de gene repórter em pró-monócitos humanos U-937. Um desses compostos, o GQ16, apresentou atividade agonista nesses ensaios e foi então caracterizado como um ligante de PPAR γ , por meio de estudos *in vitro* e em cultura de células. Em concordância com seu efeito agonista, o ligante induziu a interação entre o PPAR γ e o coativador SRC-1. O GQ16 ativou o PPAR γ de forma concentração dependente, apresentando atividade máxima correspondente à 50% da com a RSG (Figura 2.10A), demonstrando que o ligante apresenta agonismo parcial em relação ao receptor. Também apresentou potencial adipogênico em cultura de células, embora inferior ao da rosiglitazona (Figura 2.10B).^{54,55}

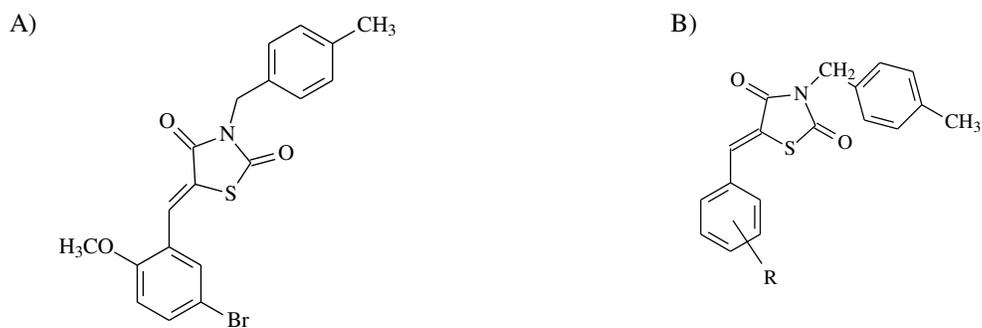


Figura 2.9. Estrutura molecular do GQ16, 5-(5-bromo-2-metóxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-thiazolidina-2,4-diona (A), originado da estrutura base 5-benzilideno-3-(4-metil-benzil)-thiazolidina-2,4-dionas (B).

O GQ16, assim como a rosiglitazona, promoveu o bloqueio da fosforilação da S245, mediada pela Cdk5, em ensaios qualitativos *in vitro*.⁵⁵ Além disso, dentre os ligantes da série sintetizada, o GQ16 foi o composto que apresentou as melhores propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas.

Em suma, o GQ16 demonstrou ótimos resultados em relação à sensibilização à insulina e apresentou menores efeitos adversos quando comparados ao agonista total RSG, de modo que este não ocasionou ganho de peso em animais.^{54,55}

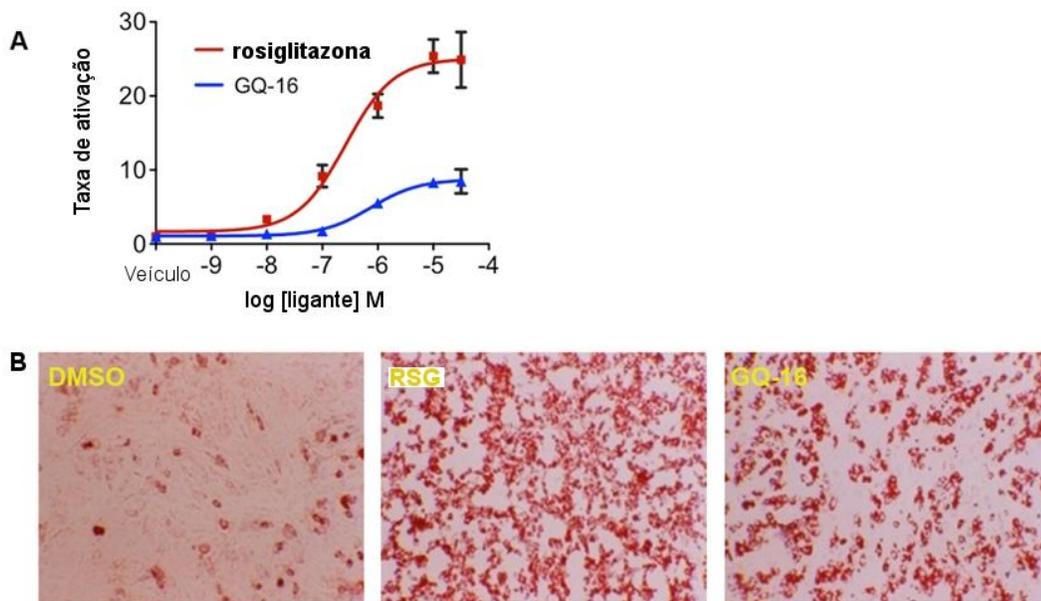


Figura 2.10. A) Gráfico da taxa de ativação dose-dependente do PPAR γ pelo logaritmo da concentração do GQ16 (azul) e da rosiglitazona (vermelho); B) Efeito do DMSO (controle), do GQ16 e da RSG sobre a adipogênese de células mesenquimais C3H10T1/2. (extraído da Ref.⁵⁵)

Capítulo 3

Simulações de dinâmica molecular

Para compreender como uma proteína trabalha é necessário o conhecimento da estrutura tridimensional (obtida por cristalografia de raio-X ou RMN) e, muitas vezes, da sua dinâmica, que é difícil de obter experimentalmente.⁵⁶ A simulação computacional por dinâmica molecular (MD, para *Molecular Dynamics*) é uma ferramenta teórica capaz de fornecer informações sobre o comportamento dinâmico de diferentes sistemas em escala molecular, sendo bastante utilizada para o estudo de biomoléculas.⁵⁷ Essa técnica descreve as interações no sistema através de potenciais efetivos clássicos entre os átomos.

Os movimentos de átomos e moléculas são definidos pelas interações entre eles. Essas interações são determinadas pela distribuição eletrônica ao redor dos átomos, podendo ser obtidas através de soluções numéricas aproximadas da equação de Schrödinger. Entretanto, somente para sistemas e condições simples é viável resolver estas equações computacionalmente. Por isso, utilizam-se os modelos clássicos, que diminuem o custo computacional e tem a vantagem de serem parametrizados para reproduzir dados experimentais.

A primeira simulação via dinâmica molecular de proteínas foi feita em 1977, em um estudo sobre uma proteína pequena no vácuo.⁵⁸ A partir de então, com o aumento do poder computacional, foi possível realizar simulações cada vez mais longas, de proteínas maiores e em solução.⁵⁶ Recentemente, as simulações de dinâmica molecular tem se mostrado complementares a técnicas utilizadas para o estudo da dinâmica de proteínas como Ressonância Magnética Nuclear, mutações sítio-dirigidas e fluorescência. A simulação por dinâmica molecular possibilita uma profunda e detalhada descrição molecular dos processos envolvidos na dinâmica de proteínas.⁵⁹

Nosso grupo tem feito importantes contribuições para o entendimento estrutural e dinâmico de proteínas, em especial, receptores nucleares. Realizamos estudos que envolveram mecanismos de dissociação dos ligantes, seletividade de ligantes naturais e sintéticos, além de mecanismos de desnaturação e de difusão térmica.^{28-30,60,61}

Neste capítulo, são apresentados alguns conceitos fundamentais de dinâmica molecular, principal técnica utilizada em nosso trabalho. Além disso, serão apresentados os detalhes dos sistemas e das simulações realizadas.

3.1 Configurações e velocidades iniciais

As configurações iniciais de um sistema são imprescindíveis para se reproduzir de forma o mais próxima possível um estado termodinâmico. Para construir uma “caixa de simulação” de sistemas complexos, como soluções proteicas, por exemplo, 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 e espectroscopia de RMN, ou estudos computacionais por homologia.

Uma forma de se ter acesso às estruturas cristalográficas de proteínas é através do *Protein Data Bank* (PDB),⁵⁰ um banco de dados de acesso livre 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 mais expostas ao solvente, apresentam baixa resolução, ou mesmo não são resolvidas pela técnica. Da mesma forma, 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 falta de *loops* ou partes da cadeia lateral da proteína em estudo pode ser corrigida através de modelagem por homologia, 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. Para completar a “caixa de simulação”, adicionam-se água e íons, de modo a obter concentração fisiológica e eletroneutralidade da solução aquosa.

Além das configurações, a técnica de MD também requer velocidades iniciais para todos os átomos do sistema. Uma das formas de se obtê-las é através de uma atribuição aleatória em relação aos átomos, utilizando-se a distribuição de Maxwell-Boltzmann. De acordo com

Maxwell-Boltzmann, a energia cinética do sistema é determinada pela temperatura conforme a equação:

$$\frac{3}{2} N K_B T = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m_i v_i^2 \quad (3.1)$$

em que N é o número de átomos, K_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura e m_i e v_i são a massa e a velocidade escalar de cada átomo i , respectivamente⁶². Além disso, é importante que a soma dos momentos de todas as partículas do sistema seja um vetor nulo, $\sum_{i=1}^N m_i \vec{v}_i = \vec{0}$, para assim, evitar o deslocamento da caixa.

3.2 Potenciais de Interação

As interações átomo-átomo em uma simulação via dinâmica molecular são determinadas por meio de um potencial empírico chamado de *campo de força*. Atualmente, existem campos de força desenvolvidos especificamente para simulações de biomoléculas ou proteínas.⁶³ Os mais utilizados são CHARMM,^{64,65} GROMOS,⁶⁶ OPLS-AA⁶⁷ e AMBER.^{68,69} 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 3.2:⁶³

$$V(R)^{total} = V(R)^{ligado} + V(R)^{não-ligado} \quad (3.2)$$

Neste trabalho, utilizamos o campo de força CHARMM, que pode apresentar até cinco termos para modelar as interações entre os átomos covalentemente ligados. Os três primeiros termos da equação 3.3 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).

$$\begin{aligned} V(R)^{ligados} = & \sum_{\text{ligações}} k_b (b - b_0)^2 + \sum_{\text{ângulos}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \\ & + \sum_{\text{diedros}} k_{\Phi n} [1 + \cos(n\Phi - \delta_n)] + \sum_{\text{diedros impróprios}} k_\omega (\omega - \omega_0)^2 \\ & + \sum_{\text{Urey-Bradley}} k_u (u - u_0)^2 \end{aligned} \quad (3.3)$$

No primeiro termo da equação 3.3, 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 3.1) e b_0 a distância de equilíbrio entre esses átomos. No segundo termo, k_θ representa a constante de força associada à deformação angular, θ é o ângulo formado entre os átomos 1, 2 e 3 (Figura 3.1) e θ_0 é o ângulo de equilíbrio entre esses átomos.

A utilização de potenciais harmônicos para descrever estiramento de ligações e deformação angular é suficiente para as condições em que as moléculas são estudadas. Em temperatura ambiente, como são conduzidas as simulações. Dessa forma, os comprimentos de ligação e ângulo entre os átomos permanecem próximos a seus valores do equilíbrio e a aproximação harmônica é válida.⁶³

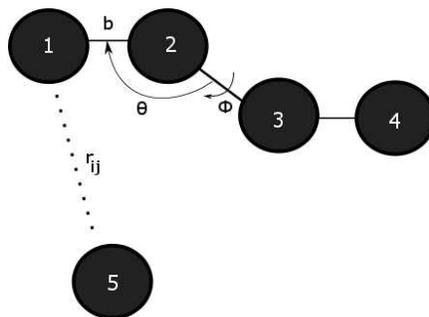


Figura 3.1. Esquema mostrando os termos utilizados para modelar interações entre átomos: estiramento de ligações químicas (b), deformação angular entre três átomos ligados sucessivamente (θ), torções diedrais associadas a quatro átomos ligados sucessivamente (Φ) e distância entre átomos não ligados covalentemente (r_{ij}). (adaptado de Becker, O.M., MacKerrel Jr., A.D., Roux, B. & Watanabe, 2001)

Já o terceiro termo, de torções diedrais 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; Φ é o valor do ângulo diédrico; δn é o valor do ângulo de fase, que determina quando o ângulo torsional passa por um ponto de mínimo. As torções representam a interação entre quatro átomos ligados sucessivamente (Figura 3.1).

O quarto termo da equação 3.3, responsável pelas torções impróprias é usado para tratar distorções fora do plano, como as que ocorrem nos hidrogênios aromáticos, por exemplo. k_ω 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, que é um termo cruzado entre dois átomos separados por duas ligações químicas

(interação 1-3), 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 que os parâmetros melhor reproduzam 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 pela soma dos potenciais de Lennard-Jones e de Coulomb, respectivamente, conforme na equação 3.4. O cálculo dessas interações é a parte de maior custo computacional da simulação MD, já que esse é o tipo de interação mais numeroso em um sistema.

$$V(R)^{\text{não-ligados}} = \sum \left(4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}} \right) \quad (3.4)$$

O primeiro termo, que 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 σ é a distância finita em que o potencial inter-partículas é zero. O segundo termo da equação 3.4 descreve as interações eletrostáticas ou Coulômbicas entre dois átomos i e j , com cargas parciais q_i e q_j , respectivamente, separados por uma distância r_{ij} .

O termo dependente de σ_{ij}^{-12} do potencial de Lennard-Jones representa a repulsão de curto alcance associada com a sobreposição das nuvens eletrônicas dos dois átomos, enquanto o termo dependente de σ_{ij}^{-6} representa a interação atrativa de dispersão eletrônica de London. Para calcular a interação entre sítios de espécies distintas, utiliza-se uma regra de combinação para os coeficientes Lennard-Jones. O campo de força CHARMM adota as regras de Lorentz-Berthelot, em que $\sigma_{ij} = \frac{\sigma_i + \sigma_j}{2}$ e $\varepsilon_{ij} = \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_j}$.⁷⁰

Assim, o potencial de Lennard-Jones é uma combinação de um termo repulsivo, com um atrativo. A parte repulsiva, por ser dependente de σ_{ij}^{-12} , é relevante quando a separação entre os átomos é muito pequena; a

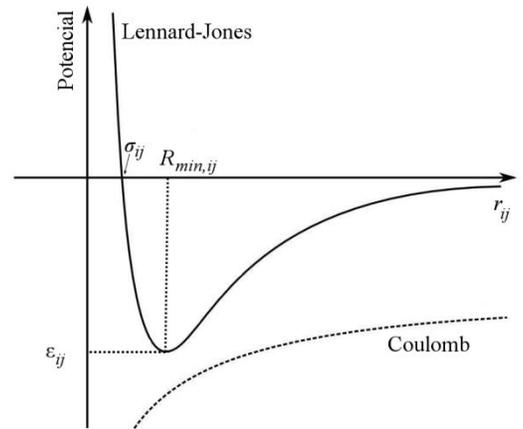


Figura 3.2. Representação gráfica dos potenciais de Lennard-Jones e de Coulomb. $R_{min,ij}$ é a distância em que o potencial atinge seu mínimo.

parte atrativa, dependente de σ_{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 (Figura 3.2). Na Figura 3.2, observa-se que o potencial de Lennard-Jones decai muito mais rapidamente que o de Coulomb. Por isso, as interações de Lennard-Jones são consideradas de curto alcance e as eletrostáticas, de longo alcance.

3.3 Equações de movimento

Uma simulação de dinâmica molecular consiste na solução numérica das equações de movimento de cada átomo que compõe o sistema. Dessa forma, pode-se estudar a evolução temporal das configurações dos constituintes do sistema e, a partir das sequências de posições geradas, determinar as propriedades macroscópicas deste, conforme os princípios da Mecânica Estatística.

A partir das posições dos átomos do sistema, as forças (\vec{F}) que atuam sobre eles podem ser calculadas através da derivada do potencial (V^{total}) através da equação: $\vec{F}(t) = -\nabla V^{\text{total}}(t)$. De acordo com a Segunda Lei de Newton, podemos calcular então a aceleração (\vec{a}) de cada um dos átomos a partir dessas forças: $-\nabla V^{\text{total}}(t) = m\vec{a}(t)$, sendo m a massa do átomo.

Com o conjunto de velocidades iniciais para as partículas definido, basta determinar as velocidades e coordenadas no instante $t + dt$, pelas equações 3.5 e 3.6, respectivamente:

$$\vec{v}(t+\delta t) = \vec{v}(t) + \frac{\vec{F}(t)}{m} \delta t + \dots \quad (3.5)$$

e

$$\vec{r}(t + \delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t)\delta t + \frac{1}{2} \frac{\vec{F}(t)}{m} \delta t^2 + \dots \quad (3.6)$$

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.⁷⁰ As equações 3.5 e 3.6 são as determinadas pelo algoritmo Velocity-Verlet, implementado no programa NAMD,⁷¹ que foi utilizado nas nossas simulações. Esse método também calcula a velocidade em um intervalo de tempo intermediário ($\delta t/2$).

Existem também outros algoritmos que fazem a integração das equações de movimento e geram trajetórias. Os mais complexos e precisos não utilizam simplesmente a integração das equações, mas fazem uma reorganização destas e, às vezes, um truncamento das séries de Taylor de posição e velocidade. Os algoritmos mais conhecidos são o de Verlet e o de Velocity-Verlet.

3.4 Etapas envolvidas na simulação

Minimização de Energia

Geralmente, antes de se iniciar uma simulação de dinâmica molecular de proteínas, é necessário realizar uma minimização de energia do sistema. Esse procedimento, permite aliviar “maus contatos” na proteína, 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 ou ainda com moléculas do solvente. 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.⁶²

Simulações

Nos primeiros instantes da simulação, algumas propriedades como temperatura, pressão e energia interna variam até atingir um patamar, em torno de um valor médio. A chamada “etapa de equilíbrio do sistema” corresponde à parte da simulação em que essas propriedades ainda estão variando. Fazendo um monitoramento da temperatura, pressão e energia interna, pode-se saber quando o patamar foi atingido e a partir daí inicia-se a etapa de produção propriamente dita. As análises serão feitas em relação às etapas de produção da simulação. A etapa de produção da simulação deve ser tão extensa quanto às escalas de tempo dos processos que se quer analisar.

3.5 Dinâmica de amostragem ampliada

A simulação de dinâmica molecular convencional não permite o estudo de alguns processos lentos, como, por exemplo, amostrar uma ampla região do espaço conformacional de uma proteína. Dessa forma, diversas técnicas especiais de dinâmica molecular foram desenvolvidas para acelerar processos de interesse na escala de tempo acessível pelas simulações.

Neste trabalho, utilizamos a Dinâmica Molecular de Amostragem Ampliada (DMAA), conhecida também como LESMD (*Localy Enhanced Sampling Molecular Dynamics*) ou ESMD (*Enhanced Sampling Molecular Dynamics*). Esta técnica está completamente implementada em nossos programas, tendo sido utilizada com sucesso nos trabalhos do grupo.^{30,61} Ela consiste em substituir uma região do sistema, por exemplo uma parte da proteína, por um conjunto de n réplicas idênticas que partem de posições semelhantes, de modo que a trajetória das réplicas represente o conjunto de trajetórias que seriam obtidas em diferentes simulações.

Inicialmente, as réplicas são colocadas em posições idênticas na caixa de simulação, mas com um conjunto de velocidades iniciais aleatórias, dessa forma, cada uma das réplicas terá uma trajetória diferente. Como as réplicas devem ser totalmente independentes entre si durante a simulação, os potenciais de interação entre as réplicas são nulos. Além disso, para que o ambiente em que as réplicas se encontram não seja muito distorcido pela presença destas, os potenciais entre elas e os componentes do ambiente devem ser ponderados pelo número de cópias, isto é,

$$\sigma_{ij} = \frac{\sigma_i + \sigma_j}{2},$$

porém com

$$\varepsilon_{ij} = \frac{\sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_j}}{n} \quad \text{e} \quad q'_i = \frac{q_i}{n}$$

se i não for do mesmo tipo de j e i for do tipo da molécula copiada n vezes. Além disso, as réplicas não interagem entre si, ou seja, $\varepsilon_{ii} = 0$ e $q'_i = 0$. Entre as outras moléculas da simulação as interações são representadas por potenciais completos.

Nas nossas simulações, replicamos um loop da proteína. A proteína, nos instantes iniciais da simulação, percebe o campo de potencial gerado pelo conjunto de réplicas do loop, como

sendo aproximadamente o campo criado pelo loop original, já que as réplicas estão próximas umas das outras. Isto permite que a estrutura da proteína não sofra, ao menos nos estágios iniciais da simulação, distorções significativas. As cópias do loop, por sua vez, “enxergam” a proteína com um potencial n vezes menor do que o original. Assim o acesso a algumas regiões do espaço conformacional é facilitado.

Entretanto, a técnica tem suas limitações. A utilização de um número muito grande de réplicas, por exemplo, pode distorcer a superfície de energia e o espaço de fase percorrido pode não ser representativo, neste caso. Como estamos replicando parte da proteína, também devemos atentar que o restante da proteína também é dependente da dinâmica desse loop. Por isso, somente aspectos gerais da dinâmica desse loop podem ser descritos.

3.6 Detalhes específicos das simulações

Detalhes das configurações iniciais dos complexos

O complexo PPAR γ -GQ16 foi simulado a partir da estrutura cristalográfica determinada pelo grupo do Prof. Robert J. Fletterick, do Departamento de Bioquímica e Biofísica da Universidade da Califórnia (PDB ID: 3T03). A estrutura determinada por Fletterick *et al.* era do homodímero do LBD do PPAR γ , sendo que uma das subunidades estava com a estrutura primária mais completa. Então, selecionamos esta estrutura mais completa do LBD, além do peptídeo coativador e GQ16 (Figura 3.3A). Consideramos todas as moléculas de água estrutural contidas na estrutura cristalográfica do complexo.

No caso do complexo PPAR γ -rosiglitazona, utilizamos a estrutura cristalográfica obtida do PDB, sob o código 1FM6.⁷² Essa é a estrutura de melhor resolução (2,1 Å) dentre os complexos PPAR γ -RSG disponíveis no PDB. Dessa estrutura, que é um heterodímero do complexo RXR α -PPAR γ , selecionamos somente as cadeias correspondentes ao LBD e coativador do PPAR γ e à RSG (Figura 3.3B). Conforme feito com o outro complexo, todas as moléculas de água estrutural contidas na estrutura cristalográfica foram consideradas.

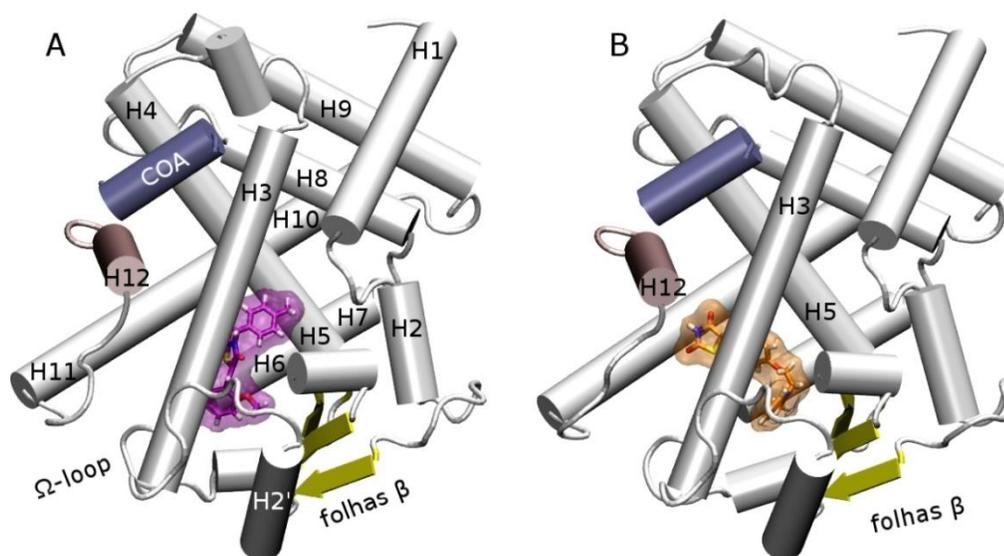


Figura 3.3. Estruturas cristalográficas do (A) complexo PPAR γ com GQ16, (B) complexo PPAR γ com RSG. As estruturas do LBD do PPAR γ em ambos os complexos foram dispostas na mesma orientação.

Algumas partes da estrutura do PPAR γ com o GQ16 não puderam ser resolvidas por cristalografia. Para adicionar os resíduos faltantes, fizemos um alinhamento da estrutura GQ16-PPAR γ com a estrutura RSG-PPAR γ , utilizando o programa de alinhamento estrutural *lovoalign*.⁷³ Então, adicionamos as coordenadas dos resíduos 206-209, 258-276 e 464 (do LBD) e 696 (do coativador) da estrutura PPAR γ -RSG à PPAR γ -GQ16.

Após esta etapa inicial, utilizamos o programa *psfgen*,⁷⁴ para adicionar os hidrogênios às estruturas. Para as histidinas, como estas podem assumir diferentes estados de protonação em pH fisiológico, foram feitos cálculos de pK_a através do servidor H++,⁷⁵ para assim decidir seus estados de protonação em pH = 7. Além de utilizar o H++ para definir o tipo de protonação das histidinas, verificamos qual o tipo de protonação permitiria a formação do maior número de ligações de hidrogênio entre este resíduo e os demais. Assim, todas as histidinas de ambos os PPARs foram protonadas no nitrogênio ϵ . Os outros resíduos ácidos e básicos foram considerados na forma carregada.

Primeiramente os complexos foram solvatados, utilizando-se o modelo de água TIP3P, em caixas retangulares, de forma que uma camada de água de espessura mínima de 15 Å fosse feita ao redor da proteína. Foram adicionados íons Na⁺ e Cl⁻ aos sistemas até atingir concentração fisiológica de 0,154 mol/L. Os sistemas finais continham em torno de 58000 átomos. No total,

simulamos quatro sistemas, sendo eles complexos PPAR γ -ligante na presença e ausência do coativador.

Detalhes dos ligantes

As estruturas cristalográficas dos complexos LBD-ligantes (anteriormente mostrada na Figura 3.3) mostram que as posições do GQ16 e da RSG são distintas no interior do LBD. Na Figura 3.4A e 3.4B estão representadas as estruturas moleculares do GQ16 e da rosiglitazona, respectivamente, sendo as moléculas divididas em três grupos para facilitar a análise posterior.

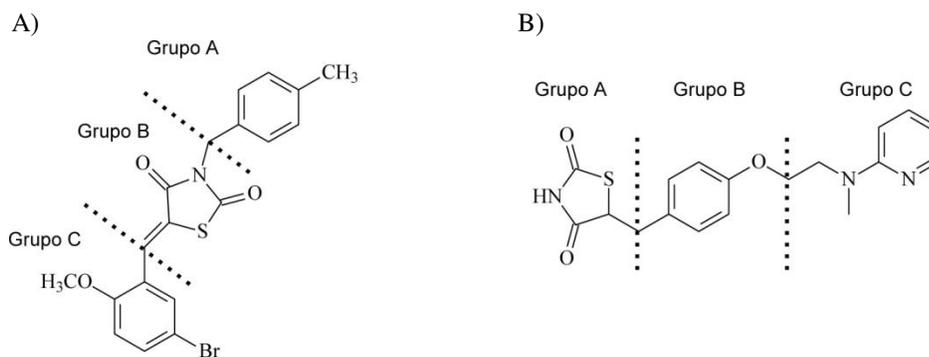


Figura 3.4. Estrutura molecular A) do GQ16 e B) da rosiglitazona.

Conforme podemos ver na Figura 3.3A, o GQ16 localiza-se atrás da H3 (principalmente o grupo B da molécula), com o grupo A voltado para a hélice H5, ficando o grupo C próximo às fitas β , H2 e H2'. Já a RSG assume uma conformação na forma de “U”, “abraçando” a hélice 3, tendo o grupo A próximo à H12, grupo B atrás da H3 e na frente da H5 e o grupo C entre a H3 e as fitas β (Figura 3.3B).

Condições de simulação

Todas as simulações foram realizadas utilizando condições periódicas de contorno no ensemble NPT, à temperatura de 300 K e 1 atm de pressão. O termostato de Langevin⁷¹ e o pistão de Langevin/Nosé-Hoover,⁷⁶ respectivamente, foram utilizados para controle de temperatura e

pressão. As interações de curto alcance (potencial de Lennard-Jones) foram truncadas no raio de 12 Å e as de longo alcance (potencial de Coulomb) foram calculadas através do método PME (*particle mesh Ewald*).⁷⁷ Todas as ligações envolvendo hidrogênios foram mantidas em seus valores de equilíbrio através do algoritmo SHAKE⁷⁸ e um passo de tempo de 2.0 fs foi utilizado para a integração das equações de movimento.

Etapas de simulação dos complexos

Os sistemas, inicialmente, tiveram suas energias minimizadas, para eliminar maus contatos das estruturas cristalográficas, devido à existência de forças repulsivas. Para isso, utilizou-se o método dos Gradientes Conjugados.^{62,78} Foram feitos 500 passos de minimização de energia, seguidos de 20 ps de MD mantendo proteína e ligante fixos, exceto resíduos modelados. Após, foram realizados mais 500 passos de minimização de energia, seguidos de 20 ps de MD mantendo carbonos α fixos, exceto resíduos modelados. A primeira etapa permitiu a relaxação do solvente e das partes modeladas, enquanto a segunda etapa permitiu a relaxação das cadeias laterais da proteína e dos ligantes. Por último, foram feitos 1050 ps de equilibração com todo o sistema livre nas condições de temperatura e pressão especificadas.

Após essas etapas de preparação dos sistemas, foram feitas 5 simulações de 5ns para cada complexo ligante-LBD. As réplicas das simulações de cada sistema partiram da mesma estrutura inicial (cristalográfica), porém tiveram distribuições de velocidades iniciais independentes. A literatura mostra que fazer múltiplas simulações curtas, ao invés de uma única longa, permite amostrar mais o espaço conformacional da proteína se comparado a uma única simulação estendida de tempo igual a soma dos tempos das simulações curtas.⁷⁹

Simulações de DMAA

Da mesma forma que as simulações convencionais, as simulações de DMAA (Dinâmica Molecular com Amostragem Ampliada) foram realizadas utilizando o programa NAMD.⁷¹ Substituímos a região do loop entre H2 e a primeira fita β (resíduos 239 a 244), onde se localiza o sítio de fosforilação da Cdk5, por um conjunto de 3 réplicas idênticas do loop.

Para realizar as simulações de DMAA, utilizamos uma estrutura do PPAR γ que já havia sido relaxada após uma dinâmica molecular de 5 ns com o GQ16. Simulamos o complexo PPAR γ -GQ16 e PPAR γ -RSG, de forma que para o último complexo, partimos da mesma estrutura inicial que o primeiro (PPAR γ -GQ16 relaxada), mas trocando o GQ16 pela RSG. Foram feitas cinco simulações de 2,5 ns cada uma, para ambos os complexos.

Capítulo 4

Parametrização dos Ligantes

Neste capítulo será descrita a parametrização dos ligantes rosiglitazona e GQ16, já que os mesmos não possuíam parâmetros de campo de força para descrevê-los. Para realizar a simulação MD dos complexos PPAR-ligantes, o campo de força deve ser ajustado de modo a reproduzir algumas propriedades estruturais e termodinâmicas do sistema como um todo, incluindo o ligante.

A parametrização da rosiglitazona já havia sido feita e publicada recentemente pelo grupo,^{80,81} por isso, seguimos o mesmo protocolo para o GQ16. Alguns conjuntos de parâmetros do campo de força são transferíveis,⁶² isto é, os mesmos parâmetros de uma molécula podem ser utilizados para modelar moléculas relacionadas. Esse é o caso de parâmetros relacionados a graus de liberdade como estiramento de ligação e deformação angular, pois influenciam pouco o desempenho do campo de força. Os parâmetros de 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, ácidos nucleicos e éteres do CHARMM para a molécula do GQ16, por analogia a grupos similares. Já as cargas atômicas e alguns diedros do GQ16 foram determinadas, respectivamente, por ajuste do potencial eletrostático e varredura da superfície de energia dos diedros.

A partir da estrutura cristalográfica do complexo GQ16-PPAR γ , iniciamos o trabalho de parametrização do GQ16. Primeiramente os hidrogênios foram adicionados à molécula utilizando o programa Avogadro.⁸² Após, foi feita a otimização da geometria molecular do ligante, a nível da teoria de densidade funcional com o híbrido funcional B3LYP e com a base 6-311+G (d,p) e assim os valores das distâncias de equilíbrio e ângulos de ligação foram obtidos. Os cálculos quânticos foram efetuados utilizando o programa Gaussian 03.⁸³ A Figura 4.1 mostra a estrutura otimizada em vácuo pelos cálculos quânticos sobreposta à estrutura cristalográfica. Como se pode notar as estruturas se parecem em alguns aspectos, mas a cristalográfica, por estar sob influência de um potencial de interação com a proteína, acaba sofrendo algumas deformações conformacionais.

No campo de força CHARMM, assim como a maioria dos campos de força, é preciso definir o tipo atômico de cada átomo do sistema, pois os parâmetros são expressos em termos destes tipos atômicos. Através do tipo atômico, tem-se informações a respeito do número atômico, grau de hibridização e ambiente molecular. Na Tabela 1 estão listados os tipos atômicos da molécula do GQ16 (identificados na Figura 4.2).

Definidos os tipos atômicos, foi possível obter as constantes de força K_b , K_θ , K_ϕ , (equação 3.3 do campo de força), por analogia a grupos similares dos arquivos de parâmetros para proteínas, ácidos nucleicos, éteres do campo de força CHARMM. As interações não-ligadas de vdW foram descritas pelo potencial Lenard-Jones 12-6, com parâmetros para cada tipo atômico transferidos do CHARMM, exceto para o átomo de bromo que foi obtida da literatura.⁸⁴

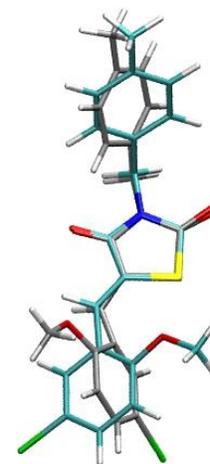


Figura 4.1. Sobreposição das estruturas cristalográfica (cinza) e otimizada (ciano) do GQ16.

4.1 Cargas Parciais Atômicas

O método de Singh, Kollman⁸⁵ e Besler et al.,⁸⁶ conhecido como esquema Merz-Singh-Kollman (MK) deriva cargas parciais que reproduzem o potencial eletrostático quântico no estado fundamental para moléculas. As cargas atômicas parciais da molécula do GQ16 (listadas na Tabela 4.1 com indicação dos átomos na Figura 4.2) foram obtidas considerando o potencial eletrostático (método Merz-Kollman), carga líquida total e o dipolo da molécula usando RHF/6-311+G(d,p), consistente com o procedimento de parametrização de potenciais efetivos do campo de força CHARMM.

4.2 Parâmetros de Torção

Uma boa descrição das torções de uma molécula é fundamental para as propriedades conformacionais de moléculas flexíveis. Na molécula do GQ16, o potencial torsional de três diedros não é conhecido. Observando a Figura 4.3, vemos ainda que na região destacada com a linha pontilhada azul, pode haver conjugação das ligações duplas. Para isso, a configuração desta parte da molécula deveria ser planar, mas não é o que acontece na estrutura cristalográfica.

Tabela 4.1. Definição dos tipos atômicos e cargas parciais para os átomos numerados conforme a Figura 4.2.

Átomo	Tipo atômico	Definição	Carga parcial (u.a.)
C1	CT3	C alifático sp ³ para CH ₃	-0,1665
O1	OH1	O de éter	-0,2346
C2	CA	C de anel aromático	0,4994
C3	CA	C de anel aromático	-0,4266
C4	CA	C de anel aromático	0,0993
C5	CA	C de anel aromático	-0,2842
BR	BR	Br ligado a anel aromático	-0,0428
C6	CA1	C de anel aromático em ressonância com C=C	0,0868
C7	CA	C de anel aromático	-0,1499
C8	CTG1	C ligado a C por dupla ligação	-0,0312
C9	CTG2	C em anel heterocíclico	-0,2527
C10	C	C de carbonila (<i>backbone</i> peptídeo)	0,5729
O2	O	O de carbonila	-0,5048
S1	S	S de anel heterocíclico	-0,0591
C11	C	C de carbonila (<i>backbone</i> peptídeo)	0,4095
O3	O	O de carbonila	-0,4339
N1	NG	N em anel heterocíclico	-0,0415
C12	CT2	C alifático sp ³ para CH ₂	-0,3176
C13	CA	C de anel aromático	0,1951
C14	CA	C de anel aromático	-0,186
C15	CA	C de anel aromático	-0,2962
C16	CA	C de anel aromático	0,3227
C17	CT3	C alifático sp ³ para CH ₃	-0,4209
C18	CA	C de anel aromático	-0,2886
C19	CA	C de anel aromático	-0,1726
H1	HA	H apolar	0,1304
H2	HA	H apolar	0,1086
H3	HA	H apolar	0,0935
H4	HP	H aromático	0,1800
H5	HP	H aromático	0,1184
H6	HP	H aromático	0,1115
H7	HAG	H ligado a C=C	0,1230
H8	HA	H apolar	0,1464
H9	HA	H apolar	0,1409
H10	HP	H aromático	0,1606
H11	HP	H aromático	0,1636
H12	HA	H apolar	0,1110
H13	HA	H apolar	0,1227
H14	HA	H apolar	0,1105
H15	HP	H aromático	0,1543
H16	HP	H aromático	0,1488

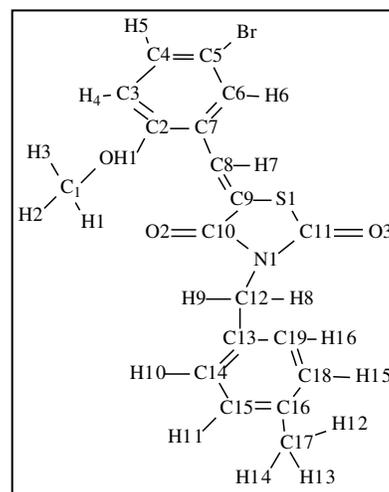


Figura 4.2. Estrutura molecular do GQ16 com numeração dos átomos

Por isso, foi feita a varredura dos diedros acoplados a fim de ajustar o potencial torsional na expressão das interações clássicas ligadas (equação 3.3).

Os parâmetros do GQ16 para as rotações torsionais indicadas na Figura 4.3 foram determinados a partir das energias obtidas de varreduras de energia com a rotação diedral, no nível de teoria B3LYP/6-311+G(d,p). A fim de diminuir o custo computacional da varredura, a molécula foi dividida em duas partes e redesenhada eliminando as porções

que pouco influenciam nas interações eletrônicas entre os átomos que representam esta torção (Figura 4.4 A, B e C).

Então, para hipotéticos 4 átomos, a varredura de energia foi feita em função da rotação de 360 graus ao redor dos átomos centrais. Cada varredura consiste em uma série de relaxações estruturais, em que somente o ângulo em estudo é mantido fixo. A varredura também foi feita classicamente (utilizando-se o NAMD 2.7), usando todos os termos do campo de força, exceto o termo do potencial de torção do ângulo em questão, o qual deseja-se determinar. O resultado da subtração das duas curvas, uma obtida quanticamente e a outra classicamente, pode ser ajustada à forma clássica do potencial de torção diedral (3º termo da equação 3.7). Os valores dos parâmetros diedrais $K_{\phi n}$, δ e n resultam deste ajuste não-linear.

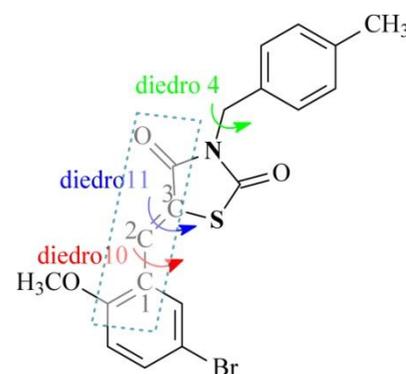


Figura 4.3. Estrutura molecular do GQ16, indicando os diedros parametrizados

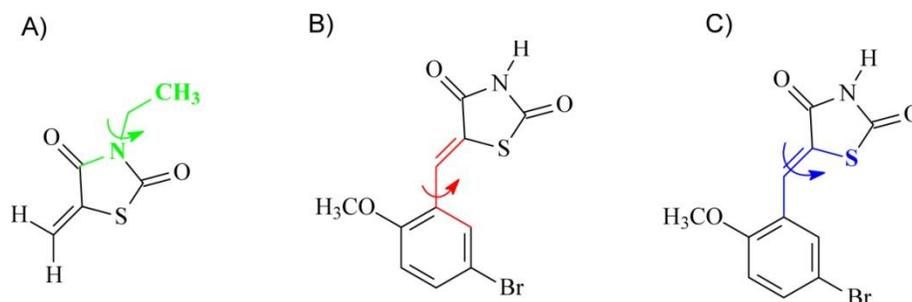


Figura 4.4. Estruturas moleculares redesenhadas do GQ16, utilizadas para realizar a varredura de energia, enfatizando o A) diedro 4, B) diedro 10 e C) diedro 11.

A partir deste procedimento, foram geradas as curvas de potencial para os diedros 4, 10 e 11 apresentadas nas Figura 4.5, 4.6 e 4.7, respectivamente. A aparência das curvas resultantes reflete fatores como a hibridização dos átomos envolvidos e/ou ressonância eletrônica.

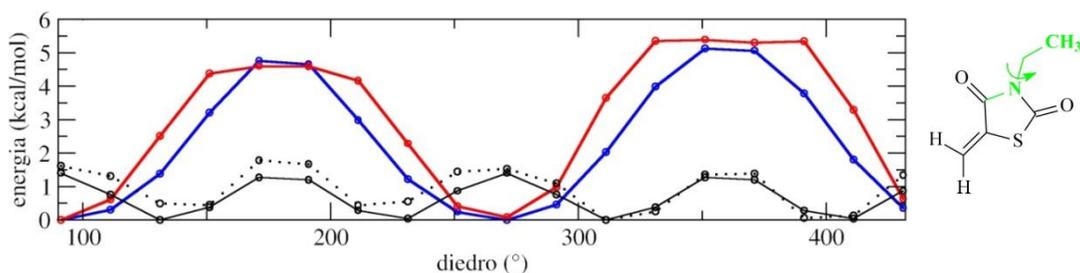


Figura 4.5. Curvas de potencial geradas para o diedro 4. Os pontos circulosados nas curva em azul são os valores de energia potencial obtidos quanticamente (QM) na varredura destes diedros, ao passo que os pontos da curva em vermelho foram obtidos na varredura destes diedros usando o potencial clássico (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. Ao lado estrutura molecular utilizada para realizar a varredura de energia da rotação do diedro 4.

Assim, na curva resultante do diedro 4 (Figura 4.5 – curva preta), por exemplo, observa-se que existem quatro pontos de mínimo. A barreira de energia para rotação do diedro 4 (Figura 4.5 – curva azul) é a mais baixa dos três diedros considerados, já que trata-se de uma torção envolvendo uma ligação simples.

Nas curvas correspondentes aos diedros 10 (Figura 4.6) e 11 (Figura 4.7) observa-se dois mínimos, em 180° e 0° , o que é condizente com o fato de se tratar de grupos que tendem a permanecer no plano do anel. A varredura dos diedros mostrou que a energia de torção do diedro 11 é maior que a do diedro 10, ou seja, a ligação dupla está localizada entre C2 e C3. Isso pode ser corroborado com a maior barreira de energia para rotação (Figuras 4.6 e 4.7– curvas azuis) do diedro 11 (~ 30 kcal/mol), em relação ao diedro 10 (~ 5 kcal/mol), já que envolve a rotação em torno de uma dupla ligação.

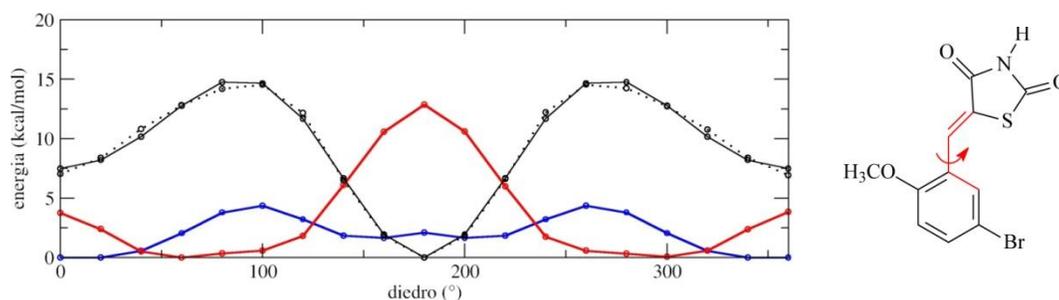


Figura 4.6. Curvas de potencial geradas para o diedro 10. A curva em azul representa valores de energia potencial obtidos quanticamente (QM) na varredura destes diedros, ao passo que a curva em vermelho representa diedros usando o potencial clássico (MM). A diferença entre as energias quântica (QM) e 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. Ao lado estrutura molecular utilizada para realizar a varredura de energia da rotação do diedro 10.

A barreira de energia envolvida para rotação do diedro 10, no entanto, é um pouco maior do que a do diedro envolvendo uma ligação simples, por estar acoplado ao diedro 11 que tem uma dupla ligação.

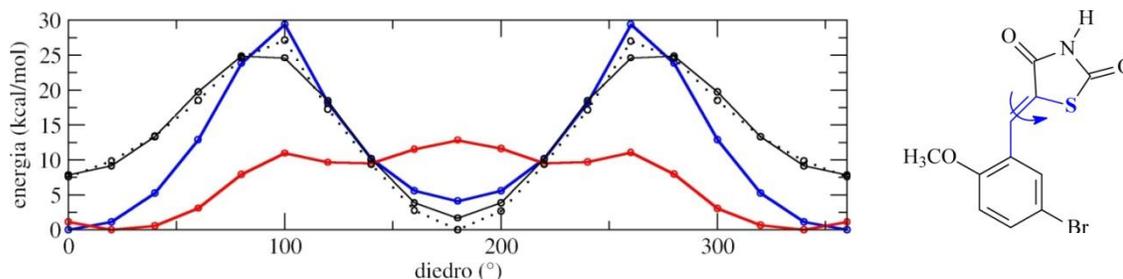


Figura 4.7. Curvas de potencial geradas para o diedro 11. A curva em azul representa valores de energia potencial obtidos quanticamente (QM) na varredura destes diedros, ao passo que a curva em vermelho representa diedros usando o potencial clássico (MM). A diferença entre as energias quântica (QM) e 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. Ao lado estrutura molecular utilizada para realizar a varredura de energia da rotação do diedro 11.

Visando avaliar a qualidade da parametrização feita para o GQ16, foram feitas simulações curtas do ligante no vácuo e em água, de modo a observar principalmente o comportamento dos diedros parametrizados. Avaliou-se também o comportamento do ligante nas simulações com a proteína.

Na simulação do GQ16 no vácuo, a estrutura na ausência de qualquer outra molécula, tende a permanecer no mínimo conformacional atingido pelo cálculo quântico. Conforme mostra a Figura 4.8A as conformações variam em torno da estrutura otimizada. O mesmo ocorre com a estrutura na simulação em água. Há uma tendência a estrutura variar durante a simulação em torno da estrutura otimizada (Figura 4.8B).

As simulações do ligante no interior do PPAR γ , mostram que a estrutura sofre influência da proteína (Figura 4.8C). Devido às interações com alguns aminoácidos, a estrutura deixa de variar em torno da estrutura otimizada (como ocorreu nas simulações no vácuo e na água). Fazendo uma análise de RMSD (*root mean square deviation*) em relação às estruturas otimizada e cristalográfica, observamos que na simulação na proteína o ligante tende a reproduzir as características conformacionais da estrutura cristalográfica. O RMSD do ligante durante o tempo

de simulação tendo como referência a estrutura cristalográfica foi de 1,96 Å, enquanto. Já quando a referência foi a estrutura otimizada, o RMSD foi de 2,45 Å.

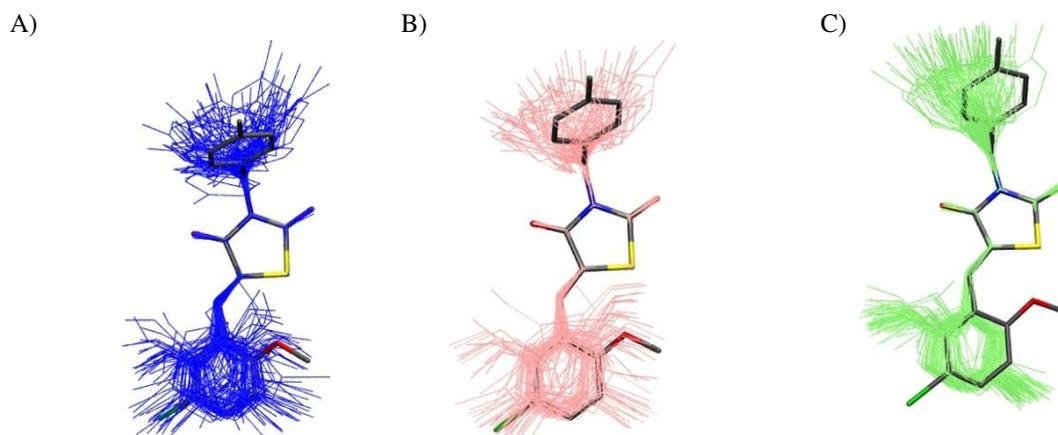


Figura 4.8: Sobreposição da estrutura otimizada do GQ16 (licorice cinza) em relação aos: A) *frames* da simulação do GQ16 no vácuo (linhas azuis), B) *frames* da simulação do GQ16 em água (linhas rosas) e C) *frames* da simulação do GQ16 na proteína (linhas verdes). Todas as estruturas foram alinhadas em relação ao anel de 5 membros.

E isso era justamente o que se esperava, que os parâmetros desenvolvidos para o ligante pudessem reproduzir o comportamento do ligante na estrutura da proteína. Mais detalhes das interações ligante-proteína serão discutidas no próximo capítulo. Uma das interações que alteram a tendência conformacional do ligante são as interações de van der Waals com R288 próximas ao anel A do GQ16 e com M364, próximo ao anel C do GQ16. Ainda há uma interação eletrostática do anel B do ligante com o resíduo K367.

Capítulo 5

Estudos dos complexos PPAR γ -RSG e PPAR γ -GQ16

A investigação a respeito de ligantes do PPAR γ teve seu início com os agonistas totais do receptor, em especial a classe das tiazolidinedionas ou glitazonas. A rosiglitazona é um dos exemplares mais estudados dessa classe, sendo o mecanismo de ativação que ela promove no receptor bastante conhecido. Por isso, o complexo PPAR γ -RSG serviu-nos como parâmetro para o estudo das interações entre o PPAR γ e o agonista parcial GQ16. Isso nos permitiu estudar mais profundamente o complexo PPAR γ -RSG e nos auxiliou na compreensão de alguns aspectos do complexo entre este receptor e o GQ16.

O entendimento de como agonistas parciais do PPAR γ podem promover a ativação do receptor sem ocasionar tantos efeitos adversos é uma questão que vem sendo bastante estudada e tem grande importância no que tange ao desenvolvimento e planejamento de novos fármacos para o tratamento da diabetes tipo 2. Neste sentido, a simulação computacional revela-se uma técnica bastante poderosa, pois permite o estudo dinâmico da interação entre receptor e ligantes. Além disso, é uma técnica complementar à cristalografia de raio-X, fornecendo informações dinâmicas do sistema, difíceis de esclarecer experimentalmente.

Neste capítulo, serão apresentados e discutidos os resultados do estudo dos complexos PPAR γ -GQ16 e PPAR γ -RSG, no que diz respeito ao modo de ligação, mecanismos de ativação e influência da proteína coativadora sobre o LBD.

5.1 Análise dos modos de ligação

A partir das estruturas cristalográficas (Figura 3.1 apresentada no Capítulo 3) é possível observar as distintas posições ocupadas pelos ligantes na cavidade de ligação e também distinguir com quais resíduos da proteína os ligantes interagem. No entanto, devido às flutuações das cadeias laterais dos resíduos do LBD durante a simulação, é possível que haja formação e quebra de ligações entre esses resíduos e os ligantes. Analisando-se os resíduos que mais frequentemente interagem com os ligantes, observa-se que, para alguns, essa interação ocorre durante a maior

parte do tempo de simulação e, para outros, há formação e quebra de ligações. Por isso, foi feita a quantificação da fração de tempo que cada resíduo se mantém em contato com os ligantes. A análise foi feita considerando-se que para a existência do contato entre ligantes e LBP, a distância ligante-resíduo não fosse superior a 4Å.

A Figura 5.1 mostra essas informações para os resíduos que ficam mais de 10% do tempo de simulação (média das 5 simulações) em contato com os ligantes nos complexos sem coativador (que é idêntica nos complexos com coativador). Podemos notar, principalmente, que há uma maior interação da H3 (resíduos de 277 a 302) e H12 (resíduos de 467 a 477) com a RSG. Já com GQ16, há maior interação das H4/H5 (resíduos de 308 a 332), fitas β (resíduos de 247 a 349) e H6 (resíduos de 350 a 354) e praticamente não há interação com H12 (Figura 5.1).

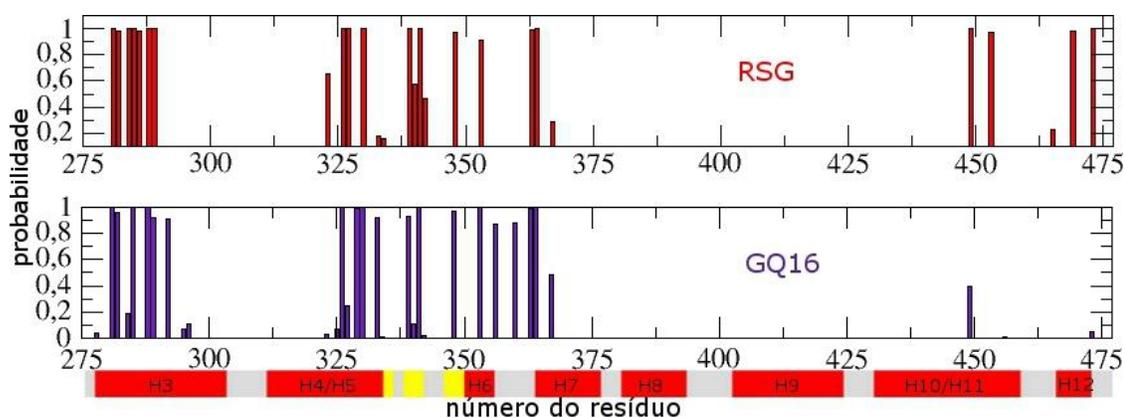


Figura 5.1. Probabilidade de tempo em que há formação de contato entre o LDB e os ligantes: RSG (vermelho) e GQ16 (azul)

Nas Figuras 5.2 e 5.4, calculamos a energia eletrostática média e a energia de van der Waals média de cada resíduo da proteína com os ligantes GQ16 e RSG, respectivamente, durante o tempo de simulação. Nota-se que há uma maior interação eletrostática entre o resíduo K367 (H7) e o GQ16, que ocorre entre uma das carboxilas do anel B do GQ16 e o grupamento carregado positivamente da lisina (Figura 5.2a e 5.3C).

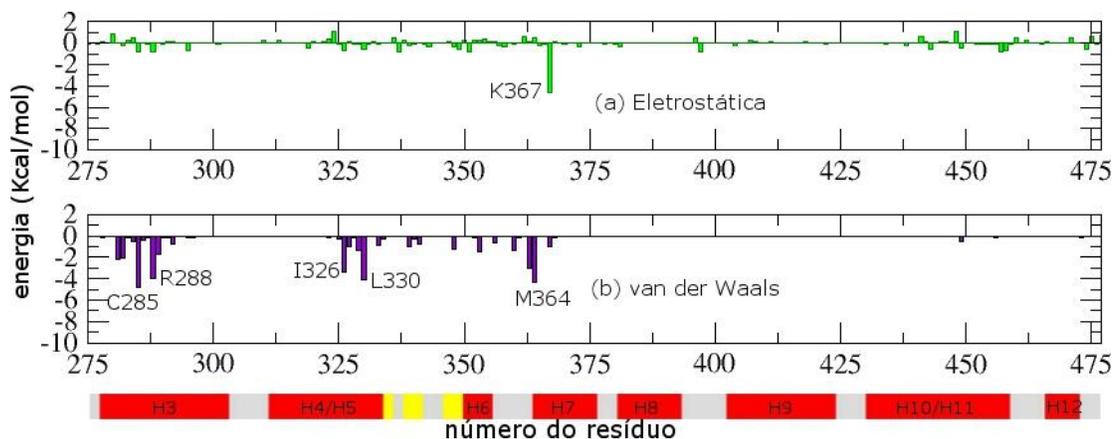


Figura 5.2. (a) Energia eletrostática média de interação entre cada resíduo e o GQ16; (b) Energia de van der Waals média de interação entre cada resíduo e o GQ16.

A Figura 5.2b mostra também as principais interações vdW que ocorrem entre o GQ16 e os resíduos C285 (H3), R288 (H3), I326 (H4/H5), L330 (H5), M364 (H6). O GQ16 interage (i) através do anel A, com o resíduo R288 por interação do tipo π -stacking (Figura 5.3A); (ii) através do átomo de enxofre (anel B) com os resíduos M364 e C285 por interação de van der Waals (vdW) (Figura 5.3B) e (iii) através do anel B com o resíduo K367 por interação eletrostática dipolo-dipolo (Figura 5.3C).

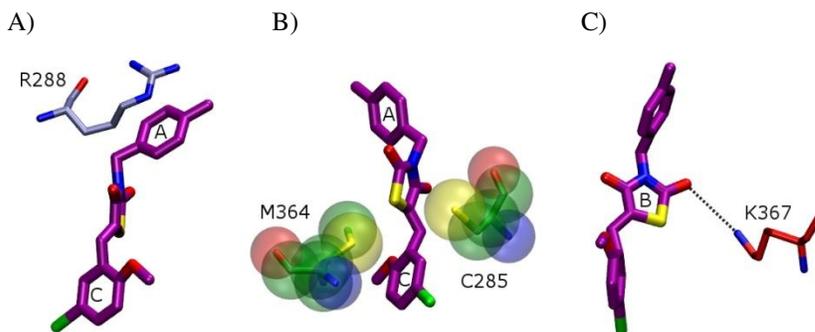


Figura 5.3. Interação de van der Waals entre (A) o anel A do GQ16 e R288 (π -stacking); (B) o anel B do GQ16 e os resíduos M364 e C285, através do átomo de enxofre. (C) interação eletrostática dipolo-dipolo entre anel B do GQ16 e K367.

Já a rosigitazona interage através de interação eletrostática com os resíduos S289 (H3), H449 (H10/H11) e Y473 (H12) (Figura 5.4a e 5.5B) e de vdW com o resíduo C285 (H3) (Figura 5.4b e 5.5A). Algumas interações observadas na estrutura cristalográfica, como por exemplo, a

interação entre o resíduo H323 (H do N ϵ) com o O da carbonila do anel A da RSG, se desfazem já nas simulações de equilíbrio. Para a H323, assim como todas as demais histidinas, tivemos o cuidado de estabelecer a protonação no N que permitisse mais interações com outros resíduos na estrutura cristalográfica. Observamos que na simulação de equilíbrio, o anel da histidina gira e ocorre uma interação entre o H do N δ , uma molécula de água e a carbonila da RSG. Por isso, a H323 não interage através de interação eletrostática com a RSG.

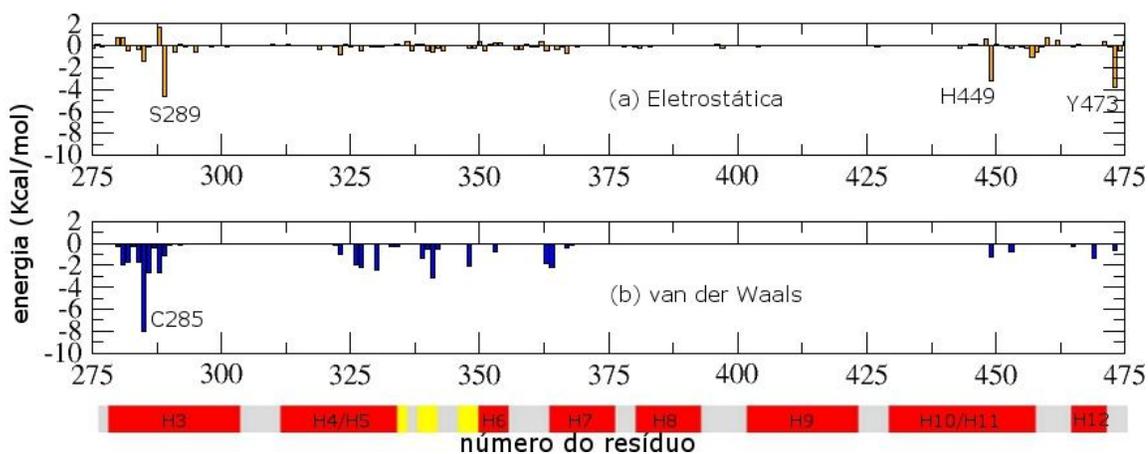


Figura 5.4. (a) Energia eletrostática média de interação entre cada resíduo e a rosiglitazona; (b) Energia de van der Waals média de interação entre cada resíduo e a rosiglitazona.

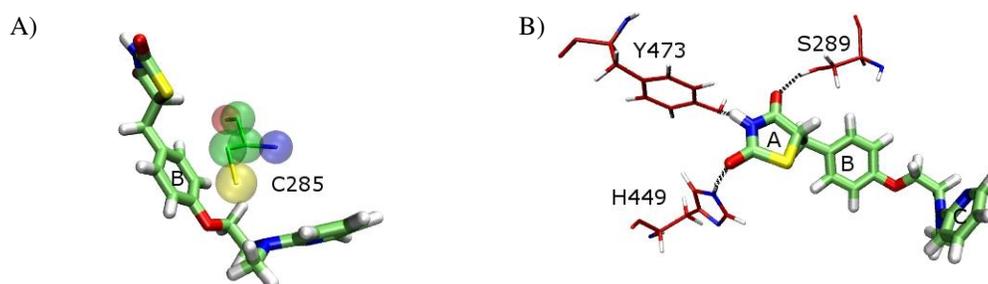


Figura 5.5. Interação de van der Waals entre (A) o anel B da RSG e C285, através do átomo de enxofre. (B) interação eletrostática entre anel A da RSG e os resíduos Y473, S289 e H449.

5.2 Interação com a hélice 12

Levando-se em conta a hipótese clássica do mecanismo de ativação do PPAR γ descrito na Introdução, a investigação da interação dos ligantes com a H12 é muito relevante. O posicionamento da H12 tem papel importante no recrutamento de proteínas coativadoras que iniciarão o processo de transcrição. Por isso, foram realizadas várias análises no sentido de tentar elucidar o modo de interação entre o GQ16 e a H12 e diferenciá-lo da RSG. Conforme visto anteriormente nas análises relativas ao modo de ligação dos ligantes, a rosiglitazona interage na maior parte do tempo de simulação com os resíduos da hélice 12, enquanto o GQ16 não o faz.

Primeiramente realizou-se a análise de mobilidade conformacional da H12 via RMSD (*root mean square deviation*), conforme equação 5.1. A hélice 12 foi considerada como sendo formada pelos resíduos 467 a 477, desconsiderou-se os hidrogênios. Calculou-se o RMSD em relação à estrutura média, e esta, por sua vez, calculada como uma média das médias de diferentes simulações.

$$\langle RMSD \rangle(t) = \sqrt{\frac{\sum_{j=i}^N [r_j(t) - r_{avg_j}]^2}{N}} \quad (5.1)$$

onde N é o número de átomos considerados (neste caso, da hélice 12), r_j é a posição do átomo j no tempo t e r_{avg} é a posição média do átomo j .

O algoritmo de alinhamento foi aplicado aos átomos do *backbone* do LBD, a fim de retirar desvios da posição atômica relativos à translação e à rotação da proteína. A partir dessa análise construíram-se histogramas que indicam a distribuição de RMSDs da H12 na forma de probabilidade normalizada (Figura 5.6).

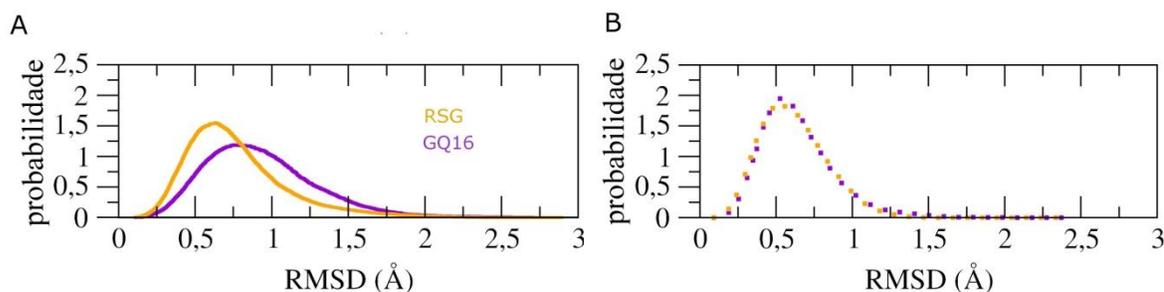


Figura 5.6: Distribuição de RMSDs da H12 em relação à estrutura média da simulação. (A) complexo LBD-ligante sem coativador (B) complexo LBD-ligante com coativador: RMSD H12 RSG (laranja), RMSD H12 GQ16 (roxo).

Através da Figura 5.6A, pode-se observar que na ausência do coativador, ou seja, imaginando-se que este ainda não tenha sido recrutado, a H12 mantém-se mais estável quando o ligante é a RSG, do que na presença do GQ-16. Na presença do coativador (Figura 5.6B), essa diferença desaparece, sugerindo que a RSG conseguiria manter a H12 mais estável para recrutar o coativador do que o GQ16. Após o recrutamento do coativador, a região parece ser estabilizada pela presença do próprio coativador (COA).

Para entender como ocorre a estabilização da H12 proporcionada pela RSG, observou-se o comportamento desta hélice no decorrer das simulações. Na estrutura cristalográfica observa-se uma proximidade entre Y473 e o átomo de nitrogênio do anel heterocíclico A da RSG. A dinâmica molecular mostra que a RSG interage diretamente com a H12 através de uma ligação de hidrogênio bastante estável com a Y473 (Figura 5.7A). A fim de quantificar o quão estável é essa interação, calculamos o tempo de simulação em que ela se mantém e constatamos que em mais do que 94% do tempo total de simulação a ligação de hidrogênio é mantida, em ambos os sistemas com ou sem COA.

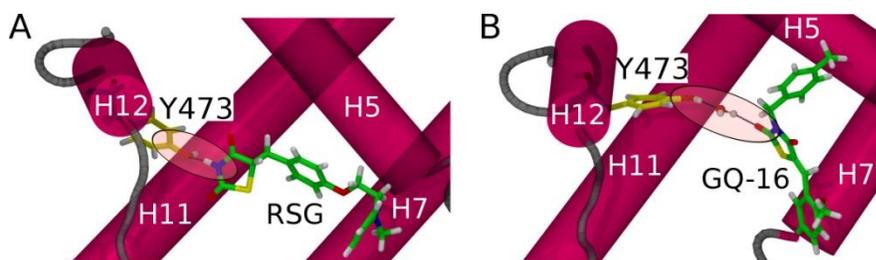


Figura 5.7: Estrutura do LBD do PPAR γ enfatizando os modos de interação da rosiglitazona (A) e do GQ16 (B) com a hélice 12.

Já na estrutura cristalográfica do complexo PPAR γ -GQ16, percebe-se que não há proximidade suficiente entre o ligante e a Y473 para haver alguma interação direta. Conforme vimos na seção anterior, no gráfico de contatos entre resíduos do LBD e GQ16 (Figura 5.1), não há formação de contato entre o ligante e este resíduo durante a simulação. Observando-se o que ocorre durante a MD, notamos a presença de uma molécula de água entre GQ16 e H12 (Figura 5.7B). Essa molécula de água intermedia a interação entre o ligante e a H12 e, dessa forma, o GQ16 interage mais fracamente com a Y473, proporcionando uma sub-estabilização da hélice 12.

O comportamento diferenciado dos dois ligantes pode estar por trás da menor atividade do GQ16 comparado com a RSG, ou seja, de seu caráter agonista parcial.

O contato entre GQ16 e H12, intermediado por água ocorre em aproximadamente 60% e 30% do tempo total de simulação no sistema sem e com COA, respectivamente. A presença do coativador parece alterar a posição da H12, que passa a interagir mais com o próprio COA e isso diminuiria o tempo de interação entre H12-água-GQ16.

5.3 Interação com regiões importantes do LBD

Além da H12, outras alterações dinâmicas são observadas no LBD do PPAR γ na presença dos ligantes. Uma forma de avaliar como os resíduos do LBD estão variando durante o tempo de simulação e, dessa forma, localizar onde estão ocorrendo alterações dinâmicas no LBD, é através do cálculo de *root mean square fluctuation* (RMSF). Também conhecido como cálculo da média do RMSD por átomo, o RMSF geralmente adota a estrutura média da proteína como referência. Através dessa análise, pode-se verificar as flutuações atômicas ao redor das posições médias e com isso, ter uma ideia de mobilidade de certas regiões.

A flexibilidade do LBD em cada um dos sistemas na presença e ausência do coativador foi quantificada em termos das flutuações médias dos carbonos α de cada resíduo. Na Figura 5.8, observa-se que as curvas de RMSF dos complexos tem perfis semelhantes, com duas regiões bastante móveis: o loop entre a H2 e a primeira fita β (resíduos 238 a 246) e o Ω -loop, entre H2' e H3 (resíduos 265 a 276).

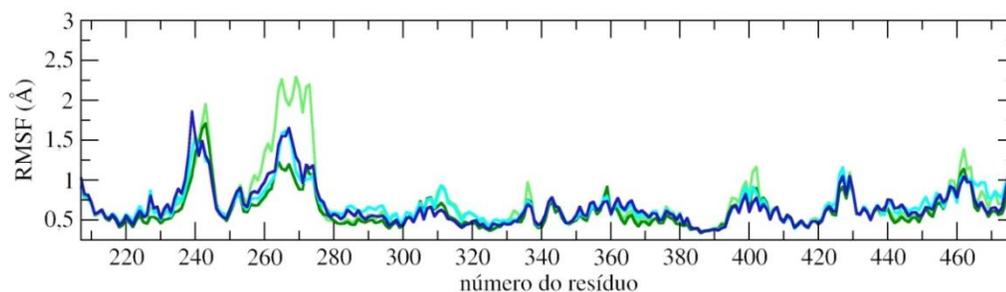


Figura 5.8: *Root mean squared fluctuation* (RMSF) dos carbonos α de cada resíduo dos complexos: PPAR γ -RSG sem COA (verde claro); PPAR γ -RSG com COA (verde escuro); PPAR γ -GQ16 sem COA (ciano); PPAR γ -GQ16 com COA (azul).

As regiões do loop entre a H2 e a primeira fita β e do Ω -loop são consideradas importantes como fatores auxiliares da ativação do PPAR γ , conforme já mencionamos na Introdução. Na Figura 5.8, observa-se principalmente que no complexo PPAR γ -RSG sem COA a região do Ω -loop é bastante móvel se comparada aos demais complexos.

Uma forma mais clara de apresentar as diferenças de flutuações dos resíduos entre um complexo e outro, é através de um gradiente de cores na representação da própria estrutura do LBD. Assim, podemos observar quais regiões de um complexo estão mais ou menos móveis relativamente a outro complexo dependendo da coloração apresentada. Na Figura 5.9, temos essa representação. Neste caso, as estruturas representadas são do LBD do PPAR γ no complexo com o GQ16 e as regiões foram coloridas em relação à estrutura do PPAR γ -RSG. Ou seja, subtrai-se a curva de RMSF do complexo PPAR γ -GQ16 da curva PPAR γ -RSG, apresentadas no gráfico da Figura 5.8, e utiliza-se um gradiente de cores para demonstrar essa variação na diferença de RMSF, conforme mostra a Figura 5.9.

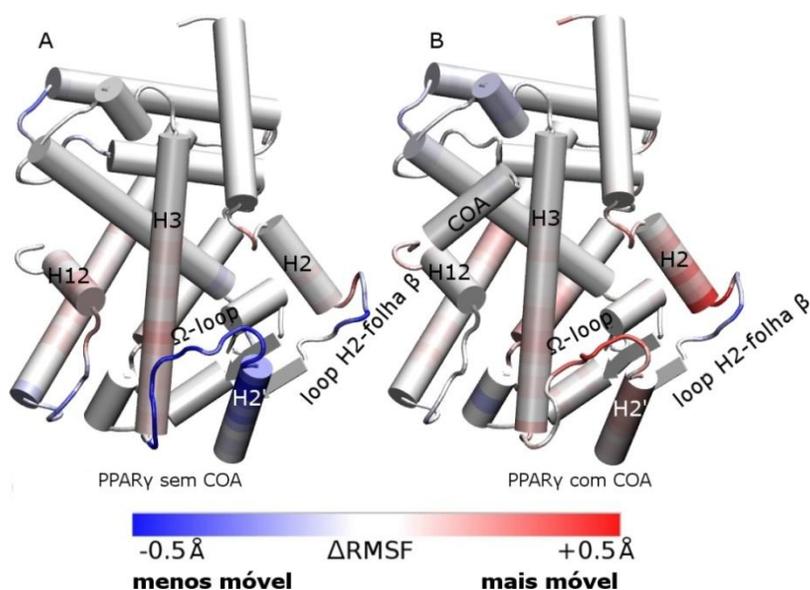


Figura 5.9: Estruturas do complexo PPAR γ -GQ16 sem (A) e com (B) coativador colorida em relação à diferença de RMSF (-0,5 a 0,5 Å) entre o complexo PPAR γ -GQ16 e PPAR γ -RSG. A cor azul indica menor mobilidade em relação ao PPAR γ -RSG e a vermelha, maior.

Observamos na Figura 5.9 que, na ausência do coativador (Figura 5.9A), a região do Ω -loop/H2' no complexo PPAR γ -GQ16 fica menos móvel do que no PPAR γ -RSG, sugerindo que a presença do GQ16 a estabiliza. Por outro lado, na presença do coativador (Figura 5.9B), o Ω -loop adquire maior mobilidade relativa, o que sugere que a presença do coativador influencia na ação da rosiglitazona sobre a estabilização do Ω -loop.

Percebemos também uma estabilização na região do loop entre a H2 e a primeira fita β , onde se localiza o resíduo alvo de fosforilação (S245), em presença do GQ16. Como mencionamos na introdução, o mecanismo proposto para a fosforilação da Ser245 envolve um aspartato (resíduo carregado negativamente). Dessa forma, além do estudo em relação ao sítio de fosforilação, também é importante o estudo de resíduos próximos à Ser245.

Ao lado da S245 há uma lisina (K244) e uma prolina (P246). Levando-se em conta que a lisina é um resíduo carregado positivamente e a prolina, um aminoácido apolar, poderia haver alguma influência da lisina sobre a reação de fosforilação. A lisina poderia, por exemplo, interagir com o aspartato e dessa forma impedir a protonação da serina e a segunda etapa da reação de fosforilação. Ou interagir com o fosfato do ATP, impedindo a reação de fosforilação da Ser245. Outra hipótese seria a de a lisina proporcionar um impedimento estérico (por ser um resíduo relativamente grande), dificultando o acesso à serina. Por isso, investigamos os resíduos S245 e K244 do loop.

Ao comparar as estruturas cristalográficas dos complexos LDB-GQ16 e LBD-RSG, observa-se uma diferença na conformação do resíduo (K244), que situa-se ao lado do sítio de fosforilação (S245). No LBD-GQ16, a cadeia lateral do resíduo K244 está mais voltado para o solvente, proporcionando um impedimento estérico da S245, se comparado ao mesmo resíduo no LBD-RSG.

Através da dinâmica molecular dos complexos, observamos que esse comportamento diferenciado do loop H2/fita β e da K244 se mantem durante as simulações. A estabilização proporcionada pelo GQ16 na região do loop H2/fita β parece estabilizar também a K244 (pertencente a este loop). Isso é o que mostra a Figura 5.10A e 5.10C: o resíduo K244 nos complexos com GQ16 varre um espaço conformacional menor do que o varrido nos complexos com a RSG (Figura 5.10B e 5.10D).

Mapeamos esse espaço percorrido pela lisina, através do cálculo da superfície de ocupação do resíduo, com base nas coordenadas atômicas e nos raios de vdW dos átomos. A

Figura 5.10 mostra esse mapa da superfície de ocupação da K244 e também alguns *frames* desta durante o tempo de simulação. O mapa, gerado através *plugin* VolMap do VMD, foi computado para todos os *frames* da trajetória de simulação, extraindo-se uma média sobre eles.

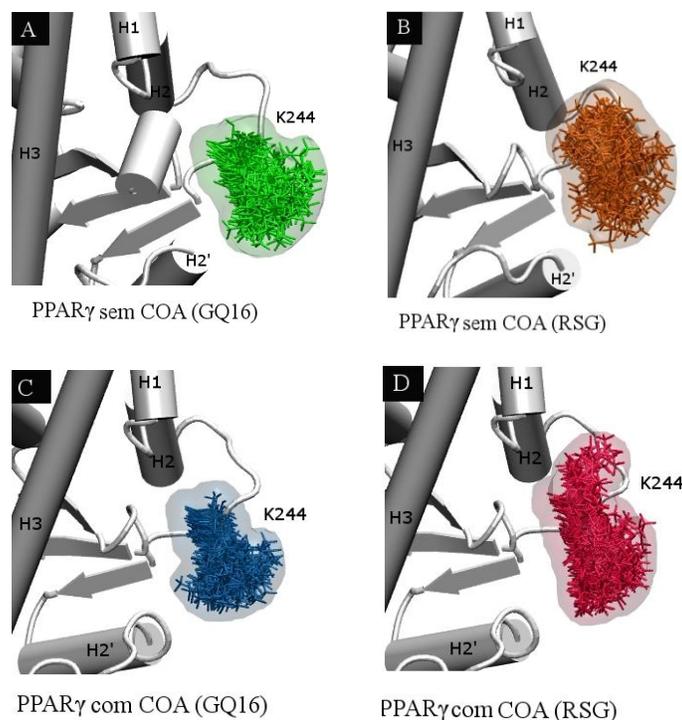


Figura 5.10. Estruturas dos LBDs nos complexos sem coativador (A) PPAR γ -GQ16 e (B) PPAR γ -RSG e com coativador (C) PPAR γ -GQ16 e (D) PPAR γ -RSG, dando ênfase à superfície de ocupação e alguns *frames* da MD da K244.

Podemos notar que o resíduo K244, nos complexos com rosiglitazona, varre um espaço conformacional maior que em presença do GQ16. Isso está de acordo com o resultado de RMSF do loop entre H2/fita β , que mostra uma maior mobilidade nessa região em presença da RSG. A partir desse resultado poderíamos pensar que a lisina nos complexos com GQ16, estando mais estabilizada, poderia interagir mais facilmente com o resíduo Asp ou com o fosfato do ATP, impedindo a reação de fosforilação.

O comportamento dos resíduos S245 e K244 foi investigado também através das simulações de DMAA, que permitem amostrar um maior espaço conformacional da proteína

(esses resultados serão discutidos na sessão 5.5). Realizamos a mesma análise de mapa da superfície de ocupação para S245 e observamos que há pouca diferença, em relação aos ligantes, em termos de espaço varrido pelo resíduo S245. A Figura 5.11 mostra a sobreposição da superfície de ocupação e alguns *frames* de MD da S245.

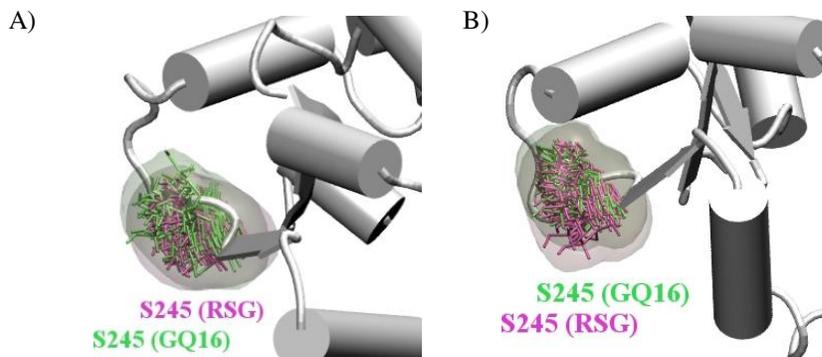


Figura 5.11. Sobreposição da superfície de ocupação e alguns *frames* da S245 nas simulações A) dos complexos sem coativador e B) dos complexos com coativador.

5.4 Influência do coativador na estrutura do complexo

O coativador, proteína recrutada após a ligação de agonistas ao receptor nuclear, tem um papel importante na ativação da transcrição de genes pelo receptor. Devido a essa importância, investigamos detalhadamente as interações do coativador com as hélices H3/H4 e H12, além da energia de interação entre coativador e LBD na presença dos ligantes. A literatura^{26,34} descreve que a posição dos resíduos K301 (da H3) e E471 (da H12), que formam o que se conhece como “grampo ou braçadeira de carga” ou *charge clamp* (Figura 5.12A), é importante para o recrutamento do coativador e seu correto posicionamento na superfície do LBD.

Analisamos a variação das distâncias entre os átomos da cadeia lateral destes dois resíduos nos complexos. Na ausência do coativador (Figura 5.12B), o *charge clamp* varre uma ampla faixa de distâncias quando o GQ16 está ligado ao LBD. Quando complexado com a RSG, a distribuição de distâncias é ligeiramente mais estreita. Entretanto, após a ligação do coativador (Figura 5.12C), a distribuição de distâncias se estreita consideravelmente no LBD-GQ16, mas

nem tanto no complexo LBD-RSG. Isso sugere que, com GQ16, o LBD adota conformações menos adequadas à ligação do coativador em comparação à RSG.

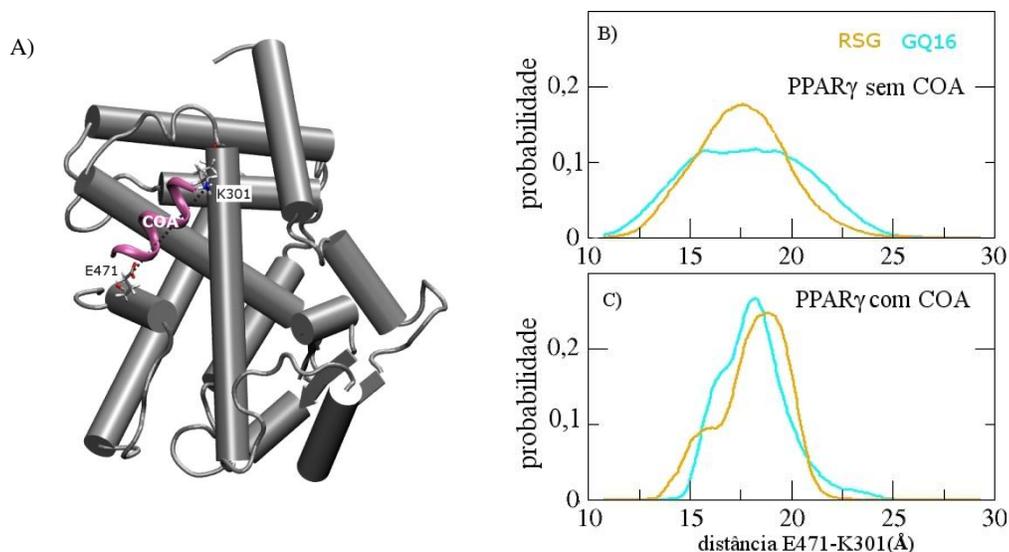


Figura 5.12. A) Estrutura do PPAR γ com coativador (lilás), enfatizando os resíduos E471 e K301, que formam o *charge clamp*. B) Probabilidade de ocorrência das distâncias entre dos átomos da cadeia lateral dos resíduos E471 e K301 no complexo sem coativador; B) e com coativador.

Através da estrutura cristalográfica, vemos que os resíduos do *charge clamp* (K301 e E471) estão próximos aos resíduos L694 e I689 (do coativador), respectivamente. Porém, durante a maior parte do tempo de simulação a distância entre E471-I689 é maior que 6Å tanto no LBD-GQ16 quanto no LBD-RSG (Figura 5.13A). Já para os resíduos K301-L694, a distância fica próxima à cristalográfica no LBD-GQ16, enquanto no LBD-RSG isso não acontece (Figura 5.13B).

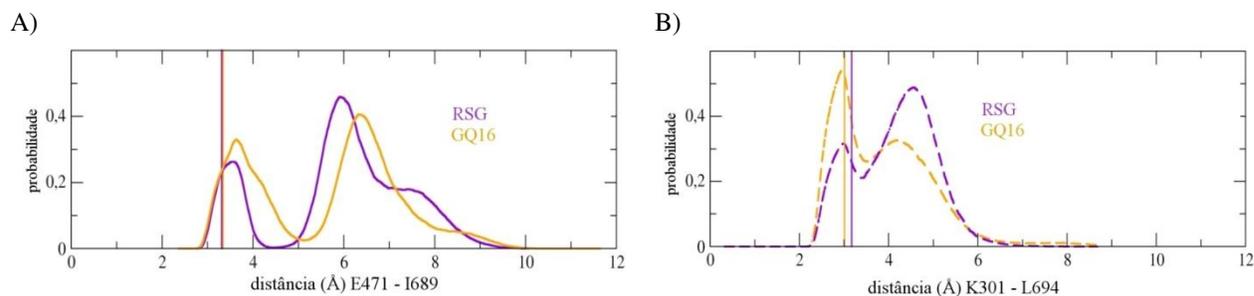


Figura 5.13. A) Probabilidade de ocorrência das distâncias entre os resíduos E471 e I689; B) K301 e L694, ambos nos complexos com coativador em presença de RSG (roxo) e de GQ16 (laranja). As linhas verticais representam as distâncias entre os resíduos na estrutura cristalográfica.

Analisando-se as trajetórias de MD do PPAR γ com coativador percebemos que E471 interage mais frequentemente com o resíduo K474 (da H12) quando em presença de GQ16 (Figura 5.14A) e com o resíduo H687 (do coativador), quando em presença da RSG (Figura 5.14B). Ou seja, há uma maior interação entre LBD-COA no complexo PPAR γ -RSG do que no complexo PPAR γ -GQ16.

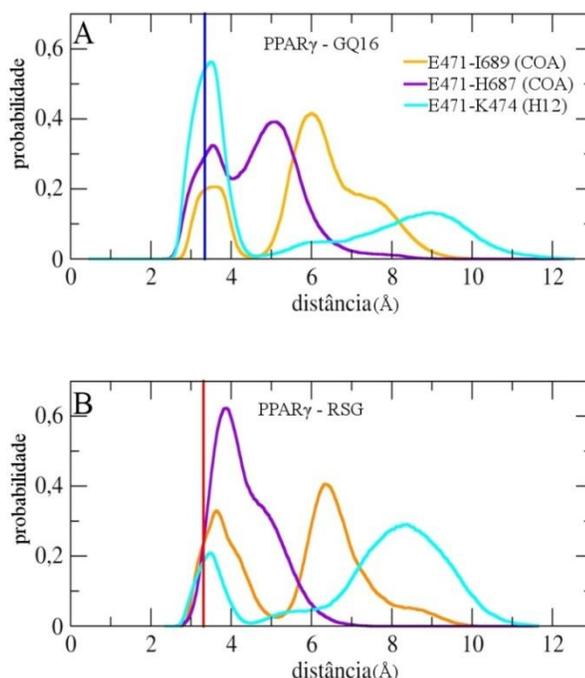


Figura 5.14. Probabilidade de ocorrência das distâncias entre os resíduos E471 e I689 (laranja), E471 e H687 (roxo) e E471 e K474 (ciano) nos complexos A) PPAR γ -GQ16 e B) PPAR γ -RSG. As linhas verticais representam as distâncias entre os resíduos na estrutura cristalográfica.

Isso pode ser corroborado calculando-se a energia de interação entre LBD e coativador. Tanto a energia eletrostática quanto a total são mais negativas no complexo PPAR γ -RSG, no qual a energia eletrostática média foi de -141 ± 30 kcal/mol e energia total média foi de -184 ± 32 kcal/mol. Portanto, a presença da RSG estabiliza a interação entre LBD e COA se comparada ao GQ16 (energia eletrostática média: -124 ± 36 kcal/mol, energia total média: -167 ± 38 kcal/mol). Pode-se perceber também, pela evolução temporal da energia de interação que a variação da energia total do LBD em relação ao COA durante a simulação é influenciada, principalmente, pelo resíduo E471 quando comparado ao K301 (Figura 5.15).

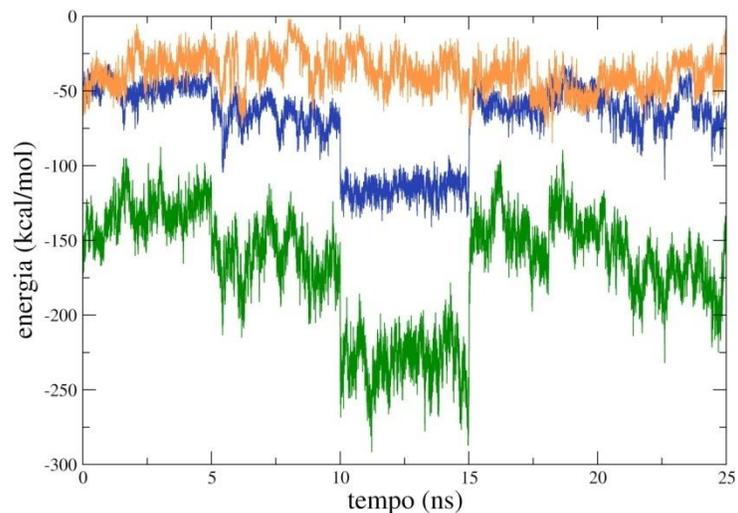


Figura 5.15. Evolução temporal da energia de interação entre COA-K301 (laranja), COA-E471 (azul) e COA-LBD (verde)

A análise de RMSD do coativador, tendo como referência as respectivas estruturas cristalográficas, mostra que o coativador do complexo PPAR γ -RSG desvia menos da estrutura de referência relativamente ao complexo com GQ16 (Figura 5.16). Uma hipótese para explicar tal fato, associando-se essa observação aos valores de energias de interação entre LBD-COA, é a de que a posição mais adequada do coativador seja a da estrutura do PPAR γ em presença da RSG.

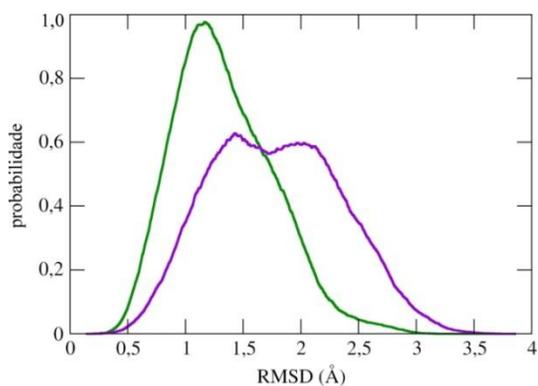


Figura 5.16. RMSD dos carbonos α do coativador nos complexos PPAR γ -GQ16 (roxo) e PPAR γ -RSG (verde).

5.5 Comportamento dos resíduos K244 e S245 nas simulações DMAA

Simulações de DMAA foram realizadas visando investigar se a substituição do GQ16 pela rosiglitazona no complexo PPAR γ -GQ16, levaria o resíduo K244 a reproduzir um comportamento conformacional similar àquele apresentado pelo complexo PPAR γ -RSG. Para tal, replicamos resíduos 239 a 244, do loop entre H2 e a primeira fita β , onde se localiza o sítio de fosforilação da Cdk5, a Ser245 (S245). As simulações de DMAA dos complexos PPAR γ -ligante foram realizadas partindo-se de uma estrutura do PPAR γ que já havia sido relaxada após uma dinâmica molecular com o GQ16. Para ambos os complexos partimos da mesma estrutura inicial (PPAR γ -GQ16 relaxada), apenas trocando o GQ16 pela RSG, no caso da simulação DMAA do complexo PPAR γ -RSG.

Observamos que na DMAA em presença do GQ16, o resíduo K244 varre um espaço conformacional menor que quando em presença da RSG (Figura 5.17A). A presença da RSG aumenta o espaço varrido por este resíduo (Figura 5.17B) e se compararmos com o espaço conformacional varrido pela K244 nas MDs convencionais (com e sem coativador) – Figura 5.10 - vemos que esta se assemelha ao comportamento da mesma na estrutura PPAR γ -RSG. Esse resultado indica que a rosiglitazona induz uma mudança conformacional no resíduo K244, já que a estrutura inicial foi a mesma em ambos os complexos e que na presença do GQ16 esse resíduo ficou mais estável.

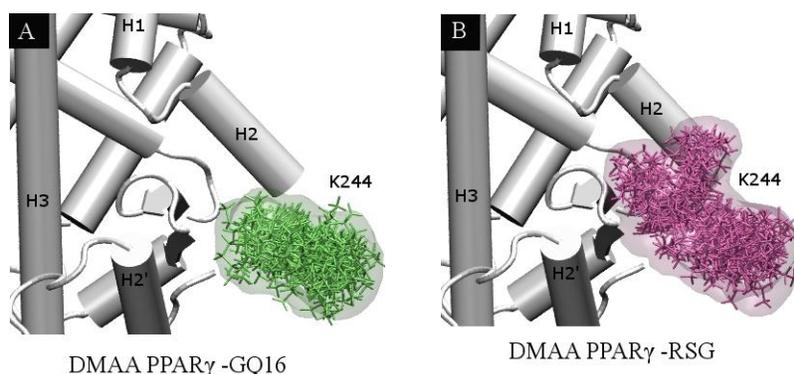


Figura 5.17. Estruturas dos LBDs nos complexos PPAR γ -GQ16 (A) e PPAR γ -RSG (B), dando ênfase à superfície de ocupação e alguns *frames* da DMAA da K244.

Essa diferença encontrada nas simulações em relação à mobilidade do resíduo K244 em presença dos ligantes é bastante interessante. A partir dos resultados experimentais sabe-se que ambos, rosiglitazona e GQ16, bloqueiam a fosforilação mediada pela Cdk5, mas esses resultados são qualitativos, ou seja, não se sabe qual dos ligantes faz um bloqueio mais efetivo da fosforilação. Os resultados encontrados a partir da dinâmica molecular levantam a hipótese de que o GQ16 poderia facilitar a interação entre o resíduo K244 e o Asp da Cdk5 ou o fosfato do ATP, dessa forma bloqueando mais efetivamente a fosforilação. São necessários mais estudos para confirmar essa hipótese, uma das formas seria através de uma mutação deste resíduo K244 por um resíduo não carregado, por exemplo, analisando-se suas implicações na fosforilação.

Realizamos a mesma análise de mapa da superfície de ocupação para a S245 e observamos que da mesma forma que o resíduo K244, a S245 varre um espaço conformacional maior em

presença da rosiglitazona durante a DMAA, ou seja, a serina também apresenta maior mobilidade em presença da RSG. A Figura 5.18 mostra a sobreposição da superfície de ocupação e alguns *frames* da DMAA da S245.

Os resultados obtidos através desta Dissertação nos levam a conclusões importantes, que foram possíveis devido à análise da dinâmica do PPAR γ . As simulações mostraram que GQ16 e rosiglitazona ligam-se à hélice 12 de forma distinta e apresentam modos de estabilização distintos para esta hélice. Dessa maneira, a resposta fisiológica induzida pelos ligantes é sensível ao modo como eles influenciam a dinâmica da H12.

O modo de interação do GQ16 com o PPAR γ , através de fatores auxiliares de ativação do receptor e de uma estabilização fraca da H12, também nos dá diretrizes para o estudo de novos agonistas parciais. Partindo-se da estrutura molecular do GQ16 poderiam ser feitas modificações na estrutura que permitissem a diminuição dos efeitos adversos sem deixar de ativar o receptor. A importância farmacológica do GQ16 pode ser o ponto de partida para o desenvolvimento de novos fármacos.

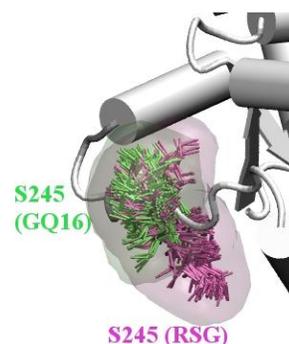


Figura 5.18. Sobreposição da superfície de ocupação e alguns *frames* da S245 na simulação de DMAA

Capítulo 6

Conclusões

Os receptores nucleares são proteínas de grande importância para o entendimento do mecanismo de interação entre ligantes e sistemas biológicos. Diversas técnicas experimentais vem sendo utilizadas para o estudo destas proteínas, possibilitando um grande avanço na compreensão da estrutura e bioquímica dos NRs, mas pouco sobre a dinâmica.

O conhecimento da estrutura isoladamente, sem o auxílio de outras técnicas, não permite o acesso a informações sobre mecanismos e formas de interação moleculares. Neste âmbito, os métodos computacionais são uma ferramenta importante e vem sendo bastante utilizados. O aumento da capacidade computacional e o desenvolvimento de novas técnicas, está permitindo que estes métodos auxiliem na compreensão da dinâmica de sistemas biológicos complexos.

Neste trabalho utilizamos simulação de dinâmica molecular para elucidar o modo de interação do agonista parcial, GQ16 ao PPAR γ , tendo-se como referência o agonista total, rosiglitazona. As simulações mostram que há diferenças no modo de interação do GQ16 e da rosiglitazona com o LBD.

Em relação aos mecanismos de ativação do PPAR γ , as simulações mostraram que a interação entre GQ16 e hélice 12 é mediada por uma molécula de água. Dessa forma, o GQ16 estabiliza menos a hélice 12, se comparado à rosiglitazona, que faz contato direto com a mesma. As interações entre LBD e coativador no complexo PPAR γ -GQ16 são menos estáveis do que nos complexos PPAR γ -RSG. Observamos que houve uma maior interação LBD-coativador (energia de interação mais negativa) e uma maior proximidade de contatos entre resíduos da H12 e do coativador em presença da rosiglitazona. Estes resultados indicam que a H12 na presença do GQ16 assume conformações sub-ótimas para o recrutamento de coativadores relativamente à RSG, fornecendo, assim, uma base molecular para o agonismo parcial observado experimentalmente pelo GQ16.

Em relação à região onde ocorre a fosforilação, as simulações revelam que há uma maior estabilização do loop que contém a S245 e do Ω -loop/H2' em presença do GQ16. Além disso, vimos que o resíduo K244, vizinho ao alvo da fosforilação pela Cdk5, apresenta comportamentos

distintos em cada um dos complexos. No complexo com a rosiglitazona esse resíduo varre um espaço conformacional maior em relação ao complexo PPAR γ -GQ16.

Nas simulações DMAA dos complexos, em que replicamos o loop da S245, também observamos que, em presença da RSG, o resíduo K244 varre um espaço conformacional maior. Mais do que isso, quando substituímos o GQ16 pela rosiglitazona no complexo PPAR γ -GQ16, observamos que K244 passa a apresentar um comportamento parecido com o apresentado na simulação do complexo PPAR γ -RSG. Este conjunto de resultados levanta uma nova hipótese: o GQ16 poderia facilitar a interação entre o resíduo K244 e o aspartato da Cdk5 ou o fosfato do ATP, dessa forma bloqueando mais efetivamente a fosforilação.

Os resultados destes estudos apontam diretrizes de pesquisas interessantes para o futuro próximo. Em particular, seria importante estender os estudos de simulação para elucidar os mecanismos de inibição da fosforilação do PPAR γ na presença de diferentes ligantes, dentre eles agonistas totais, parciais e não-agonistas do receptor. Através desses estudos esperamos poder compreender como diferentes ligantes podem dificultar mais (ou menos) efetivamente a reação de fosforilação, além de elucidar o comportamento dinâmico do complexo Cdk5/p25-PPAR γ .

Para tal, serão necessários métodos híbridos de simulação que possam tratar no nível quântico os aminoácidos do sítio catalítico e transferência de fosfato à serina. Os métodos mais eficientes para tais estudos são as denominadas simulações de MD com QM/MM.^{62,70} A técnica constitui uma aproximação híbrida que combina métodos de mecânica molecular, para movimentos atômicos, e cálculos de Química Quântica, para graus de liberdade nucleares e eletrônicos do conjunto de átomos para o qual a estrutura eletrônica é crítica para o estudo de uma propriedade de interesse.

Apêndice A

Nomenclatura e Estrutura dos aminoácidos

As tabelas a seguir mostram a fórmula estrutural e as abreviações dos aminoácidos. Os sítios ácidos e básicos são mostrados na forma majoritária, encontrada em pH fisiológico.

Tabela 1. Aminoácidos de cadeia lateral polar carregada

Nome Abreviações	Fórmula estrutural	Nome Abreviações	Fórmula estrutural
Lisina Lys K	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+ \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array} $	Ácido Aspártico Asp D	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{O}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array} $
Arginina Arg R	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH}_2)\text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array} $	Ácido Glutâmico Glu E	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{O}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array} $
Histidina His H	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{Imidazole} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array} $		

Tabela 2. Aminoácidos de cadeia lateral apolar

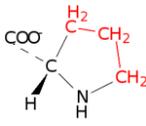
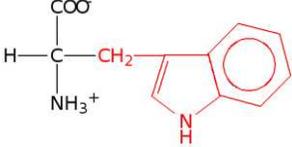
Nome Abreviações	Fórmula estrutural	Nome Abreviações	Fórmula estrutural
Glicina Gly G	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Metionina Met M	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Alanina Ala A	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Prolina Pro P	
Valina Val V	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Fenilalanina Phe F	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Leucina Leu L	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Triptofano Trp W	
Isoleucina Ile I	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}^*(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$		

Tabela 3. Aminoácidos de cadeia lateral polar sem carga

Nome Abreviações	Fórmula estrutural	Nome Abreviações	Fórmula estrutural
Serina Ser S	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{OH} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Glutamina Gln Q	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Treonina Thr T	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}^*(\text{OH})(\text{CH}_3) \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Tirosina Tyr Y	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Asparagina Asn N	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Cisteína Cys C	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{SH} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$

Referências Bibliográficas

1. Lehrke, M. & Lazar, M. The many faces of PPARgamma. *Cell* **123**, 993-999 (2005).
2. Em: <http://www.diabetes.org.br/>. Acesso em: 02 de março de 2012.
3. Em: http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/pdf/ndfs_2011.pdf Acesso em: 02 de março de 2012.
4. Gronemeyer, H., Gustafsson, J.A. & Laudet, V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 950-964 (2004).
5. McKenna, N.J., Lanz, R.B. & O'Malley, B.W. Nuclear Receptor Coregulators: Cellular and Molecular Biology. *Endocr. Rev.* **20**, 321-344 (1999).
6. Glass, C.K. & Rosenfeld, M.G. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Gene. Dev.* **14**, 121-141 (2000).
7. Steinmetz, A.C.U., Renaud, J.P. & Moras, D. Binding of Ligands and Activation of Transcription by Nuclear Receptors. *Annu. Rev. Bioph. Biom.* **30**, 329-359 (2001).
8. Chawla, A., Repa, J.J., Evans, R.M. & Mangelsdorf, D.J. Nuclear receptors and Lipid Physiology: Opening the X-Files. *Science* **294**, 1866-1870 (2001).
9. Lazar, M.A. Becoming fat. *Genes Dev.* **16**, 1-5 (2002).
10. Em: <http://www.diabetesebook.org.br/modulo-1> . Acesso em 02 de março de 2012.
11. Em: <http://www.diabetesebook.org.br/modulo-4> . Acesso em 02 de março de 2012.
12. Mourão, R.H. *et al.* Synthesis and Biological Activity of Novel Acridinylidene and Benzylydene thiazolidinediones. *Eur. J. Med. Chem.* **40**, 1129-1133 (2005).
13. Bain, D.L., Heneghan, A.F., Connaghan-Jones, K.D. & Miura, M.T. Nuclear receptor structure: implications for function. *Annu. Rev. Physiol.* **69**, 201-220 (2007).
14. Mangelsdorf, D.J. *et al.* The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835-839 (1995).
15. Francis, G.A., Fayard, E., Picard, F. & Auwerx, J. Nuclear Receptors and The Control of Metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* **65**, 261-311 (2003).
16. Li, Y., Lambert, M.H. & Xu, H.E. Activation of nuclear receptors: a perspective from structural genomics. *Structure* **11**, 741-746 (2003).
17. Kumar, R. & Thompson, E.B. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* **64**, 310-319 (1999).
18. Kumar, R., Johnson, B.H. & Thompson, E.B. Overview of the structural basis for transcription regulation by nuclear hormones. *Essays Biochem.* **40**, 27-39 (2004).
19. Khorazanideh, S. & Rastinejad, F. Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 386-390 (2001).

20. Mangelsdorf, D.J. & Evans, R.M. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83**, 841-850 (1995).
21. Lefstin, J.A. & Yamamoto, K.R. Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators. *Nature* **392**, 885-888 (1998).
22. Willson, T.M., Brown, P.J., Sternbach, D.D. & Henke, B.R. The PPARs: From Orphan Receptors to Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **43**, 527-550 (2000).
23. Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M. & Laudet, V. Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. *Pharmacol. Rev.* **58**, 685-704 (2006).
24. Luconi, M., Cantini, G. & Serio, M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): Is the genomic activity the only answer? *Steroids* **75**, 585-594 (2010).
25. Lehmann, J.M. *et al.* An Antidiabetic Thiazolidinedione Is a High Affinity Ligand for Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma (PPARgamma). *J. Biol. Chem.* **270**, 12953-12956 (1995).
26. Nolte, R.T. *et al.* Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* **395**, 137-143 (1998).
27. Xu, H.E. *et al.* Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol. Cell.* **3**, 397-403 (1999).
28. Liberato, M. *et al.* Middle Chain Fatty Acids are Selective Peroxisome Proliferator Activated Receptor Activators. (a ser publicado). *PLoS One J. I.* (2012).
29. Sonoda, M.T., Martínez, L., Webb, P., Skaf, M.S. & Polikarpov, I. Ligand Dissociation from Estrogen Receptor Is Mediated by Receptor Dimerization: Evidence from Molecular Dynamics Simulations. *Mol. Endocrinol.* **22**, 1565-1578 (2008).
30. Martínez, L. *et al.* Molecular Dynamics Simulations Reveal Multiple Pathways of Ligand Dissociation from Thyroid Hormone Receptors. *Biophys. J.* **89**, 2011-2023 (2005).
31. Bruning, J.B. *et al.* Partial Agonists Activate PPARgamma Using a Helix 12 Independent Mechanism. *Structure* **15**, 1258-1271 (2007).
32. Waku, T. *et al.* The nuclear receptor PPAR γ individually responds to serotonin- and fatty acid-metabolites. *EMBO J.* **29**, 3395-3407 (2010).
33. Oberfield, J.L. *et al.* A peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits adipocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6102-6106 (1999).
34. Pochetti, G. *et al.* 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 (2010).
35. Chalmers, M.J. *et al.* Probing Protein Ligand Interactions by Automated Hydrogen / Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **78**, 1005-1014 (2006).
36. Waku, T. *et al.* Structural Insight into PPAR γ Activation Through Covalent Modification with Endogenous Fatty Acids. *J. Mol. Biol.* **385**, 188-199 (2009).
37. Choi, J.H. *et al.* Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPARgamma by Cdk5. *Nature* **466**, 451-456 (2010).

38. Choi, J.H. *et al.* Antidiabetic actions of a non-agonist PPAR γ ligand blocking Cdk5-mediated phosphorylation. *Nature* **477**, 477–481 (2011).
39. Mapelli, M. *et al.* Mechanism of CDK5/p25 Binding by CDK Inhibitors. *J. Med. Chem.* **48**, 671–679 (2005).
40. Zhang, J., Luan, C.-H., Chou, K.-C. & Johnson, G.V.W. Identification of the N-terminal Functional Domains of Cdk5 by Molecular Truncation and Computer Modeling. *Proteins* **48**, 447-53 (2002).
41. Davies, T.G. *et al.* Structure-based design of a potent purine-based cyclin-dependent kinase inhibitor. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 745-749 (2002).
42. Willson, T.M. & Wahli, W. Peroxisome proliferators-activated receptor agonists. *Curr. Op. Chem. Biol.* **1**, 235-241 (1997).
43. Kliewer, S.A. *et al.* Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferators-activated receptors alpha and gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 4318-4323 (1997).
44. Itoh, T. *et al.* Structural basis for the activation of PPAR γ by oxidized fatty acids. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 924-931 (2008).
45. Guan, Y. *et al.* Thiazolidinediones expand body fluid volume through PPAR γ stimulation of ENaC-mediated renal salt absorption. *Nat. Med.* **11**, 861-866 (2005).
46. Burgermeister, E. *et al.* 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 (2006).
47. Pochetti, G. *et al.* 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 (2007).
48. Xu, H.E. & Li, Y. Ligand-Dependent and -Independent Regulation of PPAR gamma and Orphan Nuclear Receptors. *Science Signaling* **1**, 1-3 (2008).
49. Motani, A. *et al.* INT131: A Selective Modulator of PPAR γ . *J. Mol. Biol.* **386**, 1301-1311 (2009).
50. Berman, H.M. *et al.* The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235-242 (2000).
51. Connors, R.V. *et al.* Identification of a PPARdelta agonist with partial agonistic activity on PPARgamma. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 3550-3554 (2009).
52. Montanari, R. *et al.* 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 (2008).
53. Einstein, M. *et al.* The Differential Interactions of Peroxisome Proliferator- Activated Receptor gamma Ligands with Tyr473 Is a Physical Basis for Their Unique Biological Activities. *Mol. Pharmacol.* **73**, 62-74 (2008).

54. Amato, A.A. Tese: Investigação da Atividade Farmacológica de Benzilideno- e Acridinilideno-Tiazolidinedionas e Isoflavonas nos Receptores Alfa, Beta/Delta e Gama Ativados por proliferadores Peroxissomais. 1-104 (2008).
55. Amato, A.A. *et al.* GQ-16, A Novel PPAR γ Ligand, Promotes Insulin Sensitization Without Weight Gain. (a ser publicado). *J. Biol. Chem.* (2012).
56. Karplus, M. & Kuriyan, J. Molecular dynamics and protein function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 6679-6685 (2005).
57. Karplus, M. & McCammon, J.A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 646-652 (2002).
58. McCammon, J.A., Gelin, B.R. & Karplus, M. Dynamics of folded proteins. *Nature* **267**, 585-590 (1977).
59. Caflisch, A. & Karplus, M. Acid and thermal denaturation of barnase investigated by molecular dynamics simulations. *J. Mol. Biol.* **252**, 672-708 (1995).
60. Martínez, L. *et al.* Gaining ligand selectivity in thyroid hormone receptors via entropy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 20717-20722 (2009).
61. Martínez, L., Webb, P., Polikarpov, I. & Skaf, M.S. 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 (2006).
62. Leach, A.R. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. (Pearson Education: Harlow, 2001).
63. Becker, O.M., MacKerell Jr., A.D., Roux, B. & Watanabe, M. *Computational biochemistry and biophysics*. (Marcel Dekker, Inc.: Basel, 2001).
64. MacKerell, A.D. *et al.* All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B.* **102**, 3586-3616 (1998).
65. Brooks, B.R. *et al.* CHARMM : The Biomolecular Simulation Program. *J. Comput. Chem.* **30**, 1545-1614 (2009).
66. Hermans, J., Berendsen, H.J.C., Gunsteren, W.F.V. & Postma, J.P.M. A consistent empirical potential for water-protein interactions. *Biopolymers* **23**, 1513-1518 (1984).
67. Jorgensen, W.L., Maxwell, D.S. & Tirado-Rives, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 11225-11236 (1996).
68. Cornell, W.D. *et al.* A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5179-5197 (1995).
69. Case, D.A. *et al.* AMBER 11, University of California, San Francisco. (2010).
70. Morgon, N.H. & Coutinho, K. *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular. Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*. 413-482 (Editora Livraria da Física: São Paulo, 2007).
71. Phillips, J.C. *et al.* Scalable Molecular Dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **26**, 1781-1802 (2005).

72. Gampe Jr, R. *et al.* Asymmetry in the PPARgamma/RXRalpha crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. *Mol. Cell.* **5**, 545-555 (2000).
73. Martínez, L., Andreani, R. & Martínez, J.M. Convergent algorithms for protein structural alignment. *BMC Bioinformatics* **8**, 306-320 (2007).
74. Gullingsrud, J., Saam, J. & Phillips, J. Em: <<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/plugins/psfgen/>>. Acesso em: 29 de setembro de 2010.
75. Gordon, J.C. *et al.* H++: a server for estimating pKas and adding missing hydrogens to macromolecules. *Nucleic Acids Res.* **33**, W368-W371 (2005).
76. Hoover, W.G. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Phys. Rev. A* **31**, 1695-1697 (1985).
77. Griebel, M., Knapek, S. & Zumbusch, G. *Numerical simulation in molecular dynamics. Numerics, algorithms, parallelization, applications.* 258-273 (Springer: Berlin, 2007).
78. Ryckaert, J., Ciccotti, G. & Berendsen, H.J.C. Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes. *J. Comput. Phys.* **23**, 327-341 (1977).
79. Caves, L.S.D., Evanseck, J.D. & Karplus, M. Locally accessible conformations of proteins: multiple molecular dynamics simulations of crambin. *Protein Sci.* **7**, 649-666 (1998).
80. Hansson, A., Souza, P.C.T., Silveira, R.L., Skaf, M.S. & Martínez, L. CHARMM Force Field Parameterization of Rosiglitazone. *Int. J. Quantum Chem.* **111**, 1346-1354 (2010).
81. Prates, É.T., Souza, P.C.T., Pickholz, M. & Skaf, M.S. CHARMM Based Parameterization of Neutral Articaine - A Widely Used Local Anesthetic. *Int. J. Quantum Chem.* **111**, 1339-1345 (2009).
82. Avogadro: an open-source molecular builder and visualization tool. Em: <<http://avogadro.openmolecules.net/>>. Acesso em: 08 de julho de 2010.
83. Frisch, M.J. *et al.* Gaussian 03, Revision C.02. (2004).
84. Fuente, J.Á. de la *et al.* Synthesis, Activity, and Molecular Modeling Studies of Novel Human Aldose Reductase Inhibitors Based on a Marine Natural Product. *J. Med. Chem.* **46**, 5208-5221 (2003).
85. Singh, U.C. & Kollman, P.A. An approach to computing electrostatic charges for molecules. *J. Comput. Chem.* **5**, 129-145 (1984).
86. Besler, B.H., Merz, K.M. & Kollman, P.A. Atomic charges derived from semiempirical methods. *J. Comput. Chem.* **11**, 431-439 (1990).