

Pedro Miguel Pinto Fernandes

**EM BUSCA DE DETERMINANTES
ESTRUTURAIS NO RECONHECIMENTO E
LIGAÇÃO DE AMILÓIDE: β -2
MICROGLOBULINA COMO CASO DE
ESTUDO**

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química
Medicinal**

Orientador: Prof. Dr. Rui M. M. Brito

Co-orientador: Doutor Bruno L. Victor

Fevereiro 2016

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao Professor Rui Brito por todo apoio e orientação prestados durante o trabalho. Estou muito grato pela oportunidade de trabalhar neste tema que eu tanto gosto.

Quero agradecer ao Bruno Victor por toda ajuda que me deu, sem ele este trabalho não seria possível. Prometo que numa próxima vou chatear mais.

Agradecer à BSIM² e ao Carlos Simões a oportunidade de conhecer uma empresa *startup* e realizar parte do meu trabalho lá, fornecendo-me recursos e conhecimento.

Agradecer à Professora Cândida por estes anos todos de me aturar e ainda não me ter mandado dar uma volta. Nunca esquecerei a ajuda que me deu.

Ao grupo de Biofísica de Proteínas, Elisabete, Zaida e Pedro pelos bons momentos.

Aos amigos de Coimbra, Ana Sousa, por tudo que foste e podias ter sido, Carlota, Cristina, Mónica, Joel (why not) teremos sempre o Cabido (NSUF).

Aos amigos de Oaz city, Lizzy, Berta e Patrícia por estar sempre presentes mesmo estando longe e ter de me aturar com as minhas manias.

Last but not least, à minha família que nos momentos bons e maus teve sempre presente ajudando-me sempre que possível. Agradecimento especial à minha irmã que mesmo emigrada é como estivesse aqui.

Índice

AGRADECIMENTOS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ÍNDICE DE TABELAS.....	VII
ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 AMILÓIDE.....	1
1.2 B-2 MICROGLOBULINA: UM CASO DE ESTUDO.....	5
1.2.1 Tioflavina T.....	7
1.2.2 Complexo $\beta 2m$ -ThT.....	8
1.3 OBJECTIVOS.....	11
2 TEORIA E MÉTODOS.....	12
2.1 MODELAÇÃO COMPUTACIONAL.....	12
2.1.1 Campo de forças.....	15
2.1.2 Condições de Fronteira Periódicas.....	18
2.1.3 Minimização de energia.....	19
2.1.4 Dinâmica Molecular.....	20
2.1.5 Restrições de posições e distância.....	22
2.1.6 Acoplamento de Temperatura e Pressão.....	23
2.1.7 Convenção da imagem mínima e raio de corte.....	25
2.1.8 Tratamento das interações de longo alcance.....	26
2.2 CÁLCULOS DA ENERGIA LIVRE.....	26
2.2.1 Fundamentos dos Cálculos de energia livre.....	27
2.2.2 Limitações dos cálculos de energia livre.....	30
2.3 PROTOCOLO COMPUTACIONAL.....	32
2.3.1 Definição e preparação do sistema de simulação.....	32
2.3.2 Parâmetros para os Cálculos de Energia Livre.....	34
2.4 ANÁLISES.....	35
2.4.1 Raiz dos desvios médios quadráticos.....	35
2.4.2 Raiz das flutuações médias quadráticas.....	36
2.4.3 Ligações por ponte de hidrogénio.....	36
2.4.4 Cálculo Distância.....	36
2.4.5 Cálculos das CEL.....	37
3 RESULTADOS.....	38
3.1 DINÂMICA MOLECULAR.....	38
3.1.1 Avaliação Estrutural do dímero $\beta 2m$ e do complexo $\beta 2m$ -ThT.....	38
3.1.2 Avaliação da influência das mutações Q8A, Y10A e Y10F na estabilidade do complexo $\beta 2m$ -ThT.....	44
3.1.3 Estabilidade da ThT no local ativo.....	49
3.2 CÁLCULO DA ENERGIA LIVRE.....	58

4	DISCUSSÃO.....	62
5	CONCLUSÃO.....	66
6	REFERÊNCIAS.....	68

Índice de Figuras

Figura 1. Representação esquemática de diferentes mecanismos para a formação de agregados proteicos e fibras amilóides.....	4
Figura 2. Estrutura de uma fibra amilóide com resolução atômica.....	7
Figura 3. Representação da estrutura tridimensional selvagem da β -2 microglobulina (β 2m) (PDB ID 2YXF).....	9
Figura 4. Estrutura da tioflavina-T (ThT).....	10
Figura 5. Estrutura Cristalográfica do Complexo β 2m-ThT (PDB ID: 3MZT).....	12
Figura 6. Sistemas biomoleculares que podem ser estudados por simulações computacionais.....	16
Figura 7. Modelo Molecular.....	17
Figura 8. Função da energia potencial.....	19
Figura 9. Condições de Fronteira Periódicas.....	21
Figura 10. Superfície de energia potencial.....	21
Figura 11. Esquema de uma simulação de Dinâmica molecular.....	23
Figura 12. Ciclo Termodinâmico utilizado no cálculo de energias de ligação de pequenas moléculas orgânicas a uma proteína.....	30
Figura 13. Ciclo termodinâmico do complexo β 2m-ThT.....	31
Figura 14. Representação do local de ligação da ThT no complexo β 2m-ThT.....	40
Figura 15. (A, B) RMSD dos $C\alpha$ do dímero de β 2m e do dímero do complexo β 2m-ThT, respetivamente. (C) RMSD dos átomos de ThT no complexo β 2m-ThT.....	41
Figura 16. Sobreposição das estruturas médias do dímero nativo da β 2m (ciano) e do dímero do complexo β 2m-ThT (cinzento), com os resíduos do local ativo Q8, Y10 e Y26 em destaque.....	41
Figura 17. (A, B) RMSF dos $C\alpha$ dos resíduos de aminoácido do dímero de β 2m, para a cadeia B e C, respetivamente. (C, D) RMSF dos $C\alpha$ dos resíduos do dímero do complexo β 2m-ThT, para a cadeia B e C, respetivamente.....	42
Figura 18. Representação do dímero β 2m de acordo com os valores de RMSF. As regiões com menor RMSF estão representadas a azul e as regiões com maior variabilidade a vermelho, a espessura indica a grandeza dos valores de RMSF.....	43
Figura 19. Representação do local de ligação da ThT complexo β 2m-ThT, com os resíduos Q8A (laranja), Y10 e Y26 (verde). A linha a tracejado representa a distância medida entre o centro geométrico do grupo fenol da Y26 da cadeia B e C ao átomo de azoto do anel benzotiazol da ThT.....	44
Figura 20. (A, B) Distância do centro geométrico do anel fenólico da Tyr26 da cadeia B (A) e C (B) ao átomo de azoto do anel benzotiazol da ThT.....	45
Figura 21. RMSD dos $C\alpha$ do dímero de β 2m para os mutantes e duplos mutantes Q8A, Y10A e Y10F, ao longo dos 200 ns de simulação.....	46
Figura 22. Sobreposição das estruturas médias dos dímeros dos complexos duplos mutantes Q8A (A), Y10A (B) e Y10F (C) (ciano), com o dímero do complexo β 2m-ThT não-mutado (cinzento), com os resíduos do local de ligação em destaque.....	47
Figura 23. Sobreposição dos dímeros dos complexos mutantes simples (azul) e duplos mutantes (ciano) Q8A(A), Y10A (B) e Y10F (C), com os resíduos no local ativo em destaque.....	48
Figura 24. Gráficos de RMSF dos $C\alpha$ dos mutantes e duplos mutantes Q8A, Y10A e Y10F do dímero de β 2m no complexo com ThT.....	49
Figura 25. RMSD da ThT dos complexos mutantes e duplos mutantes Q8A, Y10A e Y10F.....	51
Figura 26. Sobreposição de snapshots da ThT representativos das simulações de DM dos complexos mutantes simples (B, E G) e duplos (A, C, D e F) Q8A, Y10A e Y10F, com a ThT do complexo de β 2m-	

ThT não-mutado (cinzento, com o átomo de azoto do anel benzotiazol a azul). Para dupla mutação Y10A existem dois snapshots (C, replicado 2) e (D, replicado 4).....	53
Figura 27. Representação da presença/ausência de Ligações de Hidrogénio entre os resíduos presentes no local de ligação da β 2m WT e mutantes Q8A, Y10A e Y10 F com a ThT (A). Percentagem ao longo do tempo de simulação da presença de ligações de hidrogénio (B).....	54
Figura 28. Representação das ligações de hidrogénio estabelecidas entre β 2m e a ThT, entre os resíduos Q8 da β 2m e o átomo de azoto do dimetilaminobenzeno da ThT.....	55
Figura 29. Distância entre o centro geométrico do anel fenólico do resíduo Tyr26, da cadeia B e C, e o átomo de azoto do anel benzotiazol da ThT, para os complexos mutantes e duplos mutantes Q8A, Y10A e Y10F de β 2m-ThT.....	58
Figura 30. Representação da distância entre o centro geométrico do grupo fenol da Y26 das cadeia B e C e o átomo de azoto do anel benzotiazol da ThT no local de ligação da β 2m (A-H).....	59
Figura 31. Gráficos de Convergência de Energia para os complexos β 2m-ThT mutantes e duplos mutantes Q8A, Y10A e Y10F.....	60

Índice de Tabelas

Tabela 1. Diferença de energia livre relativa ($\Delta\Delta G$) de ligação da ThT a β 2m para as mutações Q8A, Y10A e Y10F.....	61
--	----

Abreviaturas

β 2m	Microglobulina- β -2
DM	Dinâmica Molecular
CEL	Cálculos de energia livre
HREM	<i>Hamiltonian Replica Exchange Molecular Dynamics</i>
MBAR	<i>Multistate Bennett's acceptance ratio</i>
MM	Mecânica Molecular
PBD	<i>Protein Data Bank</i>
PME	<i>Particle-mesh Ewald</i>
ThT	Tioflavina-T
WT	Selvagem

Resumo

O desenvolvimento de novas e melhores sondas moleculares para o diagnóstico precoce de doenças amilóides como Alzheimer, Parkinson e diabetes tipo II é essencial para o estabelecimento de estratégias terapêuticas adequadas. A β -2 microglobulina (β 2m) é uma proteína associada ao complexo Major de Histocompatibilidade de classe I. Nos doentes que realizam tratamentos prolongados de hemodiálise, a β 2m pode agregar e formar fibras amilóides que se depositam nos rins e nas articulações e podem causar uma doença conhecida como amiloidose relacionada com a diálise. Neste trabalho foram realizadas simulações de dinâmica molecular (DM) e cálculos de energia livre (CEL) para caracterizar a interação da β 2m com a sonda fluorescente tioflavina-T (ThT). Foi utilizado como objeto de estudo a estrutura cristalográfica da β 2m (PDB ID: 3MZT) que pode ser considerada um oligômero amilóide constituído por 3 homodímeros em forma de anel, onde duas conformações alternativas da ThT intercalam entre as folhas- β de cada dímero da proteína. Os resultados obtidos revelaram que os resíduos Q8 e Y10 da β 2m parecem ser cruciais na interação com a ThT o que está de acordo com outros resultados presentes na literatura. Para melhor caracterizar as restrições topológicas impostas por estes resíduos, os mutantes Q8A, Y10A e Y10F foram construídos *in silico* e simulado mais uma vez através de DM. Os resultados revelam que o anel aromático do resíduo Y10 é crucial na interação da ThT com a β 2m, uma vez que na mutação Y10A esta interação é largamente afetada. Para quantificar a contribuição destes resíduos na estabilidade do complexo β 2m-ThT foram realizados vários cálculos de energia livre. Mais uma vez, os resultados revelam que o

resíduo Y10 aparenta ser o mais importante para a estabilização da ThT dado que a mutação Y10A se mostra altamente destabilizadora.

Abstract

The development of new and better molecular probes for the early diagnosis of amyloid diseases such as Alzheimer's, Parkinson's and type II diabetes are of critical essence for the establishment of appropriate therapeutic strategies. β -2 microglobulin (β 2m) is a component of the Major Histocompatibility Complex class I. In patients on long term hemodialysis, β 2m can aggregate into amyloid fibers that deposit in the kidneys and joint spaces causing a disease known as dialysis-related amyloidosis. We employed molecular dynamics (MD) simulations and alchemical free energy calculations (AFEC) to better characterize the interaction of the protein β -2 microglobulin with the well-known fluorescent probe thioflavin-T (ThT). We have used the crystallographic structure of β 2m (PDB ID: 3MZT) as our object of study. This structure may be considered an amyloid-like oligomer consisting of 3 homodimers arranged in a ring where two alternative ThT conformations intercalate between the β -sheets of each dimer of the protein. The results obtained are in agreement with reports found in the literature, where residues Q8 and Y10 of β 2m were shown to be crucial for the interaction with ThT. To better characterize the topological constraints imposed by these residues, we have constructed *in silico* the mutants Q8A, Y10A and Y10F, and performed several MD simulations. The results show that the aromatic ring of Y10 is crucial for the interaction of ThT with β 2m, as with the mutation Y10A this interaction is strongly affected. Additionally, the energetic contribution of these residues to the stability of the β 2m-ThT complex was quantified using AFEC. The results clearly demonstrate that the most important residue for the stabilization of ThT is residue Y10, as the transformation of Y10A is highly unstable.

1 Introdução

1.1 Amilóide

As proteínas estão envolvidas na maioria dos processos importantes nos sistemas biológicos exercendo uma diversidade de funções vitais. Após a sua síntese nos ribossomas, cada proteína organiza-se numa estrutura tridimensional específica para ser capaz de desempenhar a sua função biológica. A falha no enrolamento de uma proteína ou na capacidade de manter a sua estrutura tridimensional selvagem está associada a diversas doenças, nomeadamente as amiloidoses.^{1,2}

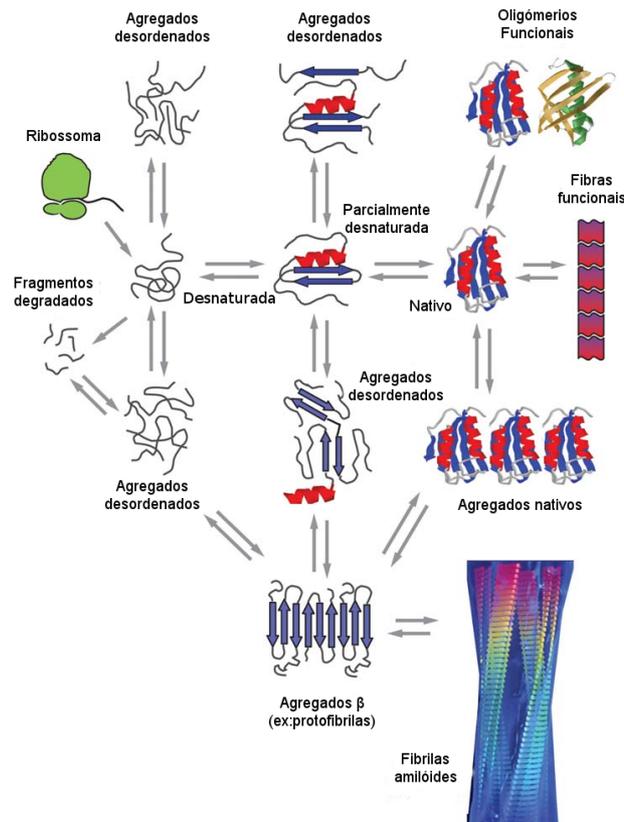


Figura 1. Representação esquemática de diferentes mecanismos para a formação de agregados proteicos e fibras amilóides. Após a sua síntese nos ribossomas, a cadeia polipeptídica organiza-se numa estrutura tridimensional selvagem que corresponde à forma funcional da proteína. Quando a proteína não adquire ou mantém a estrutura selvagem, podem gerar-se agregados que levam à formação de fibras amilóides.¹³

As fibras amilóides são agregados filamentosos de peptídeos ou proteínas que estão na origem de doenças como Alzheimer, Parkinson e diabetes tipo II.³ A formação de amilóide é uma consequência de enrolamento anormal e agregação de certas proteínas e/ou peptídeos assumindo uma conformação em folha- β pregueada e originando agregados fibrilares característicos (Figura 1). Vários estudos⁴⁻⁶ reportam a existência de alterações conformacionais de hélice- α e de estrutura não ordenada para folha- β após agregação.

Nos últimos anos, tem havido um grande interesse na caracterização da ligação não-covalente de espécies químicas a agregados e fibras amilóides. O interesse em estudar este tipo de interações baseia-se em duas grandes razões: (1) diagnóstico, onde as pequenas moléculas amiloidofílicas podem atuar como marcadores deste tipo de arranjos permitindo dessa forma através de técnicas de imagiologia detetar os depósitos de estruturas amilóides; e (2) terapêutica, onde as pequenas moléculas têm o potencial de influenciar a progressão da agregação das proteínas e a população das fibras.⁶

Uma vez que não se encontram disponíveis estruturas tridimensionais de fibras amilóides de proteínas, o foco tem sido colocado na análise estrutural de fibras amilóides de peptídeos (Figura 2). Estes permitem a investigação do mecanismo molecular subjacente à formação de fibras amilóides, fornecendo uma plataforma para o desenho racional de fármacos inibidores de formação de fibras ou solubilizar agregados e fibras já formados e promovendo uma melhor compreensão da interação entre os fármacos e os alvos. De facto, têm sido extensivamente estudadas moléculas peptídicas e não-peptídicas capazes de modular a formação das estruturas amilóides. É o caso do péptido KLVFF⁷, que através de interações de carácter hidrofóbico é capaz de se ligar a proteínas e impedir a sua polimerização inibindo a formação de fibras.⁸ Exemplos de

modeladores moleculares não-peptídicos são o DC-AB1, os derivados bisfenólicos e derivados das antracélinas⁹, moléculas bioativas como curcumina, vermelho de fenol, e polifenóis¹⁰ (derivados do vinho resveratrol e ácido tânico¹¹) e sondas fluorescente como o vermelho do congo¹².

Tal como se pode observar na Figura 1, onde estão representados possíveis mecanismos de formação de agregados proteicos, a transição de agregados- β para fibrilas amilóides pode ocorrer por adição ou de monómeros ou de protofibrilas (dependendo da proteína) para formar os agregados- β . Estes diferentes arranjos estruturais e as suas interconversões estão sujeitas a mecanismos de regulação molecular, sendo que muitas apresentam função biológica incluindo proteínas desnaturadas e fibras.¹³ As fibras estão associadas a doenças degenerativas nos mamíferos, porém em microorganismos como bactérias e fungos, estas proteínas são expressas na superfície celular e apresentam funções importantes na invasão mecânica de substratos bióticos e abióticos.¹⁴ Um exemplo bastante estudado de amilóide funcional, é o das fibras formadas pela proteína curlína que são utilizadas pela *Escherichia coli* para colonizar superfícies inertes e mediar a ligação a proteínas do hospedeiro.¹⁵ Contudo nas doenças conformacionais, tal como é o caso das doenças amilóides, os sistemas regulatórios falham e estas espécies não são corretamente eliminadas, acumulando-se no organismo e causando efeitos patológicos.¹³

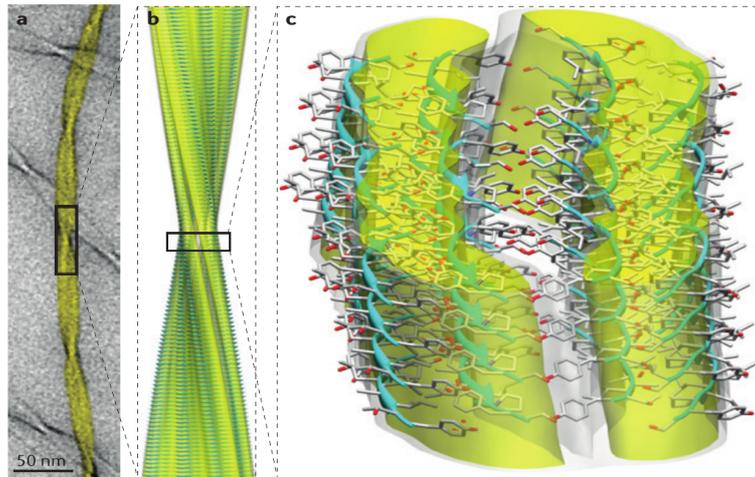


Figura 2. Estrutura de uma fibra amilóide com resolução atômica. Imagiologia por microscopia eletrônica (A) com dados de RMN de estado sólido permitiu construir modelos de estrutura com resolução atômica (B). Uma visualização mais detalhada (C) permite ver a organização da fibra amilóide em folhas- β .⁹⁴

1.2 β -2 microglobulina: um caso de estudo

A β -2 microglobulina (β 2m) humana é uma proteína monomérica globular com 99 resíduos de aminoácidos. Esta proteína é necessária na expressão do complexo major de histocompatibilidade classe 1 (MHC) assim como em outros complexos semelhantes tais como o recetor Fc fetal e o fator hemocromatose E, na superfície da membrana celular.¹⁶ Como parte do *turnover* celular normal, a β 2m é libertada no plasma e catabolizada pelos rins.¹⁷ A supressão da proteína β 2m no organismo pode comprometer o normal funcionamento do sistema imunitário e também desregular a homeostasia de ferro.^{18,19} Por outro lado, um aumento em dez vezes dos níveis de β 2m pode causar infeções e doenças degenerativas, incluindo insuficiência renal e artropatias.^{17,20}

A estrutura tridimensional da β 2m (Figura 3) apresenta sete cadeias- β (designadas de A a G) organizadas em duas folhas- β (ABED e CFG) ligadas por uma ponte dissulfeto (Cys25-Cys80).²¹ Esta estrutura rica em cadeias- β , característica transversal aos peptídeos e proteínas precursores de amilóide,¹³ favorece a formação de fibras amilóides de β 2m.

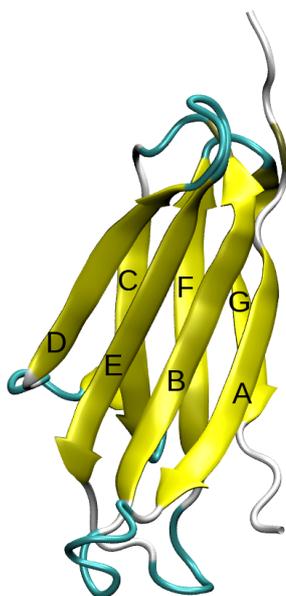


Figura 3. Representação da estrutura tridimensional selvagem da β -2 microglobulina (β 2m) (PDB ID 2YXF). A estrutura tridimensional da β 2m apresenta sete cadeias β (designadas de A a G) organizadas em duas folhas- β (ABED e CFG).

As fibras amilóides de β 2m são compostas pelo monómero da β 2m WT (selvagem), ou pelas variantes D76N, D59P e W60C.²² Particular interesse tem sido colocado na formação de fibras amiloides associadas à amiloidose relacionada com a diálise. A longo prazo, nos doentes que realizam tratamentos crónicos de hemodiálise, observa-se um aumento dos níveis da proteína no soro, causado pelo estímulo da produção da β 2m pelo processo de diálise ou pela incapacidade das membranas de diálise eliminarem a proteína. Esta acumulação da β 2m faz com que se formem depósitos de fibras amilóides nos rins que levam a insuficiência renal crónica.^{17,20} As fibras amilóides compostas principalmente por β 2m selvagem podem causar outro tipo de complicações quando se depositam nas articulações, resultando numa diversidade de artropatias^{23,24}

Apesar de um estudo estrutural extensivo da β 2m selvagem e das mutações identificadas até ao momento, os detalhes moleculares que ditam o potencial amilodogénico da β 2m continuam por elucidar. Reportado na literatura estão estudos

experimentais de determinação por cristalografia de raio-X da estrutura da proteína^{21,25}, e estudos computacionais de dinâmica molecular para analisar o enrolamento e desenrolamento da proteína selvagem e variantes^{22,26-28} e a sua agregação²⁹⁻³¹

1.2.1 Tioflavina T

A tioflavina-T (ThT) (Figura 4) é uma sonda fluorescente utilizada como método de detecção de fibras amilóides em solução e de fácil utilização.^{32,33} Quando livre em solução, apresenta um máximo de excitação a 385 nm e um máximo de emissão a 445

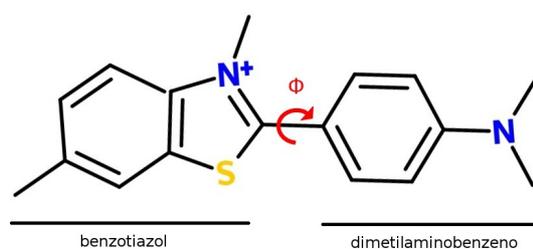


Figura 4. Estrutura da tioflavina-T (ThT). O ângulo ϕ é definido como o ângulo de torção entre o anel benzotiazol e o anel de dimetilaminobenzeno.

nm.³³ No entanto, sabe-se pouco acerca do mecanismo de interação da sonda com fibras amilóides. A ThT foi inicialmente utilizada como corante histoquímico para identificar depósitos amilóide nos tecidos e para quantificar fibras amilóide *in vitro* na presença de proteínas precursoras amilóide e agregados amorfos.³⁴ Na presença de amilóide, a ThT exibe um pico adicional de absorção a 450 nm e apresenta elevada fluorescência com um máximo de emissão a 480 nm. Estas alterações da fluorescência permitem identificar interações entre a ThT e fibras amilóides. Diversos estudos apontam para a interação da ThT com as estruturas folha- β , sendo estas o elemento estrutural predominante nas fibras amilóides.³³

O uso da ThT é frequente no estudo estrutural e mecanístico de formação de amilóide. Alterações na sua intensidade de fluorescência são usadas não só como indicador qualitativo de amilóide, mas também como medida quantitativa de formação amilóide.¹⁷ A extensão da conversão é utilizada, por exemplo, na determinação de efeitos inibidores de mutações e de pequenas moléculas.³⁵

1.2.2 Complexo $\beta 2m$ -ThT

Encontra-se disponível uma estrutura oligomérica da $\beta 2m$ na *Protein Data Bank* (PDB)³⁶ com características amilóides (PDB ID 3MZT)¹⁷. Esta estrutura (com uma resolução de 2.70 Å) é particularmente interessante porque inclui dados cristalográficos sobre o modo de ligação da sonda fluorescente ThT.^{3,8}

Esta estrutura apresenta-se sob a forma de um homohexâmero composto por três dímeros AF, BF e DE (Figura 5 A). Cada dímero é constituído por dois monómeros simétricos e por um local de ligação para a ThT localizado na interface dos monómero (Figura 5 B). As faces de contacto dos monómeros com a ThT são compostas por folhas- β pregueadas, com quatro cadeias- β e fazendo com o eixo longitudinal da ThT um ângulo perpendicular à direção das cadeias- β . Na estrutura cristalográfica referenciada, em cada uma das interfaces a ThT é representada por duas conformações alternativas.

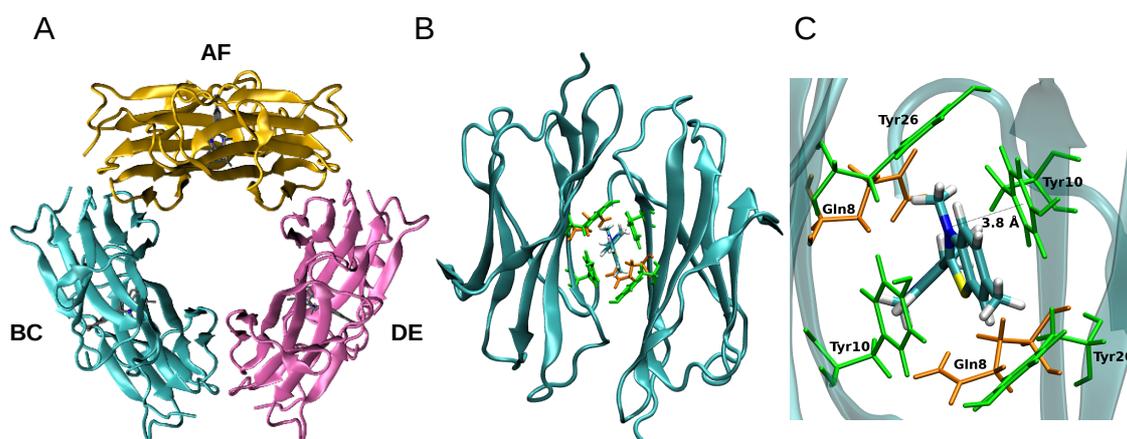


Figura 5. Estrutura Cristalográfica do Complexo β 2m-ThT (PDB ID: 3MZT). (A) Representação do hexâmero da proteína β -2 microglobulina, com a tioflavina na interface dos dímeros AF (laranja), BC (ciano) e DE (rosa). (B) Representação do dímero BC (ciano) com as cadeias laterais dos resíduos Gln8 (laranja), Tyr10 e Tyr26 (verde) em destaque. (C) Representação do local de ligação da ThT, com os resíduos Gln8, Tyr10 e Tyr26 identificados, o ligando de ThT e a distância de 3,8 Å do átomo de azoto do anel benzotiazol da ThT ao centro geométrico do anel aromático da Tyr10.

Da análise da estrutura, observa-se que as interações entre a ThT e as cadeias laterais dos resíduos Gln8, Tyr10 e Tyr26 são as mais importantes para a estabilização da interação entre a ThT e o dímero β 2m (Figura 5 C). O anel benzotiazol da ThT (Figura 4), devido à simetria do dímero, pode fazer empilhamento paralelo com o resíduo Tyr10 de um ou outro monómero. Este contacto do anel de benzotiazol com a Tyr10 indica um empilhamento aromático característico de interações catião- π e π - π . Na estrutura cristalográfica, a densidade eletrónica do anel benzotiazol da ThT está bem definida, enquanto a densidade para a porção dimetilaminobenzeno do fluoróforo parece estar limitada por uma contribuição rotacional média ao longo do eixo Φ (Figura 4). De facto, a posição fixa do anel benzotiazol restringe a localização e a orientação disponível do anel dimetilaminobenzeno. Assim, a rotação do ângulo Φ é o único grau de liberdade rotacional da tioflavina. Por outro lado, no local de ligação da proteína existe o resíduo Gln8 com uma densidade eletrónica bem definida, logo o ângulo Φ só pode variar entre

102° e 57°, uma vez que fora deste intervalo há impedimentos estéreos com as cadeias laterais de Gln8.¹⁷

Estas observações são essenciais para a caracterização de como a ThT liga a macromoléculas e como estas interações com espécies amilóides podem ajudar a explicar as alterações das suas características fotofísicas quando em complexo.¹⁷

1.3 Objectivos

Na atualidade, um dos maiores desafios no combate a doenças amilóide, como Alzheimer, Parkinson e diabetes tipo II, é a necessidade de um diagnóstico precoce. Para tal, é necessário um contínuo desenvolvimento de novas e melhores sondas moleculares como ferramentas de diagnóstico.

O objetivo deste trabalho é caracterizar detalhadamente a interação da proteína β -2 microglobulina com a sonda fluorescente ThT, procurando determinantes estruturais no reconhecimento e ligação amilóide.

2 Teoria e Métodos

2.1 Modelação computacional

As simulações computacionais apresentam cada vez mais uma relevância crescente na investigação científica. Prova disso foi a distinção no ano de 2013 de três cientistas da área de química computacional com o Nobel da Química: Arieh Warshel, Martin Karplus e Michael Levitt, pelo desenvolvimento de modelos multiescala para sistemas químicos complexos.

Este tipo de estudos podem ser utilizados em substituição ou em complemento de trabalho experimental. Em substituição na medida que só um número limitado de propriedades de um sistema biomolecular é acessível à medição experimental, enquanto numa simulação computacional não só médias, mas também séries de distribuições e de tempo de qualquer quantidade definível podem ser determinadas. As simulações computacionais representam ainda um complemento à investigação experimental ao fornecer de forma detalhada a conformação e outras distribuições que determinam as médias de espaço e tempo obtidos experimentalmente, tornando-se uma ferramenta essencial para interpretar dados experimentais.³⁷

As propriedades de um conjunto de moléculas, como gases, líquidos ou sólidos, podem ser calculadas a partir das propriedades das moléculas individuais. Se forem conhecidas as forças entre as moléculas que constituem o sistema, as propriedades do *ensemble* deverão ser computáveis. As simulações computacionais permitem estudar o enrolamento de proteínas, complexação de sistemas, por exemplo proteína-ligando, formação de membranas ou micelas, e partição de substâncias, por exemplo membranas em água. (Figura 6).³⁷

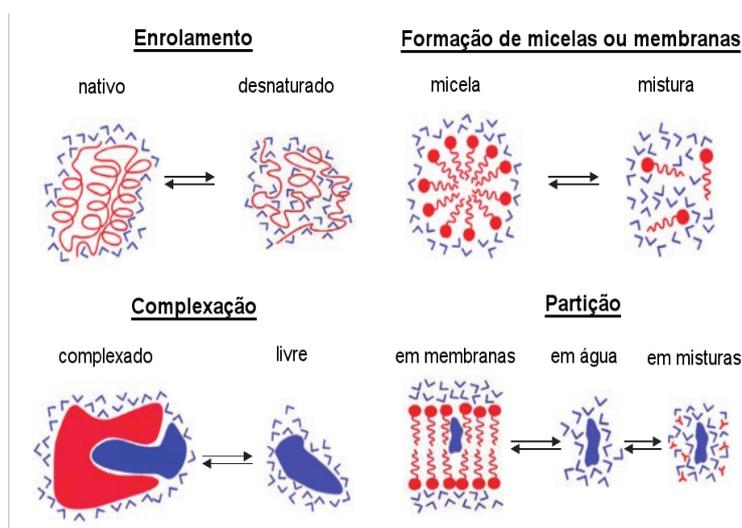


Figura 6. Sistemas biomoleculares que podem ser estudados por simulações computacionais. Exemplo, enrolamento de proteínas, formação de micelas ou membranas, complexação de sistemas e partição de substâncias.³⁷

Dois grandes desenvolvimentos permitiram que as simulações computacionais sejam hoje em dia uma área importante na investigação com aplicações em química e biologia molecular. O primeiro grande avanço foi o desenvolvimento de computadores mais potentes e baratos capazes de fazer um maior número de cálculos computacionais num menor espaço de tempo. O segundo avanço foi claramente o aperfeiçoamento dos campos de forças, simples formulas empíricas que descrevem a energia de uma molécula, ou grupo de moléculas, como função da distância entre os átomos constituintes.

De um modo geral para realizar uma simulação biomolecular é necessário definir um modelo molecular de acordo com os seguintes parâmetros: graus de liberdade moleculares ou atômicos explícitos no modelo; função de interação ou campo de forças usado para descrever a energia do sistema como função dos graus de liberdade,

amostragem destes graus de liberdade e modelação das condições de fronteira e das forças externas (Figura 7).

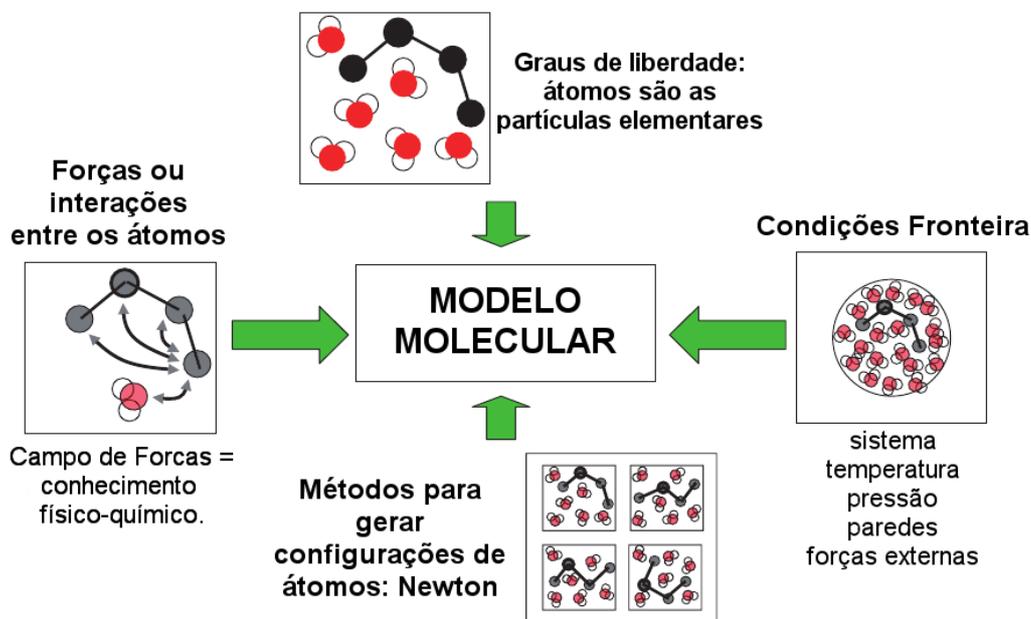


Figura 7. Modelo Molecular. Propriedades que constituem um modelo molecular: forças entre os átomos, graus de liberdade, métodos de amostragem e condições de fronteira.³⁷

2.1.1 Campo de forças

Os primeiros campos de força que permitiram descrever a dependência da energia de um sistema surgiram nos anos 60, com o desenvolvimento do método de mecânica molecular (MM). O seu objetivo inicial era o de prever estruturas moleculares, espectros vibracionais e entalpias de moléculas isoladas,³⁸ sendo por isso utilizados para estudar pequenas moléculas orgânicas. Um exemplo de referência deste tipo de estudo, são os potenciais MM desenvolvidos pelo grupo do *Allinger*³⁹, que foram originalmente aplicados ao estudo de hidrocarbonetos, mas que posteriormente foram desenvolvidos para serem capazes de lidar com diversas moléculas orgânicas e funcionalizadas (alcoóis, amidas, ésteres, etc).

Desde então a investigação científica foi incidindo em sistemas cada vez mais complexos levando a um desenvolvimento de campos de força com aplicações mais abrangentes. Exemplos de campos de forças abrangentes são o caso do *Dreiding*⁴⁰ e o *Universal*⁴¹ (UFF), que contêm parâmetros para todos os átomos na tabela periódica. Como exemplos de outros campos de forças temos o CHARMM⁴², AMBER⁴³, GROMOS⁴⁴, OPLS⁴⁵ e COMPASS⁴⁶. Os três primeiros são normalmente utilizados em simulações de biomoléculas, enquanto que o OPLS e o COMPASS foram desenvolvidos originalmente para simular matéria condensada. Todos estes campos de força estão constantemente a evoluir e a sofrer novos desenvolvimentos de modo a serem cada vez mais capazes de reproduzir propriedades experimentais.

Existem estudos que comparam a precisão dos campos de força CHARMM, AMBER e OPLS no contexto de simulações biomoleculares, mas os resultados não são claros.^{47,48} É portanto difícil comparar a performance destes campos de força.

O objetivo de um campo de força é descrever em termos clássicos todos os fatores de mecânica quântica, dividindo a energia eletrónica total em contribuições átomo-átomo como por exemplo, Coulomb, dispersão e energias de repulsão. A parametrização de um campo de força é um processo complexo, que necessita de várias etapas como a seleção da função que modela a energia do sistema; e a escolha de base de dados para determinar todos os parâmetros necessários da função anterior. Existe uma diversidade de dados experimentais que podem ser utilizados para este efeito, como comprimentos de ligação obtidos por raio-X, constantes de forças obtidas por espectroscopia, etc. Contudo, em muitos casos não estão disponíveis dados experimentais, recorrendo-se por isso a cálculos *ab initio* como fonte de informação para estas bases de dados. Uma vez que existe um grande número de parâmetros é frequente serem refinados por etapas e por

fim sendo validados os parâmetros final computando propriedades de sistemas não utilizados no processo de parametrização.⁴⁹

A conclusão é que cada campo de forças tem as suas vantagens e desvantagens relativamente aos dados e ao procedimento realizado na sua parametrização, a principal decisão para a escolha do campo de força depende do problema particular a ser considerado.⁴⁹

$$E_{total} = \sum_{\text{ligações}} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{\text{ângulos}} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{\text{diedros}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right]$$

Figura 8. Função da energia potencial.⁵⁰

Um campo de forças é descrito por uma função de energia potencial (Figura 8), que se divide em duas partes: uma que descreve as interações covalentes e outra as interações não-covalentes. Nas interações covalentes está descrito o alongamento da ligação entre dois átomos, o ângulo da ligação, torções dos ângulos impróprios ou diedros. Já, nas interações não covalentes os termos da função definem as interações van der Waals, recorrendo ao potencial de Lennard-Jonnes, e a interações eletrostáticas (carga dos átomos), através da aplicação da lei de Coulomb.⁵⁰ Nos termos intramoleculares, como se pode ver na Figura 8, o alongamento da ligação é representado muitas vezes por uma função harmónica simples que controla o comprimento de ligações covalentes. O ângulo das ligações também é definido por uma função harmónica, mas normalmente é representado como um potencial trigonométrico. Em qualquer molécula com mais de quatro átomos seguidos, é necessário incluir um

termo para os ângulos diedros. Já nos termos intermoleculares, as interações de van der Waals entre dois átomos surgem do balanço entre as forças de repulsão e de atração. As forças de repulsão devem-se à sobreposição das nuvens eletrônicas, enquanto as interações de dipolos induzidos resultam numa componente de atração que varia com r^{-6} . O potencial de Lennard-Jones é utilizado frequentemente para descrever este tipo de interações. O termo final da equação descreve as interações eletrostáticas. A densidade eletrônica molecular pode ser obtida com alta precisão através de mecânica quântica, o problema é reduzir essa densidade de cálculo num descritor comportável em DM. A escolha para esta descrição é atribuir as cargas atômicas parciais de cada núcleo e utilizar a lei de Coulomb para calcular a sua contribuição na energia total.

2.1.2 Condições de Fronteira Periódicas

Se simularmos o nosso sistema numa caixa com um tamanho finito, contendo centenas ou milhares de moléculas, enquanto que os átomos no centro da caixa estarão envolvidos em interações corretas o mesmo não se passa com as moléculas no limite da caixa devido ao vácuo que as rodeia, fazendo com que o ambiente simulado não seja o desejado.

A implementação de condições de fronteira periódicas permite solucionar este problema, rodeando o nosso sistema com imagens dele próprio (Figura 9). Considera-se assim que o sistema em estudo é uma célula unitária numa solução infinita ou cristal. Desta forma, as moléculas na face da caixa podem interagir com a sua imagem nas caixas envolventes, minimizando os efeitos de superfície. Se a molécula durante a simulação sair da caixa, então a sua imagem entrará do lado oposto da caixa, mantendo assim o número de moléculas no sistema constante. A vantagem evidente deste método

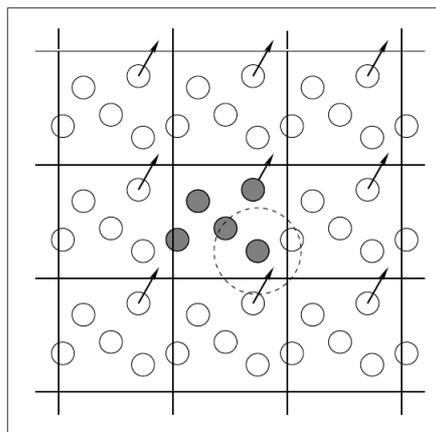


Figura 9. Condições de Fronteira Periódicas.⁴⁹

é minimização dos efeitos de superfície, contudo, verifica-se uma periodicidade artificial e elevada concentração efetiva.³⁷

2.1.3 Minimização de energia

A função de energia potencial de um sistema macromolecular possui uma superfície muito complexa com um número elevado de dimensões. Esta tem um ponto mais baixo, que se designa por mínimo de energia global, e um elevado número de mínimos de energia locais, em que a derivada da função de energia potencial com respeito às coordenadas é zero e as segundas derivadas são não-negativas (Figura 10).

Com conhecimento de todos os mínimos locais e do mínimo global e todos os pontos sela é possível usar essa informação para descrever estruturas e conformações as suas energias livres, bem como a dinâmica das transições estruturais. Contudo, a dimensão do espaço conformacional e o número de mínimos locais são demasiado elevados sendo impossível fazer uma amostragem correta ou completa desses pontos todos para obter uma superfície completa. Além disso, não existe nenhum método de minimização capaz de garantir a determinação de um mínimo global num espaço de tempo prático.

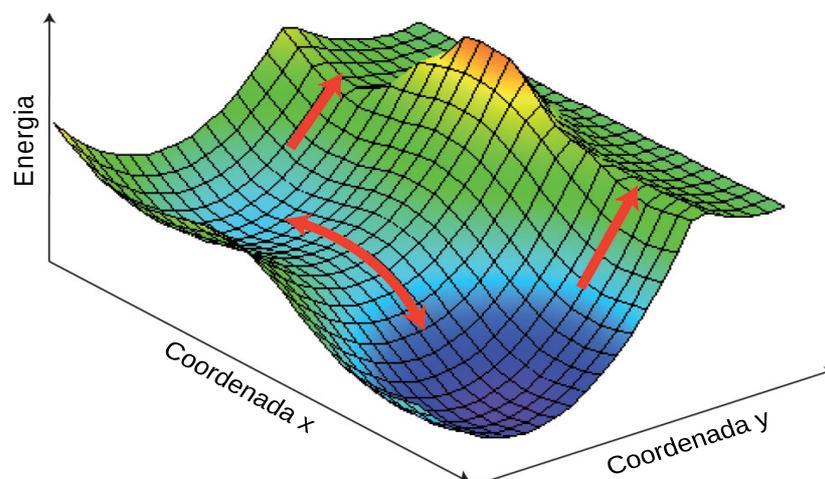


Figura 10. Superfície de energia potencial.⁹³

Existem vários métodos para minimizar a energia de um sistema. Dois desses métodos são o *steepest descent* e o gradiente conjugado. O método de *steepest descent* consiste em cada passo na direção de um gradiente negativo, na direção da força, sem qualquer consideração dos passos anteriores. O método é simples, a convergência pode ser lenta, especialmente na proximidade de um mínimo local. Apesar de este método não ser o mais eficiente na procura, é robusto e fácil de implementar.

Já o método de gradiente conjugado usa a informação do gradiente dos passos anteriores. De forma geral o *steepest descent* “leva” o sistema para um sítio mais perto de um mínimo local mais rapidamente enquanto um método de gradiente conjugado fica muito perto do mínimo local. O gradiente conjugado é um *steepest descent* mais lento nos primeiros passos de minimização, mas é mais eficiente para chegar a um mínimo de energia.

2.1.4 Dinâmica Molecular

As soluções aproximadas da equação de Schrödinger, obtidas pelos métodos de mecânica quântica, dão a melhor descrição possível de um sistema. Se o cálculo

matemático atual fosse capaz de lidar com mais de duas partículas a movimentarem-se juntas seria possível obter a solução exata da equação de Schrödinger para moléculas com mais do que um elétron, o que forneceria todas as propriedades desses sistemas. Contudo, a utilização da mecânica quântica aplicada ao estudo de sistemas proteicos, sistemas membranares, etc, é demasiada dispendiosa devido ao tamanho do objeto de estudo na medida que considera a distribuição espacial dos elétrons num sistema e portanto o número de partículas a considerar pode ser enorme e os cálculos podem ser morosos. Por esta razão, a mecânica quântica está limitada ao estudo de sistemas com poucas centenas de átomos, uma vez que acima desta ordem de grandeza, as soluções obtidas pela mecânica quântica tendem a ser menos exatas e o custo computacional insustentável.⁵¹

Em alternativa aos métodos de mecânica quântica são utilizados métodos de mecânica molecular que não têm em consideração os movimentos eletrónicos e calculam a energia de um sistema apenas em função das posições dos núcleos. Nestes métodos considera-se que todos os elétrons estão na sua posição ótima e recorre-se a regras empíricas, para calcular as energias dos núcleos. Apesar da mecânica molecular ser baseada num modelo algo simplista e empírico das interações dentro de um sistema esta técnica tem sido utilizado com sucesso em diversos estudos conformacionais.

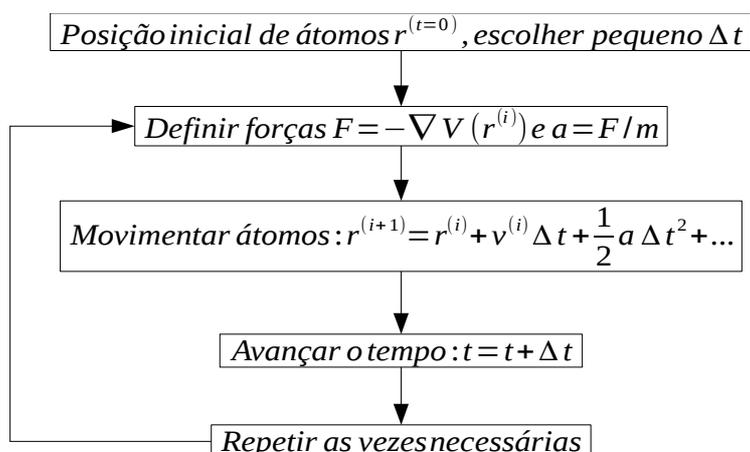


Figura 11. Esquema de uma simulação de Dinâmica molecular.⁵⁰

A dinâmica molecular é um método que utiliza os fundamentos empíricos da modelação molecular e que permite simular os movimentos de um sistema de partículas. Através da resolução das equações de movimento de Newton é possível determinar as trajetórias das partículas. Neste modelo é necessário definir um conjunto de condições iniciais (posições e velocidades para cada partícula), uma boa representação das forças que atuam entre as partículas e uma definição das condições de fronteira a serem empregues. Através da resolução das equações de movimento de Newton para cada uma das partículas, é então possível calcular as novas posições das partículas. O tempo de simulação avança e o processo é repetido várias vezes (Figura 11).

Os campos de força são uma das grandes limitações da dinâmica molecular devido à sua difícil parametrização e refinamento causado pela existência de um número elevado de compostos químicos para o qual os campos de força têm de ser derivados. A escala de tempo é outra das grandes limitações da dinâmica molecular já que os processos biológicos ocorrem em escalas de tempo superiores ao que é possível simular.⁴⁹

As simulações de DM apresentam dois grandes desafios: os campos de forças utilizados necessitam um maior refinamento e uma elevada exigência computacional impede simulações maiores que um microsegundo, levando em muitos casos a uma amostragem inadequada dos estados conformacionais.⁵²

2.1.5 Restrições de posições e distância

O principal objetivo de estabelecer restrições aos ângulos e às ligações em simulações de DM é permitir uma maior integração do tempo sem perder informação conformacional relevante. Para alcançar isto é necessário conciliar que interações e movimentos podem ser tratados de forma aproximada ou aqueles que tem de ser explícitos.

Uma constrição do sistema traduz-se em forçar propriedades do sistema, como ligações e ângulos, a adotar um valor específico ao longo da simulação. Já uma restrição define um grupo de valores que algumas propriedade do sistema são encorajadas a tomar. Contudo, não existe uma tentativa de forçar o sistema a adotar esse valor definidos como restrições. O sistema é livre para desviar desse valor ótimo, mas sofrerá uma penalização. Algumas propriedades do sistema que são sujeitas a restrições são as ligações e os ângulos entre os átomos do sistema.

Várias técnicas foram propostas para tratar desta questão. Os métodos mais utilizados em DM são os algoritmos SHAKE⁵³ e LINCS⁵⁴. Em geral, estas técnicas controlam a dinâmica de um sistema molecular de forma a permitir uma integração mais rápida sem diminuir significativamente a precisão dos resultados. Os algoritmos SHAKE e LINCS corrigem os comprimentos de ligação para os valores definidos como “corretos”. As principais diferenças entre os dois métodos, deve-se à parte iterativa do SHAKE e a sua capacidade de limitar ângulos, bem como comprimentos de ligação. O método LINCS é

baseado num algoritmo de dois passos não iterativo e é reportado como sendo mais estável e mais rápido que o algoritmo SHAKE. Contudo, o algoritmo LINCS trata principalmente de limitações de ligações, sendo capaz de controlar de forma isolada limitações de ângulos.

Para otimizar o tempo de cálculo, uma derivação do algoritmo SHAKE, designado por SETTLE⁵⁵ é geralmente utilizado no tratamento de moléculas rígidas de água, uma vez que foi otimizado para lidar com as suas restrições de ligação e de ângulos. O método de SETTLE é melhor utilizado quando se quer poupar tempo de simulação, uma vez que as moléculas de água podem ocupar 80% de um sistema explícito.

2.1.6 Acoplamento de Temperatura e Pressão

Na simulação correta de um sistema biológico é necessário controlar os parâmetros externos como a pressão e a temperatura.

O conjunto de configurações e propriedades mantidas constantes durante a integração das equações de Newton e que representam o estado do sistema é chamado de *ensemble*.⁵⁶ Uma das várias opções de *ensemble* é o microcanónico ou NVE (número de partículas, volume e energia total constantes durante a simulação). Outras alternativas para esse *ensemble* foram desenvolvidas, nas quais se controla separadamente a temperatura, T, e a pressão, P, ao invés da energia total (E). Dentro desses encontram-se o canónico NVT (com número de partículas, volume e temperatura constantes) e o isotérmico-isobárico ou NPT (com número de partículas, pressão e temperatura constantes).^{56,57}

Existem várias razões para que seja necessário controlar a temperatura de um sistema podem ocorrer desvios durante a equilibração, devido a erros de integração, aquecimento devido a forças externas. Contudo, tem se ter atenção para a temperatura

não ser definida para um ponto termodinâmico, que pode causar erros, como também não ter correta definição das forças físicas da dinâmica.

O algoritmo para o acoplamento de temperatura de Berendsen⁵⁸ simula o *ensemble* fraco com uma cinética de primeira ordem a um banho de aquecimento externo com uma determinada temperatura T_0 . O efeito deste algoritmo leva a uma correção lenta do desvio da temperatura do sistema T_0 de acordo com a equação 4.

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T}{\tau} \quad (\text{Eq.1})$$

que significa que o desvio da temperatura vai diminuindo exponencialmente com a constante de tempo τ . Este método de acoplamento tem a vantagem de a força de acoplamento poder ser alterada e adaptada à simulação.

Devido à limitação do algoritmo de *Berendsen*, foi desenvolvido o termostato *v-rescale*⁵⁹ que tem em consideração a distribuição da energia cinética, sendo assim capaz de produzir um correto *ensemble* do sistema.

Como existe no caso do acoplamento de temperatura, o sistema também pode ser acoplado a um “banho de pressão”.

O algoritmo de acoplamento de Berendesen ajusta as coordenadas e os vetores da caixa em cada passo, ou em cada n_{PC} passos, com a matriz μ , que afeta a cinética de relaxação de primeira ordem da pressão exercida numa pressão de referência P_0 de acordo com:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{P_0 - P}{\tau_p} \quad (\text{Eq.2})$$

É importante reparar que apesar do algoritmo de controlo de pressão *Berendsen* conseguir uma média de pressão correta, não consegue exatamente um *ensemble* NPT, e não é evidente que tipo de erros esta aproximação pode trazer.

Outro método de acoplamento de pressão é o baróstato Parrinello-Rahman^{60,61} que é utilizado em casos de estudo onde as flutuações de pressão ou volume são importantes, por exemplo, no cálculo de propriedades termodinâmicas, especialmente em sistemas pequenos, pode ser problemático pois o *ensemble* pode não conseguir definir corretamente acoplamentos fracos, e assim não simular um verdadeiro *ensemble* NPT.

2.1.7 Convenção da imagem mínima e raio de corte

A implementação das condições de fronteira periódicas requer a avaliação das forças exercidas sobre cada molécula por todas as demais moléculas do sistema. Se um sistema contém N partículas e o potencial se expressa como a soma das interações entre pares de partículas, então existem termos para essa soma. No entanto, as interações com as partículas das caixas imagem também têm que ser incluídas nessa soma. Com isso, a soma constará de infinitos termos e, na prática, sua avaliação requer a realização de aproximações. Para o tratamento das interações de curto alcance, onde $V \sim r^6$ (interações de van der Waals), emprega-se o procedimento denominado convenção da imagem mínima⁵⁶, que é uma consequência do uso das condições fronteira periódicas. Nesse caso, é realizado um raio de corte esférico, geralmente da ordem de $L/2$ (L é o comprimento da célula de simulação) para evitar a interação da partícula com sua própria imagem ou com a mesma partícula duas vezes.⁵⁶

2.1.8 Tratamento das interações de longo alcance

Como referido anteriormente, as interações de vdW podem ser tratadas apenas como interações de curto alcance, uma vez que o potencial de interação intermolecular decai rapidamente com o aumento da distância entre as partículas⁵⁶. No entanto, para o tratamento das interações de longo alcance (potencial de Coulomb), em que o potencial decai com a distância que é menor do que r^d (d é a dimensão do sistema), a diminuição

do potencial produz efeitos que, em muitos casos, comprometem severamente os resultados das simulações.⁶² Este problema tem sido contornado com a utilização de vários métodos, baseados na soma de *Ewald*⁵¹, como o método PME (*Particle-mesh Ewald*)⁶³

2.2 Cálculos da energia livre

A energia livre é sem dúvida um dos conceitos mais importantes em química-física. As energias livres de sistemas moleculares conseguem descrever a sua tendência de associação e reação. Desta forma, a possibilidade de prever esta propriedade através de teoria molecular seria sem dúvida alguma uma enorme vantagem e um objetivo muito sedutor. Nos anos mais recentes conseguiu-se progredir a um ponto em que é possível através da utilização de métodos de dinâmica molecular executar cálculos de energia livre em áreas tão variáveis como a solvatação de pequenas moléculas, ligação de pequenos compostos orgânicos e proteínas e ácidos nucleicos, estabilidade de proteínas, etc.

2.2.1 Fundamentos dos Cálculos de energia livre

Energia livre é uma função de estado, em que a diferença de energia livre associada a um dado evento, por exemplo um fármaco ligado ao seu recetor, é determinada apenas pela energia anterior e seguinte ao evento. O caminho percorrido do estado inicial para o estado final pode influenciar a cinética do recetor-ligando mas não tem efeito na sua energia livre.⁵⁰

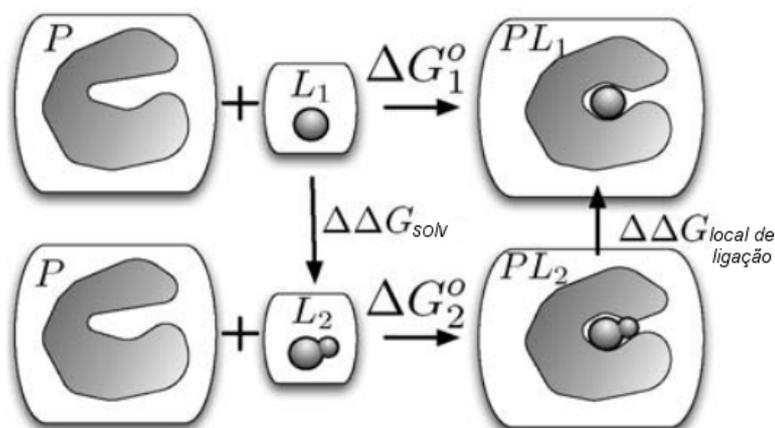


Figura 12 . Ciclo Termodinâmico utilizado no cálculo de energias de ligação de pequenas moléculas orgânicas a uma proteína.⁸⁶

Na figura 12, está descrito um ciclo termodinâmico usual neste tipo de cálculos em que temos uma proteína e a transformação de um ligando em solvente ($\Delta\Delta G_{solv}$) e no local ativo da proteína ($\Delta\Delta G_{local\ de\ ligação}$). Na secção de cima e de baixo são apresentadas as energias livres de ligação absolutas (ΔG°) para dois compostos L_1 (ΔG_1°) e L_2 (ΔG_2°), para a proteína de interesse. Estas duas energias podem ser calculadas experimentalmente. No entanto é possível calcular computacionalmente a energia livre associada à transformação de L_1 em L_2 em água ($\Delta\Delta G_{solv}$) e no local ativo ($-\Delta\Delta G_{ativo}$). As energias calculadas experimentalmente e computacionalmente são equivalentes podendo então calcular-se a energia livre de ligação relativa por:

$$\Delta G_1^\circ - \Delta G_2^\circ = \Delta\Delta G_{solv} + \Delta G_{ativo} \quad (Eq.3)$$

Neste trabalho foi utilizado um ciclo termodinâmico similar ao anteriormente descrito (Figura 13), mas que neste caso permitisse calcular a diferença de energia livre de ligação relativa aplicada a resíduos mutados no dímero de $\beta 2m$ e que são responsáveis pela ligação e estabilização da ThT. Ou seja, a transformação ocorreu entre o dímero $\beta 2m$ nativo e o mutante. Assim, avaliou-se a contribuição energética de cada

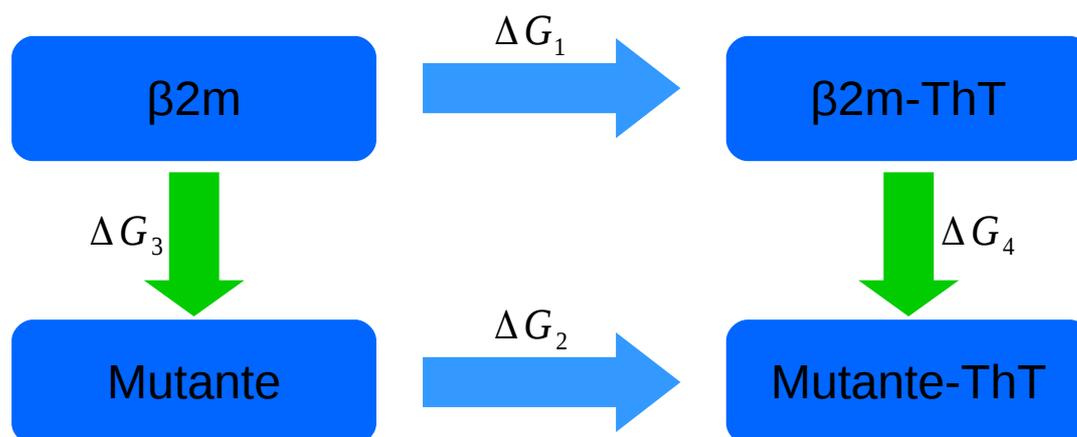


Figura 13. Ciclo termodinâmico do complexo $\beta 2m$ -ThT. ΔG_1 e ΔG_2 , a azul, podem ser calculados experimentalmente, enquanto ΔG_3 e ΔG_4 , a verde são calculados computacionalmente.

um dos resíduos na ligação da ThT com a $\beta 2m$. Como se pode observar na Figura 13, ΔG_1 corresponde à energia livre de ligação da ThT ao dímero nativo de $\beta 2m$, ΔG_2 à energia de ligação da ThT ao dímero mutante de $\beta 2m$, ΔG_3 a energia livre de transformação do dímero $\beta 2m$ para o dímero mutado, e por último, ΔG_4 a energia livre de transformação do complexo nativo $\beta 2m$ -ThT no complexo mutado $\beta 2m$ -ThT.

$$\begin{aligned} \Delta \Delta G &= \Delta G_2 - \Delta G_1 = \Delta G_4 - \Delta G_3 \\ \Delta \Delta G &= \Delta G_4 - \Delta G_3 \end{aligned} \quad (\text{Eq. 4})$$

Desta forma, através da utilização da equação 4 é então possível calcular a diferença de energia livre de ligação da ThT à $\beta 2m$ selvagem e seus resíduos mutados.

No processo de transformação as simulações podem ficar retidas em mínimos locais de energia causando resultados imprecisos. Muitos casos de simulação molecular requerem uma amostragem das superfícies energéticas pois estas possuem mínimos e barreiras de energia entre os mínimos que podem ser difíceis de ultrapassar à temperatura ambiente em escalas de tempos acessíveis a simulação. Isto significa que os resultados são influenciados pela escolha das condições iniciais, já que estas vão determinar a região no espaço a ser explorada pela simulação. As simulações de *replica*

exchange tentam aumentar a amostragem nestes casos realizando um elevado número de réplicas independentes em *ensembles* ligeiramente diferentes, e alterando periodicamente as coordenadas das réplicas entre os *ensembles*. Normalmente, o conjunto de réplicas é construído para que num extremo do conjunto de réplicas esteja o *ensemble* no qual se quer que a amostragem seja feita, e o outro extremo onde as barreiras energéticas possam ser ultrapassadas mais facilmente. Então se as tentativas de troca de réplicas entre os *ensemble* resultar em *ensembles* válidos, a probabilidade de tentativas de troca é suficientemente alta e o resultado de réplicas que daí resultar numa boa mistura de *ensembles*, pode se dizer que a amostragem final é estatisticamente correta e próxima do ideal.⁶⁴ Neste trabalho, com o objetivo de minimizar os problemas de amostragem anteriormente descritos, utilizou-se *Hamiltonian Replica Exchange Molecular Dynamics* (HREMD) em que em intervalos regulares as conformações alteram entre valores adjacentes de λ .⁶⁵

2.2.2 Limitações dos cálculos de energia livre

Para acautelar a precisão dos cálculos de energia livre é necessário que tenhamos em consideração vários aspetos. Um dos aspetos mais importantes é o tratamento realista do ambiente do sistema proteína-ligando. As simulações típicas de ligação de um ligando incluem a proteína, o ligando, água e talvez alguns iões para neutralizar o sistema a simular. Contudo muitas afinidades de ligação de um ligando depende significativamente do pH, da concentração de sal e da concentração metal-ião. Nenhum destes aspetos adicionais são tidos em conta no cálculo de energia livre na ligação de um ligando.⁶⁶

Tal como descrito anteriormente, é necessário um maior avanço no desenvolvimento de parâmetros de campos de força atômico. Um número elevado de testes de energia

livre de solvatação demonstraram que corrente geração de campos de força tem problemas fundamentais que os impede de obter a energia livre de ligação com precisão dentro de um intervalo de 1 kcal/mol.⁶⁷⁻⁶⁹ Os parâmetros de campos de forças para proteínas tem mais de dez a quinze anos, e geralmente só as torções foram melhoradas.^{70,71}

Mais problemático é a exatidão dos parâmetros dos ligandos, pois o número de grupos funcionais é significativamente maior que nos sistemas de proteínas e o tempo despendido na sua parametrização significativamente menor. Poucos são os campos de força que tem associado ferramentas ou algoritmos para determinar parâmetros de ligandos compatíveis.⁷²

Vários grupos de investigação estão a desenvolver funções de potencial polarizáveis,⁷² que têm um grande potencial em melhorar as capacidades macromoleculares de um campo de forças em prever as afinidades de ligação. A inclusão da polarizabilidade é um dos próximos passos no desenvolvimento dos campos de força,⁷³ que já foi demonstrado ser essencial no cálculo da energia livre de ligação de ligandos carregados.⁷⁴ Contudo, neste momento, ainda não foi comprovado que são quantitativamente melhores que os campos de força com carga fixa.⁷⁵

Muitos cálculos de energia livre utilizam simulações de DM simplificados, que geralmente tem dificuldade em explorar muitos graus de liberdade conformacionais. Para haver uma correta amostragem do espaço conformacional são necessários métodos como HREMD, que ao exploram esse espaço conseguem uma maior precisão na previsão da energia livre.⁷⁶

2.3 Protocolo Computacional

2.3.1 Definição e preparação do sistema de simulação

Devido à grande semelhança estrutural entre dímeros do hexâmero da $\beta 2m$ (PDB 3MZT), foi selecionado para a realização deste trabalho o dímero BC. A preparação do dímero consistiu inicialmente na remoção de todas as moléculas de água e iões presentes na estrutura cristalográfica. De seguida, foram adicionados todos os hidrogénios a cada um dos resíduos de aminoácido.

Foram preparados três grupos de estruturas: dímero selvagem (WT) $\beta 2m$; complexo WT $\beta 2m$ -ThT e complexos mutantes de $\beta 2m$ -ThT. Para a preparação dos mutantes $\beta 2m$, realizaram-se três mutações *in silico*: mutação do resíduo de glutamina na posição 8 para alanina (Q8A), mutação do resíduo de tirosina na posição 10 para alanina (Y10A), e mutação do resíduo de tirosina na posição 10 fenilalanina (Y10F). Para cada mutação foram produzidos dois mutantes: (i) apenas o resíduo de um dos monómeros foi mutado, e (ii) dupla mutação do resíduo nos dois monómeros. Estas mutações foram feitas com a ferramenta *mutagenesis* do programa PYMOL⁷⁷. No total, foram estudados 8 sistemas diferentes.

O processo de simulação utilizado é constituído por 6 passos independentes: (1) geração da topologia da proteína, (2) adição de moléculas de água à caixa de simulação, (3) neutralização do sistema através da adição de iões, (4) minimização do sistema, (5) inicialização/equilíbrio do sistema, e por último, (6) a simulação de dinâmica em si.

No primeiro passo, definiu-se o estado de protonação das cadeias laterais dos resíduos do dímero e dos seus terminais carboxílico e amina a pH 7. O campo de forças

utilizado para parametrizar a proteína foi o AMBER99SB⁷⁰ e o modelo de águas empregue foi o TIP3P⁷⁸.

No segundo passo, após se ter gerado uma caixa de simulação em forma de octaedro truncado, foi adicionado o solvente. A caixa de simulação foi construída de modo a garantir a distância mínima de 0,8 nm entre a proteína e as faces da caixa.

No terceiro passo do protocolo, foram adicionados dois íões de Na⁺, para neutralizar o sistema. A necessidade de neutralizar o sistema tem a ver com o tipo de tratamento eletrostático escolhido para as simulações: PME (*Particle-mesh Ewald*).

Em seguida, o sistema foi minimizado (Passo 4), inicialmente através do método de *steepest descent* (em que foi feita uma minimização de 2000 passos com restrições de movimento em todos os átomos), seguida de uma segunda minimização através do método de gradiente conjugado. Com 2000 passos de minimização, com restrições de movimento aplicado apenas nos carbonos- α .

O último passo da preparação do sistema para a simulação de dinâmica molecular (Passo 5) é a equilibração das variáveis do sistema, tais como a temperatura e a pressão, num total de 2 ns. Inicialmente, o sistema é simulado com restrições posicionais em todos os átomos (proteína e ligando), sendo utilizado o termostato de *Berendsen*⁵⁸ para controlar a temperatura, a 303 K. Neste passo, não se utilizou qualquer tipo de baróstato. No segundo passo, foram aplicadas restrições posicionais apenas aos carbonos- α da proteína e mantendo-se a utilização do termostato de *Berendsen* à mesma temperatura que no passo de equilibração anterior. Neste passo, também não foi utilizado qualquer baróstato. No passo seguinte, todas as condições descritas no passo anterior foram mantidas mas adicionalmente foi adicionado um baróstato de *Berendsen* para controlar a pressão do sistema em torno de 1 ATM. No passo seguinte do processo de equilibração

foram mantidas todas as condições descritas no passo anterior com exceção do termostato e do baróstato utilizados. Neste caso, o termostato utilizado para controlar a temperatura do sistema foi o *v-rescale*⁵⁹ e o controlo da pressão foi feito com o baróstato de *Parrinello-Rahman*^{60,61}. No último passo de equilibração do sistema, todas as restrições posicionais aos átomos da proteína foram removidos, mantendo-se ao mesmo tempo o termostato e o baróstato utilizados no passo anterior. O sistema deixa de ter restrições nos átomos e as condições de temperatura e pressão são as mesmas do passo anterior.

Para todas as séries de DM descritas neste trabalho, foram realizadas 4 simulações replicadas, cada uma com 200 ns de duração. As condições de simulação genéricas foram as mesmas descritas no último passo de equilibração, ou seja, com a utilização do termostato de *v-rescale* e com o baróstato de *Parrinello-Rahman* para controlar a temperatura em redor dos 303 K e a pressão do sistema de simulação por volta do 1 ATM, com um *ensemble* NPT.

A topologia do ligando (ThT) foi construída com recurso ao script /ferramenta *antechamber*⁷⁹ do AmberTools 12. O ligando foi parametrizado com o campo de forças *general amber forcefield* (GAFF)⁸⁰, sendo que as cargas parciais atribuídas aos átomos foi feita com o método AM1-BCC⁸¹. Para testar a estabilidade e o comportamento do ligando durante a simulação foi realizada uma simulação de DM de 20 ns nas condições descritas anteriormente.

2.3.2 Parâmetros para os Cálculos de Energia Livre

A construção das topologias híbridas do sistema utilizadas nos cálculos de energia livre foi feita através da ferramenta Pmx⁸². Esta ferramenta gera de forma automática as estruturas e as topologias híbridas para mutações de aminoácidos que representa os dois

estados físicos do sistema. Após a obtenção desta estrutura híbrida o procedimento e os parâmetros para a preparação da simulação é igual à descrita anteriormente para as simulações de dinâmica molecular. Os cálculos de energia livre foram realizados por HREMD num tempo de simulação total de 5 ns onde foram definidos 12 intervalos de λ , que ao longo da simulação alteraram de 0 a 1, descrevendo dessa forma a interconversão do sistema não-mutado para o sistema mutado.

2.4 Análises

Todas as análises foram feitas recorrendo a diferentes ferramentas disponíveis no software GROMACS⁸³. A visualização e construção das figuras neste trabalho foram feitas através da utilização dos programas Pymol 1.3r1⁷⁷ e VMD⁸⁴. Todos os gráficos foram construídos com o programa Veusz.⁸⁵

2.4.1 Raiz dos desvios médios quadráticos

A raiz dos desvios médio quadráticos (RMSD), é utilizada para avaliar a semelhança estrutural entre duas estruturas. Este cálculo foi feito através da ferramenta `g_rms` do *software* GROMACS.

$$RMSD(t_1, t_2) = \left[\frac{1}{M} \sum_{(i=1)}^N m_i \|r_i(t_1) - r_i(t_2)\|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (Eq. 5)$$

M represente o somatório de todos os átomos m_i e $r_i(t)$ a posição do átomo i ao tempo t . A estrutura em estudo foi alinhada por mínimos quadrados à estrutura referência sendo o cálculo de RMSD efetuado *a posteriori*.

2.4.2 Raiz das flutuações médias quadráticas

A raiz das flutuações médias quadráticas, RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*), é a medida do desvio das posições atômicas da trajetória alinhada a uma estrutura de referência.

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{t} \sum_{t_j=1}^t \|r_i(t_j) - \bar{r}_i\|^2} \quad (Eq. 6)$$

r_i é a posição vetorial do átomo i ao tempo t_j , \bar{r}_i é a posição média do átomo i durante t . Utilizou-se a ferramenta `g_rms` do GROMACS para efetuar o cálculo de RMSF dos carbonos- α do dímero $\beta 2m$, permitindo identificar as regiões da proteína que sofrem maior variação estrutural.

2.4.3 Ligações por ponte de hidrogénio

A ferramenta `g_hbond` do GROMACS analisa as possíveis ligações de hidrogénio presentes ao longo de uma simulação. Para determinar a existência de ligações de hidrogénio, é utilizado um critério geométrico:

$$\begin{aligned} r &\leq r_{HB} = 0,35 \text{ nm} \\ \alpha &\leq \alpha_{HB} = 30^\circ \end{aligned}$$

Em que r é a distância entre os átomos dador e aceitador da ligação de hidrogénio e α é o ângulo entre os vetores que ligam o hidrogénio dos átomos dador e aceitador. Este método foi utilizado para avaliar a existência de pontes de hidrogénio entre o dímero de $\beta 2m$ e o ligando ThT.

2.4.4 Cálculo Distância

O cálculo da distância entre os resíduos de aminoácidos da $\beta 2m$ e dos átomos da ThT foi realizado com a ferramenta `g_dist` de GROMACS que calcula a distância entre o centro de massa de dois grupos de átomos em função do tempo.

2.4.5 Cálculos das CEL

Recorrendo à ferramenta *alchemical-analysis* disponível no *software* pymbar⁸⁶, calculou-se a energia livre relativa de ligação da ThT à $\beta 2m$ através do método MBAR (*multistate Bennett's acceptance ratio*)⁸⁷. Este método não requer que a gama de energia amostrada seja separada em valores individuais para a construção de histogramas. Desta forma elimina-se a tendência (*bias*) devido à energia de ligação e é igualmente possível reduzir significativamente o tempo e a complexidade da resolução das equações estimadas.⁸⁶ Adicionalmente, uma estimativa da incerteza estatística é dada para o cálculo de energia livre.⁶⁶ Este método MBAR é imparcial e apresenta menores variações que qualquer outro *estimator* usando dados de equilíbrio de estados múltiplos.

3 Resultados

3.1 Dinâmica Molecular

3.1.1 Avaliação Estrutural do dímero $\beta 2m$ e do complexo $\beta 2m$ -ThT

Da análise da estrutura cristalográfica do dímero de $\beta 2m$ observa-se que as interações entre a ThT e as cadeias laterais dos resíduos Gln8, Tyr10 e Tyr26 são as mais importantes para a estabilização da interação entre a ThT e o dímero $\beta 2m$ (Figura 14). O anel benzotiazol da ThT (Figura 4), devido à simetria do dímero, pode fazer empilhamento paralelo com o resíduo Tyr10 de cada um dos monómeros. Este contacto do anel de benzotiazol com a Tyr10 indica um empilhamento aromático característico de interações catião- π e π - π .

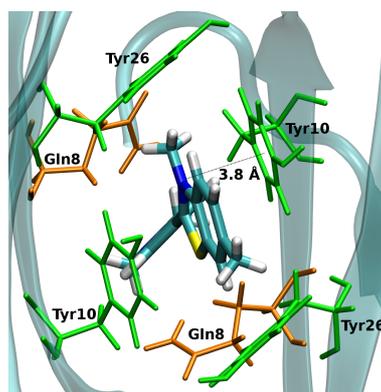


Figura 14. Representação do local de ligação da ThT no complexo $\beta 2m$ -ThT. Os resíduos Gln8, Tyr10 e Tyr26 estão identificados na imagem, assim como o ligando ThT a uma distância de 3,8 Å do átomo de azoto do anel benzotiazol da ThT ao centro geométrico do anel aromático da Tyr10.

Para melhor avaliar a interação entre a ThT e o dímero de $\beta 2m$ foram realizadas simulações de dinâmica molecular. A avaliação da variabilidade conformacional do dímero selvagem (WT) de $\beta 2m$ e do seu complexo com a ThT foi feita através de análises de RMSD (Figura 15), RMSF (Figura 17) e distância entre o centro geométrico do anel fenólico da Tyr26 da cadeia B e C ao átomo de azoto do anel benzotiazol da ThT

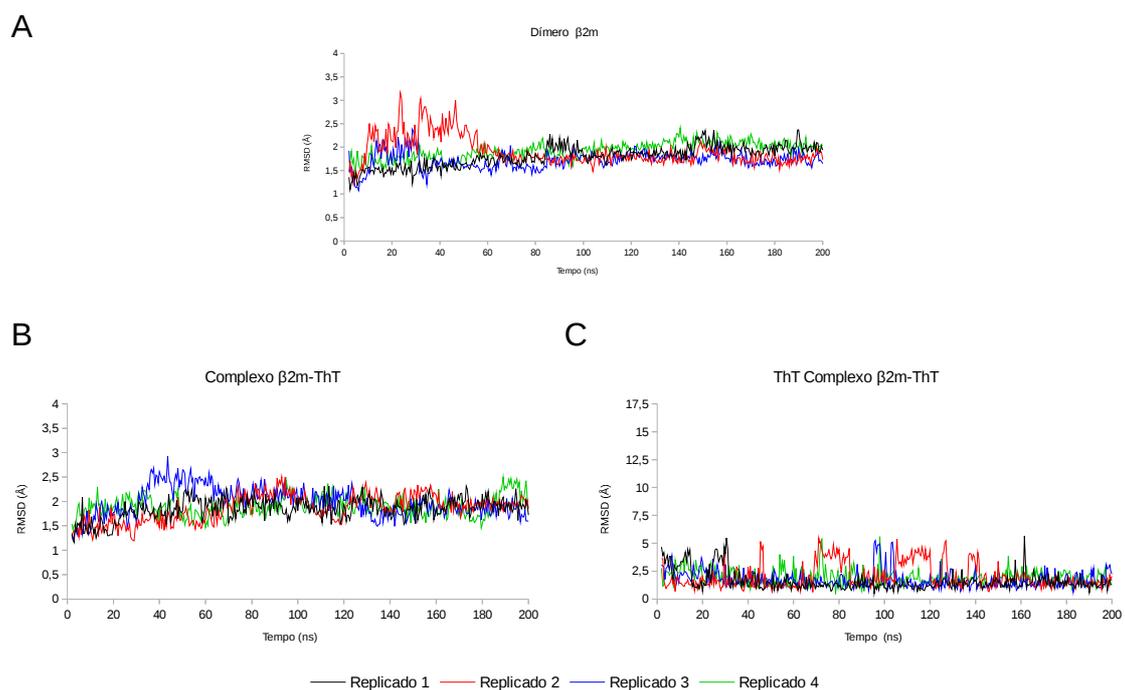


Figura 15. (A, B) RMSD dos C α do dímero de β 2m e do dímero do complexo β 2m-ThT, respetivamente. (C) RMSD dos átomos de ThT no complexo β 2m-ThT.

(Figura 20). Em todas as análises efetuadas, foram desprezados os 2 ns iniciais do passo de equilibração. Para os cálculos de RMSD do dímero, foram retirados os três primeiros resíduos do terminal amínico (Met-Ile-Gln) porque apresentam os maiores valores de RMSF. Com exceção do observado no replicado 2, o valor de RMSD do dímero de

A



Figura 16. Sobreposição das estruturas médias do dímero nativo da β 2m (ciano) e do dímero do complexo β 2m-ThT (cinzento), com os resíduos do local ativo Q8, Y10 e Y26 em destaque.

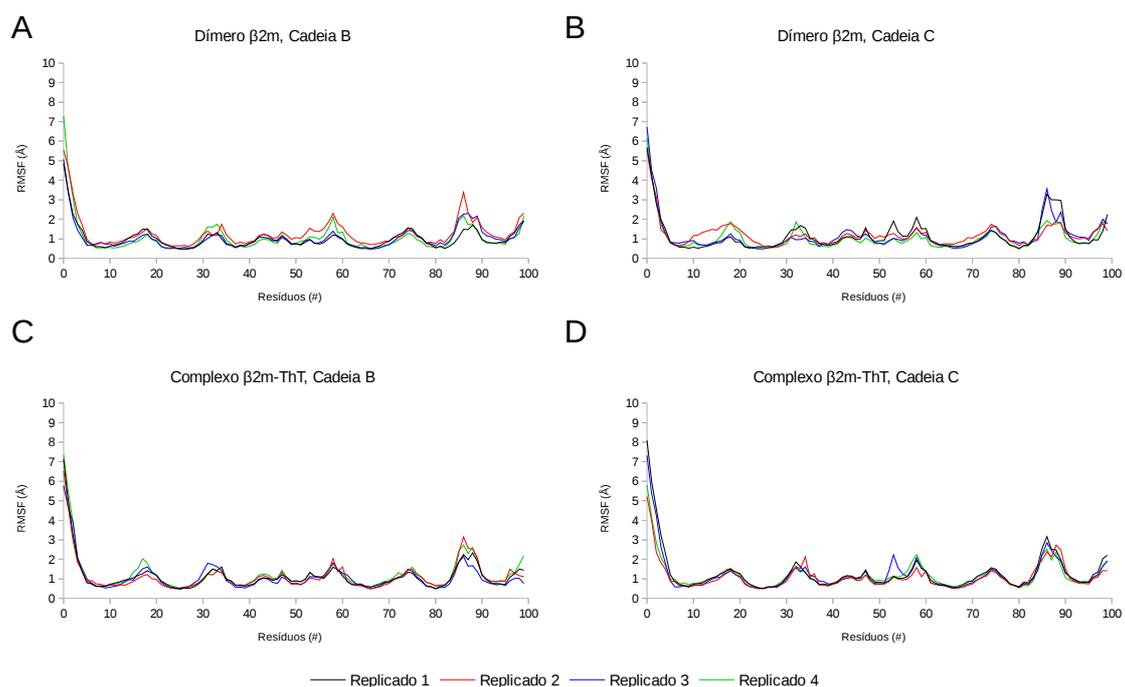


Figura 17 (A, B) RMSF dos C α dos resíduos de aminoácido do dímero de β 2m, para a cadeia B e C, respetivamente. (C, D) RMSF dos C α dos resíduos do dímero do complexo β 2m-ThT, para a cadeia B e C, respetivamente.

β 2m é bastante baixo, variando na maior parte do tempo entre 1 Å e 2,5 Å (Figura 15 A). Nos primeiros 60 ns de simulação do replicado 2, verifica-se um comportamento diferente, chegando a variação do RMSD aos 3 Å. Contudo, o que se observa de forma geral nos quatro replicados ao longo dos 200 ns é uma elevada estabilidade estrutural do dímero de β 2m (Figura 15 A).

Relativamente ao complexo de β -2 microglobulina com a sonda fluorescente tioflavina-T, verificou-se através do cálculo de RMSD ao longo do tempo de simulação de 200 ns (Figura 15 B), que o dímero na estrutura complexada é estruturalmente estável com valores semelhantes aos do dímero livre (Figura 15 A e Figura 16), isto é, com variações entre 1 Å e 2,5 Å. Na Figura 15 (C), onde é representado o RMSD da ThT no complexo β 2m-ThT, é possível verificar que não existem diferenças estruturais significativas na ThT (valores de RMSD aproximadamente 2 Å). Os resíduos com

valores menores de RMSF encontram-se em zonas onde a estrutura secundária é de cadeia- β , mais estável (Figura 17). Os resíduos com valores de RMSF maiores correspondem a zonas mais flexíveis da proteína onde predominam voltas/*turns* e estrutura desordenada (Figura 17). De facto, observa-se na Figura 17 A e B, complementado esquematicamente com a Figura 18, o valor do RMSF para o dímero não complexado, em que as zonas mais estáveis representadas à azul, correspondem a cadeias- β , enquanto a vermelho, as regiões com maior instabilidade, correspondem a estrutura em volta e aos terminais amínico e carboxílico. De referir igualmente que a diferença dos valores de RMSF entre a cadeia B e C do dímero de β 2m não são significativas.

O perfil das curvas observada nos 4 replicados é qualitativamente semelhante, o que mostra estarmos na presença de simulações com estruturas bem equilibradas.

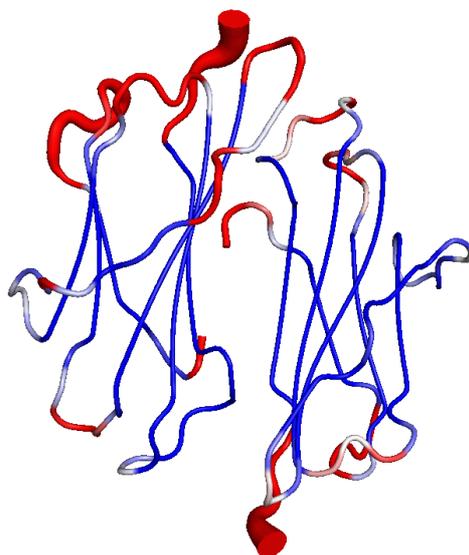


Figura 18. Representação do dímero β 2m de acordo com os valores de RMSF. As regiões com menor RMSF estão representadas a azul e as regiões com maior variabilidade a vermelho, a espessura indica a grandeza dos valores de RMSF.

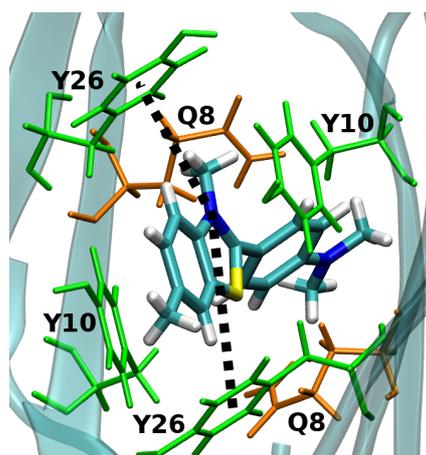


Figura 19. Representação do local de ligação da ThT complexo β 2m-ThT, com os resíduos Q8A (laranja), Y10 e Y26 (verde). A linha a tracejado representa a distância medida entre o centro geométrico do grupo fenol da Y26 da cadeia B e C ao átomo de azoto do anel benzotiazol da ThT.

O RMSF observado para o dímero do complexo de β 2m-ThT (Figura 17 C e D) tem um perfil semelhante ao do dímero não complexado com a ThT (Figura 17 A e B). Esta observação indica que a presença da ThT no local de ligação da proteína não afeta a sua estabilidade, o que é o desejado quando estamos perante uma sonda (ou seja, não há perturbação da estrutura).

Para avaliar a flutuação da ThT no local de ligação do dímero de β 2m mediu-se a distância do centro geométrico do anel fenólico da Tyr26, da cadeia B e C do dímero β 2m, ao átomo de azoto do anel benzotiazol da ThT (Figura 19 e 20, A e B). Os valores de distância da ThT à Tyr26 da cadeia B variam entre os 5 Å e os 7,5 Å e para a Tyr26 da cadeia C o valor médio observado é de 5 Å, demonstrando que a ThT se mantém a uma distância constante no local de ligação e revelando que ao longo da simulação a interação entre ThT e o dímero permanece estabilizada. Com estas análises, conclui-se que o complexo de β 2m-ThT é conformacional e estruturalmente estável ao longo dos 200 ns de simulação nos 4 replicados. Estas simulações de dinâmica molecular do

complexo de $\beta 2m$ -ThT não-mutado (*wild-type*) serão utilizadas como controle para comparação com as simulações dos complexos mutados Q8A, Y10A e Y10F.

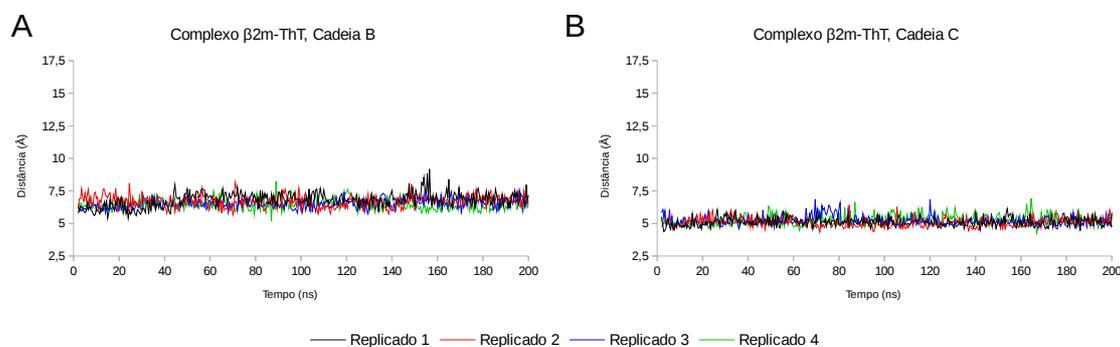


Figura 20. (A, B) Distância do centro geométrico do anel fenólico da Tyr26 da cadeia B (A) e C (B) ao átomo de azoto do anel benzotiazol da ThT.

3.1.2 Avaliação da influência das mutações Q8A, Y10A e Y10F na estabilidade do complexo $\beta 2m$ -ThT.

Para avaliar quais os resíduos da $\beta 2m$ que mais contribuem para a interação com a ThT, foram feitas diferentes mutações *in silico* em resíduos de interesse do local de ligação. Foram mutados na estrutura do complexo $\beta 2m$ -ThT o resíduo 8 de glutamina para alanina (Q8A), o resíduo 10 de tirosina para alanina (Y10A) e o resíduo 10 de tirosina para fenilalanina (Y10F). Foram feitas mutações simples, apenas num monómero e mutações duplas envolvendo os dois monómeros. Foram escolhidos estes resíduos uma vez que na literatura estão descritos como os resíduos que participam na interação entre o dímero e a tioflavina-T.¹⁷ A mutação dos resíduos de glutamina e tirosina para alanina, Q8A e Y10A, é utilizada com o objetivo de estudar o efeito da ausência dos resíduos em causa e a forma como afetam a estrutura e a estabilidade do complexo, uma vez que a alanina é um resíduo pequeno (a sua cadeia lateral grupo metilo). A mutação Y10F é feita para estudar a importância do grupo hidroxilo na

interação do dímero com a ThT, já que a diferença estrutural do resíduo de tirosina para fenilalanina é apenas o grupo OH.

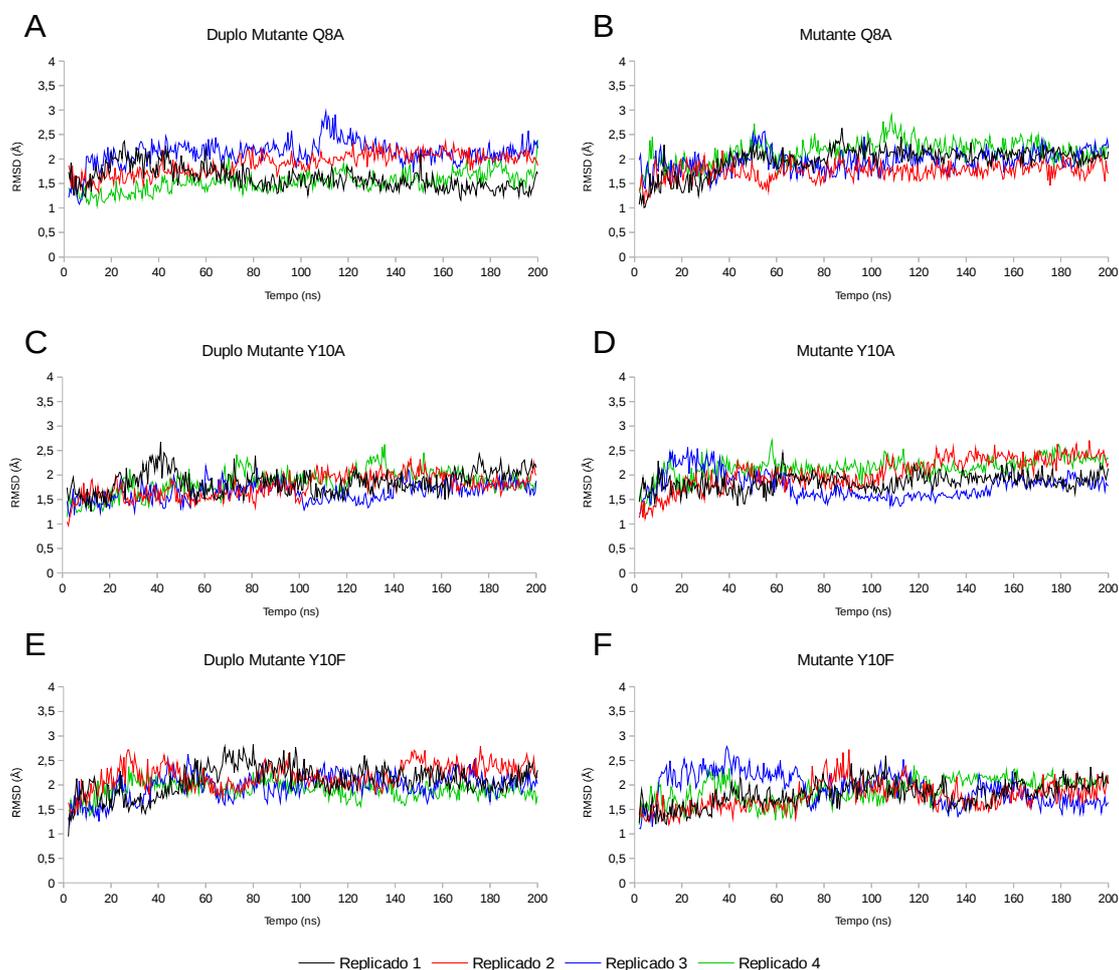


Figura 21. RMSD dos C α do dímero de β 2m para os mutantes e duplos mutantes Q8A, Y10A e Y10F, ao longo dos 200 ns de simulação.

Na Figura 21 (A) e (B) pode-se observar que na mutação Q8A simples e dupla o RMSD do dímero varia entre 1 Å e 2,5 Å, valores muito semelhantes aos do complexo β 2m-ThT não-mutado (Figura 15 B e Figura 22 A). Dessa forma, pode-se concluir que a mutação do resíduo de glutamina para alanina, quer no complexo com a mutação simples (Figura 21 B) quer no complexo com a dupla mutação (Figura 21 A), não influencia a estabilidade estrutural do dímero. Na mutação Y10A, simples (Figura 21 D)

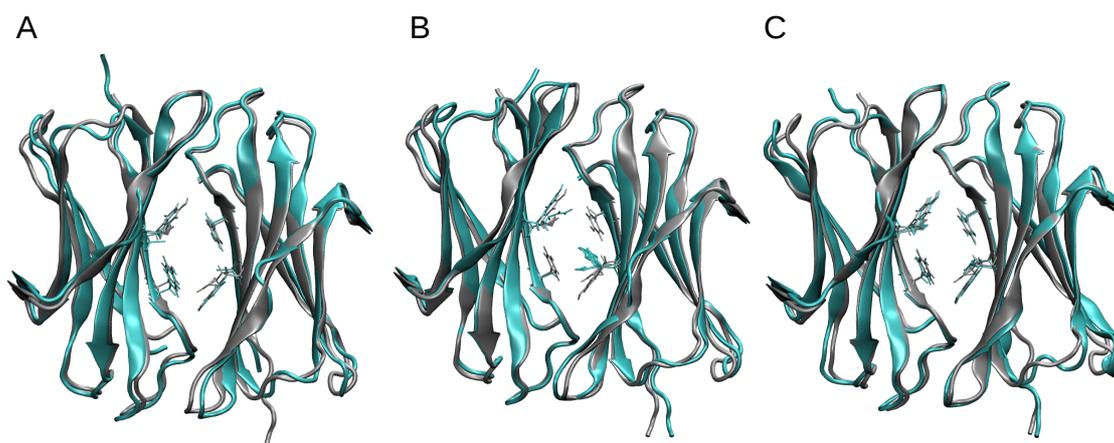


Figura 22. Sobreposição das estruturas médias dos dímeros dos complexos duplos mutantes Q8A (A), Y10A (B) e Y10F (C) (ciano), com o dímero do complexo β 2m-ThT não-mutado (cinzento), com os resíduos do local de ligação em destaque.

e dupla (Figura 21 C), ao longo dos 200 ns, também se observa um comportamento semelhante ao do complexo não-mutado (Figura 15 B e Figura 22 B) com valores de RMSD a variar entre 1 Å e 2,5 Å (Figura 21 C e D). É possível concluir através destas observações que a mutação em causa não afeta a estrutura global do dímero. Por último, através da análise do complexo mutado Y10F, com mutação simples (Figura 21 F) e dupla (Figura 21 E), é possível verificar uma variação do RMSD entre 1 Å e 2 Å (Figura 21 E e F). Estes valores demonstram assim uma elevada estabilidade estrutural deste mutante (Figura 22 C). Podemos concluir que as mutações feitas não alteram a nível global a estrutura do dímero de β 2m (Figura 22) e que não existe uma diferença perceptível entre a mutação simples de um monómero ou a mutação dupla de ambos (Figura 23). As diferenças entre os replicados em todos os casos (Figura 21 A-F) não são significativas.

Da análise de RMSF dos Ca dos mutantes Q8A, Y10A e Y10F do complexo β 2m-ThT (Figura 24 A-L) podemos observar um comportamento similar ao dímero do complexo β 2m-ThT não-mutado (Figura 17 C e D), indicando que não houve alteração estrutural e conformacional na β 2m com a introdução das mutações. Além disso, o

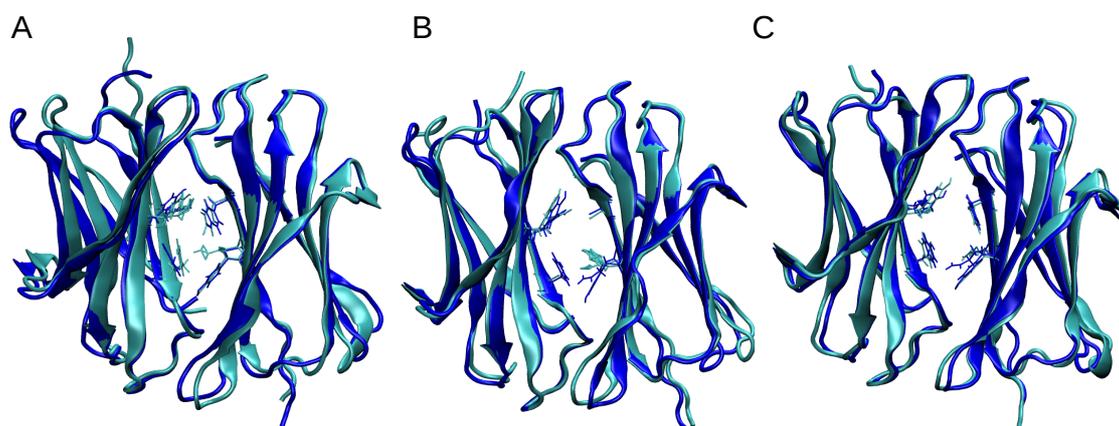


Figura 23. Sobreposição dos dímeros dos complexos mutantes simples (azul) e duplos mutantes (ciano) Q8A(A), Y10A (B) e Y10F (C), com os resíduos no local ativo em destaque.

intervalo de variação dos valores de RMSF é pequeno, reforçando a ideia que não existem alterações significativas a nível estrutural do dímero de $\beta 2m$ com estas mutações. Entre as cadeias B (Figura 24 painéis A, C, E, G, I e K) e as cadeias C (Figura 24 painéis B, D, F, H, J e L) do dímero também não existem diferenças significativas. Os resíduos 1-6, que formam o terminal amínico, são os que têm o maior valor de RMSF em todos os complexos mutantes (Figura 24, A-F), com valores entre 4 Å e 8 Å. Esta maior instabilidade estrutural e liberdade conformacional é expectável por ser um terminal do monómero. Os grupos de resíduos que formam cadeia- β , 61-11, 21-30, 36-42, 61-70, 78-83 e 91-94, têm valores de RMSF a nível global mais baixo, aproximadamente de 1 Å indicando assim uma menor flutuação, e portanto uma maior estabilidade estrutural. Já os grupos de resíduos 12-20, 31-35, 71-77 formam voltas, observando uma subida dos valores de RMSF, com valores que variam entre os 1 Å e 2 Å. Existe uma zona de maior instabilidade entre os resíduos 43-60, em que é mais difícil distinguir a diferença de organização da estrutura em cadeia- β , resíduos 50-56, e voltas, resíduos 43-49, 57-60, e na qual os valores RMSF variam também entre 1 Å e 2 Å. Relativamente aos resíduos 84-90, que constituem uma volta, os valores de RMSF

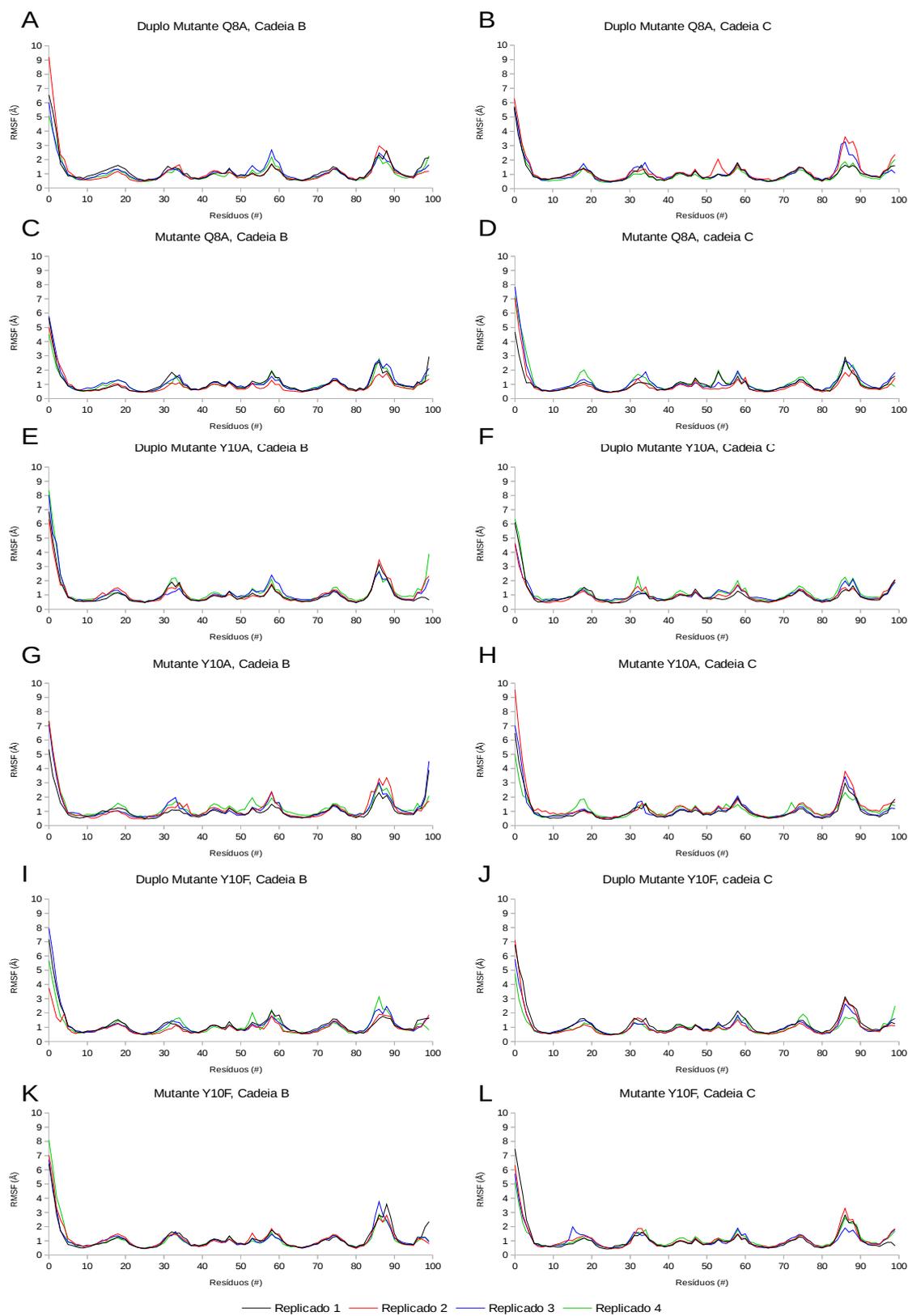


Figura 24. Gráficos de RMSF dos C α dos mutantes e duplos mutantes Q8A, Y10A e Y10F do dímero de β 2m no complexo com ThT.

atingem valores mais altos de cerca de 3 Å, possivelmente devido à sua localização mais externa no dímero e assim uma maior exposição ao solvente. Por fim, o terminal carboxílico, resíduos 95-99, apresenta uma variação de 2 Å e 3 Å.

3.1.3 Estabilidade da ThT no local ativo

A avaliação da variabilidade conformacional da ThT no dímero da β -2 microglobulina foi feita com o cálculo do RMSD da ThT nos diferentes complexos mutados Q8A, Y10A e Y10F (Figura 25 A-F). No caso da mutação simples e dupla Q8A (Figura 25, A e B), não se observam alterações entre a mutação simples e dupla, visto que os valores de RMSD em ambos os casos são em média 2,5 Å, sendo este valor muito semelhante ao da ThT no complexo não-mutado (Figura 15, C e Figura 26, A e B). Assim, pode-se afirmar que a mutação de glutamina para alanina não afeta estruturalmente o posicionamento da ThT no complexo.

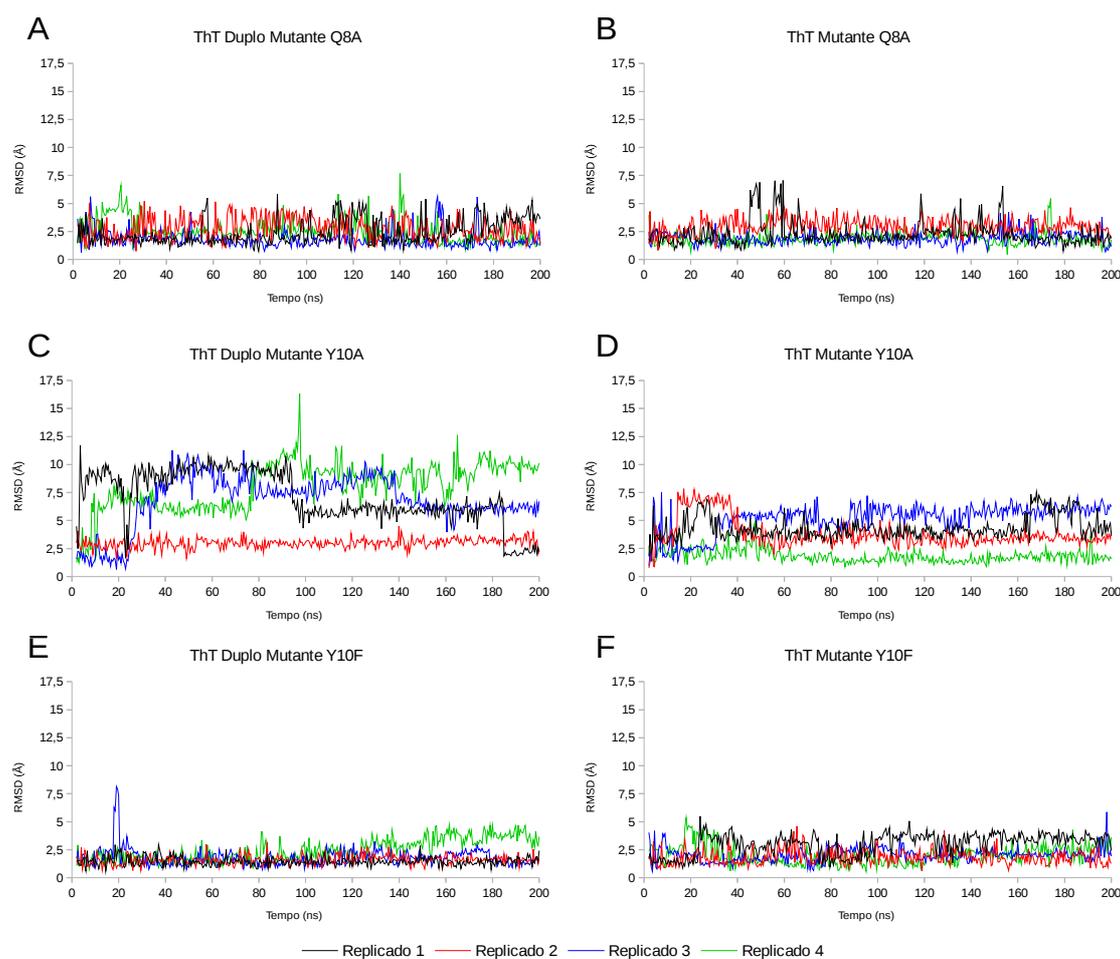


Figura 25. RMSD da ThT dos complexos mutantes e duplos mutantes Q8A, Y10A e Y10F.

Já para a mutação Y10A (Figura 25, C e D e Figura 26 C e D) é possível observar um comportamento diferente: os valores de RMSD da ThT variam muito e têm uma amplitude mais elevada. O duplo mutante Y10A (Figura 25 C) apresenta a maior variação de RMSD, atingindo valores de 10 Å (Figura 26 D), com exceção para o replicado 2 (Figura 26 C) que mantém valores semelhantes à ThT do complexo não-mutado (2,5 Å). Para esta mutação dupla de tirosina para alanina, os valores de RMSD da ThT revelam que existem diferenças estruturais significativas que prejudicam a interação da ThT com o dímero. No caso da mutação simples de Y10A (Figura 25, D e Figura 26, E), observa-se também uma alteração na estabilidade na interação mas numa menor escala, uma vez que os valores de RMSD atingem apenas um máximo de 5 Å. Estes dados indicam que mesmo tendo apenas um resíduo de tirosina 10, este é essencial na interação da ThT com o dímero, reforçando a hipótese de um interação π -catião entre o anel fenólico da tirosina e o azoto do anel benzotiazol da ThT.¹⁷

Na mutação dupla e simples Y10F (Figura 25 E e F e Figura 26 F e G) observamos um comportamento semelhante ao da ThT no complexo não-mutado, em que os valores de RMSD nos 4 replicados são, em média, de 2,5 Å ao longo dos 200 ns de simulação. Estes resultados podem indicar que o grupo hidroxilo da tirosina não é essencial na interação do ponto de vista conformacional, já que nesta mutação do resíduo de tirosina 10 para fenilalanina a diferença é um grupo OH ligado ao anel benzénico, enfatizando assim que o principal grupo para estabelecer interação entre a ThT e o dímero de β 2m será o anel benzénico.

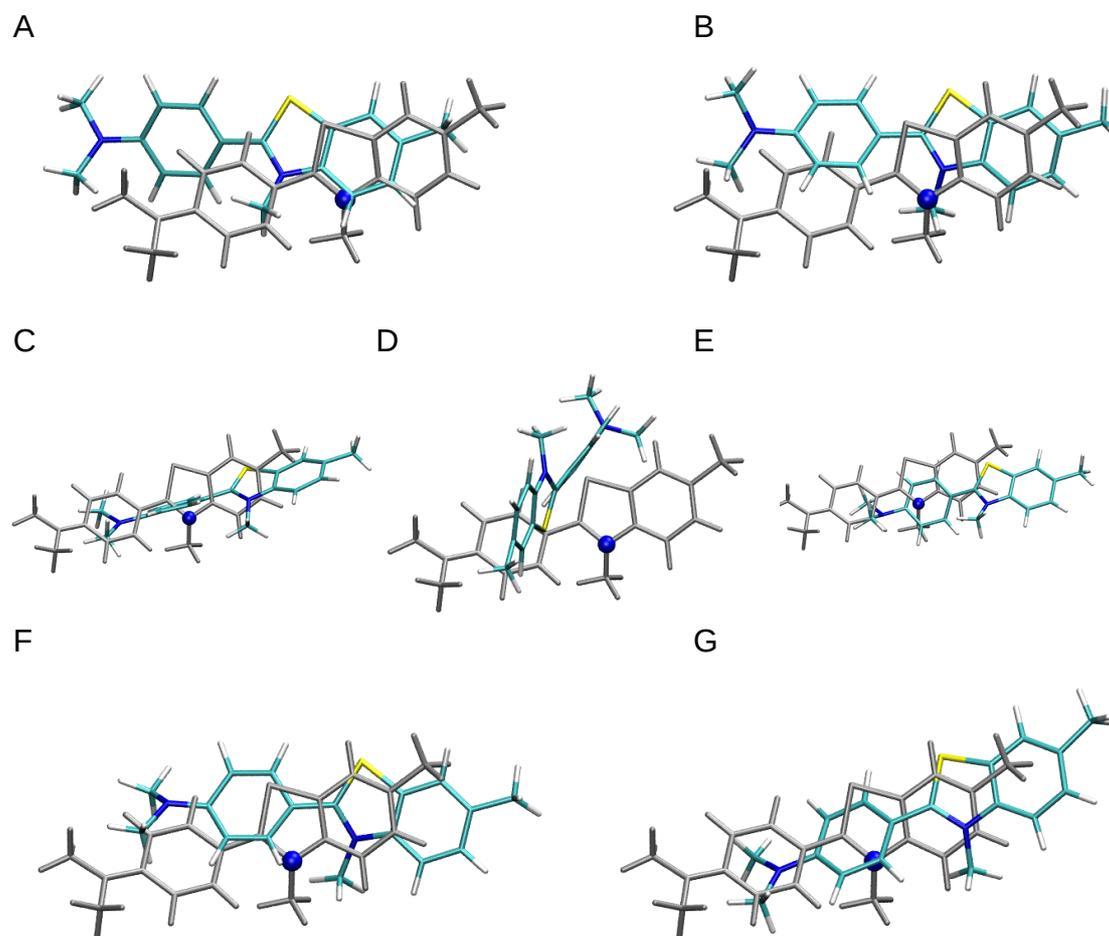


Figura 26. Sobreposição de *snapshots* da ThT representativos das simulações de DM dos complexos mutantes simples (B, E G) e duplos (A, C, D e F) Q8A, Y10A e Y10F, com a ThT do complexo de β 2m-ThT não-mutado (cinzento, com o átomo de azoto do anel benzotiazol a azul). Para dupla mutação Y10A existem dois *snapshots* (C, replicado 2) e (D, replicado 4).

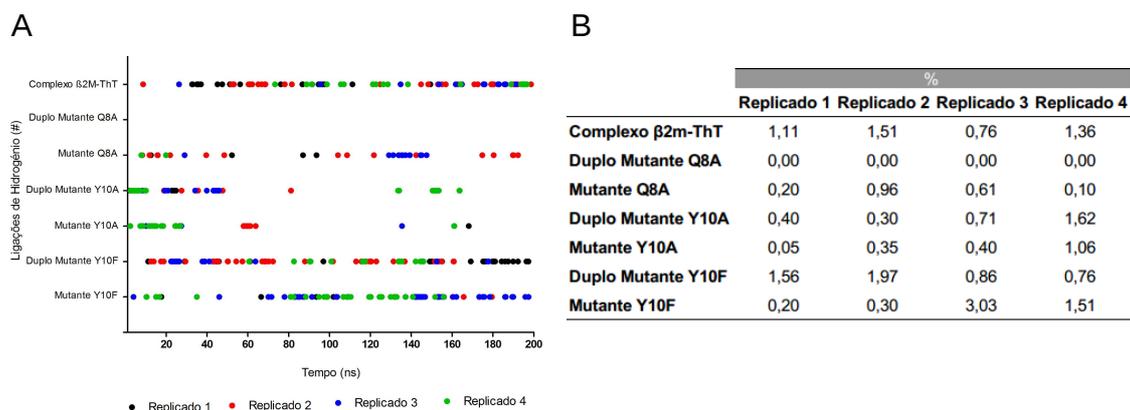


Figura 27. Representação da presença/ausência de Ligações de Hidrogénio entre os resíduos presentes no local de ligação da β 2m WT e mutantes Q8A, Y10A e Y10 F com a ThT (A). Percentagem ao longo do tempo de simulação da presença de ligações de hidrogénio (B).

Foi ainda avaliado a presença de ligações de hidrogénio ao longo das simulações de DM no complexo β 2m-ThT e nos mutantes simples e duplos Q8A, Y10A e Y10F, entre o dímero de β 2m e a ThT (Figura 27 A e B). Como se observa no complexo não-mutado ao longo dos 200 ns dos diferentes replicados, verifica-se a presença de ligações de hidrogénio, entre o dímero de β 2m e ThT, perto de 1% do tempo de simulação e esta ligação de hidrogénio é entre o resíduo Q8 do dímero e o azoto do anel dimetilaminobenzeno da ThT (Figura 28). É de realçar que não existe qualquer ligação de hidrogénio detetada para o duplo mutante Q8A, indicando assim que provavelmente será o resíduo Q8 a estabelecer as ligações de hidrogénio com a ThT. Estes resultados são reforçados pela contabilização deste tipo de interações no mutante simples Q8A. Neste caso, é contabilizada a presença de ligações de hidrogénio entre a ThT e a Q8, tal como é observado nas simulações da proteína WT (apesar de com uma menor frequência, presença de ligações de hidrogénio <1%). A mutação simples e dupla Y10A revela a presença de ligações de hidrogénio, mas em menor número quando comparado com o complexo não-mutado (em média <1%), podendo indiciar que estas mutações afetam a

interação da ThT com o dímero, impedindo um maior número de ligações de hidrogénio. Já, o mutante simple e duplo Y10F é o que demonstra ter um comportamento mais semelhante ao complexo $\beta 2m$ -ThT não-mutado (presença de ligações de hidrogénio 1 % ao longo do tempo de simulação). Este facto poderá ser justificado pela pouca importância que a mutação Y10F terá no estabelecimento de pontes de hidrogénio entre a ThT e a $\beta 2m$. Aparentemente, o grupo hidroxilo da Y10 não estabelece qualquer tipo de ligações de hidrogénio com a ThT.

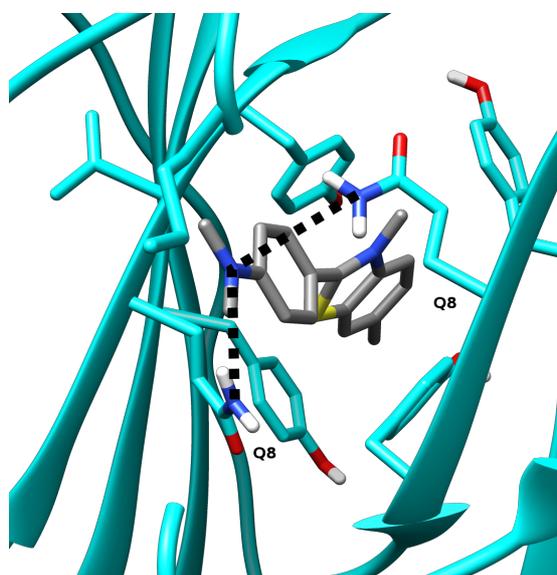


Figura 28. Representação das ligações de hidrogénio estabelecidas entre $\beta 2m$ e a ThT, entre os resíduos Q8 do $\beta 2m$ e o átomo de azoto do dimetilaminobenzeno da ThT.

Para avaliar a posição relativa da ThT no local ativo nos complexos mutantes ao longo do tempo de simulação, foi medida a distância entre o centro geométrico do anel benzénico do resíduo de Tyr26 das duas cadeias B e C do dímero $\beta 2m$ ao azoto do anel benzotiazol da ThT (Figura 29 A-L).

Na mutação simples e dupla mutação Q8A observa-se que a distância da ThT à Tyr26 da cadeia B varia entre 5 Å a 7,5 Å (Figura 29 A e C), e à Tyr26 da cadeia C em média de 5 Å (Figura 29 B e D), representado graficamente na Figura 30 (B) e (C); distâncias

que são comparáveis com as observadas no complexo β 2m-ThT não-mutado (Figura 20 A e B e Figura 30 A). Esta informação reforça os resultados de RMSD que demonstram pouca diferença estrutural e conformacional nesta mutação, revelando que a glutamina 8 não terá um papel estrutural tão crucial na interação da ThT com o dímero de β 2m.

Na dupla mutação Y10A (Figura 29 E e F) nos replicados 1, 3 e 4 (Figura 30 C) observa-se uma alteração significativa da distância da ThT ao resíduo de Tyr26, com valores que variam entre 5 Å e 12,5 Å. A exceção para esta tendência é o replicado 2 que se mantém estável ao longo do 200 ns de simulação, com valores entre 5 Å e 7,5 Å para cadeia B (Figura 29 E) e para cadeia C aproximadamente 5 Å (Figura 29 F), representado na Figura 30 (D). O que podemos observar é que claramente a dupla mutação de tirosina 10 para alanina afeta a interação entre a ThT e o dímero de β 2m, mostrando a importância deste resíduo para a estabilidade do complexo. Na mutação simples Y10A (Figura 29 G e H) vemos que existe um aumento da distância à Tyr26 da cadeia B (Figura 29 G) (mais de 7,5 Å), em comparação com o complexo não-mutado (Figura 20 A). No caso da cadeia C (Figura 29 H), que apresenta um valor médio de 4 Å (Figura 30 F), verifica-se uma diminuição da distância à Tyr26 em relação aos 5 Å observados no complexo não-mutado (Figura 20 C e Figura 30 A). Tal encontra-se em conformidade com os resultados de RMSD da ThT (Figura 15 C), demonstrando que a mutação Y10A influencia a interação mas não de uma forma tão predominante quanto a dupla mutação. De facto, a análise dos gráficos (Figura 21 G e H) parece revelar que na mutação simples se observa uma aproximação da ThT à Tyr10 da cadeia C (não-mutada) e por consequência o afastamento da cadeia B (mutada com a alanina), demonstrando, mais uma vez, a importância deste resíduo para a interação da ThT no complexo com a β 2m.

Na mutação simples e dupla mutação Y10F, a distância entre a ThT e a Tyr26 da cadeia B varia no intervalo de 5 Å e 7,5 Å (Figura 29 I e K) e, da cadeia C, varia em média 5 Å (Figura 29 J e L), representado graficamente na Figura 30 (G) e (H). Estes valores são semelhantes aos valores da distância da ThT ao resíduo de Tyr26 do dímero de β 2m não-mutado (Figura 20 A e B e Figura 30 A) o que reforça os resultados da Figura 25 (E) e (F) e Figura 26 (F) e (G), em que não se observam diferenças estruturais e conformacionais relevantes na interação entre a ThT e o dímero de β 2m.

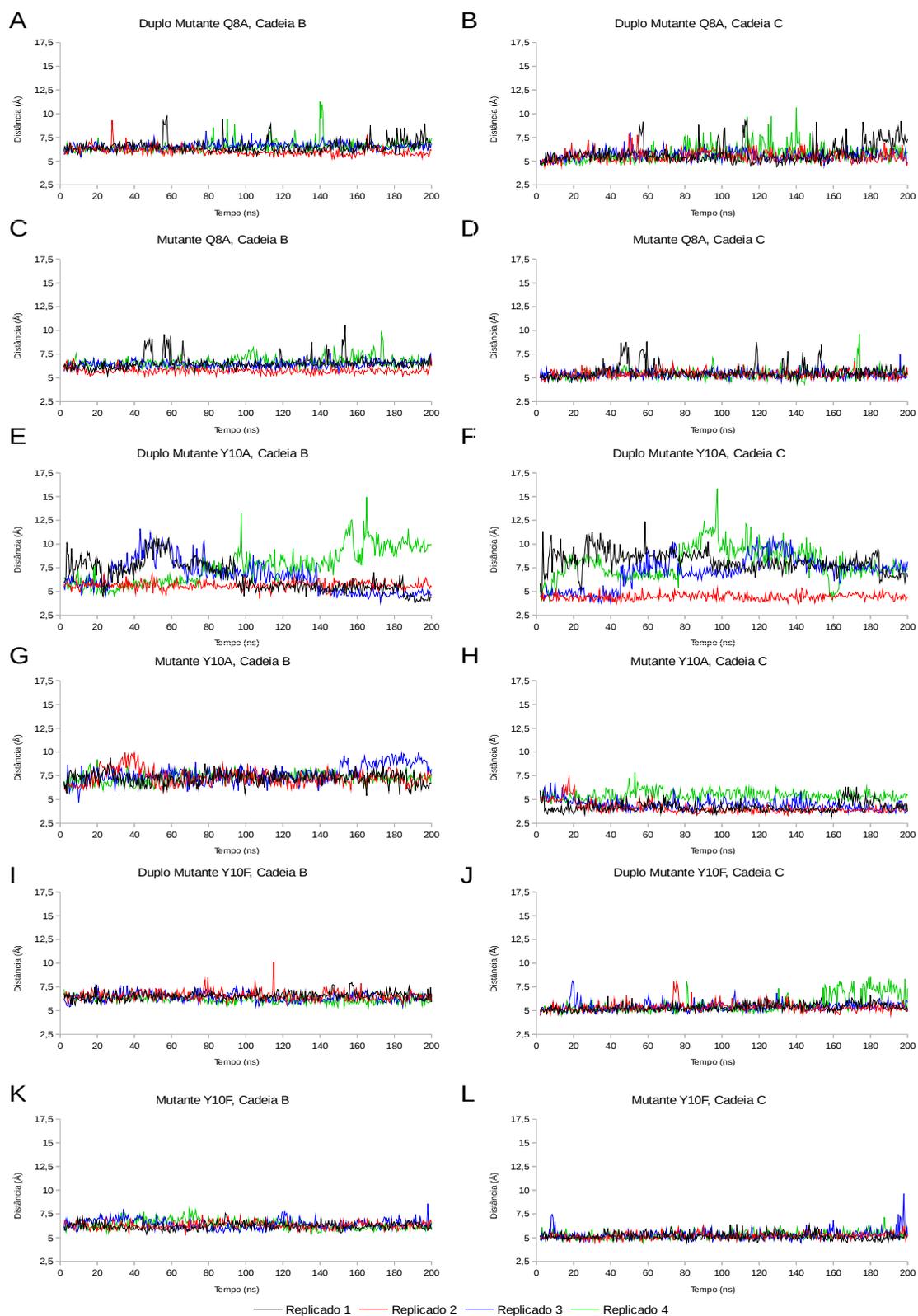


Figura 29. Distância entre o centro geométrico do anel fenólico do resíduo Tyr26, da cadeia B e C, e o átomo de azoto do anel benzotiazol da ThT, para os complexos mutantes e duplos mutantes Q8A, Y10A e Y10F de β 2m-ThT.

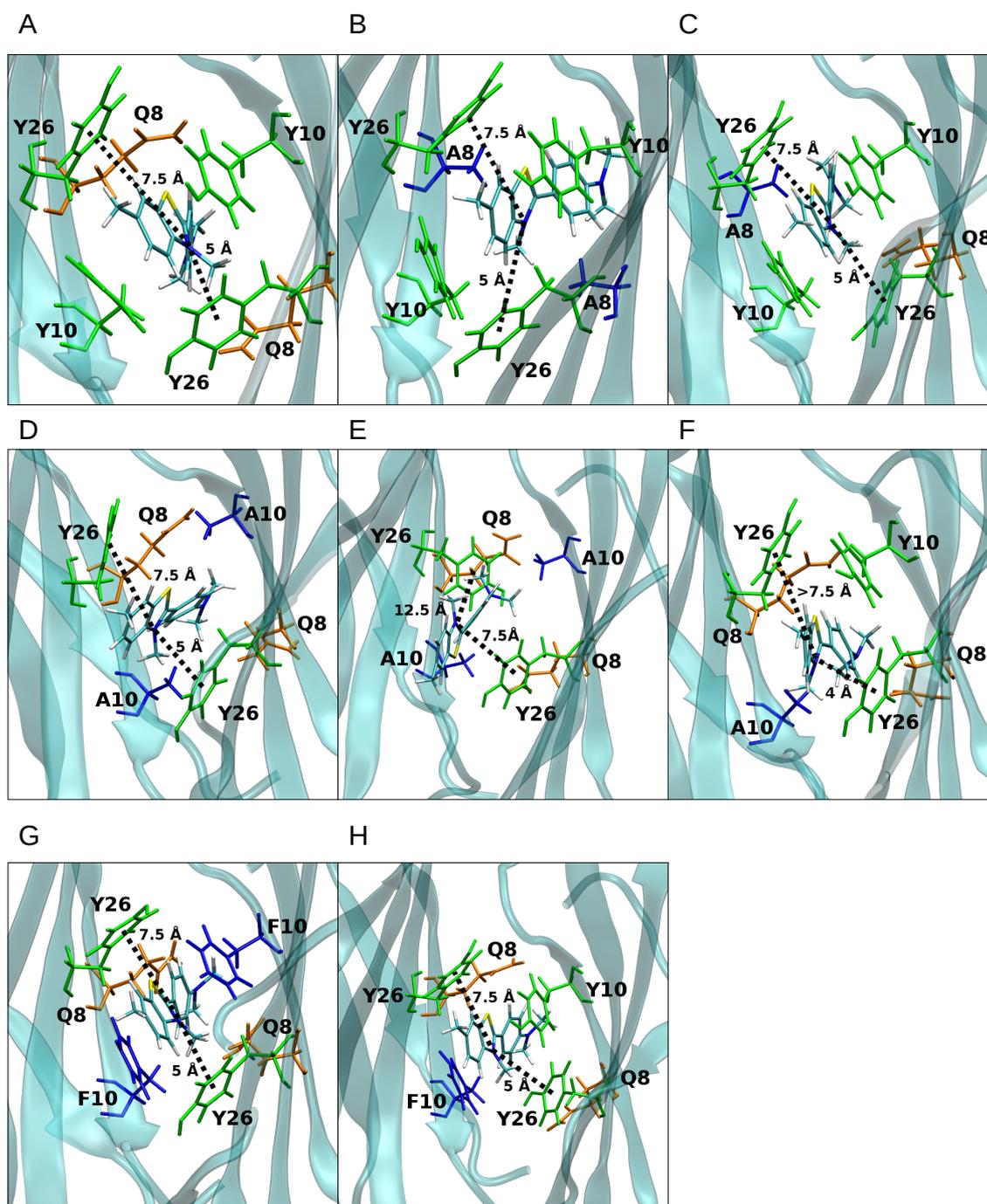


Figura 30. Representação da distância entre o centro geométrico do grupo fenol da Y26 das cadeia B e C e o átomo de azoto do anel benzotiazol da ThT no local de ligação da $\beta 2m$ (A-H). *Snapshots* do complexo $\beta 2m$ -ThT não-mutante (A), mutante Q8A simples (C) e duplo (B), mutante Y10A simples (F) e duplo (D, replicado 2 e E, replicado 4) e mutante Y10F simples (G) e duplo (H). Resíduos do local de ligação Q8 (laranja), Y10 e Y26 (verde) e resíduos mutados A8, A10 e F10 (azul) estão identificados.

3.2 Cálculo da Energia Livre

Para compreender a contribuição energética dos resíduos do local ativo foram calculados os valores de energia livre relativa dos diferentes mutantes já analisados anteriormente via DM, através da utilização do ciclo termodinâmico apresentado na Figura 12.

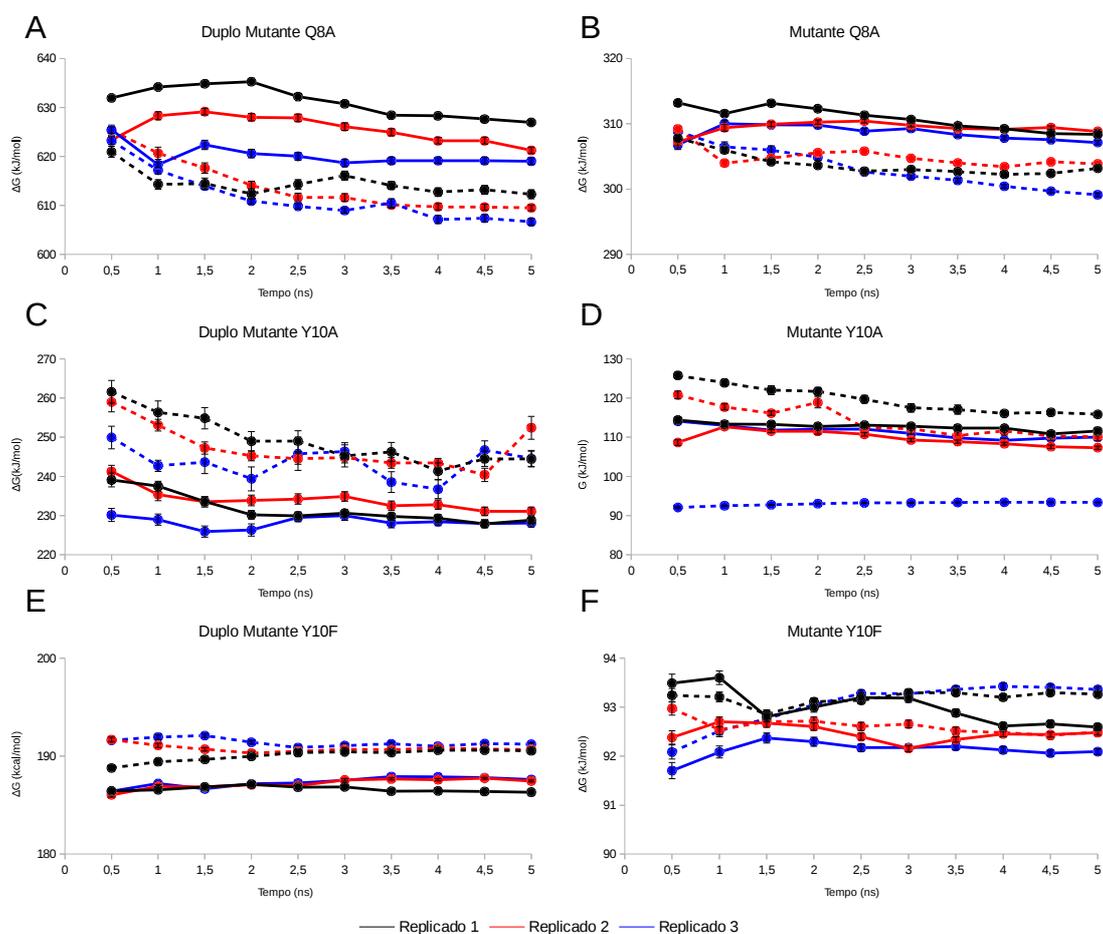


Figura 31. Gráficos de Convergência de Energia para os complexos $\beta 2m$ -ThT mutantes e duplos mutantes Q8A, Y10A e Y10F. A linha contínua representa a transformação do dímero e a linha tracejada a transformação do dímero complexado com a ThT. Estão representados as barras de erro.

Para a simulação de HREMD, foram feitos 3 replicados para cada um dos complexos mutantes, com simples e dupla mutação, Q8A, Y10A e Y10F. Nestes ensaios, foi efetuada uma transformação/mutação dos resíduos, de glutamina e tirosina, em alanina e em fenilalanina para avaliar a contribuição energética dos resíduos na interação da tioflavina-T com o dímero da β -2 microglobulina.

Com o objetivo de confirmar que as simulações estabilizaram e se podem avaliar com alguma segurança os resultados, foram feitos gráficos de convergência de energia (Figura 31 A-F). Nestes, é possível observar que em todas as simulações, ao fim dos 5 ns, houve uma evidente estabilização da energia das transformações.

Tabela 1. Diferença de energia livre relativa ($\Delta\Delta G$) de ligação da ThT a β 2m para as mutações Q8A, Y10A e Y10F. Para cada replicado está também representado o erro associado. Para cada mutante está calculada a média de $\Delta\Delta G$ e o desvio padrão da média.

$\Delta\Delta G$ (kJ/mol)							
Duplo mutante Q8A				Mutante Q8A			
Replicado 1	Replicado 2	Replicado 3	Média	Replicado 1	Replicado 2	Replicado 3	Média
-14,66 ± 1,18	-12,4 ± 0,98	-11,74 ± 0,89	-12,93 ± 1,53	-5,19 ± 0,33	-4,98 ± 0,38	-8,01 ± 0,41	-6,06 ± 1,69
Duplo mutante Y10A				Mutante Y10A			
Replicado 1	Replicado 2	Replicado 3	Média	Replicado 1	Replicado 2	Replicado 3	Média
15,62 ± 2,16	21,32 ± 3,09	16,49 ± 2,28	17,81 ± 3,07	4,24 ± 0,56	2,81 ± 1,16	11,97 ± 0,85	6,34 ± 4,93
Duplo mutante Y10F				Mutante Y10F			
Replicado 1	Replicado 2	Replicado 3	Média	Replicado 1	Replicado 2	Replicado 3	Média
4,22 ± 0,13	3,22 ± 0,17	3,61 ± 0,17	3,69 ± 0,50	0,67 ± 0,09	0,02 ± 0,08	1,27 ± 0,08	0,65 ± 0,63

Através da análise dos resultados apresentados na Tabela 1, verifica-se que a conversão do resíduo glutamina 8 para alanina (Q8A) é favorável, na medida que apresenta valores em média aproximadamente iguais a -6.06 kJ/mol. O duplo mutante Q8A exibe valores de $\Delta\Delta G$ na ordem dos -13 kJ/mol.

A transformação do resíduo de tirosina para alanina (Y10A) apresenta uma energia livre relativa positiva, indicando dessa forma que esta transformação é desfavorável para a ligação da ThT à β 2m. No caso do duplo mutante Y10A a diferença de energia livre relativa de ligação da ThT é de aproximadamente 18 kJ/mol, ou seja, mais do dobro do

valor quando comparado com a mutação simples (aproximadamente 6 kJ/mol). No caso da transformação do resíduo de tirosina para fenilalanina (Y10F), obtiveram-se diferenças de energia próximas de 0 (valor dentro do erro associado ao método). Este facto indica que esta mutação tem pouca influência na estabilidade da ThT no local de ligação da $\beta 2m$. Este facto é observável quer na dupla mutação quer na mutação simples. Estes resultados demonstram que o resíduo de Y10 é essencial na interação entre a tioflavina e o dímero de $\beta 2m$ e que o resíduo de Q8 não se mostra preponderante nessa interação.

A transformação de tirosina para alanina (Y10A) revela que o resíduo de tirosina será importante na interação da tioflavina com o dímero de $\beta 2m$, já que temos valores de $\Delta\Delta G > 0$, sendo a transformação desfavorável.

Quando temos só uma mutação num dos monómeros os valores de $\Delta\Delta G$ são menores que na dupla mutação. Isto pode ser explicado porque no caso da mutação simples temos só uma interação, enquanto que na dupla mutação temos duas interações. No replicado 3 da transformação Y10A o valor de $\Delta\Delta G$ é superior aos outros replicados e pode ser um *outlier*. No caso da mutação/transformação Y10F os valores são muito perto de zero, dentro do erro, o que pode indicar que a transformação não afeta a ligação.

Conciliando os resultados das simulações de Dinâmica Molecular e os cálculos de energia livre, pode-se confirmar que o resíduo Y10 é essencial na interação da ThT com o dímero de $\beta 2m$ quer pela desestabilização no local ativo observada nas simulações de DM em que se faz a mutação Y10A, quer pela análise dos valores obtidos a partir dos cálculos relativos de energia livre. Observa-se nas simulações de dinâmica que o fator

preponderante para a interação será uma interação π -catião, sendo que o anel aromático quer da tirosina quer da fenilalanina é suficiente para estabilizar a ThT no local ativo.

A glutamina terá provavelmente um papel pouco relevante na estabilização da ThT já que a transformação/mutação de Q8A se mostrou energeticamente favorável. Contudo, pela análise das simulações de DM existem pontes de hidrogénio entre o resíduo de glutamina e o átomo de azoto da ThT.

4 Discussão

A caracterização do processo de formação amilóide e das estruturas das fibras amilóides bem como a caracterização da interação de pequenas moléculas (entre as quais peptídeos) com fibras tem sido objeto de intenso estudo ao longo dos últimos anos. Estes estudos fornecem pistas importantes para o desenvolvimento de moléculas com potencial terapêutico, que impeçam a formação de fibras amilóides, ou com potencial para serem utilizadas como sondas para diagnóstico médico.^{8,88}

Num trabalho realizado anteriormente⁸⁹ com o objetivo de contribuir para a compreensão do modo de ligação entre pequenas moléculas e fibras amilóides, recorrendo a uma revisão da literatura e à base de dados PDB foi feita uma pesquisa de estruturas de fibras amilóides em complexo com pequenas moléculas determinadas experimentalmente. Foi considerada de particular interesse uma estrutura oligomérica da β -2 microglobulina com características amilóides, complexada com a sonda fluorescente ThT (PDB ID 3MZT).¹⁷ Sendo por isso relevante ter prosseguido o estudo desta estrutura numa tentativa de melhor compreender a interação de pequenas moléculas com espécies amilóides.

No trabalho de Ehud Gazit⁹⁰ descreve-se o papel de interações de empilhamento π na formação de depósitos amilóides, como sendo resultado de interações não-covalentes entre anéis aromáticos. Como a formação de fibras amilóides é um processo de reconhecimento intermolecular e de *self-assembly*, o empilhamento π pode fornecer dois elementos-chaves na formação destas estruturas: 1) uma contribuição energética do empilhamento em si, onde tal contribuição pode levar termodinamicamente ao processo de *self-assembly*; e 2) a orientação e direcionalidade dada por este empilhamento. Isto é

especialmente importante dado que as fibras amilóides são estruturas supramoleculares bem definidas e este padrão de empilhamento poderá levar à formação de uma estrutura ordenada.⁹⁰

Bloquear fisicamente o processo de *self-assembly* é uma das formas de clinicamente controlar doenças amilóides. A hipótese sobre o papel do empilhamento π na formação amilóide sugere que fármacos que bloqueiem estas interações podem ser candidatos fortes para o controlo de doenças amilóides. Estudos^{7,91} em que foi demonstrado experimentalmente a eficácia de pequenas moléculas contendo resíduos aromáticos no controlo da formação do polipéptido A β parecem demonstrar esta hipótese. No caso da estrutura utilizada neste estudo, a interação entre a ThT com o dímero β 2m também é caracterizada pela interação por empilhamento π entre os resíduos de Y10 e o átomo de azoto do anel benzotiazol da ThT.¹⁷ Os nossos resultados confirmam a existência deste tipo de interações, concluindo-se que os resíduos aromáticos são de facto essenciais na interação entre a β 2m e a ThT. Através da utilização desta informação, é então possível tentar o desenho racional de pequenos compostos aromáticos que realizem interações de empilhamento π e hidrofóbicas com os resíduos das espécies amilóides e que sejam capazes de impedir o *self-assembly* destas estruturas controlando assim a formação de fibras amilóides.

Chun Wu *et al*⁹² realizaram simulações de dinâmica molecular e cálculos de MM-GBSA (*molecular mechanics generalized Born/surface area*) para determinar a energia de ligação da ThT e do seu análogo neutro BTA-1 a protofilamentos do peptídeo de β -amilóide da doença de Alzheimer. Em particular, os autores deste trabalho tiveram o objetivo de determinar o local de ligação e como o efeito da mutação da ThT para BTA-1 afeta a sua afinidade de ligação a peptídeo A β . É interessante notar que a ThT

positivamente carregada liga a resíduos hidrofóbicos e aromáticos e não a resíduos carregados negativamente, sugerindo a existência de interações anel-anel e de interações hidrofóbicas, em vez de ponte salina. Os resultados obtidos no nosso trabalho parecem confirmar que a ThT estabelece interações por empilhamento π -catião e é estabilizada no local ativo da β 2m na presença de anéis aromáticos. De facto, nas simulações de dinâmica molecular da mutação Y10A foi possível observar que o posicionamento da ThT no local de ligação foi perturbado por estas mutação (Figura 29 E-H e Figura 30 D-F). É de realçar também que no trabalho acima referido, conclui-se que os grupos metilo no azoto da dimetilaminobenzeno da ThT impedem a inserção da sonda em locais de ligação mais pequenos, mas que ausência de grupos metilos iria contribuir para o enfraquecimento das interações hidrofóbicas. Também esta observação é reforçada pelos nossos resultados, que indicam que a preponderância da interação da ThT ocorre entre o azoto do anel de benzotiazol e o anel aromático Y10, tal como demonstrado pelas simulações de dinâmica molecular e pelos cálculos de energia livre (análise de RMSD da ThT Figura 25 C e D, análise das distâncias Figura 29 E-H e Tabela 1 com as energias livres).

Chun Wu⁹² e seus colaboradores utilizaram também o método de MM-GBSA para obter as energias de afinidade tanto da ThT (-9,2 kJ/mol a -35,6 kJ/mol) como do seu análogo neutro BTA-1 (-30,1 kJ/mol a -122,2 kJ/mol) para os diferentes locais de ligação no peptídeo A β . Os resultados obtidos por estes autores foram consistentes com o valor de ligação determinado experimentalmente (-12,5 kcal/mol).

Os resultados obtidos por Chun Wu e colaboradores, bem como os aqui descritos, demonstram a utilidade da aplicação de metodologias computacionais no estudo da

interação de fibras amilóides com pequenas moléculas e podem contribuir para o desenvolvimento de novas sondas para uma melhor interação com espécies amilóides.

5 Conclusão

Na atualidade, um dos maiores desafios no combate a doenças amilóide, como Alzheimer, Parkinson e diabetes tipo II, é a necessidade de um diagnóstico precoce. Para tal, é necessário um contínuo desenvolvimento de novas e melhores sondas moleculares como ferramentas de diagnóstico.

O objetivo deste trabalho era caracterizar detalhadamente a interação entre a proteína $\beta 2m$ com a sonda fluorescente ThT. Para isso realizaram-se simulações de dinâmica molecular para avaliar a estabilidade estrutural do dímero de $\beta 2m$ e do complexo $\beta 2m$ -ThT, complementadas por cálculos de energia livre de modo a calcular a contribuição energética dos resíduos do local ativo para a estabilidade do complexo $\beta 2m$ -ThT. As simulações de dinâmica demonstraram que tanto o dímero $\beta 2m$ como o complexo de $\beta 2m$ -ThT são estruturalmente estáveis durante a simulação. Os resultados obtidos destas simulações são concordantes com o reportado na literatura,¹⁷ onde os resíduos Q8 e Y10 da $\beta 2m$ se demonstraram essenciais na interação com a ThT. Avaliou-se as restrições topológicas causadas por estes resíduos, tendo sido construídos *in silico* os mutantes Q8A, Y10A e Y10F, realizando-se simulações de dinâmica molecular adicionais. De acordo com os resultados, o anel aromático do resíduo de Y10 é crucial na interação da ThT com $\beta 2m$, já que na mutação Y10A, a interação é fortemente afetada. Além disso, avaliou-se a contribuição energética destes resíduos para a estabilidade do complexo $\beta 2m$ -ThT com cálculos de energia livre (CEL). Estes cálculos demonstraram que o resíduo de $\beta 2m$ mais importante na interação com a ThT é a Y10, uma vez que a mutação Y10A é a mais energeticamente desfavorável.

Tendo estes resultados em conta, em que tanto as simulações DM e CEL revelam que o anel aromático do resíduo Y10 é crucial na interação entre a β 2m e a ThT, pode-se desenvolver novas sondas ou derivados da ThT. O desenho racional de derivados de ThT pode permitir uma maior seletividade e/ou maior sensibilidade para espécies amilóides.

6 Referências

- (1) Dobson, C. M. Protein Folding and Misfolding. *Nature* **2003**, 426 (6968), 884–890.
- (2) Jahn, T. R.; Radford, S. E. Folding versus Aggregation: Polypeptide Conformations on Competing Pathways. *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, 469 (1), 100–117.
- (3) Buell, A. K.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P. J.; Welland, M. E. Interactions between Amyloidophilic Dyes and Their Relevance to Studies of Amyloid Inhibitors. *Biophys. J.* **2010**, 99 (10), 3492–3497.
- (4) Greenwald, J.; Riek, R. Biology of Amyloid: Structure, Function, and Regulation. *Structure* **2010**, 18 (10), 1244–1260.
- (5) Sunde, M.; Blake, C. *The Structure of Amyloid Fibrils by Electron Microscopy and X-Ray Diffraction*; Advances in Protein Chemistry; Elsevier, 1997; Vol. 50.
- (6) Li, L.; Darden, T. A.; Bartolotti, L.; Kominos, D.; Pedersen, L. G. An Atomic Model for the Pleated Beta-Sheet Structure of Abeta Amyloid Protofilaments. *Biophys. J.* **1999**, 76 (6), 2871–2878.
- (7) Tjernberg, L. O.; Näslund, J.; Lindqvist, F.; Johansson, J.; Karlström, A. R.; Thyberg, J.; Terenius, L.; Nordstedt, C. Arrest of Beta-Amyloid Fibril Formation by a Pentapeptide Ligand. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271 (15), 8545–8548.
- (8) Wang, C.; Yang, A.; Li, X.; Li, D.; Zhang, M.; Du, H.; Li, C.; Guo, Y.; Mao, X.; Dong, M.; et al. Observation of Molecular Inhibition and Binding Structures of Amyloid Peptides. *Nanoscale* **2012**, 4 (6), 1895–1909.
- (9) Liu, D.; Xu, Y.; Feng, Y.; Liu, H.; Shen, X.; Chen, K.; Ma, J.; Jiang, H. Inhibitor Discovery Targeting the Intermediate Structure of Beta-Amyloid Peptide on the Conformational Transition Pathway: Implications in the Aggregation Mechanism of Beta-Amyloid Peptide. *Biochemistry* **2006**, 45 (36), 10963–10972.
- (10) Porat, Y.; Abramowitz, A.; Gazit, E. Inhibition of Amyloid Fibril Formation by Polyphenols: Structural Similarity and Aromatic Interactions as a Common Inhibition Mechanism. *Chem. Biol. Drug Des.* **2006**, 67 (1), 27–37.
- (11) Ono, K.; Yamada, M. Antioxidant Compounds Have Potent Anti-Fibrillogenic and Fibril-Destabilizing Effects for Alpha-Synuclein Fibrils in Vitro. *J. Neurochem.* **2006**, 97 (1), 105–115.
- (12) Reinke, A. A.; Gestwicki, J. E. Structure-Activity Relationships of Amyloid Beta-Aggregation Inhibitors Based on Curcumin: Influence of Linker Length and Flexibility. *Chem. Biol. Drug Des.* **2007**, 70 (3), 206–215.
- (13) Chiti, F.; Dobson, C. M. Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, 75, 333–366.
- (14) Gebbink, M. F. B. G.; Claessen, D.; Bouma, B.; Dijkhuizen, L.; Wösten, H. A. B. Amyloids--a Functional Coat for Microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, 3 (4), 333–341.

- (15) Chapman, M. R.; Robinson, L. S.; Pinkner, J. S.; Roth, R.; Heuser, J.; Hammar, M.; Normark, S.; Hultgren, S. J. Role of Escherichia Coli Curli Operons in Directing Amyloid Fiber Formation. *Science* **2002**, *295* (5556), 851–855.
- (16) Calabrese, M. F.; Eakin, C. M.; Wang, J. M.; Miranker, A. D. A Regulatable Switch Mediates Self-Association in an Immunoglobulin Fold. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15* (9), 965–971.
- (17) Wolfe, L. S.; Calabrese, M. F.; Nath, A.; Blaho, D. V.; Miranker, A. D.; Xiong, Y. Protein-Induced Photophysical Changes to the Amyloid Indicator Dye Thioflavin T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (39), 16863–16868.
- (18) Santos, M.; Schilham, M. W.; Rademakers, L. H.; Marx, J. J.; de Sousa, M.; Clevers, H. Defective Iron Homeostasis in Beta 2-Microglobulin Knockout Mice Recapitulates Hereditary Hemochromatosis in Man. *J. Exp. Med.* **1996**, *184* (5), 1975–1985.
- (19) Drake, D. R.; Lukacher, A. E. Beta 2-Microglobulin Knockout Mice Are Highly Susceptible to Polyoma Virus Tumorigenesis. *Virology* **1998**, *252* (1), 275–284.
- (20) van Ypersele de Strihou, C.; Jadoul, M.; Malghem, J.; Maldague, B.; Jamart, J. Effect of Dialysis Membrane and Patient's Age on Signs of Dialysis-Related Amyloidosis. The Working Party on Dialysis Amyloidosis. *Kidney Int.* **1991**, *39* (5), 1012–1019.
- (21) Iwata, K.; Matsuura, T.; Sakurai, K.; Nakagawa, A.; Goto, Y. High-Resolution Crystal Structure of beta2-Microglobulin Formed at pH 7.0. *J. Biochem.* **2007**, *142* (3), 413–419.
- (22) Chong, S.-H.; Hong, J.; Lim, S.; Cho, S.; Lee, J.; Ham, S. Structural and Thermodynamic Characteristics of Amyloidogenic Intermediates of β -2-Microglobulin. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 13631.
- (23) Floege, J.; Ehlerding, G. Beta-2-Microglobulin-Associated Amyloidosis. *Nephron* **1996**, *72* (1), 9–26.
- (24) Mena, C.; Esser, E.; Sprague, S. M. Beta2-Microglobulin Stimulates Osteoclast Formation. *Kidney Int.* **2008**, *73* (11), 1275–1281.
- (25) Eichner, T.; Kalverda, A. P.; Thompson, G. S.; Homans, S. W.; Radford, S. E. Conformational Conversion during Amyloid Formation at Atomic Resolution. *Mol. Cell* **2011**, *41* (2), 161–172.
- (26) Ma, B.; Nussinov, R. Molecular Dynamics Simulations of the Unfolding of beta(2)-Microglobulin and Its Variants. *Protein Eng.* **2003**, *16* (8), 561–575.
- (27) Armen, R. S.; Daggett, V. Characterization of Two Distinct beta2-Microglobulin Unfolding Intermediates That May Lead to Amyloid Fibrils of Different Morphology. *Biochemistry* **2005**, *44* (49), 16098–16107.
- (28) Fogolari, F.; Corazza, A.; Fortuna, S.; Soler, M. A.; VanSchouwen, B.; Brancolini, G.; Corni, S.; Melacini, G.; Esposito, G. Distance-Based Configurational Entropy of Proteins from Molecular Dynamics Simulations. *PLoS One* **2015**, *10* (7), e0132356.
- (29) Armen, R. S.; DeMarco, M. L.; Alonso, D. O. V.; Daggett, V. Pauling and Corey's Alpha-Pleated Sheet Structure May Define the Prefibrillar Amyloidogenic Intermediate in Amyloid Disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (32), 11622–11627.

- (30) Fogolari, F.; Corazza, A.; Viglino, P.; Zuccato, P.; Pieri, L.; Faccioli, P.; Bellotti, V.; Esposito, G. Molecular Dynamics Simulation Suggests Possible Interaction Patterns at Early Steps of beta2-Microglobulin Aggregation. *Biophys. J.* **2007**, *92* (5), 1673–1681.
- (31) Nishino, M.; Sugita, Y.; Yoda, T.; Okamoto, Y. Structures of a Peptide Fragment of beta2-Microglobulin Studied by Replica-Exchange Molecular Dynamics Simulations - towards the Understanding of the Mechanism of Amyloid Formation. *FEBS Lett.* **2005**, *579* (24), 5425–5429.
- (32) Naiki, H.; Higuchi, K.; Hosokawa, M.; Takeda, T. Fluorometric Determination of Amyloid Fibrils in Vitro Using the Fluorescent Dye, Thioflavin T1. *Anal. Biochem.* **1989**, *177* (2), 244–249.
- (33) LeVine, H. Thioflavine T Interaction with Synthetic Alzheimer's Disease Beta-Amyloid Peptides: Detection of Amyloid Aggregation in Solution. *Protein Sci.* **1993**, *2* (3), 404–410.
- (34) LeVine, H. Quantification of Beta-Sheet Amyloid Fibril Structures with Thioflavin T. *Methods Enzymol.* **1999**, *309*, 274–284.
- (35) Maskevich, A. A.; Stsiapura, V. I.; Kuzmitsky, V. A.; Kuznetsova, I. M.; Povarova, O. I.; Uversky, V. N.; Turoverov, K. K. Spectral Properties of Thioflavin T in Solvents with Different Dielectric Properties and in a Fibril-Incorporated Form. *J. Proteome Res.* **2007**, *6* (4), 1392–1401.
- (36) Berman, H. M. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28* (1), 235–242.
- (37) van Gunsteren, W. F.; Bakowies, D.; Baron, R.; Chandrasekhar, I.; Christen, M.; Daura, X.; Gee, P.; Geerke, D. P.; Glättli, A.; Hünenberger, P. H.; et al. Biomolecular Modeling: Goals, Problems, Perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45* (25), 4064–4092.
- (38) Gavezzotti, A. *Molecular Aggregation: Structure Analysis and Molecular Simulation of Crystals and Liquids*; 2007.
- (39) Allinger, N. L. Allinger's molecular mechanics research lab (home of mm2/mm3/mm4 force field) <http://europa.chem.uga.edu>.
- (40) Mayo, S. L.; Olafson, B. D.; Goddard, W. A. DREIDING: A Generic Force Field for Molecular Simulations. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94* (26), 8897–8909.
- (41) Rappe, A. K.; Casewit, C. J.; Colwell, K. S.; Goddard, W. A.; Skiff, W. M. UFF, a Full Periodic Table Force Field for Molecular Mechanics and Molecular Dynamics Simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (25), 10024–10035.
- (42) Allinger, N. L.; Chen, K.; Lii, J.-H. An Improved Force Field (MM4) for Saturated Hydrocarbons. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17* (5-6), 642–668.
- (43) Cornell, W. D. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. **1995**, *117* (19), 5179–5197.
- (44) Oostenbrink, C.; Villa, A.; Mark, A. E.; van Gunsteren, W. F. A Biomolecular Force Field Based on the Free Enthalpy of Hydration and Solvation: The GROMOS Force-Field Parameter Sets 53A5 and 53A6. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (13), 1656–1676.
- (45) 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.* **1996**, *118* (45), 11225–11236.

- (46) Sun, H. COMPASS: An Ab Initio Force-Field Optimized for Condensed-Phase Applications Overview with Details on Alkane and Benzene Compounds. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102* (38), 7338–7364.
- (47) Chang, H.-I.; Yeh, M.-K. Clinical Development of Liposome-Based Drugs: Formulation, Characterization, and Therapeutic Efficacy. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 49–60.
- (48) Price, D. J.; Brooks, C. L. Modern Protein Force Fields Behave Comparably in Molecular Dynamics Simulations. *J. Comput. Chem.* **2002**, *23* (11), 1045–1057.
- (49) Allen, M. *Introduction to Molecular Dynamics Simulation*; 2004; Vol. 23.
- (50) Durrant, J. D.; McCammon, J. A. Molecular Dynamics Simulations and Drug Discovery. *BMC Biol.* **2011**, *9* (1), 71.
- (51) Leach, A. R. *Molecular Modelling: Principles and Applications*; 2001.
- (52) Markwick, P. R. L.; Cervantes, C. F.; Abel, B. L.; Komives, E. A.; Blackledge, M.; McCammon, J. A. Enhanced Conformational Space Sampling Improves the Prediction of Chemical Shifts in Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (4), 1220–1221.
- (53) Ryckaert, J.-P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. . Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of N-Alkanes. *J. Comput. Phys.* **1977**, *23* (3), 327–341.
- (54) Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J. G. E. M. LINCS: A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18* (12), 1463–1472.
- (55) Miyamoto, S.; Kollman, P. A. Settle: An Analytical Version of the SHAKE and RATTLE Algorithm for Rigid Water Models. *J. Comput. Chem.* **1992**, *13* (8), 952–962.
- (56) Allen, M. P.; Tildesley, D. J. *Computer Simulation of Liquids*; Clarendon Press, 1989.
- (57) Huang, K. *Statistical Mechanics*, 2nd ed.; Wiley John & Sons, New York, 1990.
- (58) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81* (8), 3684.
- (59) Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M. Canonical Sampling through Velocity Rescaling. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126* (1), 014101.
- (60) Parrinello, M. Polymorphic Transitions in Single Crystals: A New Molecular Dynamics Method. *J. Appl. Phys.* **1981**, *52* (12), 7182.
- (61) Nosé, S.; Klein, M. L. Constant Pressure Molecular Dynamics for Molecular Systems. *Mol. Phys.* **1983**, *50* (5), 1055–1076.
- (62) Cheatham, T. E. I.; Miller, J. L.; Fox, T.; Darden, T. A.; Kollman, P. A. Molecular Dynamics Simulations on Solvated Biomolecular Systems: The Particle Mesh Ewald Method Leads to Stable Trajectories of DNA, RNA, and Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (14), 4193–4194.
- (63) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle Mesh Ewald: An N-log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (12), 10089.
- (64) Sugita, Y.; Okamoto, Y. Replica-Exchange Molecular Dynamics Method for Protein Folding. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *314* (1-2), 141–151.

- (65) De Ruiter, A.; Oostenbrink, C. Free Energy Calculations of Protein-Ligand Interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15* (4), 547–552.
- (66) Shirts, M. R.; Mobley, D. L.; Brown, S. P. *Drug Design*; Merz, K. M., Ringe, D., Reynolds, C. H., Eds.; Cambridge University Press: Cambridge, 2010.
- (67) Mobley, D. L.; Dumont, E.; Chodera, J. D.; Dill, K. A. Comparison of Charge Models for Fixed-Charge Force Fields: Small-Molecule Hydration Free Energies in Explicit Solvent. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (9), 2242–2254.
- (68) Shirts, M. R.; Pande, V. S. Solvation Free Energies of Amino Acid Side Chain Analogs for Common Molecular Mechanics Water Models. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122* (13), 134508.
- (69) Pitera, J. W.; van Gunsteren, W. F. A Comparison of Non-Bonded Scaling Approaches for Free Energy Calculations. *Mol. Simul.* **2002**, *28* (1-2), 45–65.
- (70) Hornak, V.; Abel, R.; Okur, A.; Strockbine, B.; Roitberg, A.; Simmerling, C. Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters. *Proteins* **2006**, *65* (3), 712–725.
- (71) Kaminski, G. A.; Friesner, R. A.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L. Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides †. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105* (28), 6474–6487.
- (72) Ponder, J. W.; Case, D. A. Force Fields for Protein Simulations. *Adv. Protein Chem.* **2003**, *66*, 27–85.
- (73) Michel, J.; Essex, J. W. Prediction of Protein-Ligand Binding Affinity by Free Energy Simulations: Assumptions, Pitfalls and Expectations. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2010**, *24* (8), 639–658.
- (74) Jiao, D.; Golubkov, P. A.; Darden, T. A.; Ren, P. Calculation of Protein-Ligand Binding Free Energy by Using a Polarizable Potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (17), 6290–6295.
- (75) Shirts, M. R.; Mobley, D. L.; Chodera, J. D. Chapter 4 Alchemical Free Energy Calculations: Ready for Prime Time? *Annu. Rep. Comput. Chem.* **2007**, *3* (07), 41–59.
- (76) Chodera, J. D.; Mobley, D. L.; Shirts, M. R.; Dixon, R. W.; Branson, K.; Pande, V. S. Alchemical Free Energy Methods for Drug Discovery: Progress and Challenges. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2011**, *21* (2), 150–160.
- (77) Schrodinger LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1. 2010.
- (78) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79* (2), 926.
- (79) Wang, J.; Wang, W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Automatic Atom Type and Bond Type Perception in Molecular Mechanical Calculations. *J. Mol. Graph. Model.* **2006**, *25* (2), 247–260.
- (80) Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and Testing of a General Amber Force Field. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (9), 1157–1174.

- (81) Jakalian, A.; Bush, B. L.; Jack, D. B.; Bayly, C. I. Fast, Efficient Generation of High-Quality Atomic Charges. AM1-BCC Model: I. Method. *J. Comput. Chem.* **2000**, *21* (2), 132–146.
- (82) Gapsys, V.; Michielssens, S.; Seeliger, D.; de Groot, B. L. Pmx: Automated Protein Structure and Topology Generation for Alchemical Perturbations. *J. Comput. Chem.* **2015**, *36* (5), 348–354.
- (83) Berendsen, H. J. C.; van der Spoel, D.; van Drunen, R. GROMACS: A Message-Passing Parallel Molecular Dynamics Implementation. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, *91* (1-3), 43–56.
- (84) Sharma, R.; Zeller, M.; Pavlovic, V. I.; Huang, T. S.; Lo, Z.; Chu, S.; Zhao, Y.; Phillips, J. C.; Schulten, K. Speech/Gesture Interface to a Visual-Computing Environment. **2000**, *20*, 29–37.
- (85) Sanders, J. Veusz - A Scientific Plotting Package <http://home.gna.org/veusz/>.
- (86) Shirts, M. R.; Chodera, J. D. Statistically Optimal Analysis of Samples from Multiple Equilibrium States. *J. Chem. Phys.* **2008**, *129* (12), 124105.
- (87) Shirts, M. R.; Chodera, J. D. Statistically Optimal Analysis of Samples from Multiple Equilibrium States. *J. Chem. Phys.* **2008**, *129* (12), 124105.
- (88) Buell, A. K.; Esbjörner, E. K.; Riss, P. J.; White, D. A.; Aigbirhio, F. I.; Toth, G.; Welland, M. E.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P. J. Probing Small Molecule Binding to Amyloid Fibrils. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13* (45), 20044–20052.
- (89) Pedro M. P. Fernandes, Cândida G. Silva, R. M. M. B. Validação de Um Programa de Acoplamento Molecular Para Rastreamento Virtual de Fármacos Contra Fibras Amilóides (Tese de Licenciatura). **2013**.
- (90) Gazit, E. A Possible Role for Pi-Stacking in the Self-Assembly of Amyloid Fibrils. *FASEB J.* **2002**, *16* (1), 77–83.
- (91) Kuner, P.; Bohrmann, B.; Tjernberg, L. O.; Näslund, J.; Huber, G.; Celenk, S.; Grüninger-Leitch, F.; Richards, J. G.; Jakob-Roetne, R.; Kemp, J. A.; et al. Controlling Polymerization of Beta-Amyloid and Prion-Derived Peptides with Synthetic Small Molecule Ligands. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (3), 1673–1678.
- (92) Wu, C.; Wang, Z.; Lei, H.; Duan, Y.; Bowers, M. T.; Shea, J.-E. The Binding of Thioflavin T and Its Neutral Analog BTA-1 to Protofibrils of the Alzheimer's Disease Aβ(16-22) Peptide Probed by Molecular Dynamics Simulations. *J. Mol. Biol.* **2008**, *384* (3), 718–729.
- (93) Glowacki, D. R.; Harvey, J. N.; Mulholland, A. J. Taking Ockham's Razor to Enzyme Dynamics and Catalysis. *Nat. Chem.* **2012**, *4* (3), 169–176.
- (94) Knowles, T. P. J.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M. The Amyloid State and Its Association with Protein Misfolding Diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15* (6), 384–396.