

3. Resultados e Discussão

3.1 Cálculo das cargas das porfirinas

O complexo da protoporfirina IX com o Fe^{2+} produz o heme. Ambas moléculas têm carga total -2 em pH=7. O grupo heme é muito importante em muitos aspectos da vida, sendo responsável pelo armazenamento e distribuição de moléculas de oxigênio no organismo. Um anel porfirínico consiste de 4 anéis pirrol conectados todos eles por pontes de metano. Um anel pirrol é um grupo de 4 átomos de carbono e um átomo de nitrogênio unidos em um anel (Fig. 1.3).

É o íon Fe^{2+} que dá a capacidade à molécula de se combinar com outros dois ligantes. No caso da hemoglobina, um dos ligantes é o oxigênio e na HSA um dos ligantes axiais é a TYR-161, como demonstraremos no presente trabalho. O monóxido de carbono tem grande afinidade pelo heme e desloca o oxigênio. No caso da hemoglobina, especialmente quando a concentração de CO no corpo humano alcança 40% , isto pode produzir efeitos irreversíveis na saúde.

3.1.1 Cálculo quântico - programa Gamess

O programa Gamess (General Atomic and Molecular Electronic Structure System) é desenvolvido pelo grupo de M. S. Gordon, do Departamento de Química da Universidade do Estado de Iowa e segue a filosofia de código aberto (Schmidt et al., 1993). Começou a se desenvolver baseado no programa HONDO existente já no ano 1981.

Entre as muitas capacidades do Gamess mencionaremos brevemente as seguintes:

1. Calcula funções de onda de campo autoconsistente usando aproximações RHF (restricted Hartree-Fock), UHF (unrestricted Hartree-Fock), ROHF (restricted open shell Hartree-Fock), GVB

(generalized valence bond), ou MCSCF (multi-configuration self-consistent field).

2. Calcula a energia de correlação eletrônica para estas funções de onda SCF usando a aproximação DFT, entre outras aproximações.
3. Calcula modelos semi-empíricos como MNDO, AM1 ou PM3 usando funções de onda RHF, UHF, ROHF, ou GVB.
4. Otimiza geometrias moleculares usando coordenadas internas ou cartesianas.
5. Procura estados de transição sobre a superfície de energia potencial.
6. Computa frequências dos modos normais de vibração, as intensidades infravermelhas e intensidades Raman.

Além das já mencionadas, o programa tem muitas outras capacidades (Schmidt et al., 1993).

3.1.2

Base escolhida na entrada do Gamess para o cálculo do ESP

O “input” do Gamess para o cálculo do ESP pode ser visto no apêndice I. Os cálculos foram feitos usando o método B3LYP, ou seja, usando a DFT com termos de correlação e intercâmbio dados pela equação 42. O conjunto de bases escolhido para todos os cálculos foi a 6-31G** (para otimização de geometria se usouse 6-31). Essa escolha foi feita para considerar que os metais de transição apresentam orbitais *d* e *p*. Esse conjunto de bases foi padrão para os cálculos do ESP, de modo que os resultados pudessem ser comparados.

Esses dados são colocados no Gamess através de um input, que contém a geometria molecular, o conjunto de bases, o método utilizado e que dados se quer calcular, como, por exemplo, o potencial eletrostático. Também é necessário colocar a carga total do sistema (em unidades atômicas), assim como sua multiplicidade de spin.

A multiplicidade do sistema foi escolhida como se todos os elétrons estivessem emparelhados, menos um, no máximo. Pela equação $2S + 1$ (*S* é o spin total do sistema), isto resulta em multiplicidade 1 para sistemas com número par de elétrons (*S*=0) e multiplicidade 2 para sistemas com número ímpar de elétrons (*S*=1).

3.1.3 Otimizando a geometria das porfirinas

Para obter a otimização da geometria se realizou o seguinte (apêndice 1):

- Primeira otimização de geometria por Mecânica Molecular (MM): Desenhou-se a geometria usando o programa Gchemical (<http://www.uiowa.edu/~gchemical/>) e se gerou o arquivo pdb correspondente. Depois, usando o mesmo programa, foi feita uma otimização de geometria usando MM e gerando o pdb correspondente.

- Segunda otimização de geometria usando a aproximação ROHF: O último pdb gerado no passo anterior serve com “input” neste passo.

Usa-se um cálculo:

- RUNTYP: OPTIMIZE (otimização de geometria)
- SCFTYP: ROHF: Para levar em conta os elétrons desemparelhados das últimas camadas
- GBASIS: N31
- NGAUS: 6 uma combinação linear de 6 gaussianas
- ICHARGE: -2
- MULT: 1

As estruturas otimizadas são mostradas na Fig 1.3. Uma vez obtida a segunda geometria otimizada procedemos ao cálculo do ESP.

3.1.4 Obtenção das cargas a partir do ESP

Para a obtenção das cargas a partir do ESP se usou o método RESP, já discutido no item 2.12.4, o qual estima melhor as cargas dos átomos “ocultos” (átomos com pouca SAS). No caso das porfirinas os átomos que formam o anel porfirínico têm pouca SAS, assim como também o Fe^{2+} .

Os resultados são mostrados na Tabela 1. Da tabela podemos observar o seguinte:

As cargas obtidas para o heme com a metodologia RESP estão em boa concordância com as cargas do campo de forças Gromos 53A6, as quais foram obtidas semiempiricamente para reproduzir os valores experimentais de energia livre de solvatação e entalpia de formação (Oostenbrink et al., 2005). É assim que

com métodos puramente quânticos conseguimos reproduzir cargas ajustadas para reproduzir valores experimentais o qual nos gera confiança nas cargas que calcularemos para o PPIX.

Quando o PPIX é complexado com o íon Fe^{2+} , as cargas dos átomos de nitrogênio aumentam de $\sim 80\%$. Apesar dessas diferenças de cargas nos átomos de nitrogênio, este não tem efeito sobre o caráter hidrofóbico da porfirina (Fig. 3.3)

As cargas dos primeiros vizinhos dos átomos de nitrogênio e do grupo carboxil são influenciadas pela ligação do Fe^{2+} . Observa-se importantes alterações de carga nos primeiros vizinhos dos átomos de nitrogênio, tais como os átomos 14 e 25. Para os átomos de oxigênio do grupo carboxil (1, 3, 21 e 22) as mudanças são mínimas, da ordem de 8% (Tabela-1).

Observa-se que o átomo 13 tem variações na carga de -0.017 a -0.093, provavelmente porque ele está próximo aos átomos de carbono ressonantes 12 e 14. Os átomos 43 e 30 também têm variações de carga, devido a sua proximidade com os átomos de carbono ressonantes 42 e 29. Observamos mudanças conformacionais induzidas nestas regiões pelo íon Fe^{2+} .

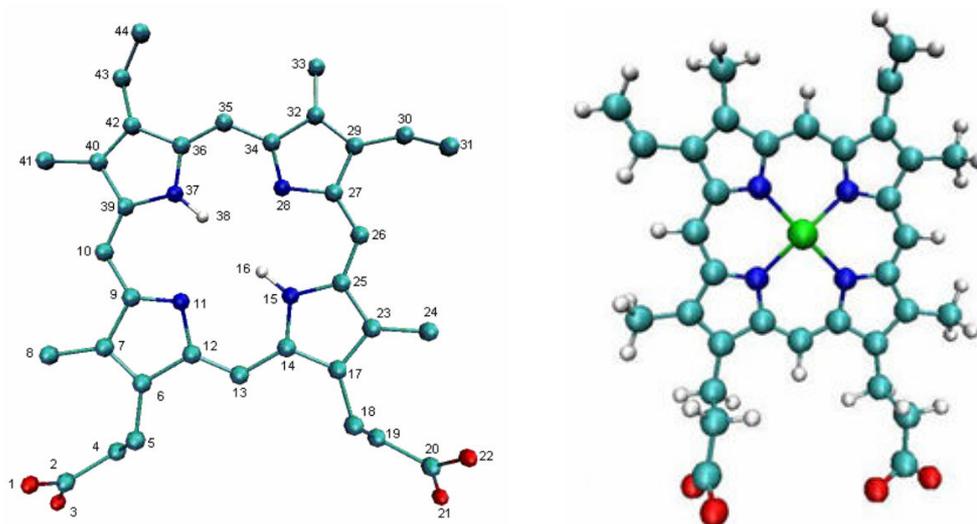


Fig. 3.1 À esquerda, protoporfirina IX depois de uma otimização de geometria. Os números estão relacionados com as posições dos átomos na tabela 1. À direita, a PPIX complexada com Fe^{2+} (heme) depois de uma otimização de geometria.

Tabela 1. Cargas RESP obtidas do cálculo DFT (terceira e quinta colunas) e a distribuição das cargas do GROMOS5A36 para o heme (quarta coluna)

Distribuição das cargas				
	Átomo	PPIX	HEME/53A6	HEME/DFT
	*Fe		0.400	0.363
1	OBJ	-0.593	-0.635	-0.644
2	CBI	0.381	0.270	0.463
3	OBK	-0.593	-0.635	-0.644
4	CBH	0.016	0.000	0.019
5	CBG	0.168	0.000	0.084
6	CAX	-0.334	0.000	-0.098
7	CAV	0.149	0.000	0.060
8	CBE	-0.083	0.000	-0.053
9	CAR	0.159	0.000	-0.071
10	CAQ	-0.117	-0.100	-0.069
	*HHB		0.100	0.113
11	NAW	-0.438	-0.100	-0.095
12	CAY	0.233	0.000	-0.046
13	CBD	-0.017	-0.100	-0.093
	*HHA		0.100	0.183
14	CBB	0.279	0.000	-0.030
15	NBA	-0.298	-0.100	-0.059
16	HBA	0.234		
17	CBC	-0.364	0.000	-0.108
18	CBL	0.156	0.000	0.055
19	CBM	0.039	0.000	-0.035
20	CBN	0.356	0.270	0.601
21	OBP	-0.593	-0.635	-0.644
22	OBO	-0.593	-0.635	-0.644
23	CAZ	0.135	0.000	0.061
24	CBF	-0.021	0.000	-0.007
25	CAT	0.041	0.000	-0.080
26	CAS	-0.036	-0.100	-0.064
	*HHD		0.100	0.061
27	CAM	0.174	0.000	-0.108
28	NAN	-0.471	-0.100	-0.055
29	CAL	-0.052	0.000	-0.026
30	CAO	-0.010	0.000	0.070
31	CAP	-0.094	0.000	-0.149
32	CAK	0.072	0.000	0.122
33	CAU	-0.092	0.000	-0.061
34	CAJ	0.157	0.000	-0.060
35	CAI	-0.070	-0.100	-0.154
	*HHC		0.100	0.111
36	CAD	0.083	0.000	-0.104
37	NAE	-0.249	-0.100	-0.012
38	HAE	0.279		
39	CAB	0.067	0.000	-0.152
40	CAA	0.108	0.000	0.111
41	CAH	-0.054	0.000	-0.063
42	CAC	-0.021	0.000	-0.006
43	CAF	-0.020	0.000	0.070
44	CAG	-0.074	0.000	-0.112

3.2 Geração das topologias para as porfirinas

PPIX / HEME

A informação sobre a topologia da PPIX não está disponível no campo de forças Gromos5A36. Para a construção desta topologia usamos o servidor PRODRG (<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrg/>)(Schuettelkopf et al., 2004) o qual gera parâmetros para as ligações, ângulos e cargas. Inserimos como entrada para este servidor web um arquivo no formato pdb da PPIX otimizada geometricamente. Finalmente, no arquivo de saída do servidor, mudamos as cargas pelas cargas que já tínhamos calculado por meio do cálculo quântico.

A topologia assim gerada é mostrada no apêndice II.

No caso do heme, a topologia já existe no campo de forças Gromos5A36 e aqui somente as cargas foram trocadas pelas obtidas no cálculo quântico, o PRODRG não foi usado neste ultimo caso.

3.3 Solvatação e estabilidade das porfirinas na água

O efeito hidrofóbico tem um papel importante em ‘folding’ de proteínas, reconhecimento molecular e numerosos processos tecnológicos (Ding et al., 2000). Atualmente, há muitos estudos acerca dos processos de solvatação e hidratação de hemoproteínas (Lounnaset et al., 1994; Phillips et al., 1995; Gu et al., 1995), mas poucos sobre a influência da solvatação do heme e seu precursor, a PPIX.

O contacto hidrofóbico ocorre principalmente na ligação do heme e da PPIX nos bolsões hidrofóbicos da hemoglobina, mioglobina e transportadores como a HSA (Wardell et al 2002). Os resultados da solvatação nos dariam elementos para investigar o comportamento das moléculas num meio semelhante ao fisiológico.

Com o objetivo de estudar a relação estrutura-solvente, formação de pontes de hidrogênio, camadas de solvatação e o caráter hidropático das porfirinas foi realizada uma DM de 10 ns. Antes da DM, se realizou uma minimização de energia para estabilizar o sistema, na qual as porfirinas foram colocadas numa caixa de água (ver Fig. 3.2) sob as seguintes condições:

1. As moléculas porfirinas foram inseridas numa caixa junto com 6825 moléculas de água, com uma distância de 15 Å entre o soluto e a parede da caixa.
2. Estabeleceram-se condições periódicas de contorno.
3. Sistema termodinamicamente acoplado a um banho térmico de 310 K.
4. Pressão 1 atm.
5. Modelo de água SPC.
6. O sistema tem carga total -2 e foi neutralizado com dois íons sódio (Na^+).
7. Tratamento eletrostático PME.
8. As interações de van der Waals e Coulomb foram consideradas com um corte de 1 nm.
9. Passo na simulação de 2 fs.
10. Trajetórias atômicas colhidas para análise de 10 ns

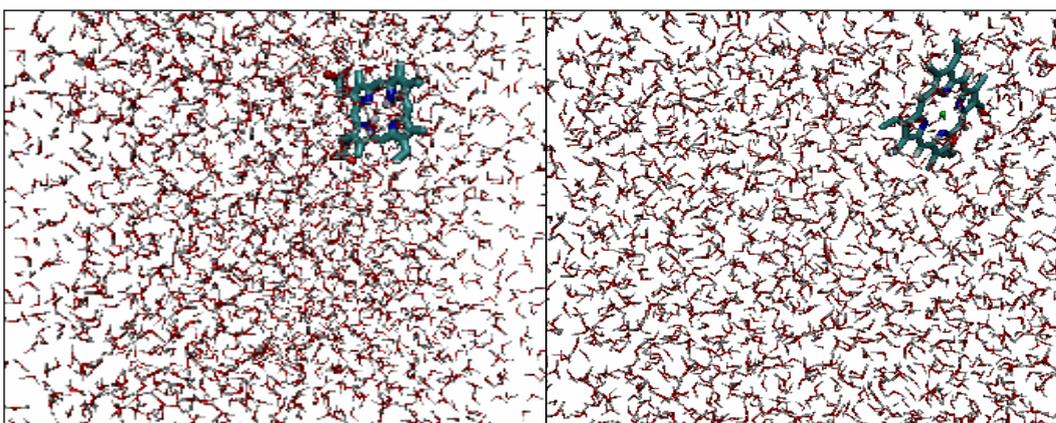


Figura 3.2 Esquerda e direita: PPIX e Heme numa caixa de água. (gráfico gerado com VMD)

A minimização de energia (ME) consiste dos seguintes passos:

1. ME com restrição de posição do soluto usando o algoritmo steepest-descent, para relaxar somente o solvente e evitar a sobreposição dos raios de van der Waals das moléculas de água.
2. ME sem restrição de posição usando o algoritmo steepest-descent, para relaxar o sistema soluto-solvente.
3. ME sem restrição de posição usando gradiente conjugado.

A dinâmica molecular (DM) consiste dos seguintes passos:

1. DM de 500 ps com restrição de posição do soluto, com o objetivo de permitir a formação das camadas de hidratação.
2. DM de 500 ps sem restrição de posição para equilibrar o sistema.
3. Finalmente uma DM de 10 ns para estudar a interação entre as porfirinas com a água.

A relação água-porfirina foi analisada usando-se a função de distribuição radial (FDR) $g(r)$ durante a DM de 10 ns, com os resultados a seguir.

3.3.1 Heme e PPIX

A Fig. 3.3 mostra o gráfico de $g(r)$ para as moléculas protoporfirina IX e heme. Empregando-se a Energia Livre de Helmholtz na forma $W(r) = -kT \ln g(r)$, demonstra-se que ambas moléculas têm um caráter global hidrofóbico, pois $g(r)$ é menor que 1, gerando um potencial de força média repulsivo, o qual é típico de moléculas hidrofóbicas. Além disso, $g(r)$ não mostra picos característicos de ligações de hidrogênio. A presença do Fe^{2+} não tem um efeito global na hidrofobicidade da PPIX.

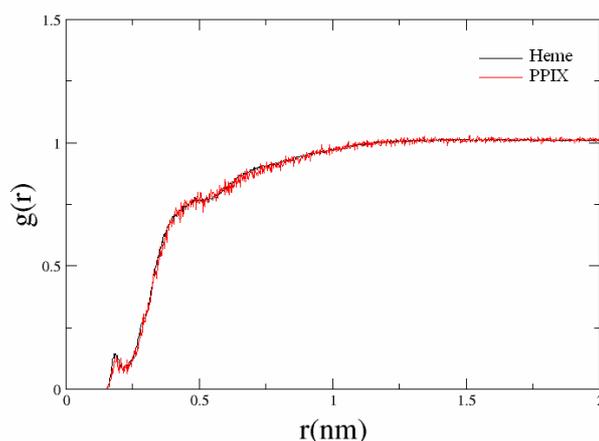


Figura 3.3 Gráfico de $g(r)$ para as moléculas de protoporfirina IX e heme. A distância é em relação às moléculas de água.

3.3.2 Grupo carboxil

O heme e a PPIX têm dois grupos carboxil desprotonados em pH 7.0, com uma carga total de -1 cada um. Em nosso estudo, o gráfico de $g(r)$ ao redor deste grupo mostra o caráter total hidrofílico e uma ponte de hidrogênio bem definida, perto de 0.19 nm. (Fig. 3.4). Nesse caso $g(r)$ atinge valores maiores que 1 e portanto $W(r)$ será atrativa. Na primeira camada de hidratação podemos observar que a presença do íon Fe^{2+} no anel central diminui a afinidade do carboxil pelo solvente. Observamos-nos que as cadeias laterais da PPIX onde os grupos carboxil são localizados se juntam apreciavelmente na presença do Fe^{2+} (Fig. 1). Esta mudança conformacional poderia originar a exclusão de moléculas de água, diminuindo o $g(r)$.

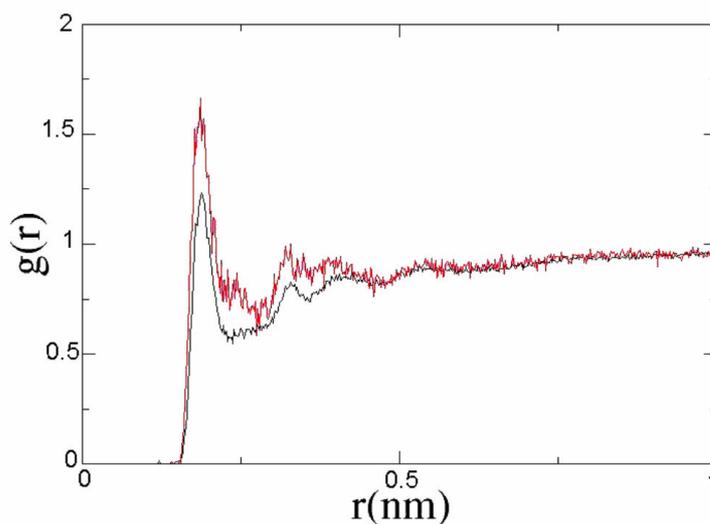


Figura 3.4 Gráfico do $g(r)$ para o grupo carboxil. A distância é com relação aos átomos de hidrogênio da água (preto, para o heme e vermelho, para a PPIX)

3.3.3 Oxigênio do carboxil

A Fig. 3.4 mostra que, como um todo, o grupo carboxil tem um caráter hidrofílico ($g(r) > 1$), mas na Fig. 3.5 pode-se notar que existe um entorno hidrofílico bem localizado nos oxigênios do carboxil. Podemos observar que o primeiro e segundo picos indicam uma forte interação atrativa com o solvente.

Nossos resultados sugerem que a presença do íon Fe^{2+} no anel porfirínico não muda significativamente a hidropaticidade do oxigênio dos grupos carboxil.

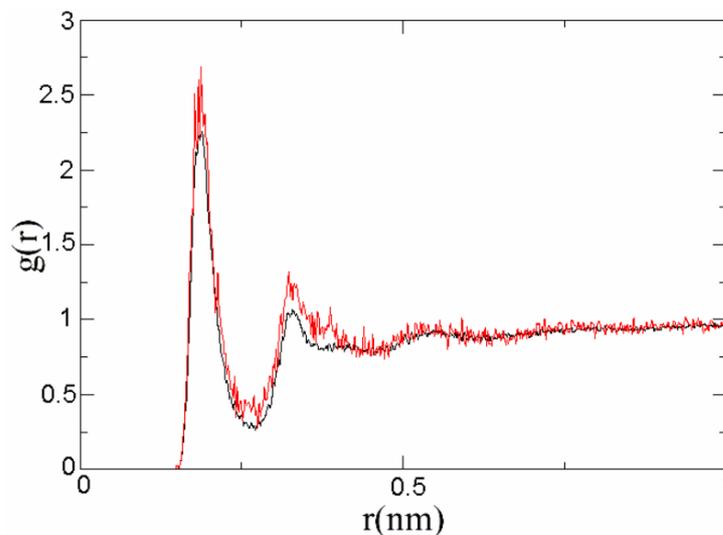


Figura 3.5. Gráfico de $g(r)$ para o oxigênio do carboxil do PPIX e Heme. A distancia refere-se aos átomos de hidrogênio das moléculas de água (preto para o heme e vermelho para o PPIX)

3.3.4 O Fe^{2+} do heme

A Fig 3.6 mostra o $g(r)$ das moléculas de água para o íon Fe^{2+} . Aqui mostra-se, paradoxalmente, que o íon teria um caráter global hidrofóbico pois $g(r)$ é menor que 1. No entanto, o efeito aqui observado é a blindagem do acesso do Fe^{2+} à água pelo anel do heme. A carga parcial do íon Ferro no heme é de cerca de 0,4 (tabela-1), suficiente para atrair moléculas de água (através dos átomos de oxigênio). O íon forma três camadas de hidratação bem definidas, a primeira em aproximadamente 0.19 nm.

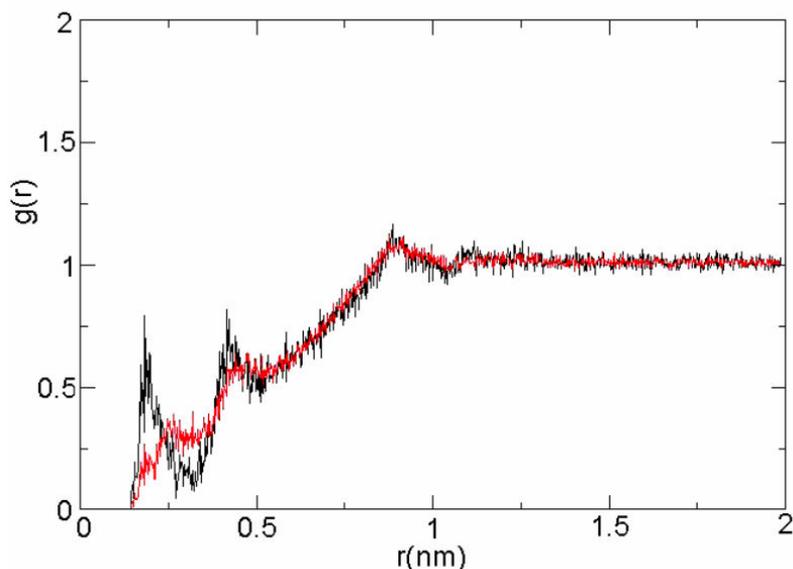


Figura 3.6 Gráfico de $g(r)$ para o íon Fe^{2+} . A distância está referida às moléculas de água (vermelho) ou ao átomo do oxigênio da água (preto).

3.4 DM dos sistemas HSA, HSA-PPIX e HSA-HEME, Propriedades globais

A topologia da HSA foi gerada usando o comando `pdb2gmx` do GROMACS, as topologias das porfirinas foram inseridas nos arquivos com a topologia da HSA. O protocolo usado para a DM destes complexos é mostrado no Apêndice C. As condições de simulação foram as seguintes:

1. Uma distancia do soluto a parede da caixa de 15 Å ao redor da HSA e do complexo HSA-HEME (No caso do HSA-PPIX usamos uma distancia do soluto a parede da caixa de 12 Å)
2. Estabeleceram-se condições periódicas de contorno.
3. Sistema termodinamicamente acoplado a um banho térmico de 310K.
4. Pressão 1 atm.
5. Modelo de água SPC.
6. O sistema tem carga total -16 e -18 (para os complexos do HSA-Porfirinas) e foi neutralizado com Na^+ .
7. Tratamento eletrostático PME.
8. As interações de van der Waals e Coulomb foram consideradas com um corte de 1 nm.
9. Passo na simulação de 2 fs.

10. Trajetórias atômicas colhidas em 20 ns de simulação.

A minimização de energia consiste dos seguintes passos:

1. ME com restrição de posição usando o algoritmo steepest-descent.
2. ME sem restrição de posição usando o algoritmo steepest-descent.
3. ME sem restrição de posição usando gradiente conjugado.

A DM consiste dos seguintes passos:

1. DM de 500 ps com restrição de posição do soluto, com o objetivo de permitir a formação das camadas de hidratação.
2. DM de 500 ps sem restrição de posição para equilibrar o sistema.
3. Finalmente uma DM de 20 ns para estudar a evolução dos complexos na água.

Da Fig. 3.7 podemos observar que a dinâmica molecular da HSA e seus complexos mostram conformações diferentes. Esta diferença é notória principalmente na região de random coil (aminoácidos de 105 até 115) do subdomínio IB, o qual perde flexibilidade por causa do ligante e acompanha a dinâmica do IB. Isto contribui para afastar os subdomínios IB e IIIB, fazendo mais notória sua separação, ver Fig. 3.8.

3.4.1 Desvio médio quadrático

Em simulações de Dinâmica Molecular, mesmo após a etapa prévia de equilíbrio e termalização, quando os átomos do sistema atingem uma distribuição de velocidades compatível com a temperatura, o relaxamento das estruturas ainda continua por tempos que vão além de centenas de picosegundos. Isto ocorre geralmente devido às diferenças entre o ambiente aquoso da simulação de macromoléculas biológicas e a estrutura cristalina inicial. Para avaliar o comportamento global das estruturas foi calculado a Raiz do Desvio Medio Quadrático (Root mean square deviation, RMSD) para os sistemas, no tempo, tomando como referência a estrutura após as minimizações. Estas análises permitem acompanhar dinamicamente as variações da estrutura em relação à estrutura antes da DM. Os resultados são mostrados na Fig. 3.9

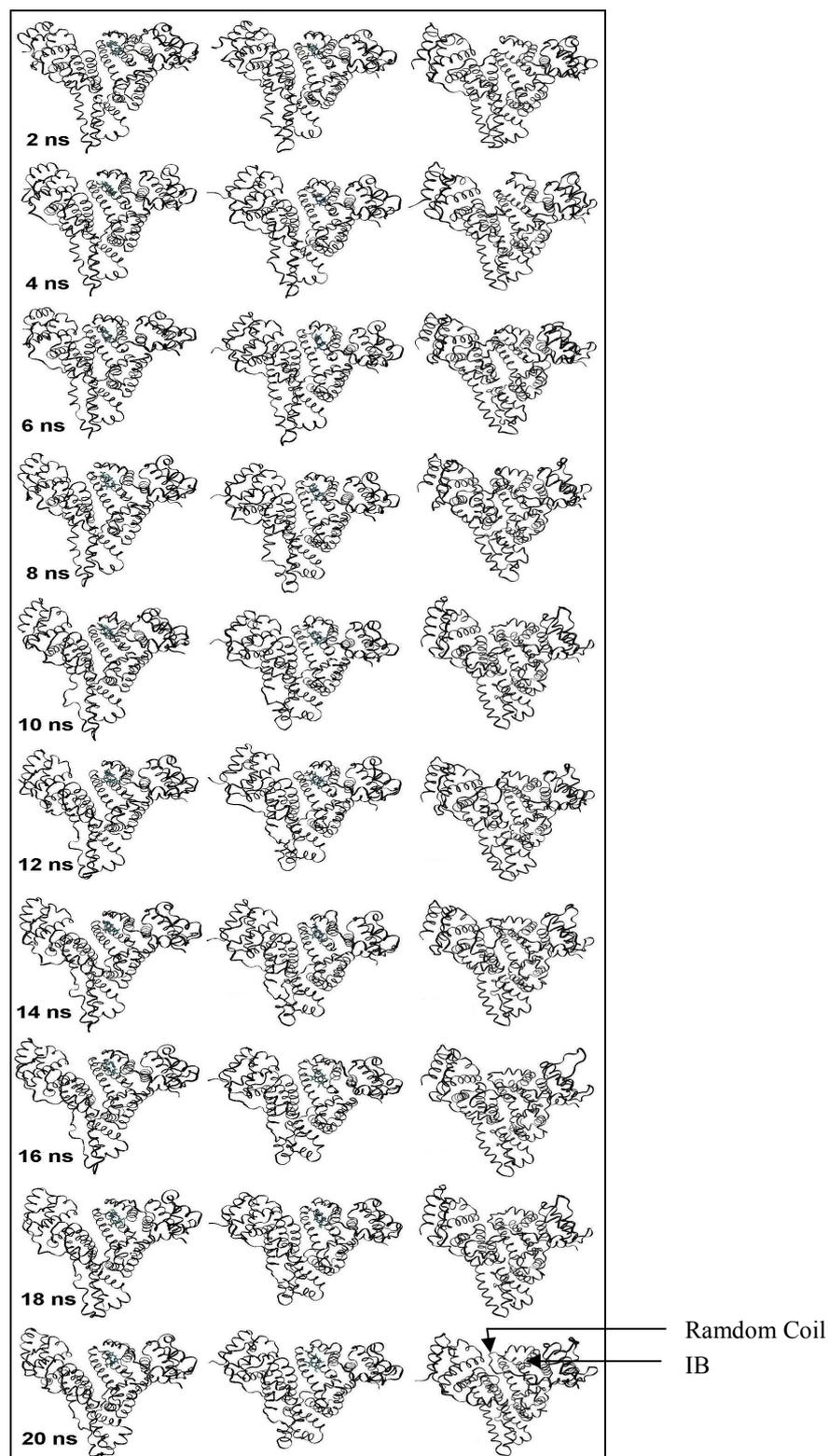


Figura 3.7 Da esquerda para a direita, HSA-HEME, HSA-PPIX e HSA, mostrando a conformação da porfirina cada 2 ns.

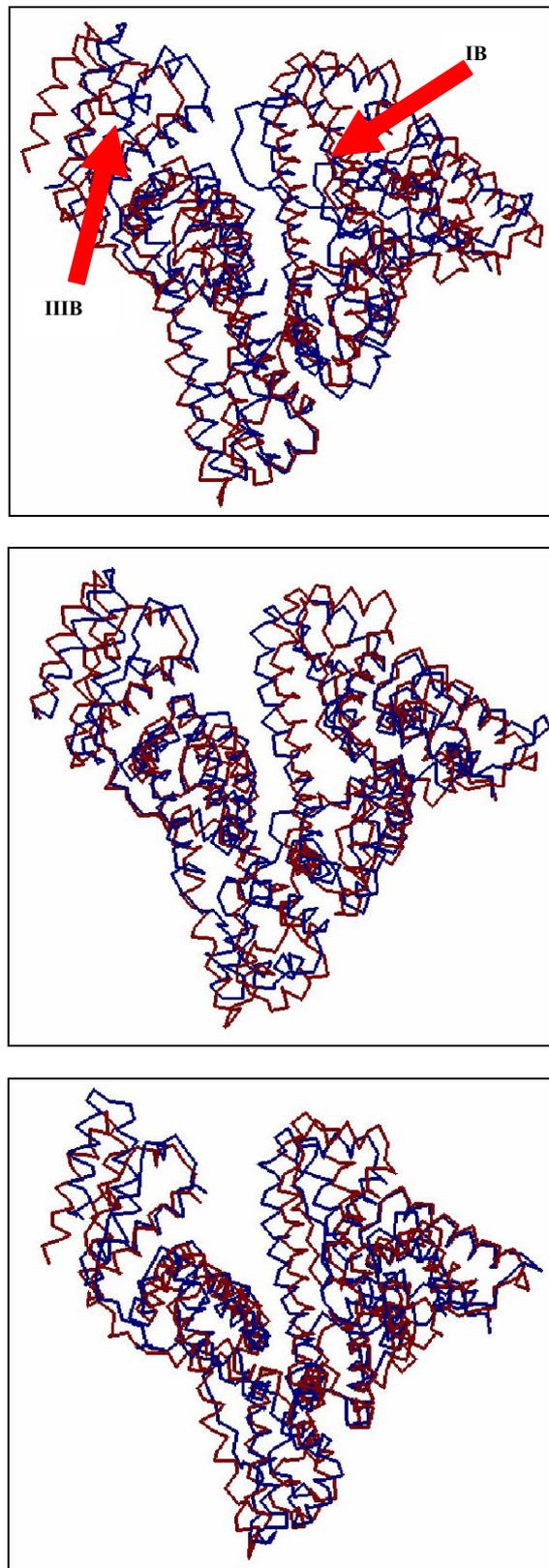


Figura 3.8 De cima para baixo, sobreposição da estrutura inicial (marrom) e final (azul) da HSA, HSA-PPIX e HSA-HEME (o ligante não é mostrado).

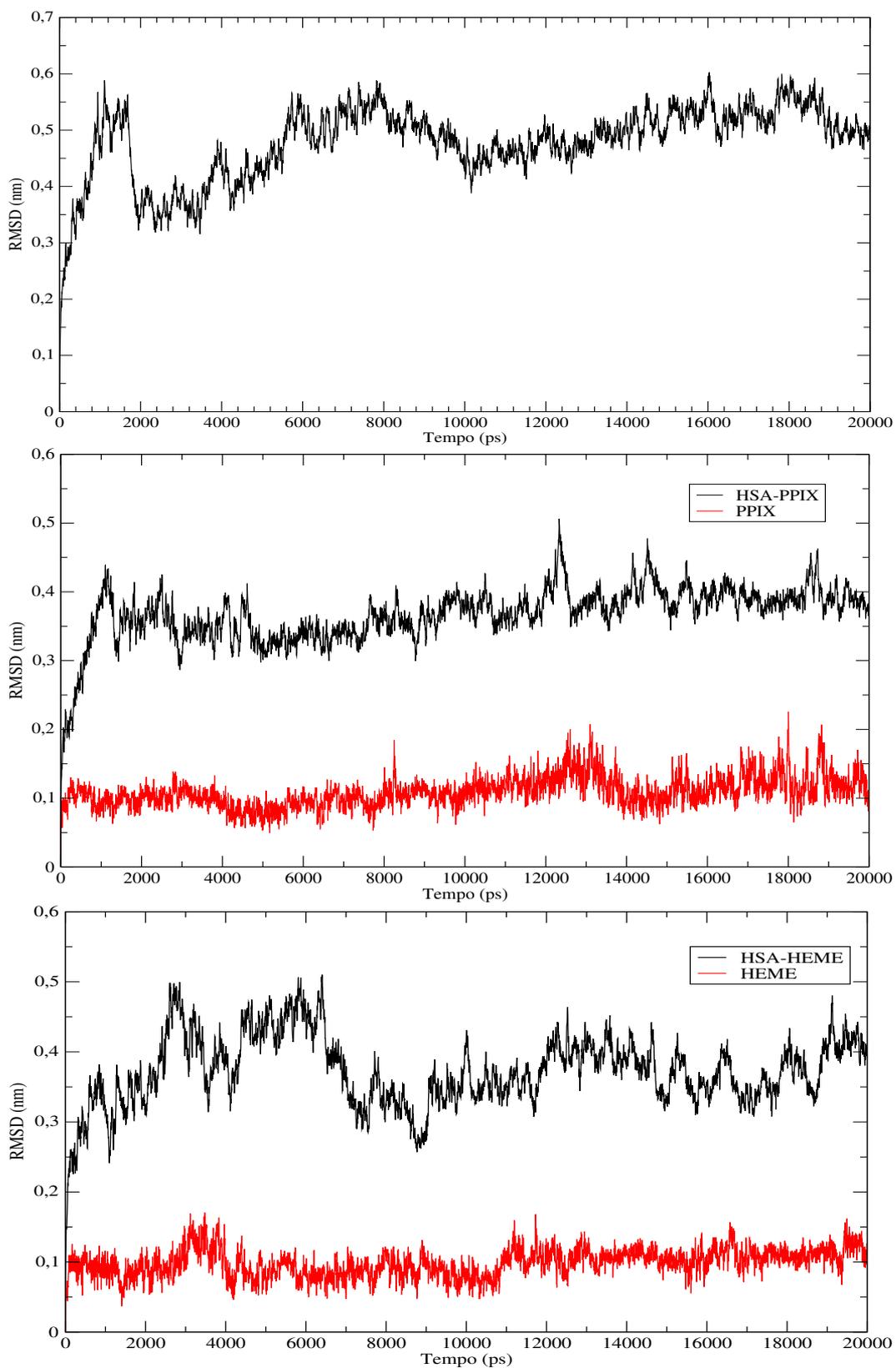


Figura 3.9 De cima para baixo: Em preto, RMSD da cadeia de HSA, HSA-PPIX e HSA-HEME em relação à cadeia da estrutura inicial. Em vermelho, RMSD dos ligantes em relação ao ligante na estrutura inicial.

Da Fig. 3.9 podemos observar que o HSA e o HSA-heme conseguem se estabilizar totalmente a partir dos 10 ns, não sendo assim com o complexo HSA-PPIX, o qual se estabilizou nos primeiros 1500 ps. Por esta razão, nós tomaremos como faixa temporal útil para análise de 10 – 20 ns, nos três sistemas.

Podemos observar que os ligantes estabilizam rapidamente e que acompanham as flutuações globais que a proteína sofre. No caso do complexo HSA-PPIX no intervalo de 1200 a 1400 ps, a proteína sofre uma grande flutuação que, como veremos quando analisarmos o raio de giro, isso pode ser devida a um movimento de rotação ou de “respiração” da proteína. Neste caso, a PPIX acompanha as mudanças de seu hospedeiro.

No caso dos dois complexos o ligante acompanha as mudanças do hospedeiro, isto é notório no HSA-HEME no intervalo de 3 - 4ns.

Para ver o tempo de estabilização do ligante na proteína fazemos um zoom no intervalo de tempo de 0 – 1 ns, como se mostra nas Figuras 3.10 e 3.11.

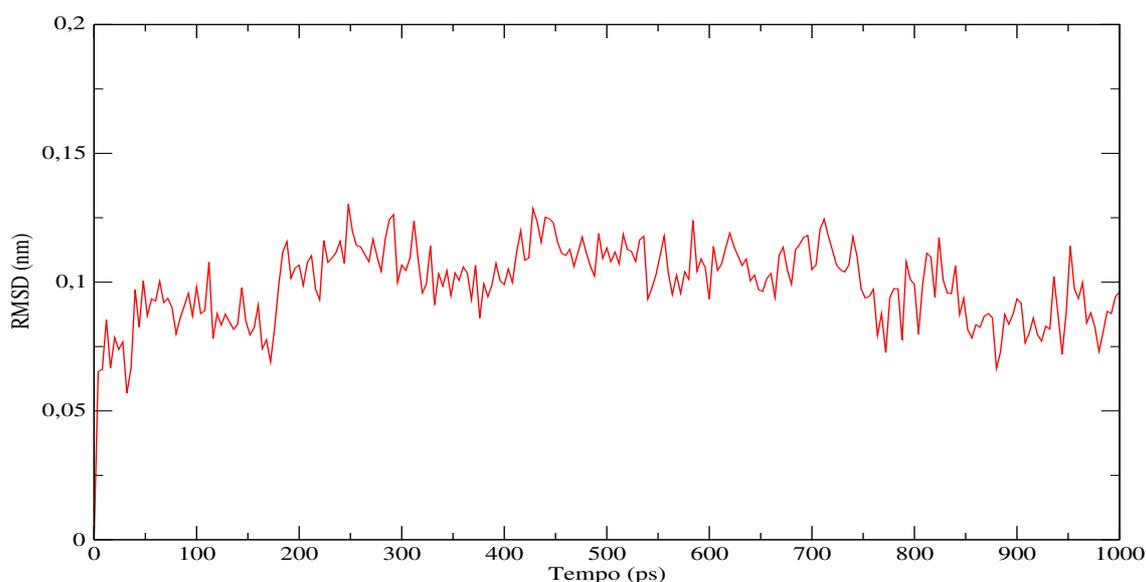


Figura 3.10 RMSD da PPIX com relação a PPIX na estrutura inicial, como se pode observar, o ligante se estabiliza nos primeiros 250 ps

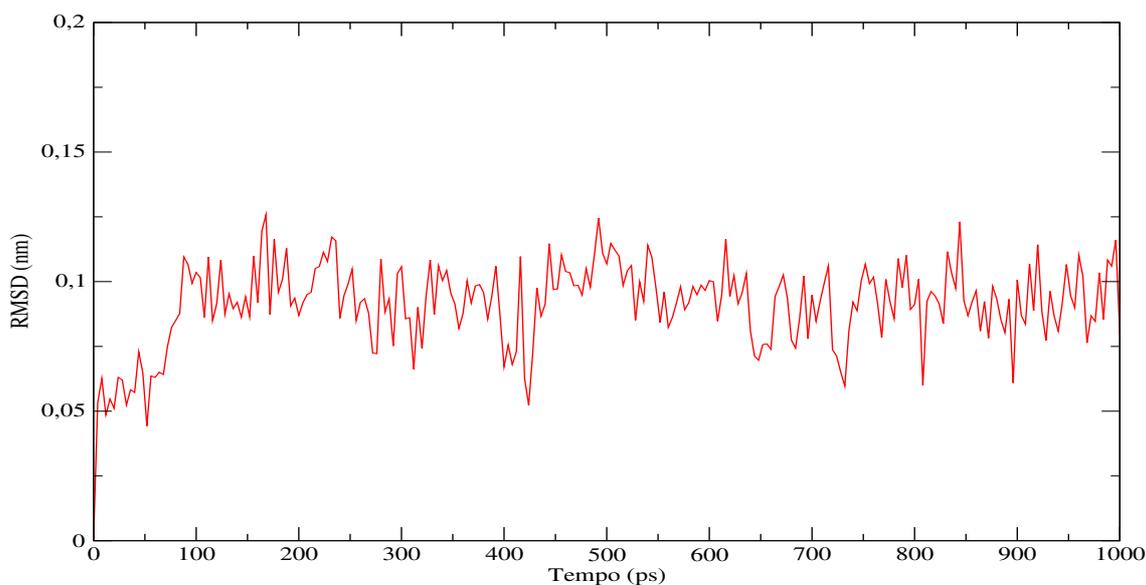


Figura 3.11 RMSD do heme no sítio de ligação durante o primeiro nano segundo da simulação. Como se pode observar, o heme se estabiliza nos primeiros 150 ps.

Nestas últimas duas figuras, observamos que os ligantes se estabilizam rapidamente no sítio de ligação principal do subdomínio IB. O PPIX se estabiliza nos primeiros 250 ps. Já o heme se estabiliza mais em aproximadamente 150 ps. Como veremos mais adiante quando analisaremos as pontes de hidrogênio, esta diferença no tempo de estabilização poderia ser explicada pelo fato que a LYS-190 estaria atuando como uma tampa molecular, que fixaria o heme no bolso hidrofóbico. Como veremos a LYS-190 forma pontes de hidrogênio com os oxigênios do grupo carboxil do heme.

3.4.2 Desvio médio quadrático 3D

Com o objetivo de se ter uma melhor visualização de quais sub-domínios mais contribuem com as mudanças no RMSD, analisaremos o RMSD-3D para cada sistema. Para isto usamos o programa MOLMOL (<http://hugin.ethz.ch/wuthrich/software/molmol/index.html>). As Figuras 3.12, 3.13 e 3.14 mostram as quatro vistas principais da proteína.

Nas Figuras 3.13 e 3.14 podemos observar o efeito estabilizador dos ligantes na proteína, na região mostrada na Fig. 3.12 (seta vermelha). Esta região em “random coil” se mostra ainda mais estável na presença do heme que da PPIX.

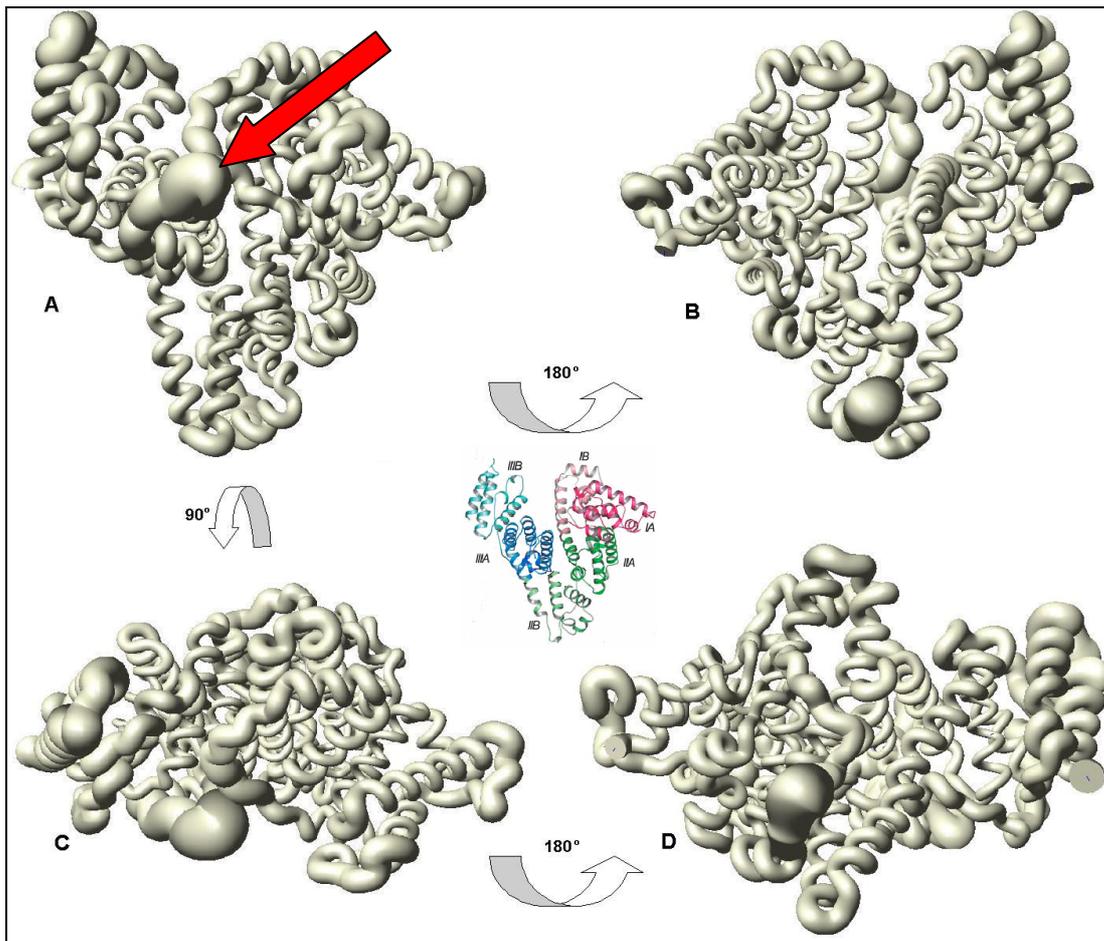


Figura 3.12 RMSD 3D do HSA, mostrando as quatro vistas principais; A: vista frontal; B: vista posterior; C: vista superior; D: vista inferior. Como podemos observar o HSA tem 4 subdomínios principais com muita mobilidade e são os mais expostos ao solvente. A figura central no corresponde à conformação A, é só referencial e mostra uma vista frontal com as posições dos subdomínios.

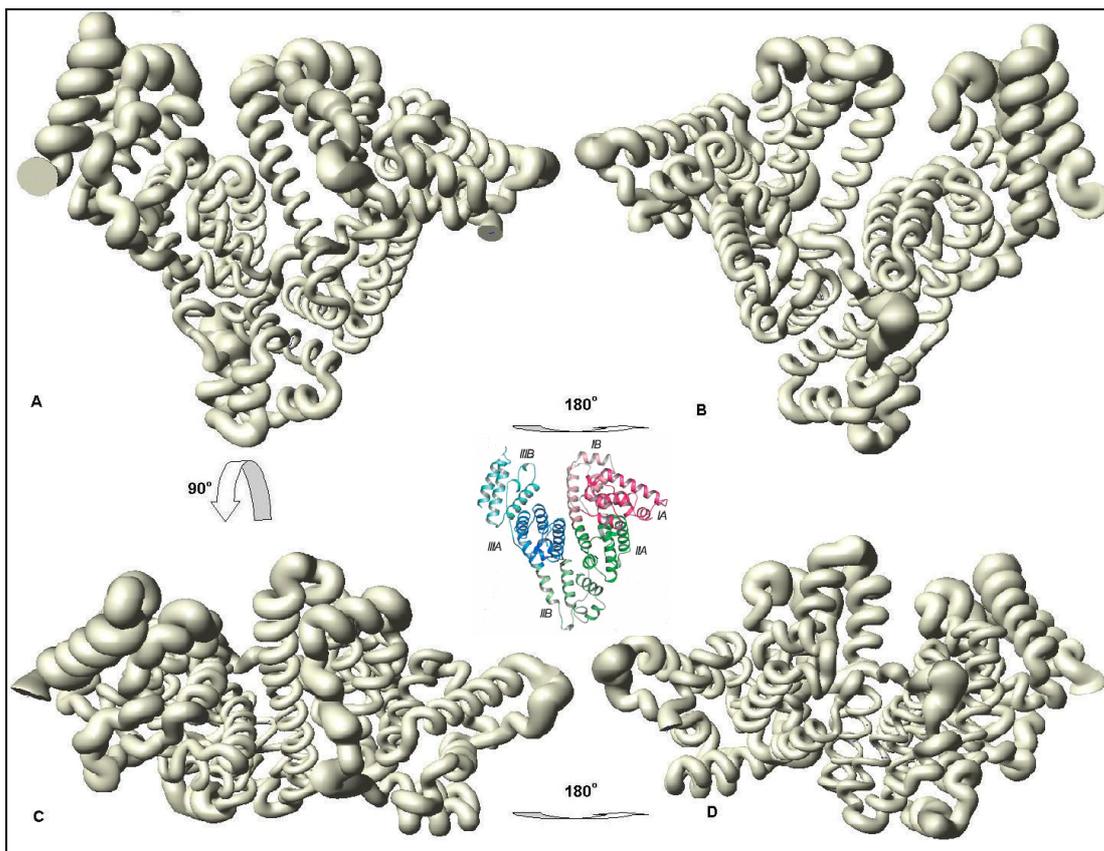


Figura 3.13 RMSD 3D do HSA-PPIX, mostrando as quatro vistas principais; A: vista frontal; B: vista posterior; C: vista superior; D: vista inferior. (o ligante não é mostrado). A figura central não corresponde à conformação A, é só referencial e mostra uma vista frontal com as posições dos subdomínios.

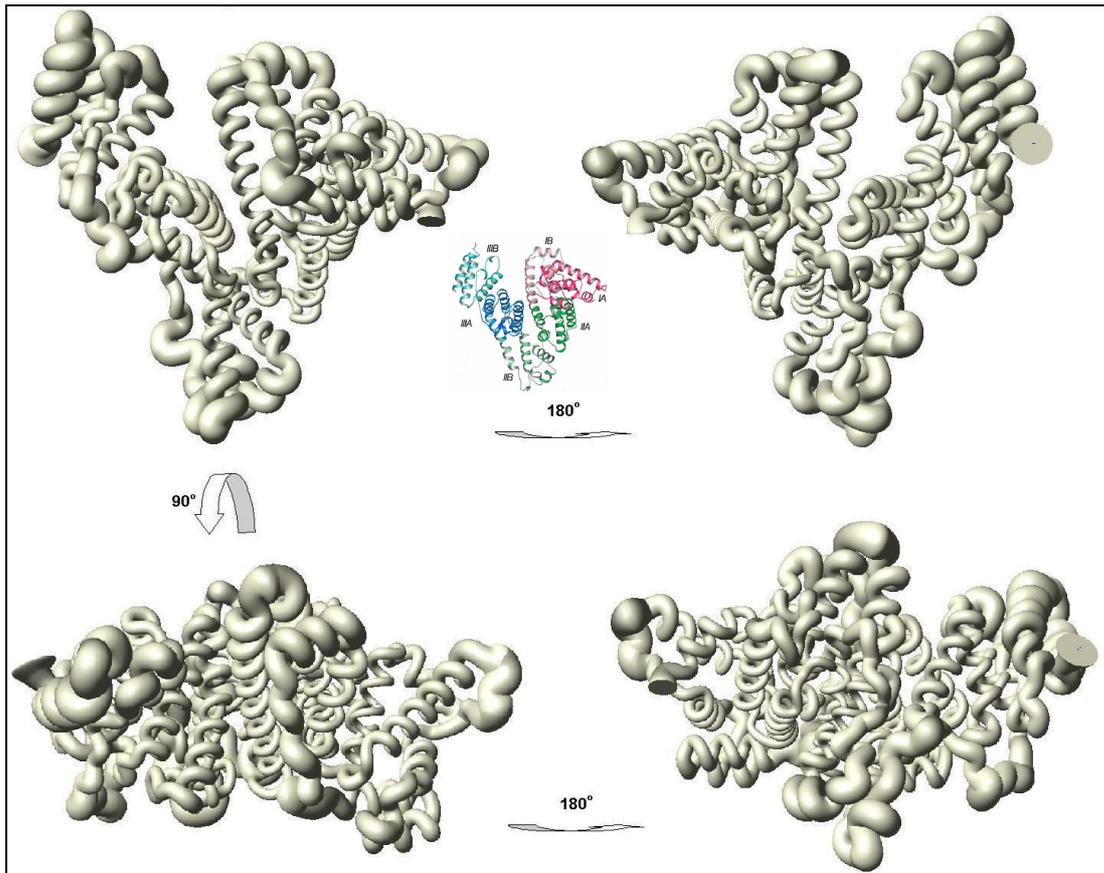


Figura 3.14 RMSD 3D do HSA-HEME, mostrando as quatro vistas principais; A: vista frontal; B: vista posterior; C: vista superior; D: vista inferior (o ligante não é mostrado). A figura central no corresponde à conformação A, é só referencial e mostra uma vista frontal com as posições dos subdomínios.

3.4.3 Raio de Giro

O raio de giro nos dá informação a respeito da evolução da geometria da proteína, se esta gira ou se esta realiza movimentos periódicos de contração e expansão (respiração). Estes movimentos de giro ou de contração acontecem quando o raio de giro com respeito aos eixos se cruzam. A seguir mostramos o raio de giro para os três sistemas.

O raio de giro é calculado com o comando `g_gyrate` do Gromacs usando a seguinte fórmula:

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

Onde m_i é a massa do átomo i e r_i a posição do átomo com referência ao centro de massa da molécula

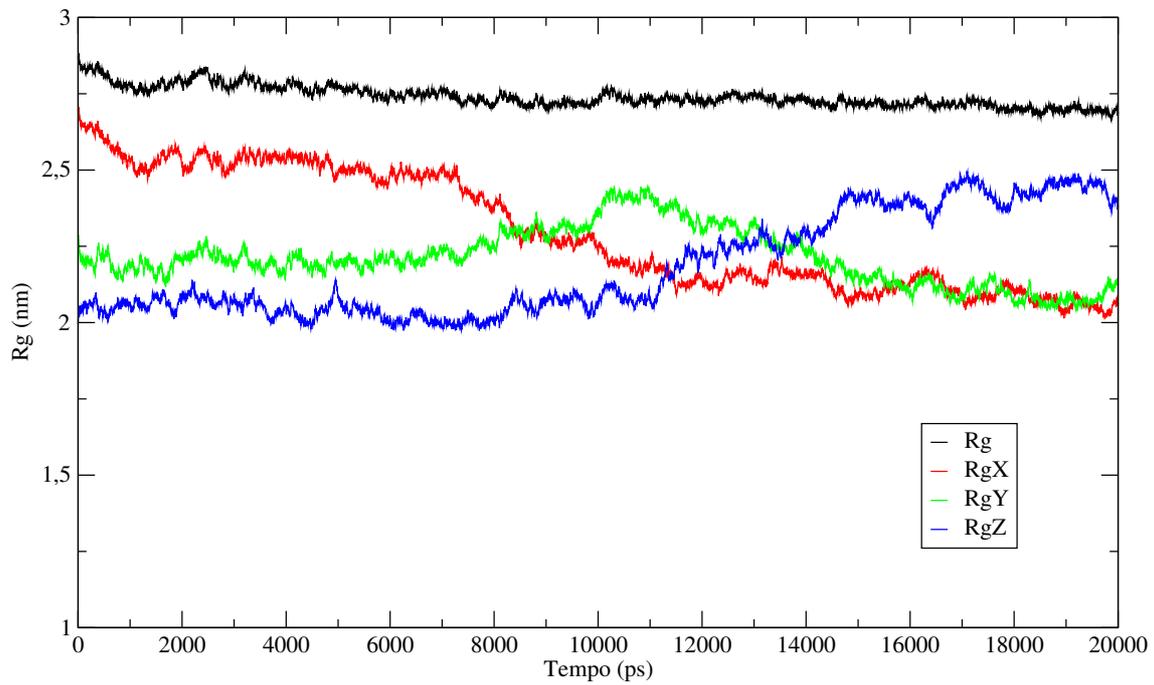


Figura 3.15 Raio de giro da HSA

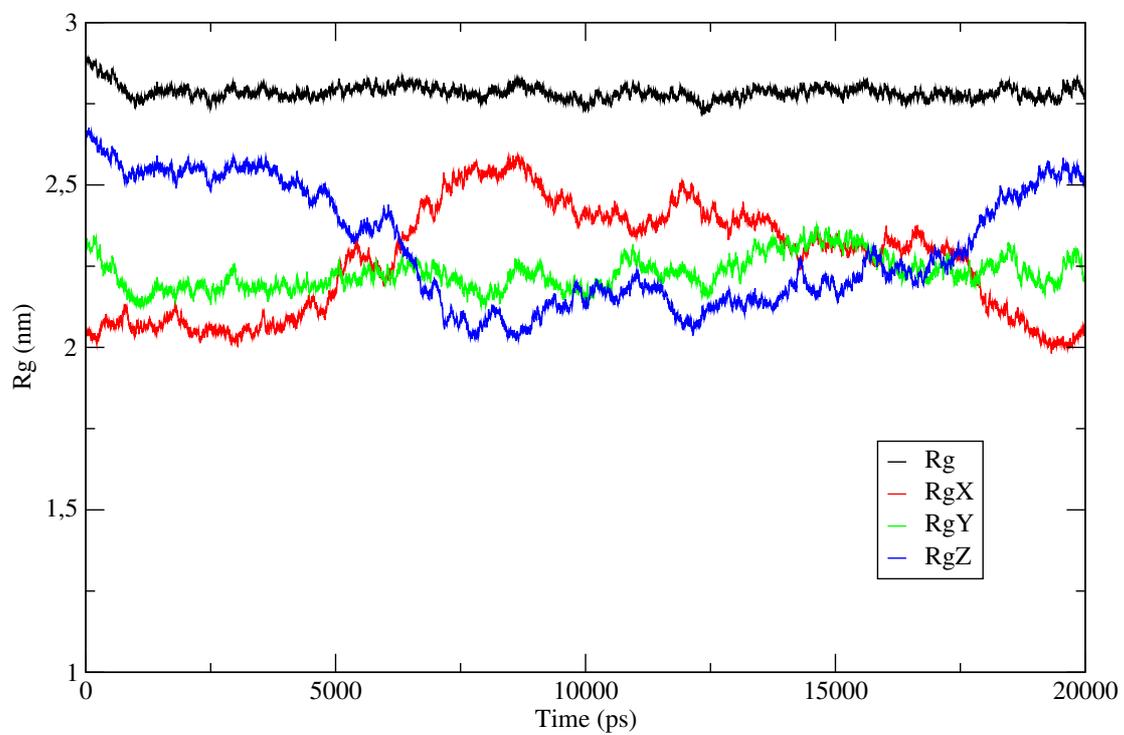


Figura 3.16 Raio de giro do complexo HSA-PPIX

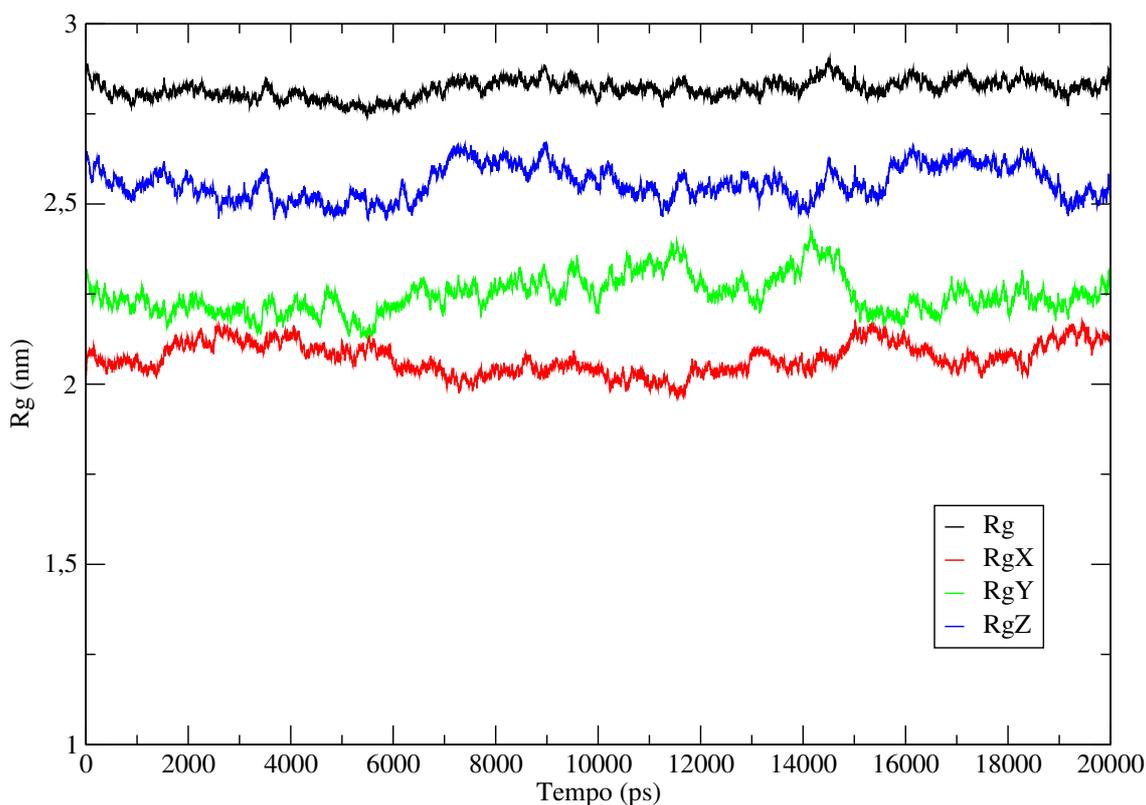


Figura 3.17 Raio de giro do complexo HSA-HEME

Nestas simulações a HSA e o complexo HSA-PPIX apresentaram grandes movimentos de domínios, com oscilações e rotações, enquanto o complexo HSA-HEME permaneceu mais estável, apresentando somente oscilações de pequenas amplitudes. Porém, esses movimentos não são conclusivos, pois estamos analisando somente 20 ns e uma única simulação de cada sistema. Assim, não temos amostragens temporais ou de ensemble suficientes para análise, por exemplo, de movimentos de baixa frequência e grandes amplitudes. Na escala de tempo de dezenas de nanossegundos em complexos macromoleculares com mais de 100.000 átomos, como o que está em estudo, são possíveis várias análises sobre flutuações locais, estrutura e estabilidade de ligações de hidrogênio com ligantes e caracterização da superfície intermolecular, como será feito a seguir.

3.4.4 Evolução da energia

Para ver se o sistema é estável energeticamente, fizemos o gráfico da evolução da energia total do sistema no tempo. Na Fig. 3.18, podemos ver que os sistemas HSA e seus complexos são estáveis durante toda a DM. Fazendo um

zoom no intervalo de 0 – 1 ns como mostra a Fig. 3.19, vemos que a partir dos 100 ps, pode-se considerar que o sistema é estável energeticamente.

A diferença de energia entre os sistemas HSA, HSA-heme com referência ao HSA-PPIX é devido ao número das moléculas de água. No último sistema se considerou só uma distância do soluto até a parede da caixa de 12 Å, diferentemente dos 15 Å considerados para os dois primeiros.

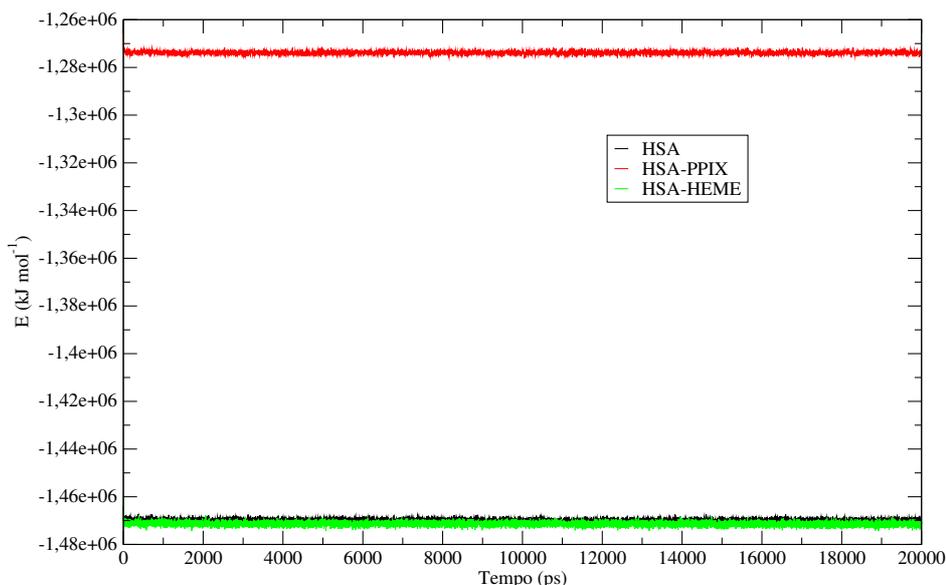


Figura 3.18 Energia total do HSA e seus complexos, mostrando que o sistema é estável energeticamente.

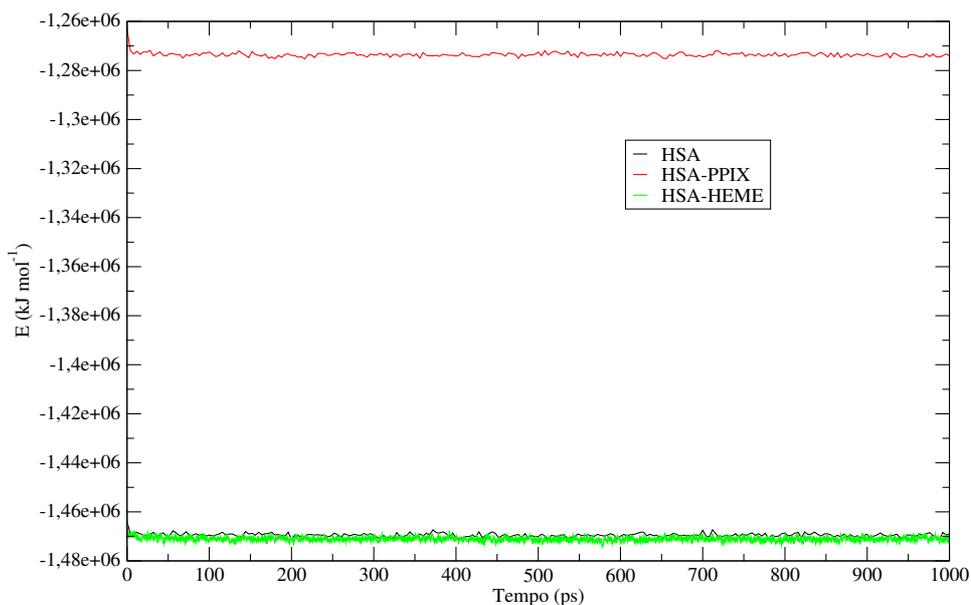


Figura 3.19 Energia total do HSA e seus complexos, mostrando que o sistema já é estável a partir dos 100 ps.

3.4.5 Flexibilidade dos resíduos na proteína

Usaremos a flutuação da raiz média quadrática (root mean square fluctuations, RMSF) para fazer um estudo da flexibilidade dos diferentes subdomínios do HSA e ver o efeito do ligante nessas regiões. A RMSF é calculada comparando-se as estruturas instantâneas obtidas em cada passo da simulação com a estrutura inicial antes da DM. Usamos os átomos de carbono alfa da proteína. Os resultados para cada complexo são mostrados nas Figuras 3.20 e 3.21. Já a Fig. 3.22 mostra a superposição dos complexos HSA-HEME e HSA-PPIX.

Pode-se observar o seguinte:

A região de “random coil” compreendida entre os aminoácidos 105 e 115 experimenta grandes flutuações (RMSF do HSA, Fig. 3.20), o que é mostrado também no RMSD-3D.

Na Fig. 3.20 para o HSA, os subdomínios que experimentam maior RMSF são os IIB e IIIB enquanto os que experimentam o menor RMSF são os subdomínios IIA e IIIA (exceto na região “random coil” entre os aminoácidos 460-480).

Este resultado é interessante tendo presente que os subdomínios IIA e IIIA são os principais sítios de ligação da proteína, e se esperaria que regiões com grande flexibilidade fossem também as de maior atividade regulatória. Mas Artali et al. (2005) já relataram estudos teóricos que confirmam nossos resultados.

Quando o HSA é complexado com o ligante, o RMSF do HSA muda, mostrando que os “random coils” nos subdomínios IB e IIIA são interdependentes e a mobilidade de um afeta a mobilidade do outro (Fig. 3.22). Assim, em geral o padrão do RMSF do HSA muda na presença das diferentes porfirinas.

Quando comparamos os RMSF dos complexos HSA-PPIX e HSA-heme, observamos que em geral o PPIX tem um efeito estabilizador mais pronunciado sobre a proteína nas distintas regiões do HSA, da seguinte forma:

Entre os resíduos 260-290, 433-446, 462-473, 493-503, 547-582 o heme aumenta a flexibilidade da proteína.

A PPIX tem efeitos pontuais importantes nas regiões 347-356 e 361-380 onde a flexibilidade aumenta pronunciadamente.

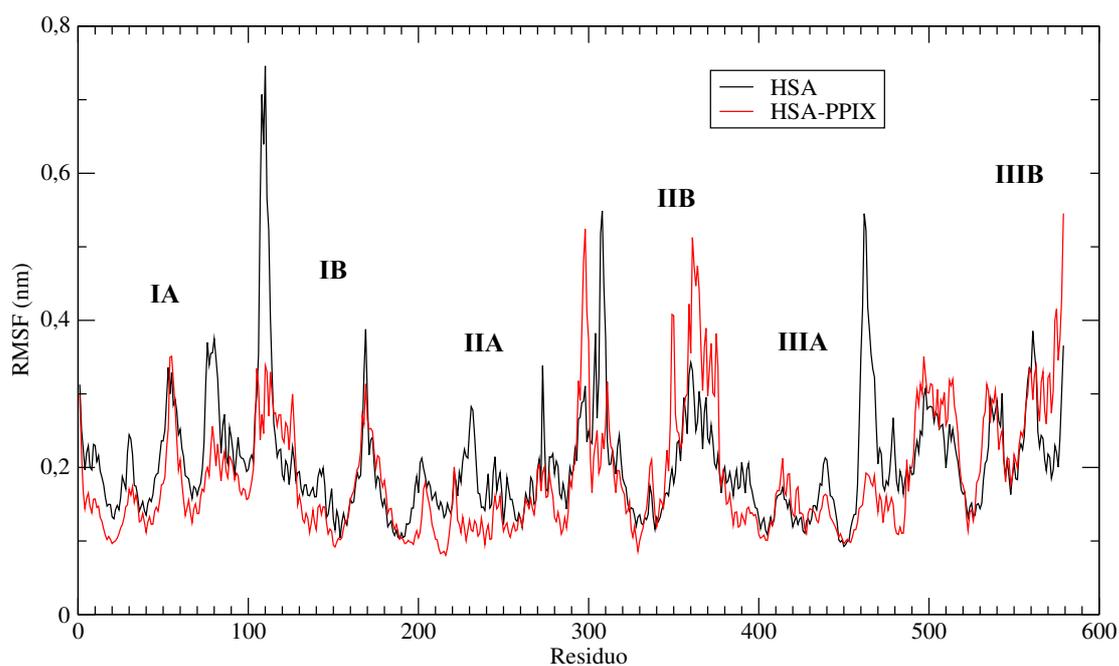


Figura 3.20 RMSF de HSA e de HSA complexada com PPIX, mostrando as variações produzidas nos diferentes subdomínios e os possíveis efeitos alostéricos produzidos na

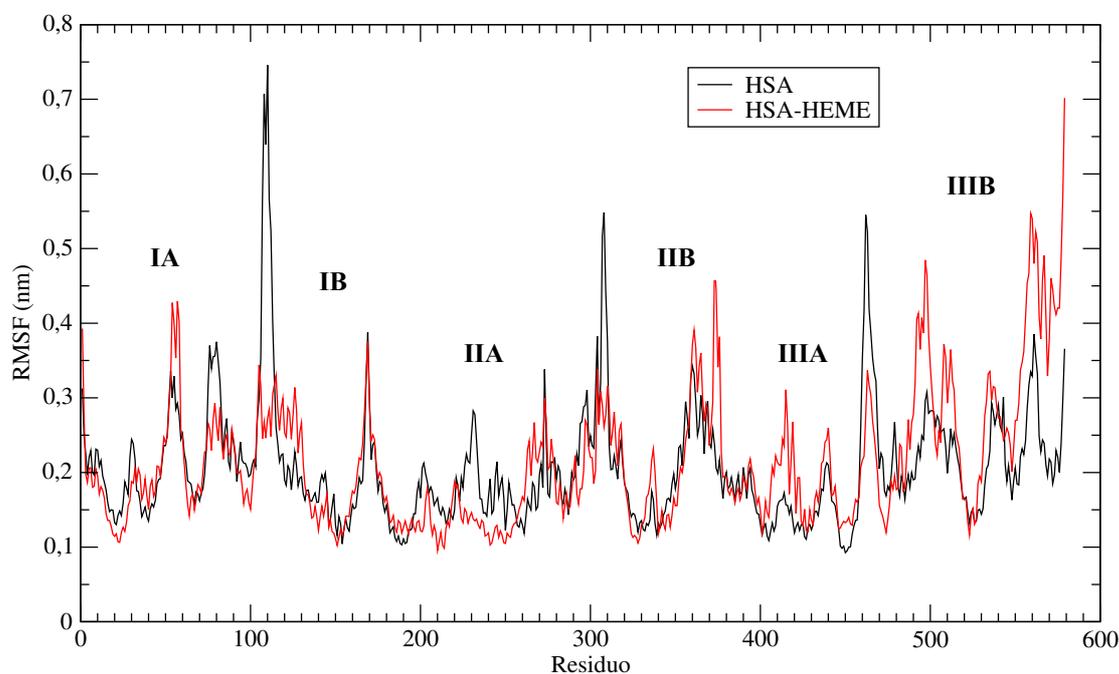


Figura 3.21 RMSF de HSA e de HSA complexada com heme, mostrando as variações produzidas nos diferentes subdomínios e os possíveis efeitos alostéricos produzidos no HSA.

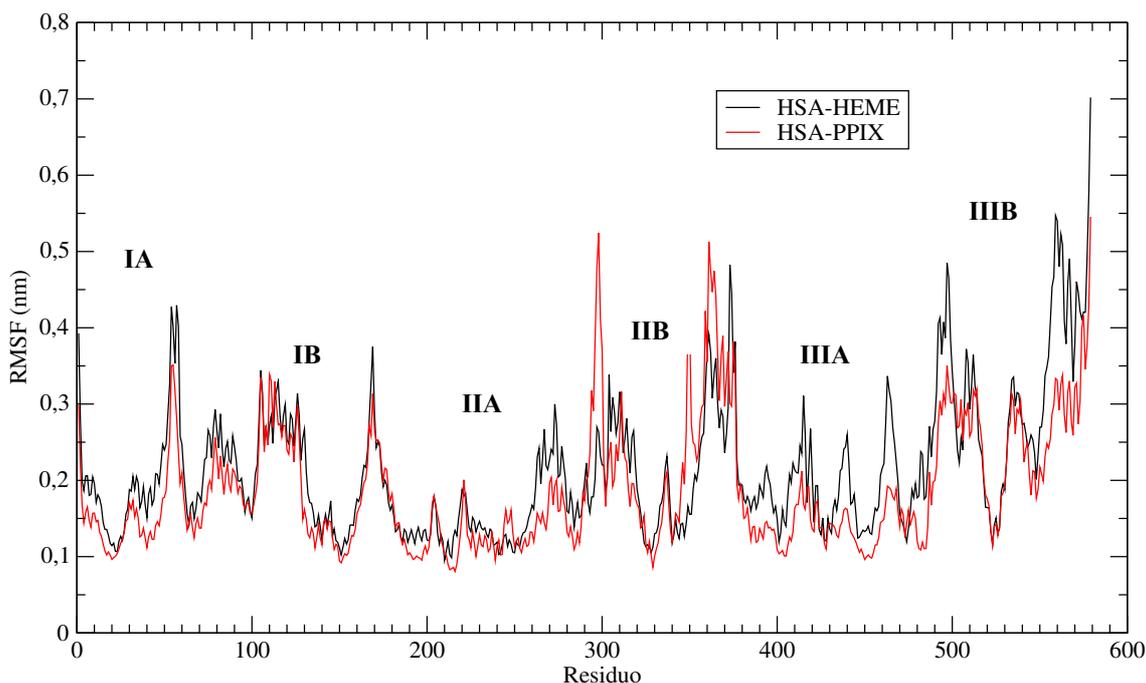


Figura 3.22 RMSF do HSA-heme e do HSA-PPIX, mostrando as variações produzidas nos diferentes subdomínios pela presença do íon Fe^{2+} .

3.5

Superfície de contato intermolecular entre HSA e as porfirinas

Quais são os resíduos que mais interagem com as porfirinas?

Para responder a esta pergunta faremos uso do conceito de superfície de contacto intermolecular (SCI). Com esta informação visualizaremos a distância no tempo entre os diferentes aminoácidos (e os átomos principais) com referência aos ligantes.

Para determinar quais são os aminoácidos do HSA que interagem com as porfirinas calculou-se a SCI entre os aminoácidos da proteína e os ligantes. A SCI é determinada pela interseção entre a SAS do ligante e a SAS da proteína.

Para isso se gerou um arquivo multi pdb com o comando `trjconv` do GROMACS, considerando somente os últimos 10 ns da DM, registrando-se as posições atômicas com um espaçamento temporal de 100 ps. Para o cálculo da SCI se usou o programa SURF desenvolvido no Laboratório de Modelagem e Dinâmica Molecular (LMDM) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

O programa SURF está baseado no algoritmo de Connolly (Connolly, 1983) e precisa, além do multi pdb, dados como o raio de prova (1.4 Å) e a densidade de

pontos (1 ponto/Å²). Com estes dados disponíveis, rodo-se o SURF e obtive-se as áreas de contato intermolecular dos aminoácidos que interagem com as porfirinas. Com estes dados pode-se recriar o micro entorno molecular de cada uma das porfirinas, determinar a importância dos aminoácidos na estabilidade do sítio ativo, determinar a hidropaticidade do sítio de ancoramento, determinar a natureza da interação entre os resíduos do HSA e as porfirinas, além de várias outras informações.

Da Fig. 3.23 na qual observamos a área de contato intermolecular HSA-HEME e HSA-PPIX por resíduo. Os 10 principais aminoácidos do HSA que interagem como o heme são os seguintes :

ARG-186, TYR-161, ILE-142, LEU-115, ARG-145, TYR-138, HIS-146, LEU-139, LYS-190, LEU-154

As LEU, ILEU, TYR e HIS são aminoácidos com caráter hidrofóbico e, por conseguinte, o HEME fica ancorado num bolso predominantemente hidrofóbico. Estes aminoácidos parecem ser de muita importância na alta afinidade do HSA pelo HEME.

No caso do HSA com o PPIX, os principais aminoácidos que interagem são os seguintes:

TYR-138, TYR-161, LEU-139, ILE-142, LEU-154, LEU-115, LEU-135, PHE-157, ARG-186, ALA-158.

Como podemos ver o PPIX interage com mais leucinas, e fica ancorado no bolso hidrofóbico do heme. Também podemos observar cinco regiões de interação claramente definidas centradas nos resíduos: LEU-115, TYR-138, LEU-154, TYR-161, ARG-186, o que poderia definir um padrão de interação do HSA com estas porfirinas.

Na região centrada na TYR-138 a PPIX apresenta uma maior SCI comparada com o heme. Isto é devido à contribuição dos aminoácidos LEU-139 e TYR-138.

Na região centrada na LEU-154 se observa que a PPIX apresenta maior SCI devido à contribuição dos aminoácidos LEU-154 e LEU-155.

Na região centrada na TYR-161 se observa que a PPIX apresenta maior SCI devido a contribuição dos aminoácidos PHE-157 e ALA-158.

Já na região centrada na ARG-186 o heme apresenta maior SCI devido à contribuição dos aminoácidos ARG-186 e LEU-182.

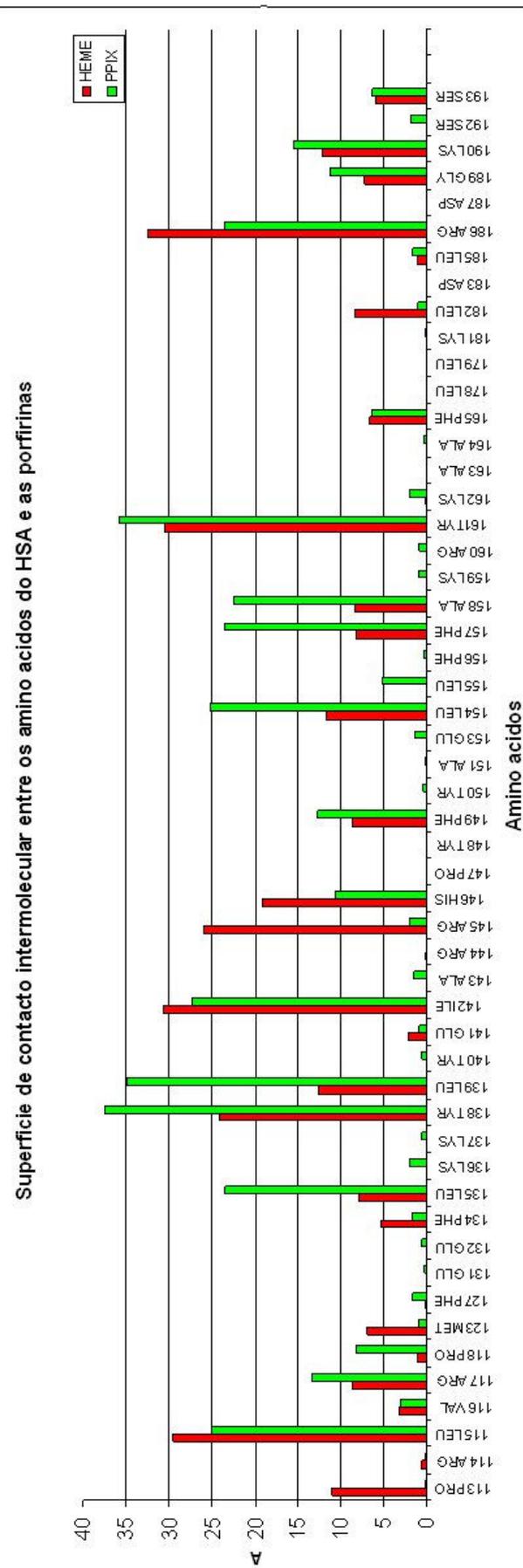


Figura 3.23 Área de contacto intermolecular entre HSA e as porfirinas

3.6

Distância entre os aminoácidos do HSA que mais interagem com as porfirinas

3.6.1

Distância entre os aminoácidos do HSA que mais interagem com PPIX

Para visualizar a relação entre os movimentos dos principais aminoácidos analisaremos a distância entre os centros de massa (CM) do PPIX e dos três aminoácidos que mais interagem com a PPIX com respeito ao CM da cadeia da proteína.

Como sabemos dos resultados do RMSD da PPIX na proteína, esta estabiliza nos primeiros 250 ps, por conseguinte analisaremos os dados de toda a DM.

Na Fig. 3.24 vemos que o único aminoácido que poderia estar realizando algum tipo de enlace com a PPIX seria a TYR-161. A distância mínima é de 1 Å no tempo de 8470 ps e a distância máxima é de 3,6 Å em 18753 ps.

Observa-se que nos primeiros 4 ns a TYR-161 acompanha o comportamento do ligante. Depois desse tempo, o aminoácido sofre reacomodações até se estabilizar definitivamente depois do 10.5 ns, quando passa a seguir o padrão de conduta da PPIX.

A TYR-138 e LEU-139 seguem o mesmo padrão de conduta do ligante com uma distância média de separação com referência ao ligante de 7,3 Å e 4,5 Å, respectivamente.

Quais seriam as causas pelas quais a TYR-161 sofre essa série de reacomodações no intervalo entre 4 e 10,5 ns?

Para responder a esta pergunta faremos uma análise mais detalhada da interação TYR-161 e a PPIX considerando os átomos interagentes. Da DM se observou que o átomo de oxigênio do OH interage com o anel porfirínico, mas quais são os átomos de nitrogênio do anel que têm função estabilizadora nesta interação?

Para responder a esta pergunta graficamos a distância entre o oxigênio OH-TYR161 e os nitrogênios NAW-PPIX e a distância entre oxigênio OH-TYR161 e o nitrogênio NAE-PPIX.

Observa-se na Fig. 3.25 que o oxigênio permanece ligado com uma distância média de 4 Å, sendo esta ligação definida a partir dos 10.5 ns.

Na Fig. 3.26 mostramos a distância entre o átomo de oxigênio OH-TYR161 e os átomos de nitrogênio restantes do anel. Observa-se que durante os primeiros 10.5 ns o oxigênio tem uma distância média de 4 Å, para depois se afastar dos nitrogênios a uma distância média de 5,5 Å. Isto nos indica que a TYR-161 fica inicialmente armadilhada no anel porfirínico por causa dos nitrogênios e depois dos 10.5 ns ela se estabiliza basicamente adotando uma posição fixa com

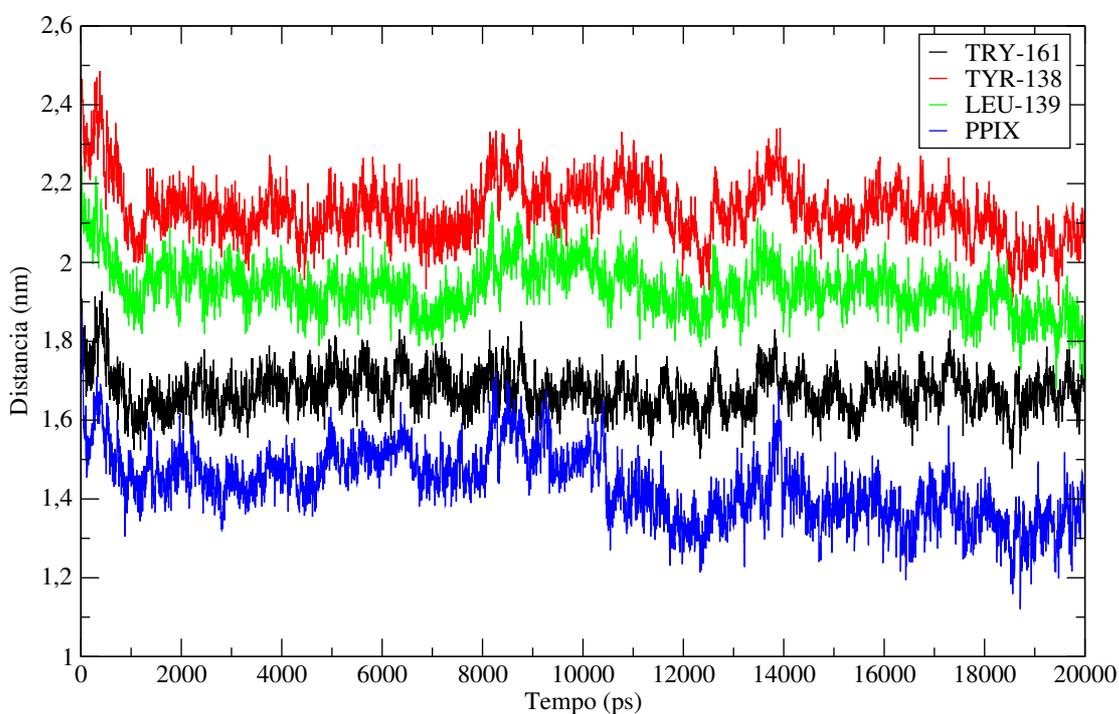


Figura 3.24 Distância do centro de massas dos aminoácidos e do ligante PPIX à cadeia de HSA. Pode-se observar a correlação entre as posições dos aminoácidos e do ligante.

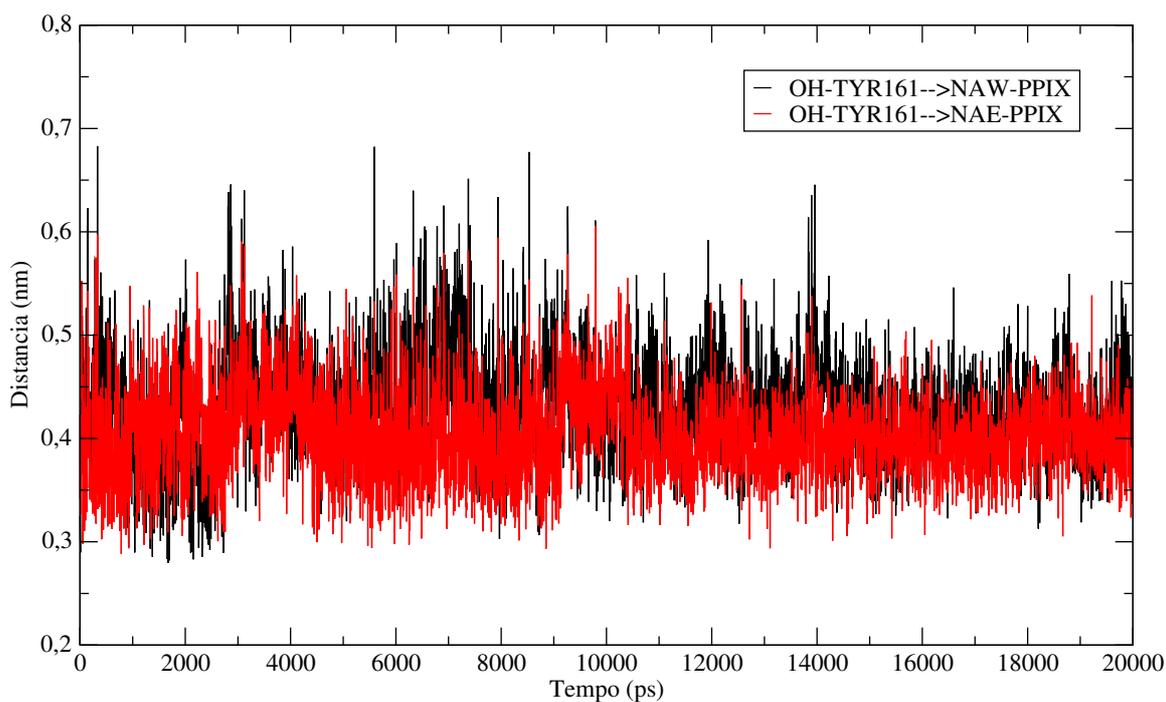


Figura 3.25 Distância entre o OH da TYR-161 e os nitrogênios NAW e NAE do ligante PPIX, mostrando que durante a DM a distância média permanece a mesma.

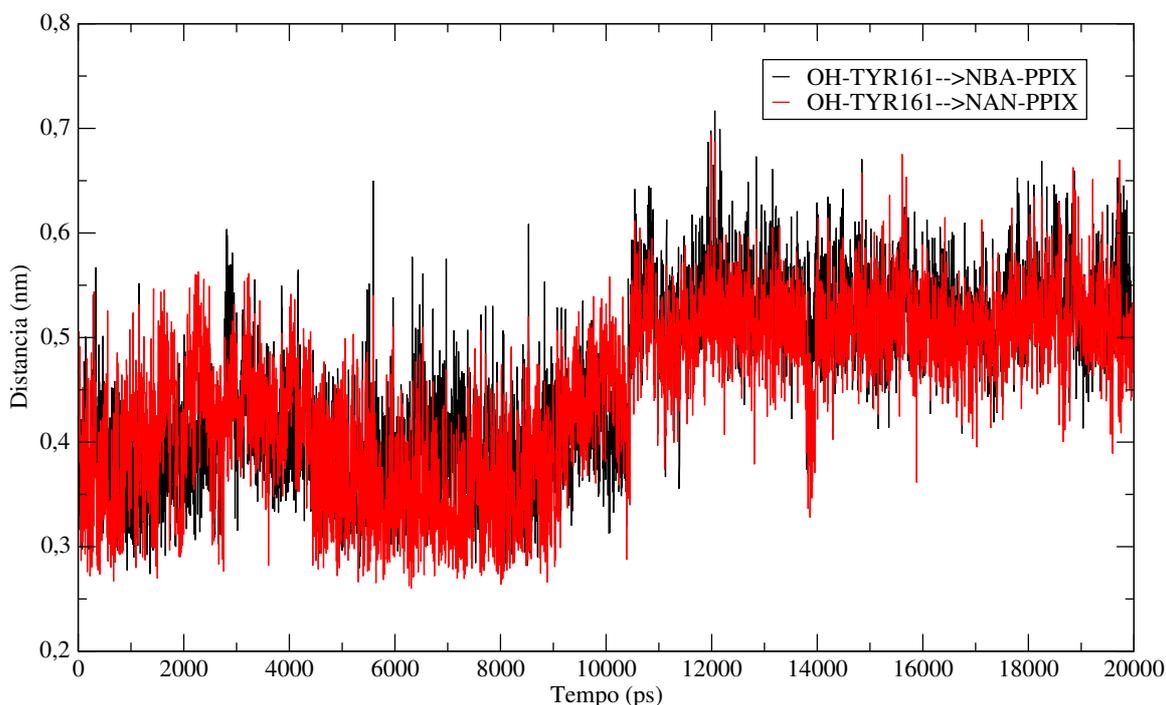


Figura 3.26 Distância entre o OH da TYR-161 e os nitrogênios NBA e NAN do ligante PPIX, mostrando que durante os primeiros 10,5 ns da DM a TYR-161 está quase no centro do anel porfirínico tendo a mesma distância de 4 Å, em média, com relação aos 4 nitrogênios do anel e que depois dos 10,5 ns ela se afasta dos nitrogênios NBA e NAN para se estabilizar com os outros nitrogênios restantes.

3.6.2

Distância entre os amino ácidos do HSA que mais interagem com o HEME

Para visualizar a relação entre os movimentos dos principais aminoácidos analisaremos a distância entre os centros de massa (CM) do heme e dos três aminoácidos que mais interagem com a heme com respeito ao CM da cadeia da proteína.

Como vimos nos resultados do RMSD do heme na proteína, esta estabiliza nos primeiros 150 ps, por conseguinte analisaremos os dados de toda a DM. Da Fig. 3.27 podemos dizer o seguinte: em geral os três aminoácidos seguem o padrão de conduta do heme. Considerando só o intervalo de 10 – 20 ns, os três aminoácidos não se afastam do padrão do heme.

Visualizando a trajetória da DM do heme no HSA, vemos que o oxigênio OH da TYR-161 interage frontalmente com o Fe-heme, formando um enlace pentacoordenado com o Fe (ver Fig. 3.28). A distância mínima é de 2,1 Å, a distância máxima é 5,9 Å e a distância média é 3,8 Å (ver Fig. 3.29). Valores experimentais da distância de ligação de Fe ao OH-TYR161 são dados em (Wardell et al., 2002), no qual a distância do Fe ao plano do heme é de 2,73 Å.

Na Fig. 3.30, mostram-se os gráficos comparando as microvizinhanças encontradas por difração de raios X (Wardell et al., 2002) e com nossa metodologia de cálculo. Em nossa DM observamos que a TYR-161 faz pontes de hidrogênio com os aminoácidos PHE-157, PHE-165 e com as moléculas de água W6209 e W8834, os quais parecem ter um papel importante na estabilização da ligação com o íon Fe.

Observam-se estas duas moléculas de água no lado proximal e não se observam moléculas de água no lado distal (ver Fig. 3.30). Podemos observar que a TYR-138 se encontra do outro lado do anel porfirínico, podendo ter um papel semelhante ao da histidina proximal como na hemoglobina.

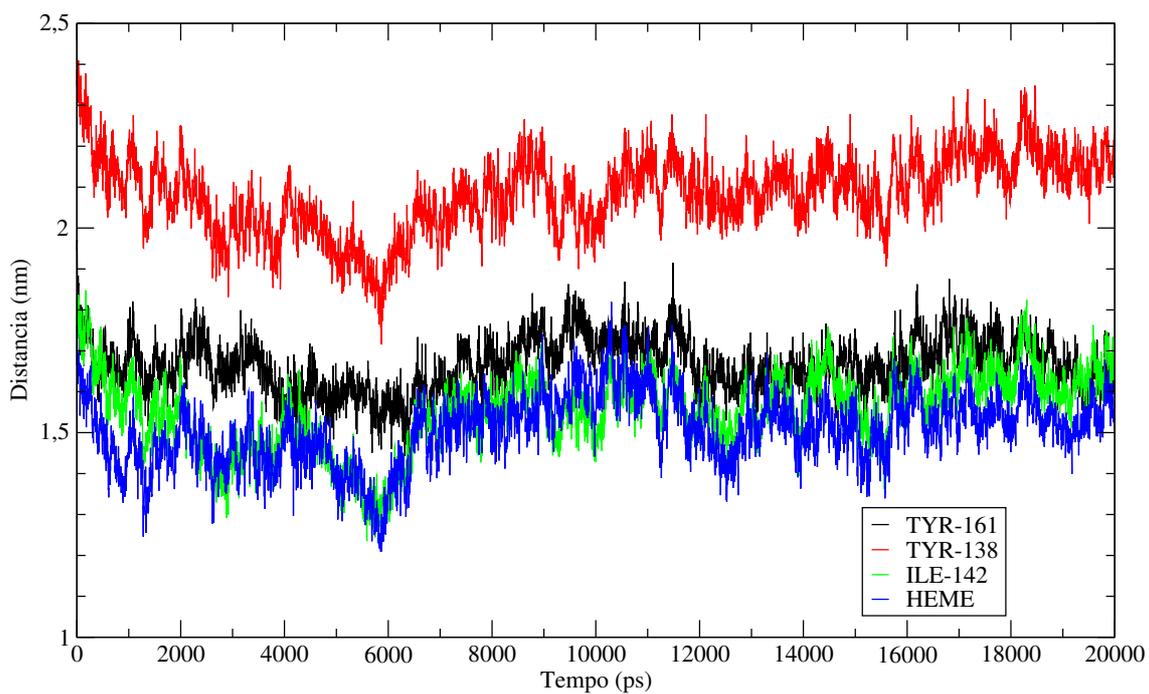


Figura 3.27 Distância dos principais aminoácidos do HSA que interagem com o heme ao CM da cadeia.

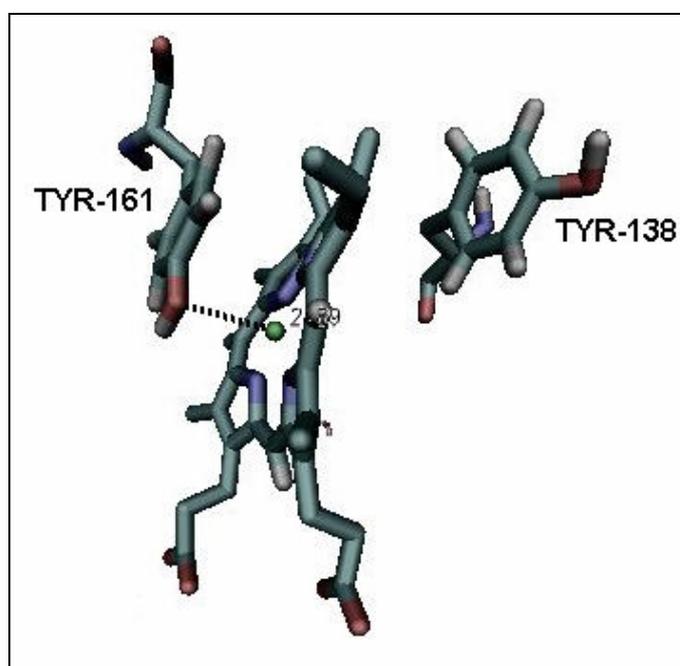


Figura 3.28 No lado proximal, TYR-161 interagindo frontalmente com o Fe^{2+} do heme; no lado distal TYR-138 interagindo com os nitrogênios do anel. A mutação de ambas TYR por HIS poderia fornecer um entorno semelhante ao da hemoglobina.

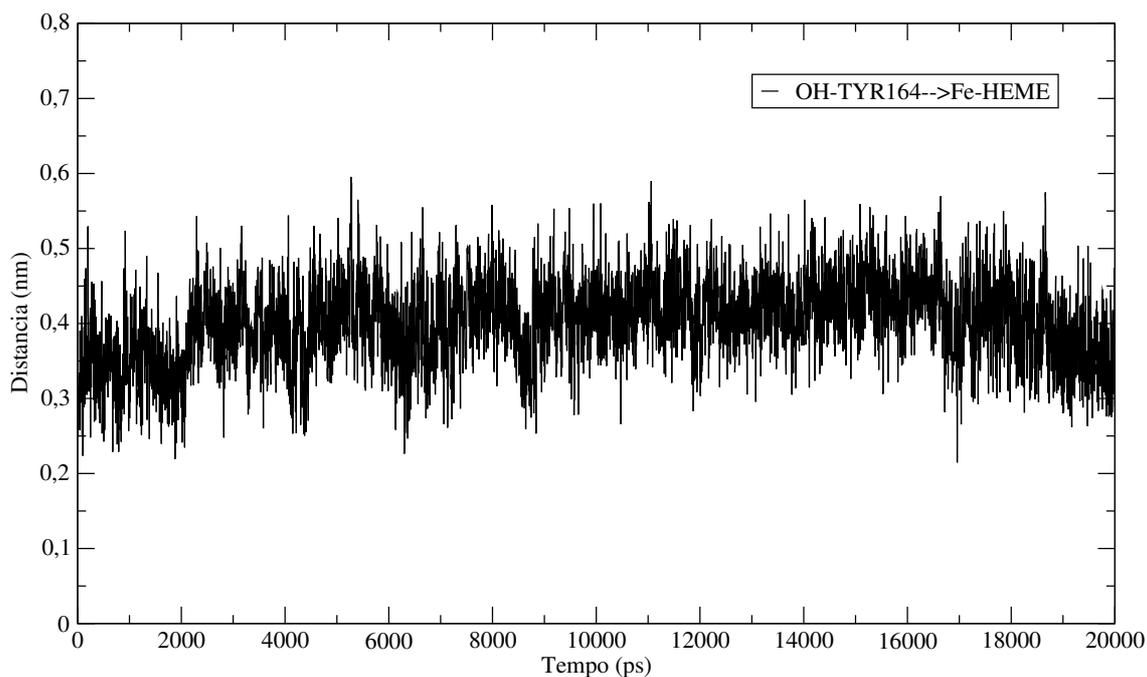


Figura 3.29 Distância entre o oxigênio OH-TYR161 e o íon Fe^{2+} do heme.

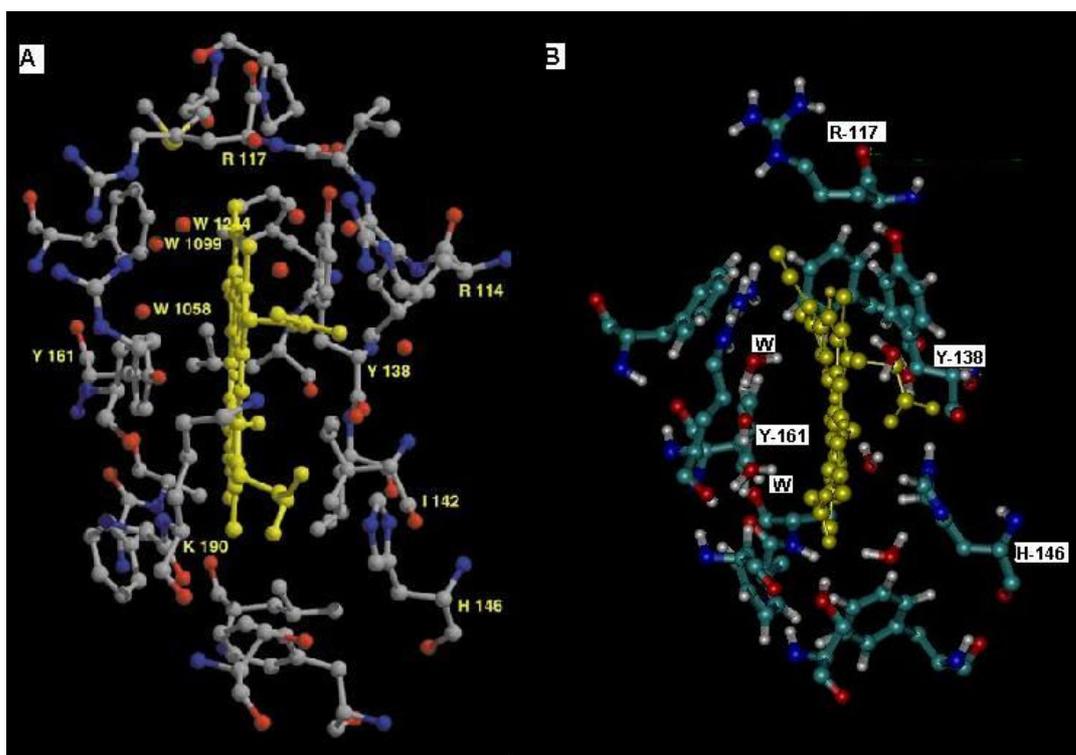


Figura 3.30 Comparação teórica-experimental. Em A, a microvizinhança molecular obtido por raios X (Wardell et al., 2002); em B, a microvizinhança molecular obtido em nossos cálculos. Colocou-se o nome de alguns aminoácidos como referência, W denota moléculas de água no lado proximal.

3.7

Pontes de hidrogênio entre o HSA e as porfirinas

Interações não covalentes são essenciais para manter a estrutura da proteína, para os processos de reconhecimento e para as interações ligante-proteína. Ligações de hidrogênio são uma classe de interação não covalente e têm um papel importante na afinidade do ligante pelo sítio de ligação. Aqui nós mostraremos as ligações de hidrogênio e identificaremos os átomos doadores e aceptores.

Nas tabelas 2 e 3 mostramos as pontes de hidrogênio diretas formadas entre as porfirinas e os aminoácidos no bolso hidrofóbico, mostramos também o tempo de prevalência definido como o percentaje do tempo no qual se mantém a estrutura de ponte de hidrogênio. Pode-se observar o seguinte:

Heme/PPIX

A LYS-190 faz ligação de hidrogênio com os carboxilatos do heme. A mais curta e mais forte ocorre entre o hidrogênio do NZHZ2 e o oxigênio O2D do heme e a mais fraca e de menor prevalência é feita entre o hidrogênio do NH com o oxigênio O1A do heme. Estes resultados concordam com o observado experimentalmente por Wardell et al. (2002).

Da DM se observa que a LYS-190 está sempre entre os dois grupos carboxil e forma pontes salinas permanentemente entre eles. Desta forma a LYS-190, que está na entrada do bolso hidrofóbico, estaria atuando como uma “tampa” que ajudaria a fixar o heme. Já as ligações de hidrogênio entre a PPIX e a LYS-190 são desprezíveis.

A ARG-145 faz ligações de hidrogênio com os oxigênios dos grupos carboxil do heme, tendo maior prevalência com os átomos de oxigênio O1D e O2D e menor prevalência os átomos de oxigênio O1A e O2A. A DM parece indicar que a ARG-145 teria o um efeito estabilizador no ligante muito parecido ao LYS-190.

Já no caso do PPIX este aminoácido ARG-145 forma pontes de hidrogênio com uma prevalência importante só com o nitrogênio NH1-HH11 e o oxigênio OBK, assim o efeito estabilizador da ARG-145 é pouco importante na PPIX.

A ARG-114, que se encontra localizada na entrada do bolso hidrofóbico, forma uma ponte de hidrogênio com o átomo de nitrogênio NH1-HH11 e o átomo de oxigênio O2D do heme. Já no caso do PPIX este aminoácido forma pontes de

hidrogênio só com os átomos de oxigênios OBK e OBJ de um grupo carboxil do PPIX.

Tabela 2: Pontes de hidrogênio diretas entre o HSA e o heme e % de prevalência (7ª coluna) numa DM de 20 ns.

	Doador		Hidrogênio		Aceptor	Prev. (%)
193SER	OG	193SER	HG	583HEME	O2A	2.03
190LYSH	NZ	190LYSH	HZ2	583HEME	O2D	34.63
190LYSH	N	190LYSH	H	583HEME	O1A	20.34
146HISB	NE2	146HISB	HE2	583HEME	O2D	2.85
145ARG	NE	145ARG	HE	583HEME	O1A	9.38
145ARG	NE	145ARG	HE	583HEME	O2A	7.84
145ARG	NE	145ARG	HE	583HEME	O1D	13.52
145ARG	NE	145ARG	HE	583HEME	O2D	17.68
114ARG	NH1	114ARG	HH11	583HEME	O2D	21.54
114ARG	NE	114ARG	HE	583HEME	O1D	3.52

Tabela 3: Pontes de hidrogênio diretas entre o HSA e o PPIX e % de prevalência (7ª coluna) numa DM de 20 ns.

	Doador		Hidrogênio		Aceptor	Prev. (%)
190LYSH	NZ	190LYSH	HZ3	583PYP	OBP	2.99
190LYSH	NZ	190LYSH	HZ2	583PYP	OBP	4.48
190LYSH	NZ	190LYSH	HZ3	583PYP	OBO	2.49
146HISB	NE2	146HISB	HE2	583PYP	OBP	2.99
145ARG	NH2	145ARG	HH21	583PYP	OBO	3.98
145ARG	NH1	145ARG	HH11	583PYP	OBK	9.95
114ARG	NH1	114ARG	HH11	583PYP	OBJ	14.43
114ARG	NH1	114ARG	HH11	583PYP	OBK	22.89

Nas Figuras 3.31 e 3.32 observamos que PPIX faz em média maior número de ligações de hidrogênio com as moléculas de água na vizinhança do sítio de ligação que o heme. Isto é devido a que o heme faz, em média, maior número de ligações com a proteína (Tabela 2 e figuras 3.31 e 3.32). Nos gráficos dessas figuras, são consideradas todas as pontes de hidrogênio com o solvente, incluindo as pontes intermediadas por água.

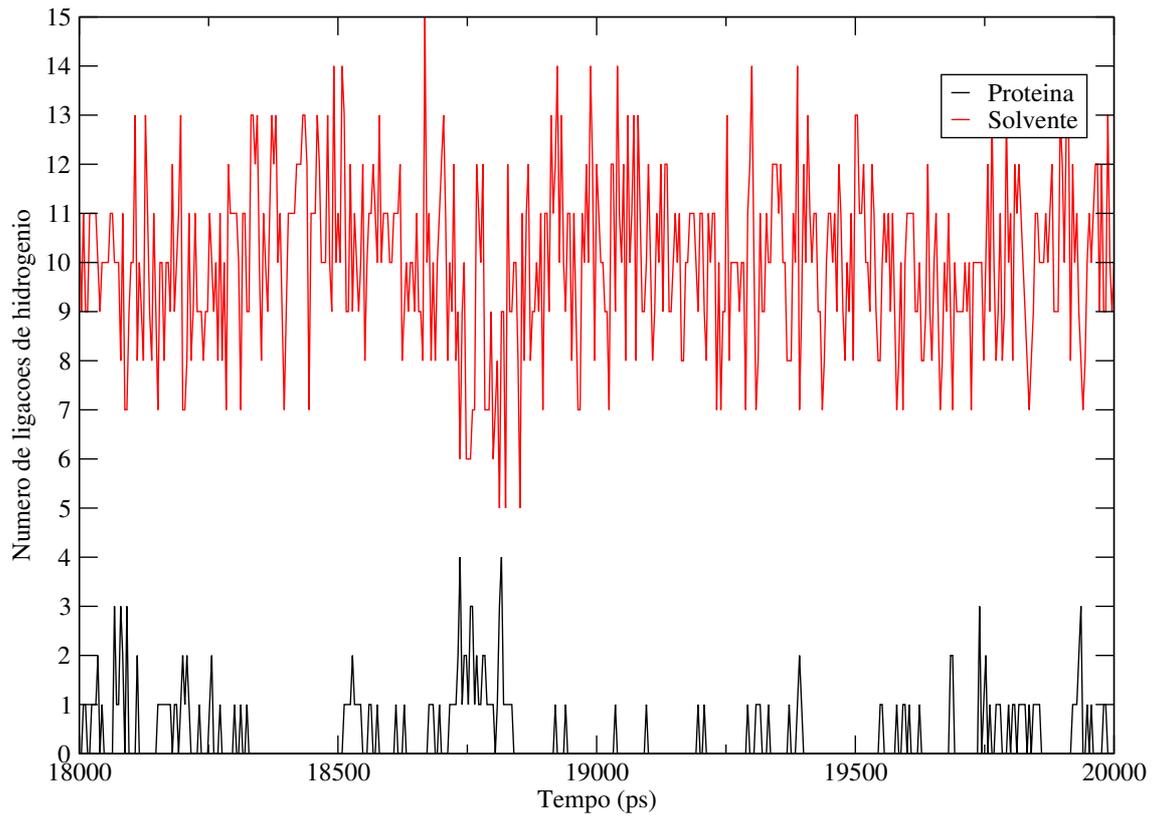


Figura 3.31 Ligações de hidrogênio da PPIX com HSA (preto) e com a água nas

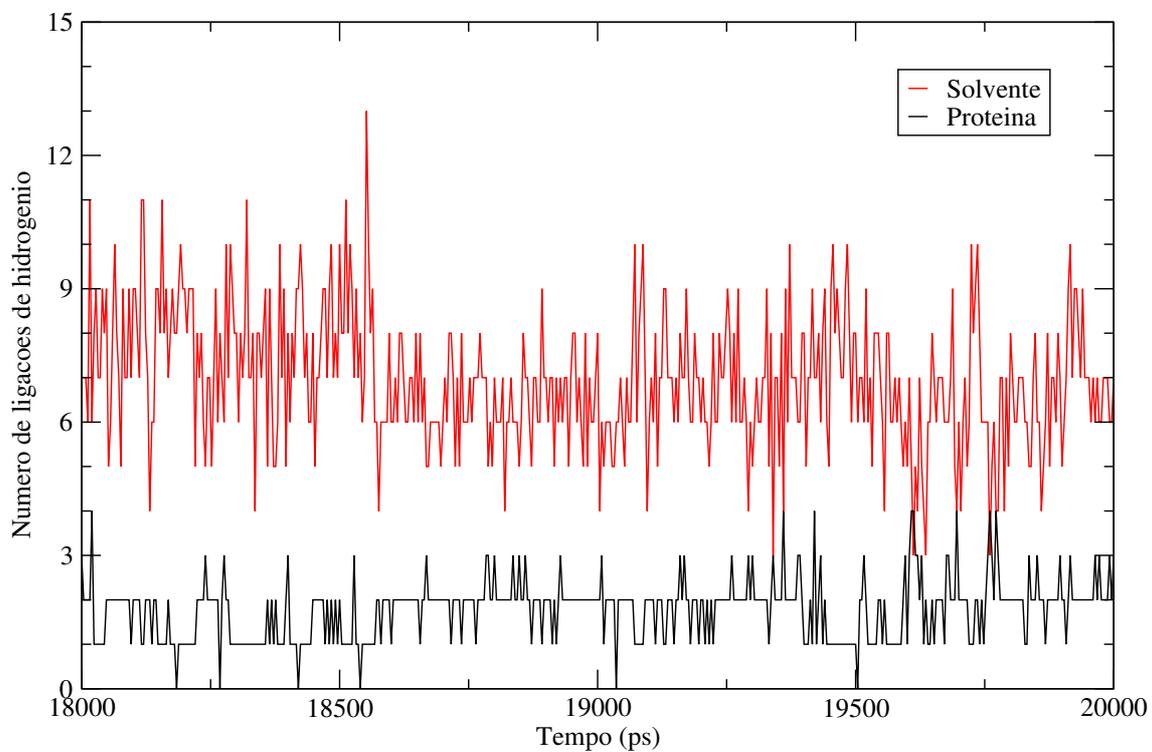


Figura 3.32 Número de ligações de hidrogênio do heme com a proteína (preto) e com o solvente presente nas vizinhanças do sítio de ligação (vermelho)

3.8 Análise da superfície eletrostática dos sistemas HSA, HSA-PPIX e HSA-heme

A superfície eletrostática (SE) de uma proteína nos dá informação sobre a distribuição de cargas na superfície da molécula, o que pode indicar prováveis sítios de ligação de interesse. No nosso caso, a superfície eletrostática de HSA possibilitaria a previsão do melhor local de interação da proteína com as porfirinas.

A superfície eletrostática da proteína é colorida de acordo com o potencial eletrostático. Em vermelho encontram-se regiões de potencial negativo, em azul, potenciais positivos e em branco, regiões neutras. Nas figuras 3.33 e 3.34 mostramos as superfícies eletrostáticas moleculares de HSA e seus complexos, calculadas pelo programa APBS (Baker et al., 2001), visualizadas pelo programa PMV (Sanner et al., 1999) depois de uma DM de 20 ns .

Em um primeiro exame da superfície eletrostático (ver Fig. 3.33, notamos que o padrão de distribuição das cargas positivas (em azul) e negativo (em vermelho) da proteína muda conforme o ligante. Dados preliminares do RMSD-3D (ver Fig. 3.11, 3.12 e 3.13) e do RMSF (ver Fig. 3.20 e 3.21) indicaram que a acomodação dos ligantes no subdomínio IB modifica a conformação dele. O “random coil” presente nessa região perde muita flexibilidade de forma a alterar a distribuição de cargas na superfície. Essa perda de mobilidade por efeito do ligante contribui para gerar a separação entre os subdomínios IB, IA, IIA e os subdomínios IIIA, IIIB como se observa na Fig. 3.33. Além disso, tem-se observado que a PPIX tem um efeito de diminuir a flexibilidade com relação ao heme. Isso é visto na superfície eletrostática entre ambos complexos.

Pode-se observar a presença de três regiões de potencial positivo (região central da proteína) inicialmente isoladas no HSA. A presença dos ligantes gerou a união desses domínios positivo. A PPIX torna evidente esta união, mas heme preservou-se esta união de domínios positivos e isolou-se região dos subdomínios IB e IIA.

Porém, como dito anteriormente, mais dados são necessários para melhor caracterizar as macro-mudanças conformacionais, as quais estão associadas a movimentos de grande amplitude, passíveis de análise em MD envolvendo

maiores tempos de simulação ou com o emprego de outras técnicas como cálculo da Dinâmica Essencial e Modos Normais de Vibração.

Fazendo um zoom no subdomínio IB (ver Fig. 3.34), vemos que o padrão eletrostático é totalmente alterado na presença do ligante, sugerindo que a interação ligante-proteína é responsável pela formação do sítio de ligação das porfirinas, mas deve-se ter presente que no plasma humano os diversos ligantes que o HSA transporta, como os ácidos graxos, poderiam contribuir para a pré-formação dos sítios de ligação das porfirinas.

Ja no nosso modelo de calculo nos inserimos as porfirinas em sitios pre-formados, mas a interacão entre as porfirinas aumento o volumen dessos sitios.

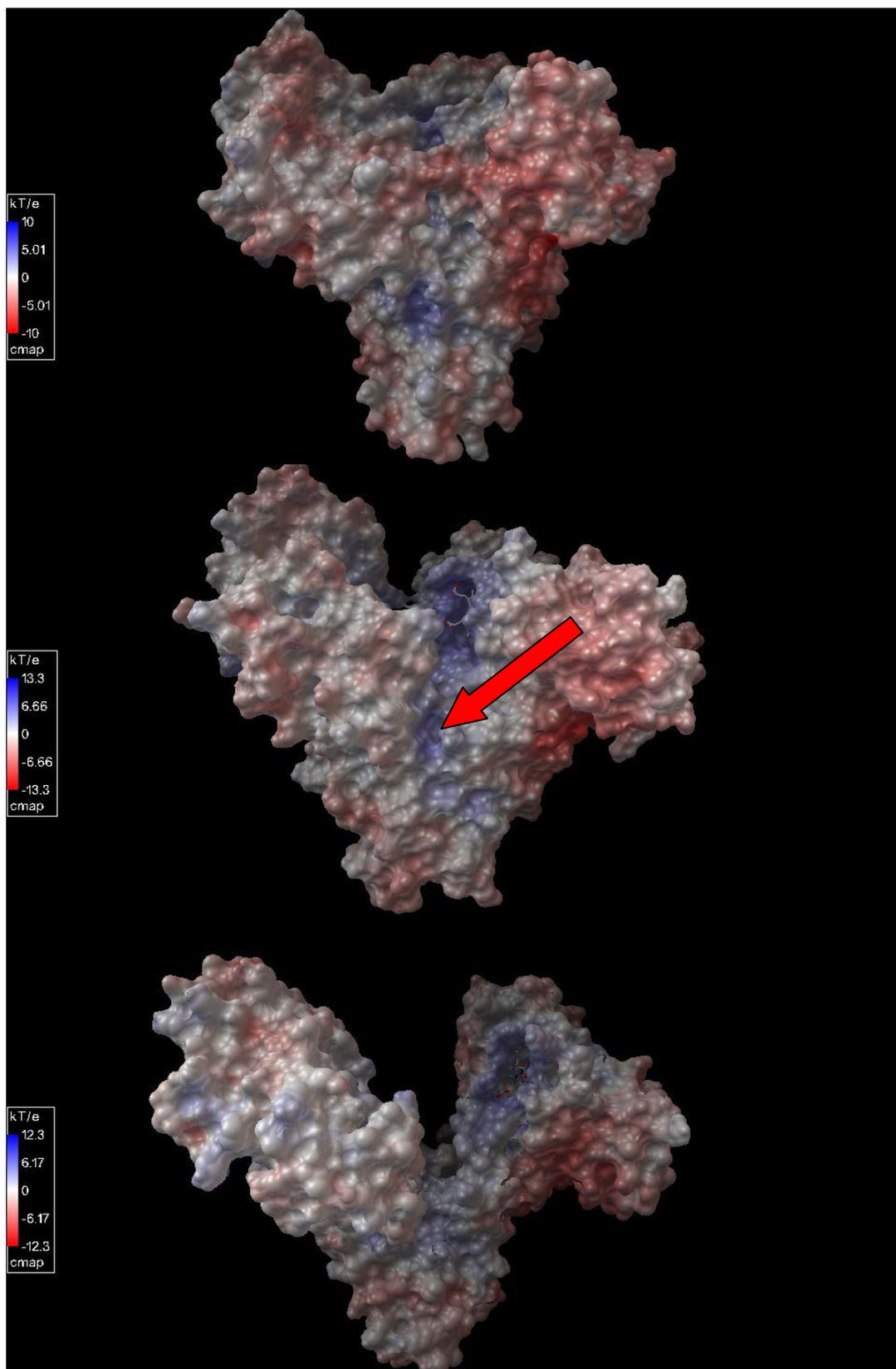


Figura 3.33 De cima para baixo: superfície eletrostática do HSA, HSA-PPIX e HSA-heme depois de 20 ns de DM (em azul: potencial eletrostático positivo, em vermelho: negativo).

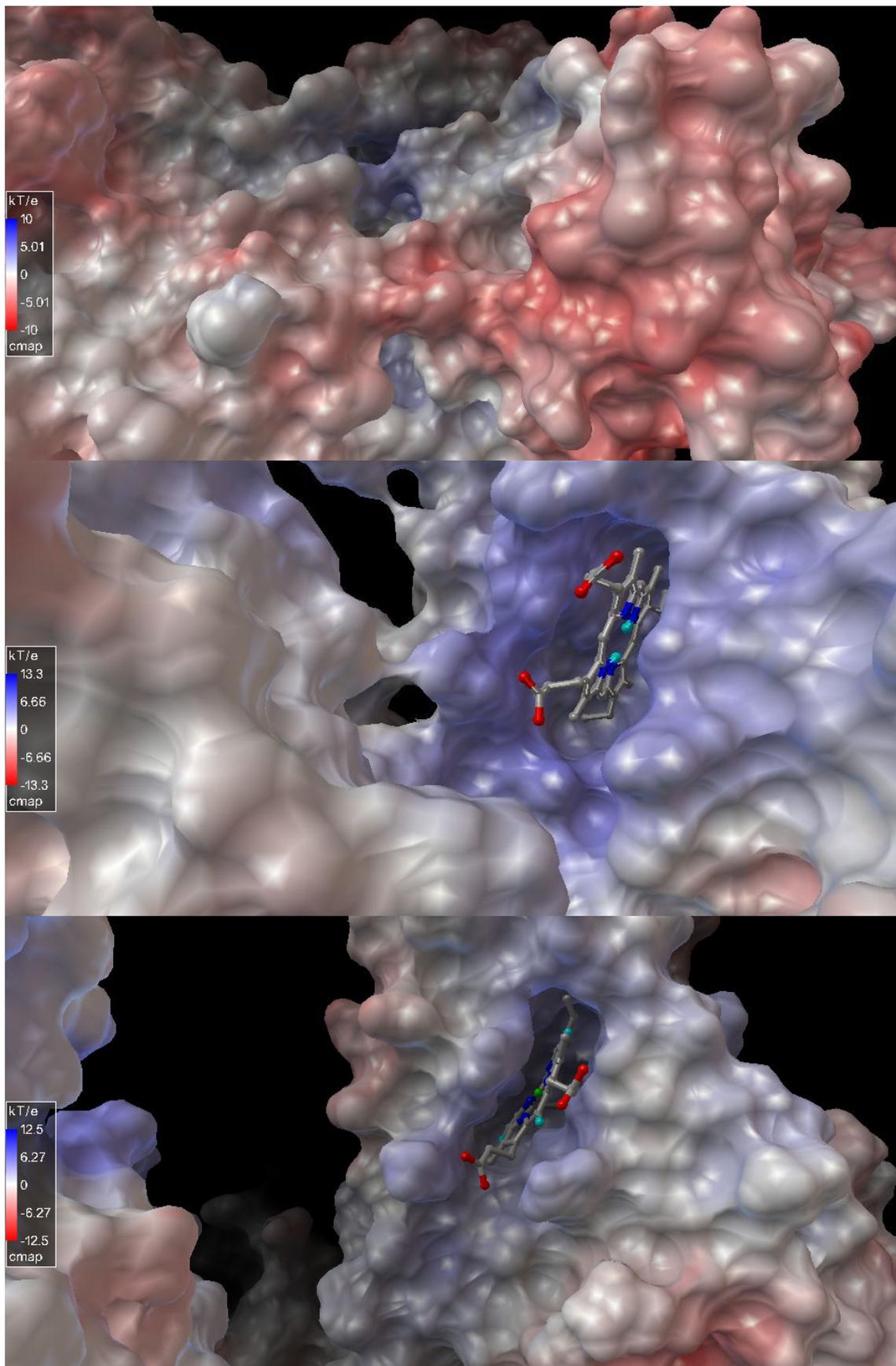


Figura 3.34 De cima para baixo: superfície eletrostática do subdomínio IB do HSA, HSA-PPIX e HSA-heme depois de 20 ns de DM.

3.9

Prováveis segundos sitio de ligação das porfirinas no HSA

Evidências experimentais (Zhang et al., 2002) têm proposto a possível existência de um segundo sitio de ligação da PPIX com o HSA usando técnicas baseadas em eletroforese. Nesses estudos não se dá referências sobre a possível posição do segundo sítio de ligação.

Após realizar a DM de 20 ns do complexo HSA-PPIX fazemos um análise da superfície e do potencial eletrostático sobre esta para identificar uma região que tenha uma área e potencial favoráveis para a ligação do PPIX.

Localizou-se a região mostrada na Fig. 3.33 com uma seta vermelha, para confirmar se esta região poderia ser um segundo sítio de ligação realizou-se um Docking Molecular usando o programa AUTODOCK.

O resultado do Docking mostra que a região localizada entre os sub domínios IIA e IIIA seria um possível sitio de ligação (ver Fig. 3.35 e 3.36). Este resultado poderá ser confirmado fazendo uma DM da porfirina no HSA nesse sitio. Se o resultado dessa DM mostrasse que a porfirina é estável nesse sitio, teria se confirmado o segundo sitio de ligação.

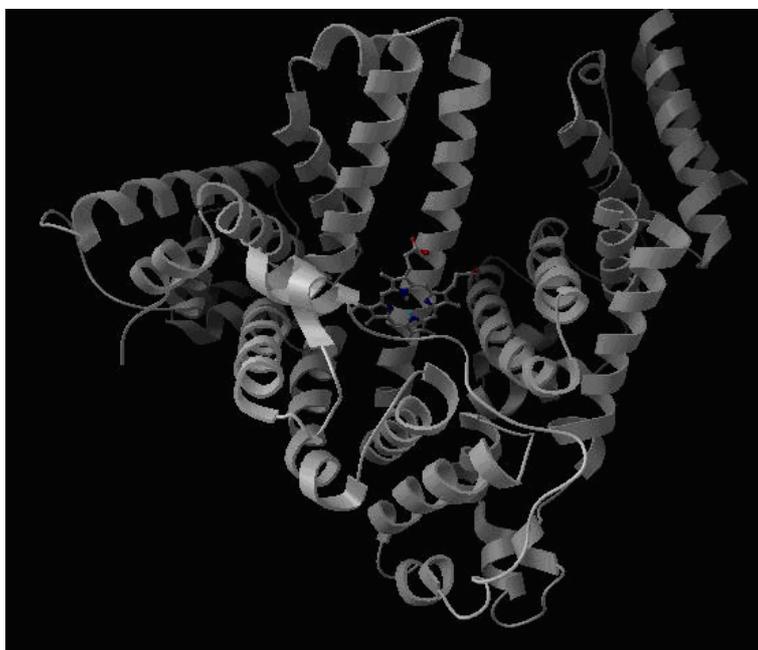


Figura 3.35 Segundo provável sitio de ligação da PPIX no HSA

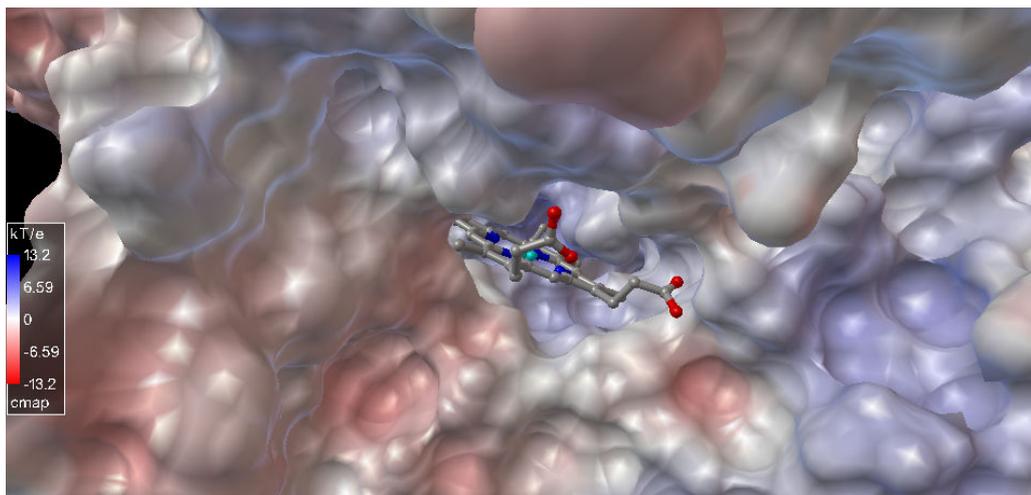


Figura 3.36 Potencial eletrostático na superfície da proteína na região do segundo provável sitio de ligação da PPIX no HSA

Considerando que o heme e o PPIX tem características hidrofóbicas e cargas iguais, este segundo provável sitio de ligação poderia hospedar também o heme.

3.10 Existem regiões do HSA correlacionadas ao subdomínio IB?

Antes de começar esta última seção devemos mencionar que os resultados correspondentes a este item, não puderam ser comparados com estudos prévios experimentais ou teóricos, que correlacionem os movimentos atômicos nas diferentes regiões do HSA, porque estes não existem até o momento.

Como vimos nas Figuras 3.20 e 3.21, a ligação da porfirina no subdomínio IB muda o padrão do RMSF. Isto nos leva a fazer a seguinte pergunta: As diferentes regiões da HSA correlacionadas?

Escolhemos os elementos carbono alfa (C_{α} , átomos que compõem o esqueleto da proteína) da cadeia para aplicar a matriz de correlação, porque tomar a proteína inteira faria inviável nosso cálculo. Devemos mencionar uma vez mais que um resultado mais conclusivo só será obtido com uma dinâmica longa (tempo de simulação > 100 ns), em nosso caso tomaremos uma faixa temporal entre 5ns – 20 ns.

Um valor do coeficiente de correlação igual a zero significa que não existe correlação. Um valor menor que um, mas maior que zero significa que existe

correlação. Esta correlação pode ser baixa, média ou alta; para distingui-las usaremos um código de cores.

Vermelho:	Correlação muito baixa	(0 – 0.1)
Amarelo	: Correlação baixa	(0.1-0.2)
Verde	: Correlação media	(0.2-0.5)
Azul	: Correlação alta	(0.5-1)

Como primeiros passos determinarão o padrão de correlação total (termos linearmente correlacionados e termos não linearmente correlacionados) do HSA e o compararemos com o padrão de correlação linear. Desta forma podemos saber a contribuição dos termos não lineares no padrão de correlação das diferentes regiões do HSA.

Na Fig. 3.37, pode-se observar “pequenas mudanças” no padrão de correlação, estas mudanças são difíceis de visualizar, mas para ter uma melhor idéia geraremos a matriz da diferença entre a matriz de correlação total e correlação linear, como é mostrado na Fig. 3.38.

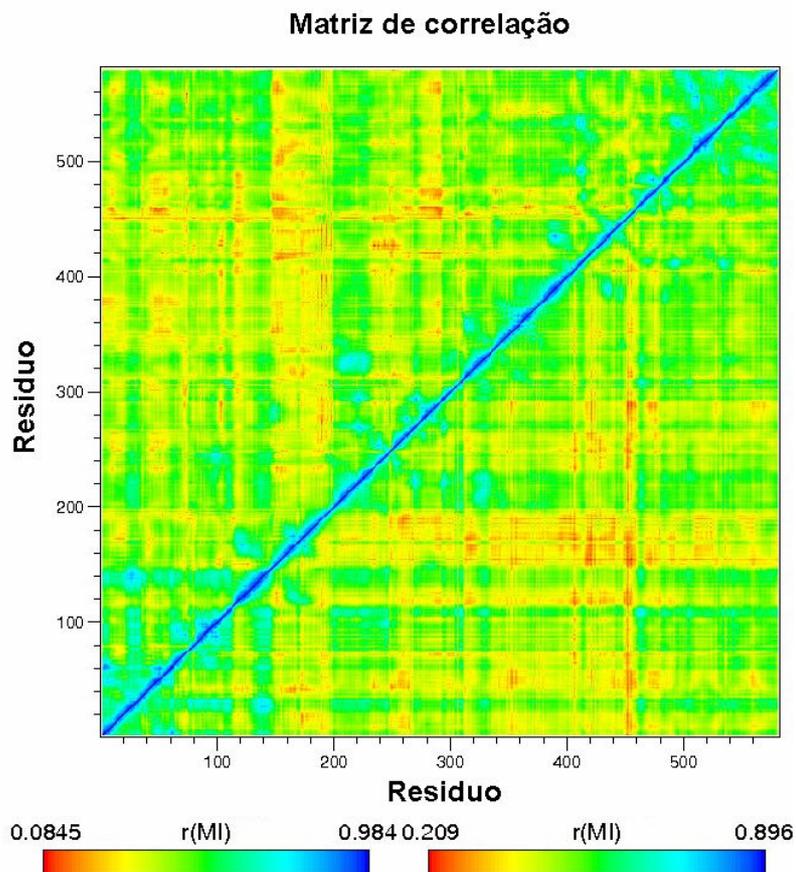


Fig. 3.37 Padrão do HSA: Linear (triângulo superior direito), total (triângulo inferior esquerdo).

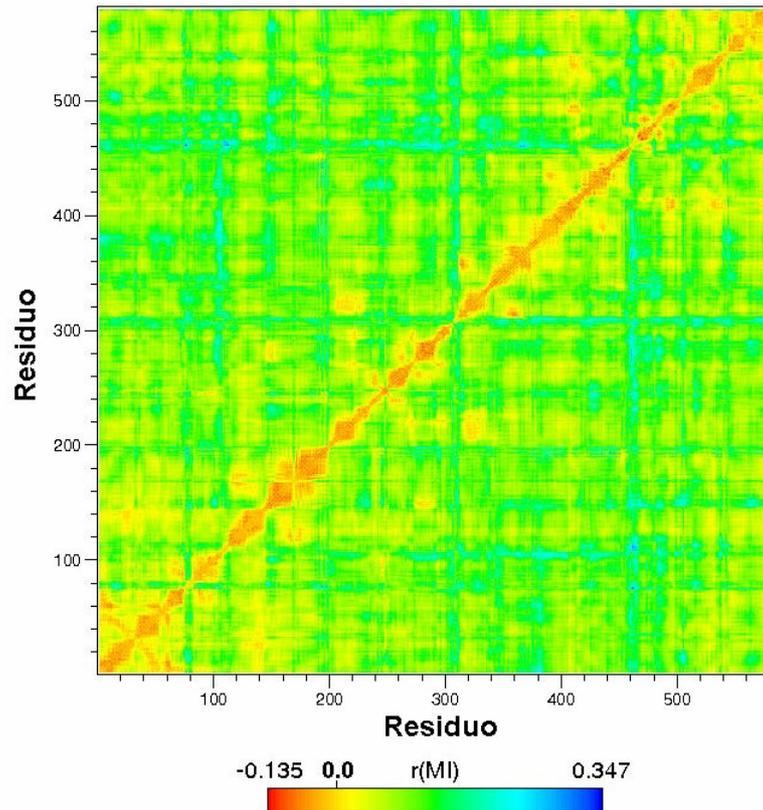


Fig. 3.38 Matriz da diferença entre a matriz de correlação total e linear do HSA

Podemos observar que, de forma global, considerar só os movimentos correlacionados linearmente gera uma perda de informação $\sim 40\%$.

Da matriz da diferença vemos que existem zonas bem localizadas (zonas em azul) onde os termos não lineares são importantes.

Nas figuras 3.39 e 3.40, mostramos os padrões de correlação generalizados do HSA-HEME e do HSA-PPIX

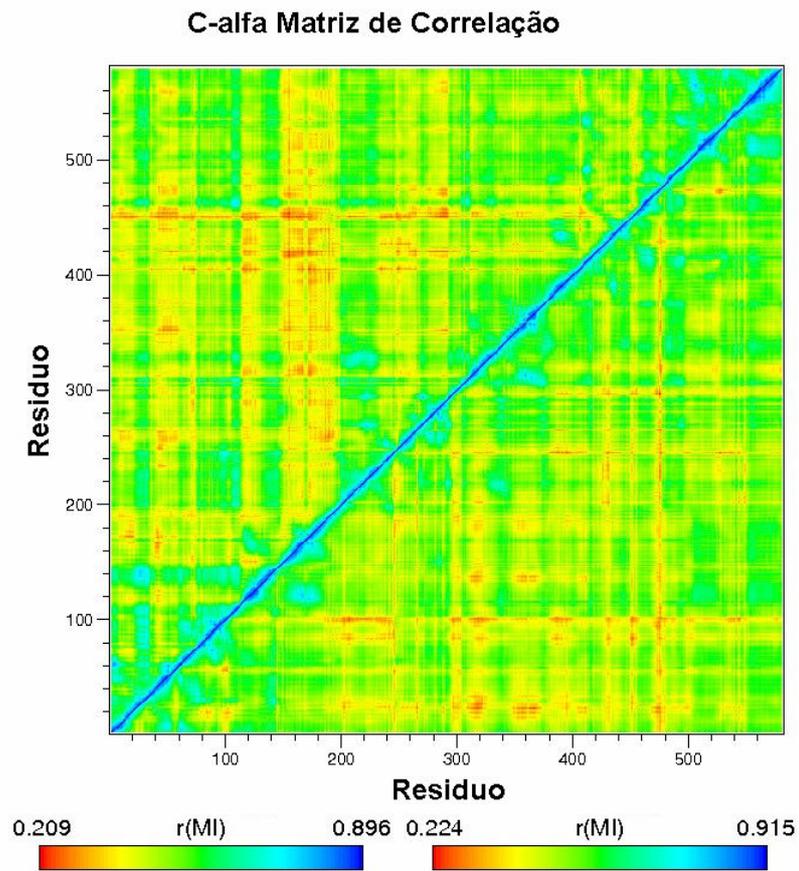


Fig. 3.39 Padrão de correlação generalizada: HSA (triângulo superior direito), HSA-HEME (triângulo inferior esquerdo).

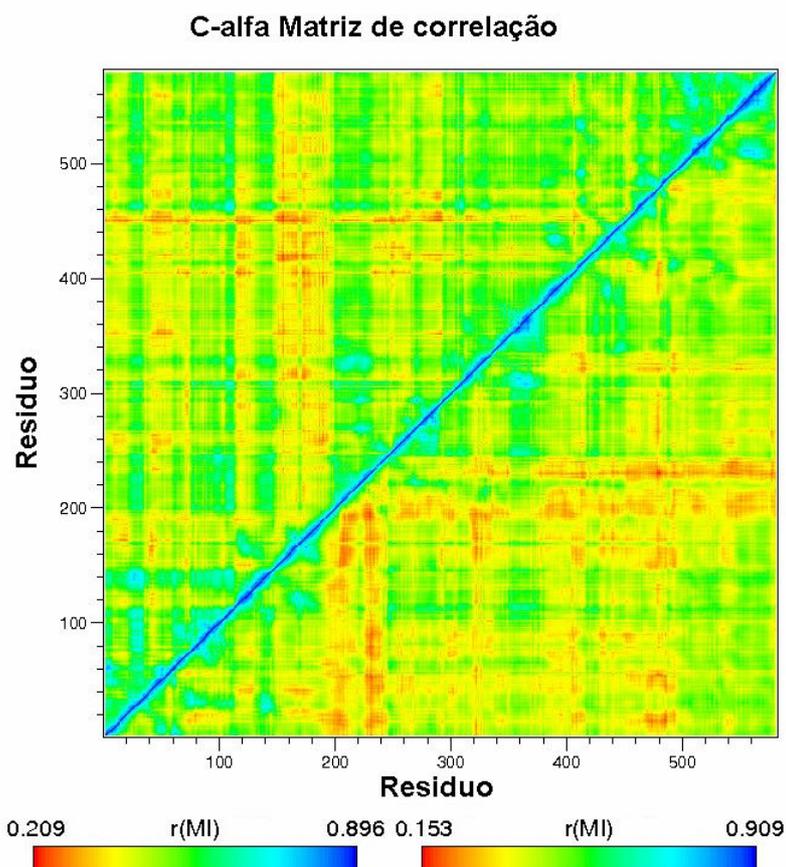


Fig. 3.40 Padrão de correlação generalizada: HSA (triângulo superior direito), HSA-PPIX (triângulo inferior esquerdo).

Agora veremos os efeitos do heme inserido no subdomínio IB e as mudanças no padrão de correlação. Tentaremos encontrar as regiões da proteína que poderiam estar correlacionadas com ela. Para isso traçaremos duas verticais paralelas começando do resíduo 100 até o 200 (subdomínio IB), e duas horizontais paralelas começando do resíduo 100 até o 200, Fig. 3.41

A região compreendida nessas paralelas e com coeficiente de correlação diferente de zero, chamaremos de regiões diretamente correlacionadas, e aquelas que estão fora das paralelas, mas que contribuem com os movimentos atômicos destas chamaremos de regiões indiretamente correlacionadas. O gráfico inserido (da Fig. 3.21) na Fig. 3.41 mostra o padrão de RMSD do HSA e do HSA-HEME, o objetivo é explicar este padrão com base nos movimentos correlacionados dos átomos.

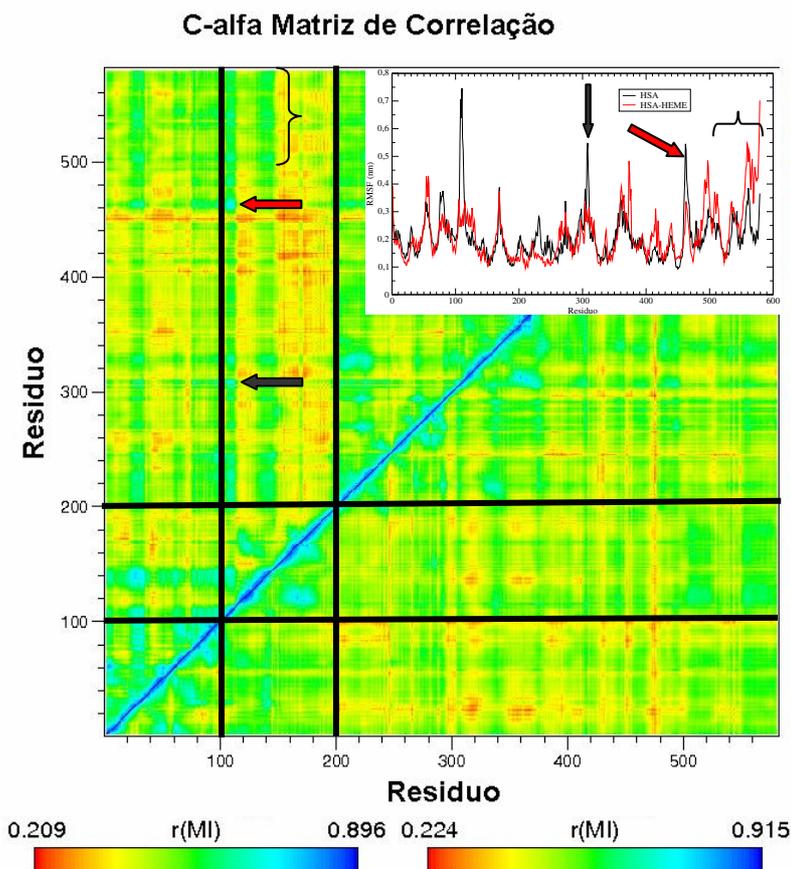


Fig. 3.41 Padrão de correlação generalizada: HSA (triângulo superior direito), HSA-HEME (triângulo inferior esquerdo). Nesta figura mostra-se entre as paralelas as regiões diretamente correlacionados com a região compreendida entre os resíduos 100-200.

Da Fig. 3.41, pode-se observar o seguinte, os resíduos 110 a 118 no HSA estão altamente correlacionados com os resíduos 460-465 (seta vermelha), mas uma vez que o heme é ligado, esta correlação diminui apreciavelmente. Isto explica o observado na inserção da Fig. 3.41 ou na Fig. 3.21 (visualizemos estas regiões na Fig.3.41).

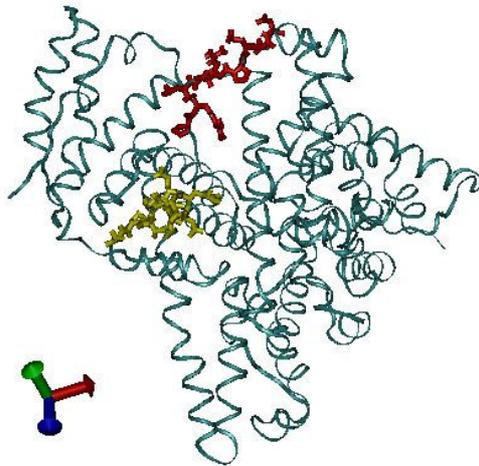


Fig. 3.42 Região (100-118, vermelho) correlacionada com a região (460-465, amarelo)

Agora observemos a região em torno ao resíduo 310 (seta preta), que perde correlação uma vez que o heme é inserido. Isto se manifesta como uma perda de mobilidade, como se vê na figura inserida na Fig. 3.41. Visualizemos esta região na Fig. 3.43.

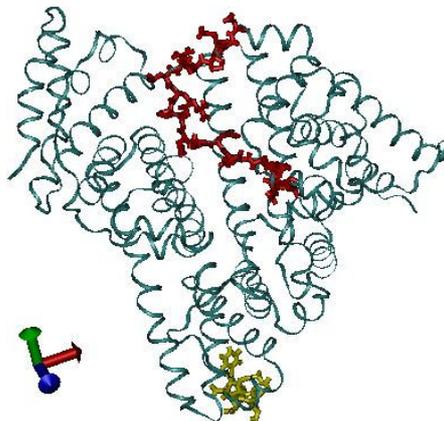


Fig. 3.43 Região (100-118, vermelho) correlacionada com a região (306-313, amarelo)

Esta correlação já não é facilmente evidente, pois as duas regiões se encontram afastadas, mas fortemente correlacionadas. Observamos da Fig. 3.38 que grande parte destes movimentos correlacionados são não lineares. Isto pode

ser explicado pelo fato de considerar um sistema de N massas-molas. Quando $N=2$ se têm um sistema com uma alta correlação linear, mais quando N é muito grande se perde a correlação linear entre a primeira e última massa-mola do sistema, assim para N grande os efeitos não lineares contribuem mais aos movimentos correlacionados.

Finalmente, veremos que a região entre os 110-140 está diretamente correlacionada com a região 500-582 (marcada com um “}” na Fig. 3.41) como já era evidenciado na figura inserida na Fig. 3.41, mas esta região mantém e aumenta a correlação um vez que o heme é inserido. Visualizemos estas regiões na Fig. 3.44.

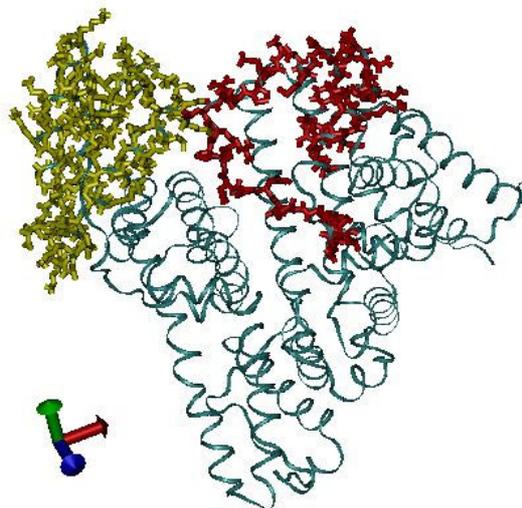


Fig. 3.44 Região (110-140, vermelho) correlacionada com a região (500-582, amarelo)

Estudos com maior detalhe serão realizados com uma dinâmica longa destes sistemas e servirão de base para estudos de efeitos alostéricos, pré-formação de sítos de ligação por inserção de ligante, efeitos entrópicos, etc.