

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Química Fundamental
Programa de Pós-Graduação em Química



Carlos Henrique Bezerra da Cruz

Simulações de Dinâmica Molecular e QM/MM
Revelam o Mecanismo de Inibição da Insulinase
pelo ATP na Clivagem do Amilóide- β 42: Um
Peptídeo Associado à Patologia da Doença de
Alzheimer

Recife

2014

Carlos Henrique Bezerra da Cruz

Simulações de Dinâmica Molecular e QM/MM
Revelam o Mecanismo de Inibição da Insulinase
pelo ATP na Clivagem do Amilóide- β 42: Um
Peptídeo Associado a Patologia da Doença de
Alzheimer

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Pernambuco como
requisito parcial à obtenção de título de
Doutor em Química

Orientador: Gustavo de Miranda Seabra

Recife

2014

Catálogo na fonte
Bibliotecária Arabelly Ascoli CRB 4-2068

C957s Cruz, Carlos Henrique Bezerra da
Simulações de dinâmica molecular e QM/MM revelam o mecanismo de inibição da insulinase pelo ATP na clivagem do amiloide- β 42: um peptídeo associado à patologia da doença de Alzheimer / Carlos Henrique Bezerra da Cruz – 2014.
118 f.: fig., tab.

Orientador: Gustavo de Miranda Seabra
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CCEN. Química Fundamental. Recife, 2014.
Inclui referências.

1. Química computacional. 2. Alzheimer, doença de. 3. Enzima degradadora de insulina I. Cruz, Carlos Henrique Bezerra da (orientador). II. Título.

542

CDD (22. ed.)

UFPE-FQ 2019-02

Tese submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Química.

Aprovada:

Prof. Gustavo de Miranda Seabra

Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Munir Salomão Skaf

Instituto de Química
Universidade Federal de Campinas

Prof. Ricardo Luiz Longo

Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Willian Ricardo Rocha

Departamento de Química
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Daniel Pedro Udrisar

Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Thereza Amélia Soares da Silva

Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Simulações de Dinâmica Molecular e QM/MM Revelam O Mecanismo de Inibição da Insulinase pelo ATP na Clivagem do Amiloide- β 42: Um Peptídeo Associado a Patologia da Doença de Alzheimer

Por

Carlos Henrique Bezerra da Cruz

Departamento de Química Fundamental
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Universidade Federal de Pernambuco

Recife-PE-Brasil

30 de Maio de 2014

Aos meus pais Eronita Bezerra da Silva e
Cláudio Ferreira da Cruz

Agradecimento

A realização deste trabalho só foi possível com o incentivo, apoio e suporte dos meus familiares, professores e amigos que contribuíram diretamente e indiretamente no desenvolvimento desta pesquisa. Não posso deixar de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro cedido no período do doutorado, ao Instituto de Nanotecnologia de Marcadores Integrados (INAMI) pelo custeio de inscrições, passagens e hospedagens em congressos nacionais e internacionais, à FACEPE pela aquisição de peças, computadores e materiais em geral, ao Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho de Pernambuco (CENAPAD-PE) e ao *Oak Ridge Leadership Computer Facility* pelo tempo computacional, sem o qual seria impossível a realização desse trabalho. Gostaria de agradecer em particular ao meu orientador Gustavo Seabra por ter confiado sobretudo em mim e no meu trabalho, além de cedido boa parte do seu tempo para o aprimoramento desta pesquisa, a Maria Carolina Pacheco Lima, integrante da nossa equipe de pesquisa, pelo suporte dado ao longo da pesquisa e a banca de avaliação de qualificação constituída pelos profs. João Bosco Paraíso, Thereza Soares e Ricardo Longo do Departamento de Química Fundamental (UFPE) e ao prof. Daniel Udrisar do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (UFPE), bem como à banca de avaliação final constituída pelos três últimos e os professores Munir Skaf do Instituto de Química da UNICAMP e Willian Rocha do Departamento de Química da UFMG, pelas sugestões as quais recebo com atenção. Não deixarei de citar Júlio Cosme, Gabriel da Hora, Fred Pontes, Reinaldo Tenório, Eduardo Castro, Diego de Paula, Victor Rusu, Roberta Dias, Miguel Ângelo pelo incentivo à pesquisa e soma de conhecimento técnico e científico, essenciais para o melhor desenvolvimento do trabalho aqui apresentado. Agradeço também ao Professor Paulo Menezes e Antônio Carlos Pavão, com os quais mantenho colaborações. Por fim, nada seria possível sem o apoio incondicional dos meus pais Eronita Bezerra da Silva e Cláudio Ferreira da Cruz.

Resumo

O acúmulo incomum do polipeptídeo amilóide- β 42 ($A\beta$ 42) em regiões específicas no cérebro tem sido fortemente associado à patologia da doença de Alzheimer. Baseado nestas evidências, muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas no sentido de controlar os níveis cerebrais do amilóide. A insulinase, também chamada de *Insulin-Degrading Enzyme (IDE)*, é uma metaloprotease de zinco envolvida na regulação dos níveis de insulina e amilóide, sendo, portanto, alvo do desenvolvimento de terapias contra o diabetes e a doença de Alzheimer. Sua estrutura terciária existe em duas conformações: aberta e fechada, as quais fazem parte do mecanismo de ação. Quando na conformação aberta, a enzima permite a entrada do substrato ou saída dos produtos de degradação, mas quando na forma fechada bloqueia o acesso do substrato ao seu sítio catalítico. Portanto, chama-se a IDE aberta de ativa e a fechada de inativa. A IDE é regulada pelo ATP através de um mecanismo controverso: ativador da IDE na presença de substratos pequenos, o ATP é inibidor da IDE na quebra de substratos longos, incluindo o $A\beta$ 42. A elucidação do mecanismo de regulação da IDE pelo ATP é desafiador e abrirá caminhos para o desenvolvimento racional de ativadores da IDE. Nesta tese, usamos simulações de dinâmica clássica e cálculos híbridos de mecânica quântica e mecânica molecular na tentativa de desvendar o mecanismo de inibição da IDE pelo ATP. Nossos resultados mostram que interações específicas entre a IDE, ATP e $A\beta$ 42 mantêm a enzima na conformação inativa (fechada), impossibilitando a entrada de uma nova molécula de substrato. Ao mesmo tempo, o ATP induz no amilóide e na região do sítio ativo modificações estruturais proteoliticamente inadequadas para a reação, aumentando a energia de ativação da etapa determinante da reação e, com isso, o tempo de vida da enzima na forma inativa. Estes resultados estão em acordo com os dados experimentais, os quais mostram que a inibição depende de interações específicas IDE-ATP, é alostérica, e resulta na aparente redução da afinidade da IDE pelo substrato.

Palavras Chave: Doença de Alzheimer. Enzima Degradadora da Insulina. Mecanismo de Inibição. amilóide Beta.

Abstract

The unusual accumulation of amyloid- β 42 (A β 42) polypeptide in specific regions of the brain has been strongly associated with the pathology of Alzheimer's disease. Based on this assumption, research is being developed to monitor brain levels of amyloid. Insulinase, also called *Insulin-Degrading Enzyme* (IDE), is a zinc metalloprotease involved in regulating amyloid and insulin levels, being therefore target of the development of new therapies for diabetes and Alzheimer's. Its tertiary structure exists in two conformations, open and closed, which support its mechanism of action. When opened, the enzyme allows for substrate entry or release of degradation products but, when closed, it blocks substrate access to the catalytic site. Therefore, IDE open is called *active* and closed, *inactive*. IDE is regulated by ATP via a controversial mechanism: IDE activator in the presence of small substrates, ATP is an IDE inhibitor in the breakdown of long substrates, including A β 42. Understanding of the IDE's regulation mechanism by ATP is challenging, and opens avenues for the rational development of IDE activators. In this thesis, we use classical molecular dynamics and hybrid molecular mechanics and quantum mechanics calculations in an attempt to unravel the mechanism of inhibition of IDE by ATP. Our results show that specific interactions between IDE, ATP and A β 42 hold the enzyme in its inactive conformation, preventing the entry of a new substrate molecule. At the same time, ATP induces structural changes in the amyloid and in the active site region that lead to a catalytically inefficient structure, increasing the activation energy of the rate-determining step and the lifetime of the inactive enzyme. These results are in agreement with experimental data which shows that the inhibition depends on specific interactions IDE-ATP, is allosteric, and results in apparent reduced affinity of IDE for the substrate.

Keywords: Alzheimer Disease. Insulin Degrading Enzyme. Inhibition Mechanism. Amyloid Beta.

Lista de Tabelas

- Tabela 1:** Mutações introduzidas no complexo IDE+A β 42 durante o processo de purificação e cristalização. 55
- Tabela 2:** Número de moléculas d'água, íons de Na⁺ e Cl⁻ e átomos dos sistemas sem íons (IDE-A β 42), com ATP (IDE-A β 42 + ATP) e em solução salina de NaCl (IDE-A β 42 + NaCl). ... 57
- Tabela 3:** Ocupação das ligações de hidrogênio formadas pelo ATP. Os valores em parênteses indicam a ocupação da réplica. 66
- Tabela 4:** População percentual dos grupos amostrados das simulações originais. 75
- Tabela 5:** A energia de ativação da etapa determinante da reação (passo-2) foi calculada subtraindo a energia do TS(II-III) da energia do intermediário, S(II), e a constante cinética relativa usando a Equação 38. Foram usadas as seguintes constantes físicas: constante de Boltzmann (k_B) e temperatura iguais a R e 300 K, respectivamente. 88

Lista de Figuras

Figura 1: Mudanças percentuais em causas de mortes selecionadas no período de 2000 a 2008. ⁵	16
Figura 2: Esquema ilustrativo do processo de desintegração dos microtúbulos e formação dos emaranhados da proteína tau.....	18
Figura 3: Figura ilustrativa do mecanismo de produção do amilóide. A via não-produtora e produtora do amilóide é mostrado nesta figura. ³⁴	20
Figura 4: Estrutura cristalográfica do polipeptídeo A β 42 (Código no PDB: 1IYT).....	21
Figura 5: Estrutura do monômero da IDE livre obtida a partir da estrutura cristalográfica (Código do PDB: 2JG4). O sítio ativo é mostrado na figura ao lado.....	22
Figura 6: Estrutura cristalográfica do complexo IDE-A β 42 (código no PDB: 2WK3). A IDE-N e IDE-C são mostrados nas respectivas cores vermelho e azul, e os locais de ligação do amilóide na IDE (sítio ativo e distal) são mostrados nas imagens ampliadas.	23
Figura 7: Mecanismo de ação da IDE.....	24
Figura 8: Moléculas ativadoras da IDE-1 e -2 (Ia1 e Ia2).....	26
Figura 9: Mecanismo de reação baseado proposto baseado em dados experimentais.....	28
Figura 10: Exemplo que ilustra a evolução do RMSD de uma proteína em função do tempo.	43
Figura 11: Esquema ilustrativo da malha de pontos criada durante processo de encaixe molecular A molécula é encaixada dentro dos limites da caixa, onde está localizado o sítio funcional [Figura modificada da referência 72]......	45
Figura 12: A figura mostra a previsão do sítio de ligação do inibidor na protease HIV-1 (código do PDB: 1HPS). O <i>backbone</i> da proteína é mostrado em tubo azul, o inibidor é mostrado em	

bolas-e-tubos, com os carbonos, nitrogênios e oxigênios colorido de cinza, azul e vermelho, respectivamente. A figura em (a) mostra o local de ligação do inibidor na proteína, em (b) é mostrado os mapas de afinidade e em (c) os envoltórios que definem o local de ligação do inibidor.¹¹² 48

Figura 13 A ilustração mostra a superfície de energia livre da transição do estado A para o estado B em curvas de níveis. O perfil de energia ao longo do caminho AB (coordenada de reação) pode ser calculada usando *umbrella sampling*. As janelas da umbrella são representadas na coordenada de reação. 50

Figura 14: Estrutura inicial da simulação IDE-A β 42 mais ATP após o tratamento do arquivo PDB descrito no texto. As moléculas de água são ocultadas para facilitar a visualização. O fragmento do amilóide em preto não é detectável no raio-X, e foi construído a partir da posição experimental dos fragmentos 1–3 e 16–22 (em vermelho). O fragmento reconstruído 966–978 é mostrado e azul. 56

Figura 15: Geometria inicial dos resíduos em torno do sítio ativo dos sistemas (A) IDE-A β 42 sem íons e (B) com ATP..... 60

Figura 16: Átomos que compõe a região MM e QM. 61

Figura 17: RMSD dos átomos do *backbone* da IDE (C, N e O) como função do tempo, tomando como referência a primeira estrutura de cada simulação. 65

Figura 18: RMSD dos átomos do backbone da IDE em função do tempo para as réplicas dos sistemas sem íons (vermelho), com ATP (preto) e em NaCl (verde)..... 64

Figura 19: Esquerda; A estrutura da enzima é representada em fitas, enquanto que as esferas representam o ATP (carbono: azul claro, nitrogênio: azul, oxigênio: vermelho e hidrogênio: branco), e o Zn (salmão). As ligações entre o ATP e a parede interna da IDE-C (vermelho) e IDE-N (azul) é mostrado. Direita; Visão ampliada do sítio de ligação do ATP, mostrando as principais interações ATP–IDE e ATP–A β 42..... 65

Figura 20: Numero de ligações de hidrogênio entre o ATP e o A β 42 (linha preta) e o ATP e a IDE (linha vermelha) no complexo IDE–A β 42 mais ATP. 67

Figura 21: Número de ligações de hidrogênio entre o ATP e a A β 42 (linha preta) e o ATP e a IDE (linha vermelha) na réplica, como uma função do tempo.	66
Figura 22: Ocorrência de íons Cl ⁻ a pelo menos 4,0 Å de distância das cadeias laterais dos aminoácidos LYS e ALA. Visão de cima dos principais sítios de ligação dos íons Cl ⁻ na IDE (S1, S2e S3). A ocupação do sistema original é mostrado e em parênteses o da réplica.	68
Figura 23: (A) RMSF do <i>backbone</i> do A β 42 obtido para os sistemas sem íons (quadrado vermelho), na presença do ATP (triângulo preto) e em solução salina (círculos verdes). Os resíduos phe19 e lys28 do substrato, envolvidos na ligação com a IDE, são indicados. (B-D) Estrutura secundária da IDE–A β 42 no sistema sem íons (B), na presença do ATP (C) e em NaCl (D). Verde: <i>turn</i> , amarelo: folhas- β , laranja: pontes isoladas, rosa: hélice- α , azul: hélice 3–20 e branco: <i>coil</i>	70
Figura 24: RMSF dos átomos do <i>backbone</i> da IDE (C, CA, N) nos sistemas com ATP (preto) e em solução salina (verde), ambos relativo ao sistema sem íons.	71
Figura 25: Variação da energia-livre de ligação ATP–A β 42 em função da distância que separa os centro de massas dos átomos do ATP e o CM dos átomos de carbono- α da ser26 e lys28 do substrato (coordenada de reação).	72
Figura 26: Estrutura representativa do fragmento 1–3 e 18–21 do A β 42 ligado na IDE. (A) As principais interações entre o fragmento 1–3 do A β 42 e o sítio distal (d1–d4); (B) interações entre o fragmento 18–21 do A β 42 e o sítio ativo da IDE (d5–d10); (C) Ocupação das ligações de hidrogênio entre o fragmento 1–3 do amilóide e o sítio distal e o fragmento 18–21 do amilóide e o sítio ativo e (D) a ligação de hidrogênio d10 formada entre os resíduos TYR831 e a ala21.....	73
Figura 27: Ocorrência em porcentagem de frames das ligações de hidrogênio em torno do sítio ativo nas réplicas dos sistemas sem íons (vermelho), com ATP (preto) e em NaCl (verde).	75
Figura 28: Superfície de energia-livre da reação de degradação do amilóide na ausência do ATP. O caminho de menor energia sugerido e o rótulo das estruturas da reação são mostrados na figura.....	81

Figura 29: Superfície de energia-livre da reação de degradação do amilóide na presença do ATP. O caminho de menor energia sugerido e o rótulo das estruturas da reação são mostrados na figura.....	82
Figura 30: Perfil de energia-livre ao longo do caminho de menor energia na ausência e presença do ATP.	82
Figura 31: Estruturas da reação na ausência do ATP. Reagente: S(I), estado de transição do passo-1: TS(I-II), intermediário: S(II), estado de transição do passo-2: TS(II-III) e produto: S(III). O valor médio e o erro padrão das principais distâncias em Ångströms é mostrado. ..	83
Figura 32: Estruturas da reação na presença do ATP. Reagente: S(I), estado de transição do passo-1: TS(I-II), intermediário: S(II), estado de transição do passo-2: TS(II-III) e produto: S(III). O valor médio e o erro padrão das distâncias em Ångströms é mostrado.....	84
Figura 33: Ocupação da ligação de hidrogênio GLU111–THR142 em porcentagem de estruturas de S(I), TS(I-II), S(II), TS(II-III) e S(III).	87
Figura 34: Estrutura da primeira e segunda esfera de coordenação do zinco ao longo do segundo passo da reação. A média do comprimento de ligação é mostrado e o desvio padrão entre parênteses.....	89
Figura 35: Distribuição da carga atômica do nitrogênio N7 e do íon zinco no intermediário, S(III), da reação catalítica.	90

Lista de Abreviações

A β : Amiloide Beta.	nstlim: número limite de interações.
A β 40: Amilóide beta com 40 resíduos.	NVT: número de partículas, volume e temperatura constante.
A β 42: Amilóide beta 42 com resíduos.	PHE: fenilalanina.
ADAM9: Disintegrin and metalloprotease Domain - contendo a proteína 9.	PMF: Potencial de Força Médio.
ADT: Auto Dock Tools.	PNE2: Preselin Enhancer 2.
AM1: Austin Model 1.	QM: Mecânica Quântica.
APH-1: Anterior Pharynx Defective 1.	RC: Coordenada de Reação.
APP: Amyloid Protein Precursor.	RESP: Restrained Eletrostatic Potential.
ARG: Arginina.	RMSD: Variação do Desvio Quadrático Médio.
ATP: Adenosina Tri-Fosfato.	RMSF: Flutuação quadratatica média.
CM: Centro de Massa.	SCC-DFTB: Self-Consistent Charge Density-Functional Tight-Binding.
DA: Doença de Alzheimer.	SEL: Superfície de Energia Livre.
DFT: Density Fuctional Theory.	SER: Serina.
DFTB: Density Fuctional Tight-Binding.	TYR: Tirosina.
DM: Dinâmica Molecular.	TS: Estado de Transição.
Δt : passo temporal.	US: <i>Umbrella Sampling</i> .
ELL: Eneriga Livre de Ligação.	VAL: Valina.
GHO: General Hibryd Orbital.	WHAM: Método de Análise Ponderado do Histograma.
GLU: Glutamato.	
GLY: Glicina.	
HF: Hatree-Fock.	
HIS: Histidina.	
Ia1: Ativador da IDE 1.	
Ia2: Ativador da IDE 2.	
IDE: Insulin Degrading Enzyme.	
IDEc: Insulin Degrading Enzyme na conformação Fechada.	
IDEo: Insulin Degrading Enzyme na conformação Aberta.	
IDE-C: Metade C-terminal da IDE.	
IDE-N: Metade N-terminal da IDE.	
KS: Kohn-Sham.	
LEU: Leucina.	
LH: Ligações de Hidrogênios.	
LSCF: Local Self-Consistent Field.	
LYS: Lisina.	
MK: Merz-Kollman.	
MM: Mecânica Molecular.	
NPT: número de partículas, pressão e temperatura constantes.	

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1	A Doença de Alzheimer	15
1.2	Hipótese Amilogênica	17
1.3	Mecanismo de Formação do A β 42	19
1.4	Estratégias de Combate	21
1.5	A Enzima Degradadora da Insulina	22
1.5.1	<i>Ciclo Catalítico</i>	24
1.5.2	<i>Regulação por Pequenas Moléculas</i>	25
1.5.3	<i>Mecanismo de Degradação do Aβ42</i>	27
1.6	Hipóteses	29
1.7	Estratégias	30
2.	METODOLOGIA	31
2.1	Mecânica Estatística	31
2.2	Mecânica Clássica	32
2.3	Formas de Energia	33
2.4	Hamiltoniano Clássico	34
2.5	Hamiltoniano Híbrido	35
2.5.1	<i>Partição de Energia QM</i>	35
2.5.2	<i>Energia de Acoplamento QM/MM</i>	37
2.5.3	<i>Link Atoms</i>	38
2.6	Dinâmica Molecular	38
2.6.1	<i>Condições Periódicas de Contorno</i>	39
2.6.2	<i>Interações de Curto e Longo Alcance</i>	40
2.6.3	<i>Simulação à Temperatura e Pressão Constante</i>	41
2.6.4	<i>Análises Estruturais</i>	43
2.7	Encaixe Molecular	45
2.8	Previsão de Sítios de Ligação	47
2.9	Autoligand	48
2.10	Cálculo da Energia Livre	49
2.10.1	<i>Umbrella Sampling</i>	49
2.10.2	<i>WHAM</i>	51
2.11	Constante de Velocidade	52
3.	PROCEDIMENTO COMPUTACIONAL	54

3.1	Simulação de Dinâmica Molecular Revela o Mecanismo de Inibição da IDE pelo ATP na Quebra do A β 42	54
3.2	Elucidação do Mecanismo de Degradação do A β 42 pela IDE na Ausência e Presença do ATP.....	59
4.	RESULTADOS, DISCUSSÕES E CONCLUSÕES.....	63
4.1	Simulação de Dinâmica Molecular Revela o Mecanismo de Inibição da IDE pelo ATP na Quebra do A β 42	63
4.1.1	<i>Resultados.....</i>	63
4.1.2	<i>Discussões.....</i>	76
4.1.3	<i>Conclusões.....</i>	79
4.2	Elucidação do Mecanismo de Degradação do A β 42 pela IDE na Ausência e Presença do ATP.....	81
4.2.1	<i>Resultados.....</i>	81
4.2.2	<i>Discussões.....</i>	91
4.2.3	<i>Conclusões.....</i>	93
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
6.	PERSPECTIVAS	95
6.1	Estrutura da IDE aberta.....	95
6.2	Abertura da IDE	95
6.3	Busca por Ativadores da IDE	96
	REFERÊNCIAS	98
	APÊNDICE	113
	Inputs dos Cálculos de Dinâmica Molecular	113
	Inputs dos Cálculos de Reação QM/MM	115

1. INTRODUÇÃO

Esse é o primeiro ensaio computacional que busca a elucidação do mecanismo de inibição da enzima degradadora da insulina (insulinase) pelo ATP na quebra do amilóide- β 42 ($A\beta$ 42), um polipeptídeo associado a patologia da doença de Alzheimer (DA). O problema é abordado de duas maneiras complementares, e importantes para chegarmos à uma conclusão sobre os problemas bioquímicos envolvidos na relação metabólica entre a enzima degradadora da insulina e o $A\beta$ 42. Isso abrirá caminhos para o desenvolvimento de novas terapias contra a DA. Para maior clareza, a introdução, as hipóteses e estratégias dos dois trabalhos são apresentadas neste capítulo. No próximo capítulo (Capítulo 2) é introduzida a metodologia. O Capítulo 3 descreve o procedimento computacional. Os resultados, as discussões e conclusões são apresentados separadamente no Capítulo 4. As considerações finais no Capítulo 5. Por fim, no Capítulo 6, as perspectivas.

1.1 A Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é o mais comum e devastador tipo de demência, se manifesta geralmente em pessoas acima de 65 anos e raramente em adultos aos 50 anos de idade.[1], [2] Os sintomas surgem silenciosamente e são facilmente confundidos com os de outro tipos de demência, o que dificulta o diagnóstico e tratamento da doença. O início da doença é marcada pela perda de memória, seguida do declínio das funções cognitivas, dificuldade na comunicação, razão e lógica. A patologia é desconhecida, mas existem fortes indícios que apontam para um desequilíbrio químico a nível cerebral capaz de desencadear processos inflamatórios e neurodegenerativos em regiões específicas do cérebro que estão relacionadas aos sintomas da DA.[3] O tratamento é sintomático e limitado à administração diária de drogas que restauram a cognição dos pacientes e retarda o avanço da doença (Donepezil, Galantmina, Tacrina e Rivastigmina são alguns exemplos).[2]

Estima-se que cerca de 36 milhões de pessoas no mundo sofrem de Alzheimer e que 604 bilhões de dólares ao ano são investidos em pesquisa, prevenção, tratamento e diagnóstico da doença.[4], [5] No Brasil, até 2002 7,1% da população já havia sido diagnosticada com algum tipo de demência, sendo a DA comprovadamente responsável por

55% dos casos investigados.[6] Estes números, embora já expressivos, estão a se tornar cada vez maiores com o aumento da longevidade.[5], [7] Estudos realizados entre 2000–2008 pelo *Centro Nacional de Estatística da Saúde dos Estados Unidos* mostra que o número de mortes causadas pela DA tem crescido significativamente, enquanto que o número de mortes causada por outros tipos de doenças tem diminuído (**Figura 1**). Por exemplo, o número de mortes atribuída a DA cresceu 66% neste período, enquanto que o número de mortes causadas por doenças do coração e HIV têm diminuído 13% e 29%, respectivamente.[4]

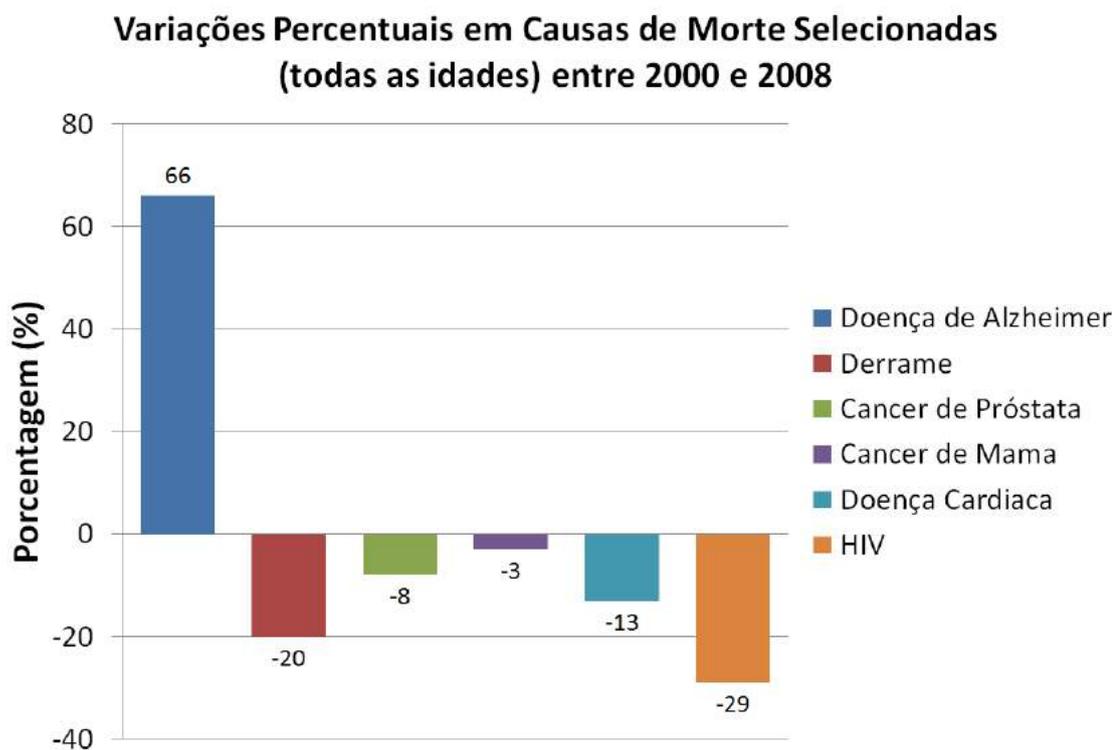


Figura 1: Mudanças percentuais em causas de mortes seleccionadas no período de 2000 a 2008.[4]

A DA não tem cura e o número de mortes tem crescido vertiginosamente nos últimos anos, causando um grande impacto social a nível mundial. Isso tem encorajado grandes companhias farmacêuticas a trabalharem juntas no desenvolvimento de novas terapias que atuam não só nos sintomas como também na causa.[8]–[12] Entretanto, até o momento, nenhuma dessas tentativas resultaram em um tratamento eficaz.

1.2 Hipótese Amilogênica

A DA foi primeiramente diagnosticada pelo Dr. Aloisius Alzheimer, um psiquiatra alemão especialista em neuropatologias que recebeu, em 1901, uma paciente de 51 anos de idade chamada Auguste Deter com sintomas característicos de demência precoce.[13] Após a morte de Deter em 1906, Alzheimer identificou a presença de placas nas regiões lesionadas do cérebro, que foram mais tarde associadas às fibras e emaranhados do polipeptídeo amilóide- β 42 ($A\beta$ 42) e da proteína tau.

Apesar de ter sido diagnosticada pela primeira vez há mais de um século, a patologia da doença de Alzheimer vem sendo estudada apenas há cerca de três décadas. Desde então, várias hipóteses foram propostas na tentativa de elucidar os fenômenos que levam aos sintomas, dentre as quais destacam-se a hipótese da cascata amilogênica,[14] hipótese do metal,[15] dano oxidativo,[16] neuroinflamação,[17] degeneração do citoesqueleto neural[18] e a hipótese colinérgica.[19] Essas hipóteses, embora distintas quanto à sua fisiologia, não são exclusivas e podem ocorrer mutualmente. Por exemplo, o aumento da expressão gênica da proteína precursora do amilóide (APP, *Amyloid Precursor Protein*), prevista pela hipótese amilogênica, aumenta a concentração de amilóide no cérebro formando as fibras que compõem as placas senis. Esse processo, segundo a hipótese do metal, é fortemente favorecido na presença dos íons Zn^{2+} e Cu^{2+} , metais já presentes no cérebro, mediadores químicos e cofatores de várias enzimas. Especula-se que os metais contidos nas placas promovem a catálise da reação do peróxido de hidrogênio para uma espécie oxigênio reativa (ROS, *Reactive Oxygen Species*), causando dano oxidativo, comprometimento da integridade da membrana, neuroinflamação e morte do tecido cerebral.[20] Esses processos reduzem drasticamente a concentração do mediador químico acetilcolina, relacionado aos processos de aquisição do conhecimento (cognição), dando início os fenômenos que regem a hipótese colinérgica. Portanto, intervenções terapêuticas agem inibindo a enzima acetilconesterase, responsável pela regulação dos níveis cerebrais de acetilcolina, restaurando a cognição perdida e retardando o avanço da doença. Tais eventos fazem da DA uma doença multifatorial.

Atualmente, a hipótese da cascata amilogênica ou hipótese amilogênica é a mais aceita e estudada como a causa da DA. Ela foi proposta em 1992 por John A. Hardy e Gerald

A. Higgins,[14] e prevê o aumento da expressão gênica das vias produtoras do amilóide, produzindo uma variedade de peptídeos amilogênicos que, na sua forma insolúvel, agregam-se formando as placas observada no cérebro dos pacientes. Isto causa, de maneira não muito clara, a hiperfosforilação de uma proteína encontrada dentro dos neurônios, chamada de tau, cuja função é modular os microtúbulos que fazem parte do sistema de transporte da célula.[21] O descolamento da *tau* inicia o processo de agregação e formação intracelular de emaranhados neurofibrilares da *tau*, culminando com a supressão do sistema de transporte, necrose do tecido cerebral e aos sintomas característicos da DA (**Figura 2**). A agregação da proteína *tau* é chamada de taupatia, não é exclusivo da DA, e só ocorre após a deposição das placas amilogênicas, que é característico da doença.

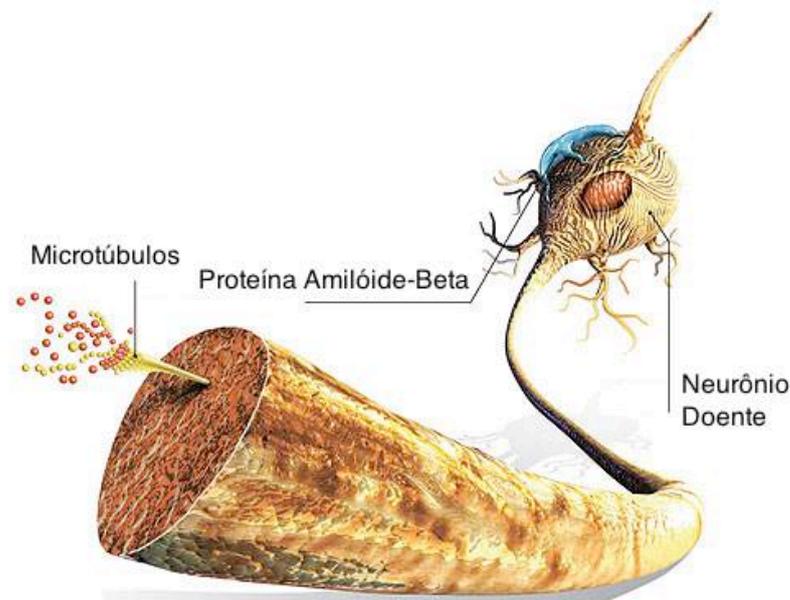


Figura 2: Esquema ilustrativo do processo de desintegração dos microtúbulos e formação dos emaranhados da proteína tau (Adaptado da referência).[22]

A relação entre a formação das fibras amilogênicas e a taupatia ainda é desconhecida, mas especula-se que a deposição do A β 42 na superfície dos neurônios forma canais transmembrânicos que permitem o tráfego seletivo de íons cálcio para dentro do neurônio, aumentando a concentração intracelular de íons Ca²⁺ através de um processo denominado homeostase.[23], [24] O cálcio controla a fosforilação da *tau*[25] e a sua homeostase é conhecida por interromper o processo sináptico através da equalização das cargas entre os meios intra e extraneural, e por antecipar os processos degenerativos através do aumento das ROS mitocondrial.[26] Portanto, acredita-se fortemente que a

homeostase do cálcio também esteja relacionada com a hipotermofosforilação da *tau* e, conseqüentemente, com a formação dos emaranhados neurofibrilares da *tau*. Uma descrição mais detalhada da hipótese amilogênica é encontrada no artigo de revisão por Kinoshita e colaboradores.[27]

A hipótese amilogênica foi testada em meados de 2000 através do estudo comportamental de camundongos geneticamente modificados para aumentar a expressão gênica da APP.[28], [29] Os camundongos submetidos a tais mutações desenvolviam um certo grau de demência precoce associada ao acúmulo incomum do polipeptídeo A β no cérebro, dando início aos eventos que causam inflamações e necrose do tecido cerebral. Impressionantemente, a cognição desses camundongos foi restaurada após a regulação dos níveis cerebrais do A β pelo aprimoramento da atividade da Enzima Degradora da Insulina (IDE, *Insulin-Degrading Enzyme*).

1.3 Mecanismo de Formação do A β 42

A APP é uma proteína de membrana do tipo-I composta por 751 a 770 resíduos distribuídos em um grande domínio extracelular e um pequeno domínio intracelular. A proteína é comumente encontrada na membrana plasmática, retículo endoplasmático e majoritariamente no complexo de Golgi.[30], [31] Sua função fisiológica não é clara, mas especula-se que a APP esteja envolvida no processo de adesão e movimento celular.[32]–[34]

Existem duas vias secretoras da APP: uma via não-amilogênica e outra amilogênica (**Figura 3**).[35]–[37] Esta última associada à produção do amilóide. O caminho não-amilogênico acontece em uma única etapa intermediada pela enzima α -secretase *Disintegrin and Metalloprotease Domain – Containing Protein 9* (ADAM9). A enzima atua no domínio extracelular quebrando a APP na região do resíduo 83, produzindo dois fragmentos de proteínas chamados de C83 e *Proteína Precursora do Amilóide α -secretada* (*sAPP α*). O primeiro fragmento contém parte do A β e permanece preso a membrana, enquanto que o outro fragmento, *sAPP α* , é expelido. Este caminho é dito não-amilogênico porque quebra a APP na região do amilóide. A via produtora do amilóide não é comum e acontece em duas etapas; a primeira conduzida por uma enzima β -secretase e a segunda orquestrada por um

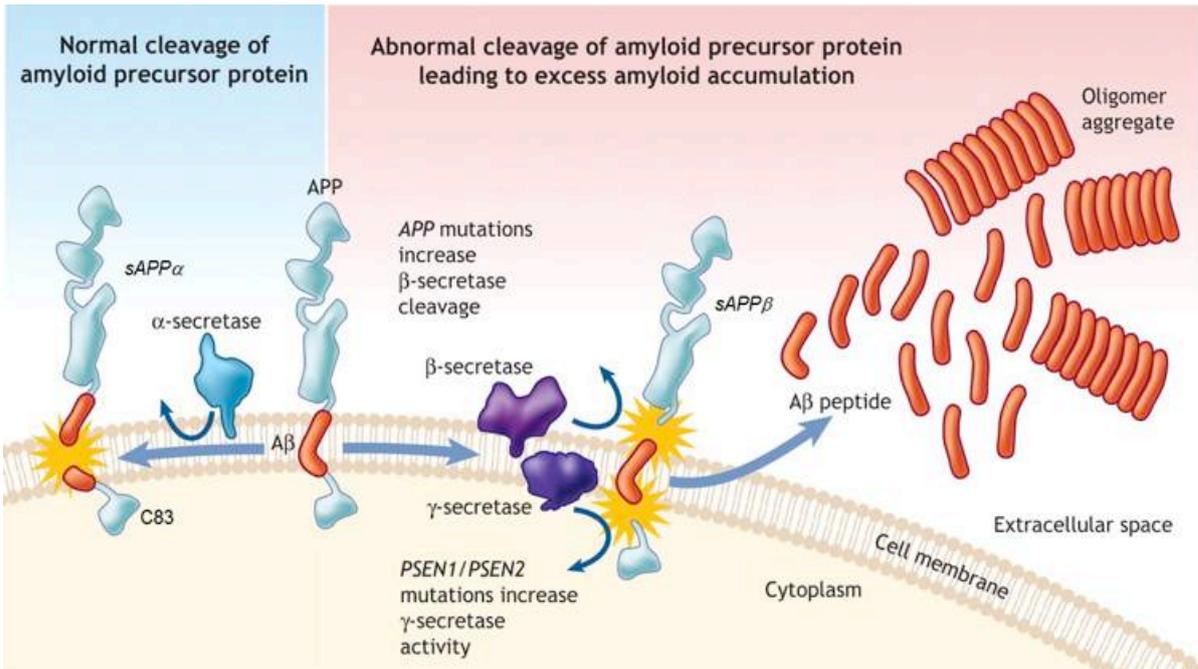


Figura 3: Figura ilustrativa do mecanismo de produção do amiloide. A via não-produtora e produtora do amiloide é mostrado nesta figura.[37]

conjunto de enzimas γ -secretases. Na primeira etapa, a enzima BACE-1 atua na região transmembrânica quebrando a APP na posição do aminoácido 99, produzindo, assim, dois fragmentos; chamados de C99 e *Proteína Precursora do Amiloide β -secretada* ($sAPP\beta$). O fragmento $sAPP\beta$ é expelido da membrana, enquanto que o fragmento remanescente, C99, sofre sucessivas quebras nos resíduos 38 à 43, intermediadas pelas enzimas *Presenilin-1* e -2, *Nicastrin*, *Presenilin Enhancer 2* (PNE2) ou *Anterior Pharynx-Defective 1* (APH-1), resultando na produção de peptídeos de vários tamanhos, entre 38–42 resíduos em comprimento .

No entanto, apenas os peptídeos de amiloide com 40 ($A\beta_{40}$) e 42 ($A\beta_{42}$) resíduos são gerados em grande quantidade com proporções de 10:1 peptídeos de $A\beta_{40}$ e $A\beta_{42}$. [36] Curiosamente, apenas o $A\beta_{42}$ é capaz de oligomerizar e formar as plaquetas observadas no cérebro de pacientes com a DA (ver estrutura do $A\beta_{42}$ na **Figura 4**). [38]

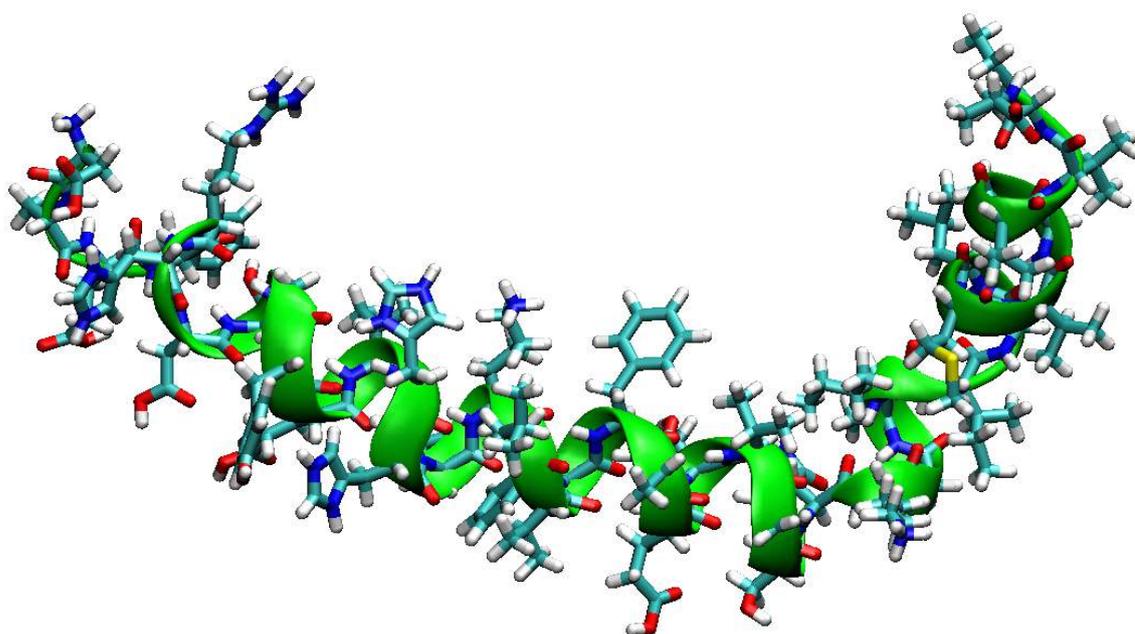


Figura 4: Estrutura cristalográfica do polipeptídeo Aβ42 (Código no PDB: 1IYT).

1.4 Estratégias de Combate

Pouco se sabe sobre os eventos que causam a doença. No entanto, é inquestionável a estreita relação entre o excesso de amilóide e os fenômenos que levam a degeneração do cérebro de pacientes com a DA. Essas descobertas criaram um arcabouço no qual se apoiam as principais linhas de pesquisa. Atualmente, acredita-se que a cura esteja fortemente relacionada à regulação da quantidade de amilóide no cérebro, seja através da inibição das enzimas que participam da formação do amilóide, de substâncias capazes de solubilizar as fibras amilogênicas, da redução da quantidade dos íons Cu^{2+} e Zn^{2+} no cérebro ou da degradação do polipeptídeo Aβ42. Ao longo dos últimos anos tem se dado ênfase à determinação das vias proteolíticas pelas quais o Aβ é regulado.[39], [40] Neste sentido, as enzimas neprilysin (NEP) e a enzima degradadora da insulina (IDE) são as que melhor desempenham esta função.

1.5 A Enzima Degradadora da Insulina

Presente em várias células, incluindo as endoteliais vasculares cerebrais a IDE, também conhecida como insulinase, é uma metaloprotease de zinco da família M16 encontrada em bactérias, fungos, plantas e animais.[41] Ela foi historicamente associada à degradação da insulina e posteriormente com a degradação de outras biomoléculas ativas, incluindo o A β . [42], [43] A sua função não é completamente conhecida, mas sua habilidade de degradar a insulina e o amilóide tem sido relacionada à patologia do diabetes do tipo II e da DA.[44], [45]

A IDE tem uma estrutura terciária composta por 970 resíduos distribuídos em quatro domínios homólogos (domínios 1; resíduos 43–282, domínio 2; resíduos 283–516, domínio 3; resíduos 545–768 e domínio 4; resíduos 769–1011) com 25% de similaridade e na forma de $\alpha\beta$ sanduíche (**Figura 5**).[46] Os domínios 1 e 2 formam a metade C-terminal (IDE-C), que está conectada aos domínios 3 e 4 da metade N-terminal (IDE-N) por um *alça* de 28 resíduos. A flexibilidade dessa *alça* articula movimentos entre duas formas da IDE: conformação aberta (IDEo) e fechada (IDEc).[47] A IDE na conformação fechada forma uma câmara catalítica de base triangular com dimensões e volume iguais a 35x34x30 Å e 1300 Å³, respectivamente, capaz de acomodar substratos longos, entre eles o A β 42.

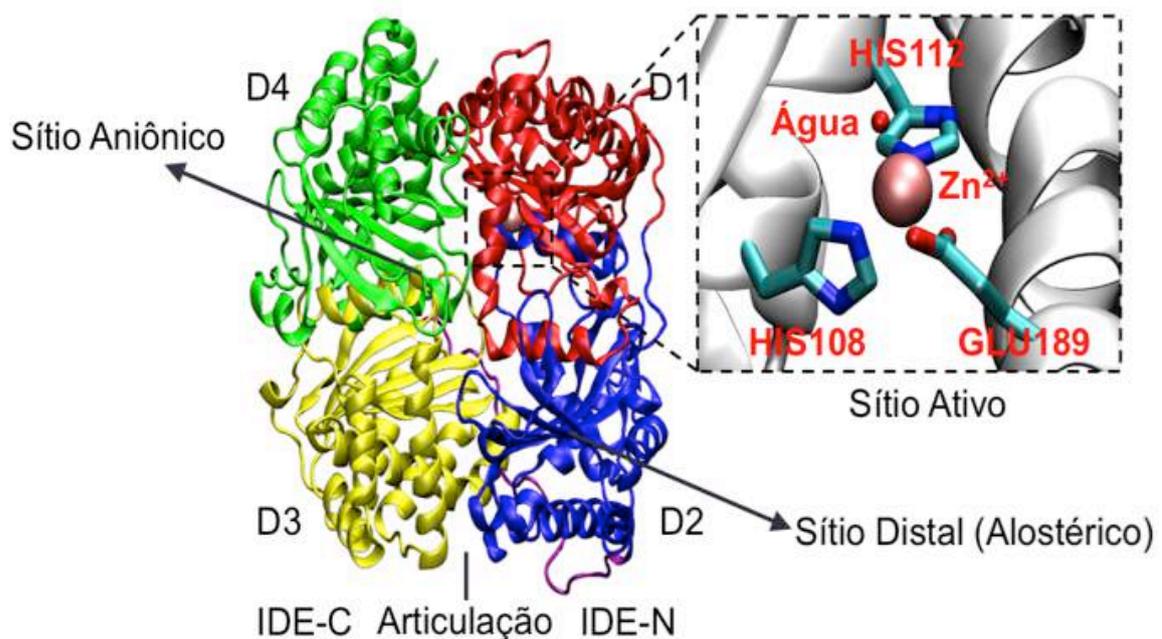


Figura 5: Estrutura do monômero da IDE livre obtida a partir da estrutura cristalográfica (Código no PDB: 2JG4). O sítio ativo é mostrado na figura ao lado.

Por outro lado, a IDE na conformação aberta permite a entrada de substratos ou liberação do produto da degradação. Localizado dentro da câmara e na parede interna do domínio 1, o sítio ativo é composto por uma molécula de água e por uma tríade de aminoácidos (HIS108, HIS112 e GLU189) com as cadeias laterais ligadas ao íon Zn^{2+} , cuja sequência de aminoácidos (HXXEH) é inversa a das outras enzimas da mesma família (HEXXH), como a Termolisina.[41], [42] Além deste, existe um sítio catiônico localizado na IDE-C entre os domínios 2 e 3, composto pelos resíduos ARG429, LYS898, LYS899 e SER901, no qual ligam-se o ATP e outros íons. Sua função foi comprovadamente associada com a degradação da adenosina trifosfato (ATP)[48] e com a ativação alostérica da IDE na quebra de substratos pequenos.[49] Por fim, existe um sítio não catalítico localizado no domínio 2, a 30 Å de distância do sítio ativo, chamado de sítio distal, cuja função é facilitar e orientar as mudanças conformacionais do substrato dentro da câmara catalítica e ativar a IDE via efeito alostérico.[50]

O reconhecimento da IDE pelo substrato acontece na IDE-N e está relacionado mais com a forma (geometria) e sequência de aminoácidos polares do que por uma sequência específica de aminoácidos do substrato.[51] O A β 42, por exemplo, se liga a IDE através dos fragmentos 1–3 e 1–6 (**Figura 6**). O fragmento 1–3 interage na região do sítio distal e forma

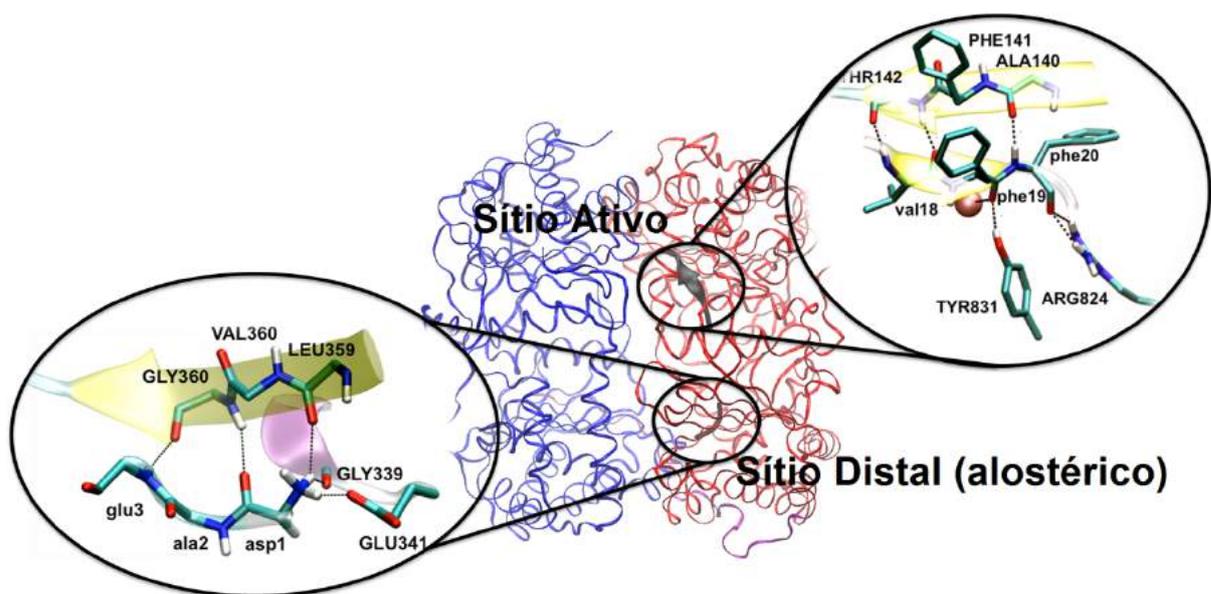


Figura 6: Estrutura cristalográfica do complexo IDE-A β 42 (código no PDB: 2WK3). A IDE-N e IDE-C são mostrados nas respectivas cores vermelho e azul, e os locais de ligação do amilóide na IDE (sítio ativo e distal) são mostrados nas imagens ampliadas.

com o fragmento 341–363 da IDE-N uma folha- β , enquanto que o fragmento 16–22 do amilóide interage com o sítio ativo para formar, com o fragmento 140–145 da IDE-N, outra discreta folha- β . Nesse contexto, a IDE-C também inicia uma função importante: ela é responsável por facilitar a ligação do substrato com o meio catalítico (IDE-N) e aprimorar a degradação do substrato.[47], [52]

1.5.1 Ciclo Catalítico

A IDE é encontrada na forma de monômeros ou em mistura de dímeros e tetrâmeros, sendo os dímeros a forma predominante e mais ativa. A priori, a enzima está na sua conformação fechada, a mais estável. No entanto, para dar início ao ciclo catalítico (**Figura 7**), a IDE precisa vencer as interações que a mantêm fechada, abrir para expor o seu endossítio catalítico e permitir a entrada do substrato. Em seguida, a enzima fecha para dar início ao processo de reconhecimento e degradação do substrato. Após a proteólise, a IDE abre novamente para liberar o produto da degradação e admitir a entrada de uma nova molécula de substrato, reiniciando o ciclo catalítico. Quando na conformação aberta, a IDE expõe o sítio catalítico para dar início a degradação do substrato, tornando-a ativa, e quando

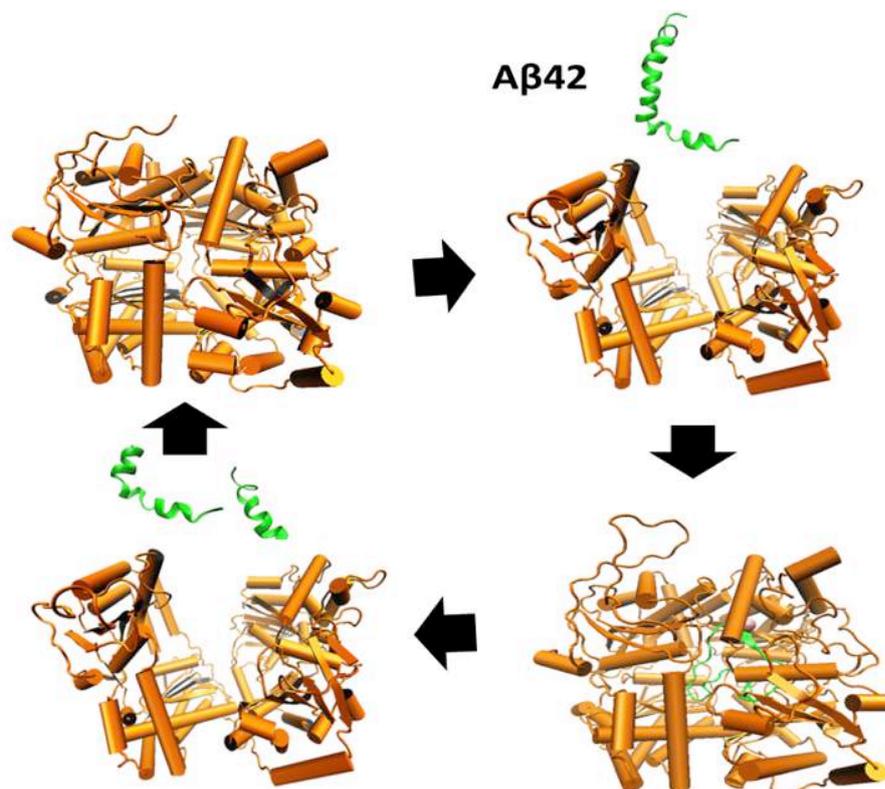


Figura 7: Mecanismo de ação da IDE.

na forma fechada, bloqueia o acesso do substrato à câmara catalítica, inibindo a sua função enzimática.[53] De fato, estudos mostram que a atividade catalítica da IDE aumenta com o aumento do raio hidrodinâmico e diminui com o favorecimento da forma fechada.[53] Portanto, a IDE_o é conhecida como a forma ativa e a IDE_c a forma inativa.

1.5.2 Regulação por Pequenas Moléculas

O ciclo catalítico da IDE pode ser regulado por pequenas moléculas e através de mecanismos distintos, dentre eles o mecanismo de inibição competitiva e a ativação/inibição alostérica por pequenos substratos e/ou ATP. Alguns desses mecanismos não foram completamente clarificados e a sua elucidação é uma importante via para o desenvolvimento de drogas que regulem a atividade da IDE.

A literatura tem comumente relatado a inibição competitiva da IDE por pequenas moléculas.[54]–[57] Essas moléculas competem com o substrato pelo sítio ativo da IDE, por vezes ligando-se na enzima e bloqueando o acesso do substrato ao sítio catalítico. São moléculas desenvolvidas para ter grande afinidade com a IDE e interagir com o sítio ativo através de ligações eletrostáticas, van der Waals e até mesmo covalentes. Em contrapartida, existem moléculas capazes de ativar a IDE, mas apenas na quebra de substratos pequenos.[58], [59] Tais moléculas ligam-se ao sítio distal de uma das duas subunidades da IDE, promovendo a ativação alostérica da subunidade vizinha. Este mecanismo é coerente com o mecanismo de *ativação alostérica simétrica*, no qual a molécula ativadora interage com a subunidade A do dímero AB, produzindo mudanças estruturais que levam a ativação alostérica da subunidade B. Essas moléculas, entretanto, falham na degradação de substratos grandes, assim como o A β 42.

Recentemente, Cabrol e colaboradores descobriram pequenas moléculas capazes de ativar a degradação do A β 42 pela IDE.[58] Essas moléculas foram divididas em quatro classes de compostos: compostos que mimetizam o ATP, que ativam a IDE independentemente do ATP, que atuam sinergicamente com o ATP e compostos que quebram os efeitos induzidos pelo ATP. Dentre todos os compostos estudados, foram descobertas duas moléculas que agem sinergicamente com o ATP para a ativação da IDE na quebra de peptídeos pequenos. Não obstante, tais moléculas na presença de peptídeos pequenos também ativam a

degradação do A β 42 pela IDE em até 700%. Essas moléculas, chamadas de ativadores da IDE-1 e -2 (Ia1 e Ia2, **Figura 8**), são quimicamente compatíveis com o sítio catiônico, o que supostamente lhes dão a habilidade de ligar-se à IDE por um domínio comum ao do ATP. Essas moléculas sozinhas não exercem efeitos na hidrólise do A β 42, o que remete a seguinte pergunta: Qual é o verdadeiro papel das moléculas Ia1 e Ia2 no mecanismo de degradação do A β 42 pela IDE? Entender o mecanismo de ativação/inibição da IDE é desafiador e contribuirá para o desenvolvimento de novas terapias contra a DA.

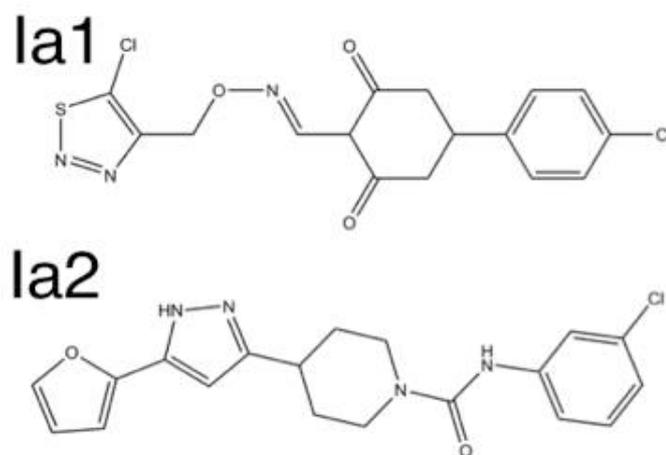


Figura 8: Moléculas ativadoras da IDE-1 e -2 (Ia1 e Ia2).

O ATP participa de vários processos chave para a manutenção da vida.[60] No contexto deste trabalho, o ATP desempenha funções ambíguas: *inibidor* endógeno da IDE na quebra de peptídeos grandes,[61] O ATP é *ativador* da IDE na quebra de peptídeos pequenos com menos de 13 resíduos.[62], [63] Essa estreita relação, que está aparentemente relacionada com o tamanho do substrato, é alvo de várias pesquisas. O ATP muda a estrutura quaternária da IDE de dímeros e tetrâmetros para monômeros, eliminando, assim, a conexão entre as subunidades e, conseqüentemente, a ativação alostérica (iniciada com a ligação do substrato no sítio distal). Posteriormente, o nucleotídeo liga-se no sítio catiônico, quebrando o suposto equilíbrio eletrostático que une as duas extremidades da enzima na conformação fechada, aumentando a fração de enzimas na forma abertas (ativas). Este mecanismo de ativação é consistente com a ideia de *ativação alostérica sequencial*, em que a molécula ativadora interage com a enzima, produzindo mudanças conformacionais que levam à ativação. No entanto, não existe um consenso sobre o mecanismo de inibição da IDE pelo ATP na quebra de substratos longos. Sabe-se, apenas, que a inibição depende das

interações IDE–ATP, ocorre com a redução da afinidade da IDE e através de efeitos alostéricos.

1.5.3 Mecanismo de Degradação do A β 42

O mecanismo de reação comumente aceito é baseado no mecanismo catalítico da metaloprotease de zinco carboxipeptidase A (CPA), investigado em 1988 por David Christianson[64] através de cristalografia de raios-X, mutagênese e espectrocinética. A reação começa, supostamente, após a formação do complexo de Michaelis–Menten, S(I) (**Figura 9**). No primeiro passo da reação (Passo-1), o oxigênio carbonílico do aminoácido catalítico GLU111 (O4) atua como base e abstrai o próton da molécula de água (H2) coordenada ao zinco. Ao mesmo tempo, o carbono da carbonila phe19 (C6) sofre ataque nucleofílico do oxigênio da hidroxila (O1) e, por intermédio do estado de transição TS(I–II), forma o intermediário gen-diol, S(II). Neste momento, o aminoácido GLU111 troca de função e atua como ácido doando o próton capturado na etapa anterior (H2) ao nitrogênio da phe20 (N7), enquanto que o hidrogênio H3 é abstraído pelo oxigênio do GLU111 (O5) (Passo-2). Através do estado de transição TS(II–III), a ligação N7–H3 é formada, resultando na quebra da ligação peptídica phe19–phe20 (C6–N7) e formação dos produtos da reação enzimática, S(III).

Recentemente, Bora e colaboradores[65] propuseram um mecanismo teórico para a hidrólise catalítica da IDE na quebra do A β usando os principais resíduos envolvidos na reação catalítica: o resíduos do sítio ativo, o aminoácido catalítico GLU111, a molécula de água reativa e o par de resíduos do substrato cuja ligação peptídica será quebrada. O mecanismo é consistente com uma reação em três passos: o primeiro passo é a ativação da molécula de água ligada ao zinco, o segundo é caracterizado pelo ataque nucleofílico do oxigênio O1 ao carbono C1 e o terceiro culmina na quebra da ligação peptídica, sendo o primeiro passo a etapa determinante da reação com energia de ativação entorno de 17 kcal·mol⁻¹. Em uma representação mais realística, Amata e colaboradores[66] estudaram o mecanismo de degradação da insulina pela IDE usando os resíduos da primeira e segunda esfera de coordenação do zinco. Nesse estudo, a etapa determinante da reação é o ataque nucleofílico do oxigênio O1 ao carbono C1 e acontece com energia de ativação

aproximadamente igual a $16 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Atualmente, não existem estudos teóricos do mecanismo de degradação do A β 42 pela IDE usando a representação completa da enzima e substrato ou na presença do ATP.

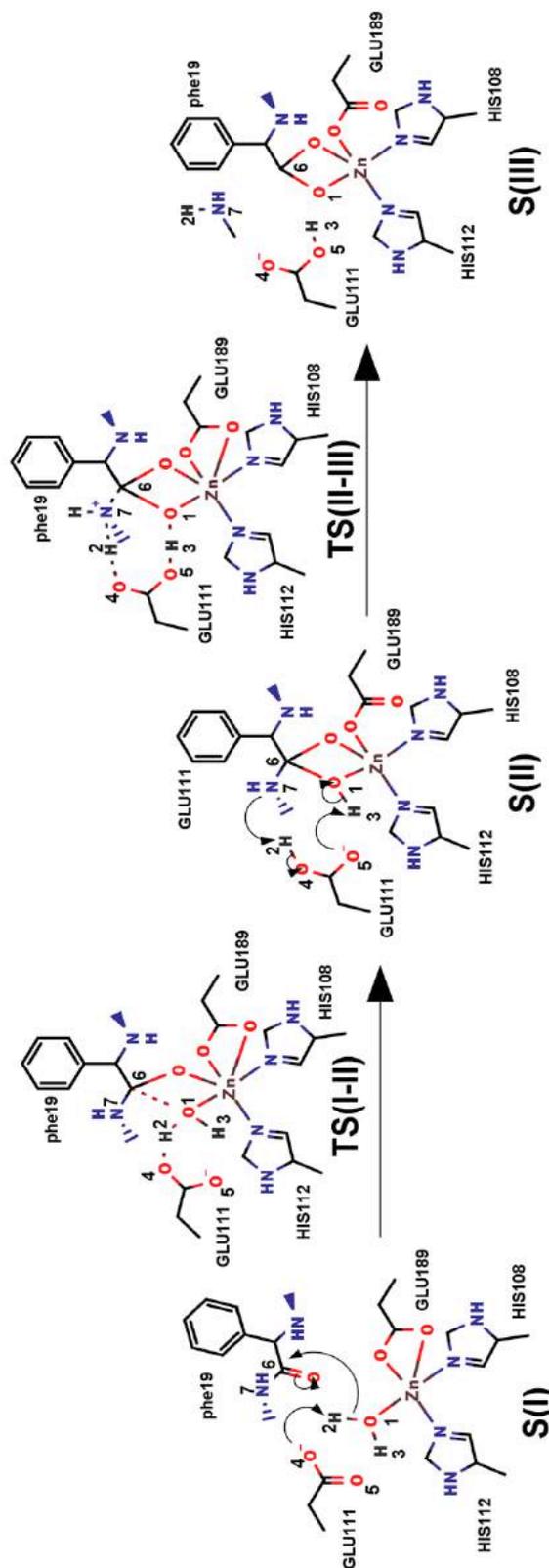


Figura 9: Mecanismo de reação baseado proposto baseado em dados experimentais

1.6 Hipóteses

O ATP desencadeia efeitos distintos na IDE que dependem aparentemente do tamanho do substrato. Com base nisto, levantamos as seguintes hipóteses:

1. Independente do tamanho, qualquer substrato irá se ligar na metade catalítica (IDE-N). No entanto, apenas substratos longos, como o A β 42, podem alcançar o sítio catiônico localizado na outra metade da enzima (IDE-C). Então, só os substratos longos serão capazes de interagir com o ATP, que está ligado ao sítio catiônico, e formar interações capazes de favorecer a conformação inativa (fechada), considerando, evidentemente, que o ATP e o amilóide coexistam dentro da metaloprotease.
2. O cloreto de sódio é capaz de ativar a IDE por um efeito similar ao do ATP. Nestas condições, a carga é o principal fator responsável pela ativação. Se a primeira hipótese é verdadeira, então é razoável supor que o efeito ativador da carga do ATP se opõe ao efeito inibidor da estrutura gerada pelas interações IDE–A β 42–ATP.
3. Do ponto de vista reacional, o ATP ligado ao sítio catiônico pode induzir mudanças conformacionais no substrato, levando-o à uma configuração proteoliticamente inadequada, inibindo a atividade enzimática e aumentando o tempo de vida das interações IDE–A β 42–ATP e, conseqüentemente, a proporção de enzimas inativas (fechadas), culminando numa aparente redução da afinidade da IDE pelo A β 42.

1.7 Estratégias

1. Primeiramente, supomos que o amilóide e o ATP possam coexistir dentro da IDE com o amilóide ancorado na IDE-N, e o ATP no sítio catiônico localizado na IDE-C.
2. Usar simulações de dinâmica molecular do sistema IDE complexado com A β 42 na presença do ATP para avaliar a estabilidade do complexo e as interações proteína–proteína e ATP–proteína. Do nosso ponto de vista, a existência de interações entre o ATP e o substrato é crucial para a elucidação do mecanismo de inibição. Logo, investigamos o impacto dessas interações no substrato e na enzima. Para isto, analisamos a ocorrência de ligações de hidrogênio entre o ATP–A β 42, ATP–IDE-C e A β 42–IDE-N, bem como o efeito da presença dos ânions na conformação do substrato e da enzima. Avaliamos o efeito da ausência do ATP e testamos o efeito da carga adicionando cloreto de sódio ao sistema IDE–A β 42 sem íons. Por fim, estimamos a energia de ligação ATP–A β 42 para termos ideia da magnitude dessa ligação e discutir o efeito dela no mecanismo de inibição proposto.
3. Estimar o perfil da reação de degradação do A β 42 pela IDE na ausência e presença do ATP para avaliar o efeito do nucleotídeo no perfil reacional. Para este fim, usamos a dinâmica molecular para gerar as estruturas, o método híbrido QM/MM para computar as energias, a técnica *umbrella sampling* para perturbar o sistema no sentido da reação e o programa *Weighted Histogram Analysis Method* (WHAM) de Alan Grossfield[67] para reconstruir as superfícies de energia potencial.

2. METODOLOGIA

As propriedades do sistema foram obtidas a partir de uma distribuição de estruturas geradas usando a teoria da mecânica clássica e os modelos moleculares baseado em campo de força e hamiltonianos híbridos. Com isso é possível analisar propriedades estruturais de sistemas grandes, tal qual o pensado na tese. Esse estudo foi auxiliado com o cálculo de energia de livre de ligação, que só foi possível usando a técnica de *umbrella sampling* e o método de análise do histograma ponderado (WHAM, *Weighted Histogram Analysis Method*). Em seguida, usamos a dinâmica molecular de modelos híbridos de mecânica quântica e mecânica molecular (QM/MM, *Quantum Mechanics / Molecular Mechanics*), e através da técnica de *umbrella sampling* e do método WHAM determinamos o mecanismo catalítico e o perfil energético da reação. Essas teorias, métodos e técnicas serão apresentadas de maneira sucinta nos próximos tópicos. Para mais detalhes, sugiro a leitura citada no corpo do texto e os livros *Essentials of computational chemistry: theories and models*, [68] *Introduction to Computational Chemistry* [69] e *Molecular Modelling: principles and applications*. [70]

2.1 Mecânica Estatística

Mesmo na temperatura do zero absoluto, os sistemas moleculares experimentam diferentes estruturas ao longo do tempo. Com isso, as propriedades moleculares dependem fortemente de uma distribuição de probabilidade de estruturas, as quais são completamente descritas conhecendo-se a posição e o momento de todas as partículas no espaço de fase. Dessa forma, N partículas de um sistema tridimensional podem ser determinadas por $6N$ coordenadas: $3N$ reservadas para a posição, $q=(x_1, y_1, z_1, \dots, x_N, y_N, z_N)$, e $3N$ para o momento, $p=(p_{x1}, p_{y1}, p_{z1}, \dots, p_{xN}, p_{yN}, p_{zN})$. Então, para um sistema com temperatura, pressão, volume e número de partículas constante, o valor médio da propriedade A no equilíbrio pode ser calculado através da seguinte expressão:

$$\langle A \rangle = \iint A(q, p) P(q, p) dp dq \quad \text{Equação 1}$$

Em que $\langle A \rangle$ é a média da propriedade A , $A(q,p)$ o valor esperado da propriedade A associada a uma estrutura no espaço de fase (microestado) e $P(q,p)$ a densidade de probabilidade desse microestado ocorrer. Em um estado termodinâmico, os microestados estão distribuídos segundo a equação

$$P(q, p) = Q^{-1} e^{-E(p,q)/k_B T} \quad \text{Equação 2}$$

Em que E é a energia total para o microestado (igual a energia cinética mais potencial), k_B é a constante de Boltzmann, T temperatura, e Q a função de partição

$$Q = \iint e^{-E(p,q)/k_B T} dqdp \quad \text{Equação 3}$$

Em química computacional, as propriedades são calculadas usando técnicas de amostragem molecular, dentre as quais destaco o método da dinâmica molecular. Nesse trabalho, usamos as funções de movimento da mecânica clássica para prever o movimento dos átomos no espaço de fase e um modelo atômico de campo de força que calcula a energia potencial usando uma representação simplória do átomo e de suas ligações. Os detalhes serão apresentados nos próximos tópicos.

2.2 Mecânica Clássica

A mecânica clássica foi desenvolvida no século XVII por Isaac Newton para descrever a dinâmica dos corpos. Segundo Newton, forças externas interagem com a partícula, produzindo uma força resultante que descreve o movimento da partícula: uma equação diferencial da velocidade em função do tempo, que também é expressa pelo produto da massa e aceleração.

$$\vec{F} = m \frac{d\vec{v}}{dt} = m\vec{a} \quad \text{Equação 4}$$

Em que \vec{F} é a força, m a massa, \vec{v} a velocidade, t o tempo e \vec{a} a aceleração da partícula, definida por:

$$\vec{a} = \frac{d^2\vec{r}}{dt^2} \quad \text{Equação 5}$$

Em que \vec{r} denota a posição da partícula.

Para um sistema conservativo, onde o trabalho é independente do caminho, $U \equiv \int_{r_i}^{r_f} F(\vec{r}) d\vec{r}$, a força é obtida a partir do negativo do gradiente de uma função escalar da posição, chamada de *potencial* ou *energia potencial*, U .

$$\vec{F} = -\frac{\partial U}{\partial \vec{r}} \quad \text{Equação 6}$$

Conhecendo-se a posição da partícula no tempo t , sua velocidade e a forma do potencial é possível prever sua posição e velocidade dentro de um intervalo de tempo $t + dt$. A trajetória tomada pela partícula pode ser determinada através de associações iterativas das equações de movimento de Newton.

2.3 Formas de Energia

A energia potencial depende do tipo de interação que a partícula experimenta: energia potencial gravitacional e elétrica são alguns exemplos. No campo das simulações moleculares, a energia potencial é derivada das forças que atuam sobre os átomos, que podem ser obtidas resolvendo as equações da mecânica quântica (QM, *Quantum Mechanics*). No entanto, são equações diferenciais difíceis de serem resolvidas porque dependem da interação simultânea de muitos corpos, o que limita o nível de precisão à algumas dezenas de átomos. Para sistemas maiores, como os estudados nesta tese, o uso de QM é proibitivo. Assim é necessário recorrer à uma forma aproximada de calcular a energia do sistema, como por exemplo a Mecânica Molecular (MM, *Molecular Mechanics*).

Segundo a MM, os átomos são descritos por esferas maciças de carga pontual ligadas umas as outras por “molas”. As interações entre os átomos são regidas por um campo de forças paramétrico descrito por potenciais de interação covalentes (ligação, ângulo e diedro) e não-covalentes (eletrostático e de Van der Waals).

$$U_{\text{total}} = U_{\text{ligação}} + U_{\text{ângulo}} + U_{\text{diedros}} + U_{\text{VDW}} + U_{\text{el}} \quad \text{Equação 7}$$

Em que U_{total} é a energia potencial total, $U_{\text{ligação}}$, $U_{\text{ângulo}}$ e U_{diedros} são os respectivos potenciais de ligação, ângulo e diedros, e U_{VDW} e U_{el} são os potenciais que descrevem as

interações de van der Waals e eletrostática, respectivamente. Algumas funções de energia incluem um termo de acoplamento entre os três primeiros termos da equação. Cada termo da Equação 7 é uma função paramétrica das coordenadas dos átomos, cujos parâmetros são normalmente obtidos a partir de dados experimentais e/ou teóricos de um conjunto de moléculas pré-estabelecido. Eles dependem da natureza e topologia do átomo, de modo que podem ser transferidos de um sistema para outro por similaridade, formando assim um grupo de átomos específicos de uma determinada classe de moléculas quimicamente semelhantes. Dessa forma, é possível calcular propriedades físicas de sistemas com milhares de átomos. Os modelos da mecânica molecular usam um nível de detalhe atomístico que permite avaliar apenas o movimento nuclear negligenciando os efeitos eletrônicos.

No entanto, ainda há casos em que a descrição eletrônica é fundamental, como por exemplo a quebra e formação das ligações químicas numa reação enzimática. Uma alternativa é dividir o sistema em duas regiões: uma região pequena, que é da competência da mecânica quântica, e outra composta por todos os átomos restantes, onde atuará o métodos da mecânica molecular. A combinação desses dois métodos é chamado de híbrido QM/MM.

Em nossa abordagem, buscamos entender o mecanismo de inibição da IDE pelo ATP na quebra do A β 42 do ponto de vista estrutural e reacional. Portanto, usamos a MM para avaliar os efeitos estruturais, tais como interação proteína-proteína e mudanças conformacionais, e o método QM/MM para determinar o perfil da reação enzimática. Os tópicos a seguir descreveram as funções empregadas nos métodos MM e QM/MM.

2.4 Hamiltoniano Clássico

A forma analítica dos potenciais de interação depende do tipo de campo de forças. Alguns exemplos são MM2[71], MM3[72], CHARMM[73], GROMOS[74] e AMBER.[75] O presente estudo foi realizado usando o campo de forças FF99SB contido no pacote de programas do AMBER 12.[76] Este campo de forças foi projetado para simular proteínas e ácidos nucleicos, e usa os seguintes potenciais de interação:

$$\begin{aligned}
 U_{\text{total}} = & \sum_{\text{ligações}} K_r (r - r_{\text{eq}})^2 + \sum_{\text{Ângulos}} K_\theta (\theta - \theta_{\text{eq}})^2 \\
 & + \sum_{\text{Diedros}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} + \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} - \frac{q_i q_j}{\epsilon_r R_{ij}} \right]
 \end{aligned}
 \tag{Equação 8}$$

Em que U_{total} é a função de energia potencial total em função da posição dos átomos. Os valores de r_{eq} , θ_{eq} e ϕ são os valores de referência de distância de ligação, ângulo e diedro, tipicamente obtidos dos dados de estrutura de raio-X, os valores de K_r , K_θ , γ , A_{ij} , B_{ij} , A_{ij} , q_i e q_j são parâmetros geométricos e eletrônicos empiricamente definidos no processo de parametrização e r , θ e ϕ os dados geométricos instantâneos da molécula gerados durante a simulação. Os três primeiros termos da equação acima definem, respectivamente, as ligações, ângulos e diedros, enquanto que os demais termos descrevem os potenciais de interação entre pares não ligados e de natureza eletrostática e de van der Waals.

2.5 Hamiltoniano Híbrido

No método QM/MM a molécula é dividida em duas regiões, uma QM e outra MM. A região QM deve conter os átomos que participam efetivamente dos eventos onde a descrição eletrônica é crucial, e a região MM deve ser aquela com maior número de átomos cujo efeito simula o ambiente molecular. Essa região é normalmente constituída por todos os átomos que não fazem parte da região QM. Basicamente, são três termos que definem a partição da energia QM/MM. O primeiro e o segundo termo definem as energias quântica e clássica e o terceiro a energia de acoplamento entre as duas regiões.

$$U_{\text{eff}} = U_{\text{QM}} + U_{\text{MM}} + U_{\text{QM/MM}}
 \tag{Equação 9}$$

Em que U_{eff} é a energia efetiva, U_{QM} é a energia da região quântica, U_{MM} é a energia da região clássica e $U_{\text{QM/MM}}$ é a energia de fronteira, que conecta a região QM a MM.

2.5.1 Partição de Energia QM

O *Self Consistent Charge Density Functional Tight Binding* (SCC-DFTB)[77] é um método QM baseado na teoria do funcional da densidade (DFT, *Density Functional*

Theory)[78] e na aproximação *Tight Binding* (TB)[79] por um esquema auto-consistente de aprimoramento da carga chamado de *Self Consistent Charge* (SCC). O SCC-DFTB tem sido aplicado com sucesso em várias reações enzimáticas.[80]–[83]

Na aproximação TB o funcional da densidade eletrônica é obtido a partir de uma expansão de segunda ordem com relação à flutuação de uma densidade de referência, ρ_0 . Dessa forma, o funcional da energia SCC-DFTB, $U^{\text{SCC-DFTB}}$, pode ser definido como

$$U^{\text{SCC-DFTB}} = \sum_i^{\text{occ}} \langle \psi_i | \hat{H}_0 | \psi_i \rangle + U_{\text{rep}} + \frac{1}{2} \sum_{\alpha\beta} \Delta q_\alpha \Delta q_\beta \gamma_{\alpha\beta} \quad \text{Equação 10}$$

Em que o primeiro e segundo termo correspondem aos níveis energia e ao potencial repulsivo de curto alcance obtidos da teoria DFTB,[79] e o terceiro termo descreve a flutuação da densidade de carga entre átomos vizinhos α e β (aproximação TB), Δq_α e Δq_β , as cargas atômicas são calculadas pela partição de Mulliken e modificadas iterativamente através do esquema SCC.

O funcional da densidade eletrônica é calculado com base na combinação linear dos orbitais atômicos (LCAO, *Linear Combination of Atomic Orbitals*), onde os orbitais são descritos por um conjunto de funções de base mínima do tipo Slater, $\psi_i = \sum_\mu c_{\mu i} \varphi_\mu$. Eles são usados para calcular os elementos da matrix Hamiltoniana (Equação 11).

$$H_{\mu\nu} = \begin{cases} \epsilon_\mu & , \text{ se } \varphi_\mu = \varphi_\nu; \\ \langle \varphi_\mu | H(\rho_\alpha + \rho_\beta) | \varphi_\nu \rangle & , \text{ se } \varphi_\mu \in \alpha \text{ e } \varphi_\nu \in \alpha; \\ 0 & , \text{ caso contrário} \end{cases} \quad \text{Equação 11}$$

Em que ϵ_μ é a energia do átomo μ e $\langle \varphi_\mu | H(\rho_\alpha + \rho_\beta) | \varphi_\nu \rangle$ é o termo usado para calcular a energia associada ao hamiltoniano de dois centros μ e ν , $H_{\mu\nu}$. Nessa abordagem, os termos de três centros são negligenciados. Os hamiltonianos e os elementos da matriz de sobreposição, $S_{\mu\nu}$, são parametrizados para uma variação das distâncias entre dois átomos, ambos descritos nas Equação 12 e Equação 13

$$H_{\mu\nu} = \langle \varphi_\mu | \hat{H}_0 | \varphi_\nu \rangle + \frac{1}{2} S_{\mu\nu} \sum_\xi^N (\gamma_{\alpha\xi} + \gamma_{\beta\xi}) \Delta q_\xi \quad \text{Equação 12}$$

e

$$S_{\mu\nu} = \langle \varphi_\mu | \varphi_\nu \rangle; \forall \mu \in \alpha, \nu \in \beta \quad \text{Equação 13}$$

Em que $\gamma_{\alpha\xi}$ e $\gamma_{\beta\xi}$ são funções analíticas que corrigem limites, quando a distância entre os átomos é muito grande. O SCC-DFTB foi implementado no programa Sander, parte do pacote de programas do Amber 12,[84] e parametrizado para atender, entre outros, os átomos normalmente utilizados em sistemas biológicos (C, H, O, N e S) e os relevantes nos processos bioquímicos (P, Zn, Mg e Na).[85] Além de ter a eficiência computacional comparável à dos métodos semiempíricos baseados no formalismo Hatree–Fock, como *Austin Model 1* (AM1)[86] e *Parameterized Model 3* (PM3),[87] o SCC-DFTB se sobressai à estes na predição de geometrias, frequências vibracionais, energias de interação e energias reacionais, que são por vezes comparáveis com os mais robustos métodos de química quântica, como por exemplo o método de perturbação de Møller-Plesset de Segunda Ordem (MP2).[88] Devido à essas vantagens, esse foi nosso método de escolha para os cálculos que requerem o tratamento quântico.

2.5.2 Energia de Acoplamento QM/MM

A energia de acoplamento QM/MM, também chamada de energia de fronteira, quantifica a energia das interações entre os átomos da região QM e MM.[68], [69] Os átomos MM interagem parametricamente com os átomos QM através de interações eletrônicas e de van der Waals.

$$H_{QM/MM} = - \sum_{iM} \frac{q_M}{r_{iM}} + \sum_{iM} \frac{Z_\alpha q_M}{R_{\alpha M}} + \sum_{\alpha M} \left\{ \frac{A_{\alpha M}}{R_{\alpha M}^{12}} - \frac{B_{\alpha M}}{R_{\alpha M}^6} \right\} \quad \text{Equação 14}$$

Em que os subscritos M, i e α correspondem aos átomos MM, elétrons e núcleos QM, respectivamente, q corresponde à carga da partícula, Z ao número atômico, r a distância elétron/carga, R a distância núcleo/carga e $A_{\alpha M}$ e $B_{\alpha M}$ são parâmetros de van der Waals. Os dois primeiros termos da direita são os termos eletrostáticos do acoplamento QM/MM para os elétrons e núcleos. O último termo descreve as interações de van der Waals. A inclusão desse termo admite que a região QM sofra influência das cargas pontuais da região MM durante o cálculo da energia QM. Isto permite que o ambiente molecular crie um campo

elétrico na região QM capaz de estabilizar estruturas críticas e guiar reações por caminhos antes não observados em fase gás ou condensada.

2.5.3 Link Atoms

A energia reacional é muito sensível à escolha da partição molecular dos fragmentos QM e MM. Em muitos casos, a separação entre essas duas regiões precisa ser feita ao longo de uma ligação covalente que conecta os dois fragmentos, resultando em um sistema QM com valências incompletas. Existem vários métodos que tratam a conexão entre os fragmentos QM e MM de forma a completar a valência na parte QM, tais como o LSCF[89] e o GHO.[90] Estes dois métodos usam orbitais híbridos paramétricos localizados próximos aos átomos QM de fronteira para mimetizar o efeito dos átomos vizinhos, de forma que nenhum átomo é adicionado ao sistema QM. No entanto a solução mais simples, e utilizada no AMBER, simplesmente completa a camada de valência dos átomos de fronteira com *Link Atoms* (LA), geralmente hidrogênios, posicionados ao longo da ligação a ser quebrada com a distância típica de ligações simples C-H.[91] Os LA são considerados nos cálculos QM, mas não participam nas interações com a região MM.

2.6 Dinâmica Molecular

O conjunto ordenado de estruturas que representa a propagação do sistema ao longo do tempo é chamado de trajetória e pode ser obtido resolvendo iterativamente as equações de movimento da mecânica clássica por algoritmos de integração (Verlet,[92] Velocity Verlet,[93] LeapFrog, Beeman, entre outros). Esse procedimento é baseado na determinação sistemática do valor numérico da posição e do momento (velocidade) instantâneo dos átomos a cada passo temporal, e compõe aquilo que chamamos de dinâmica molecular, podendo ser descritos resumidamente em três etapas. São elas:

1. **Determinação da posição inicial.** A posição inicial dos átomos da proteína é geralmente obtida a partir de um banco de dados de estruturas cristalográficas. Tomamos como exemplo o *Protein Data Bank* (PDB).
2. **Determinação das velocidades iniciais dos átomos.** As velocidades iniciais são atribuídas aleatoriamente a partir de uma distribuição de Maxwell-Boltzmann.[68]

$$f(v_x) = \left(\frac{m}{2\pi k_B T}\right)^{1/2} \exp\left(-\frac{mv_x^2}{2k_B T}\right) \quad \text{Equação 15}$$

As velocidades seguintes são determinadas por métodos de integração e estão relacionadas à temperatura no instante t , [68] que pode ser calculada a cada instante como:

$$T(t) = \frac{1}{k_B(3N - n)} \sum_{i=1}^N m_i |\vec{v}_i|^2 \quad \text{Equação 16}$$

Em que $T(t)$, k_B , $(3N - n)$ e \vec{v}_i são respectivamente a temperatura do sistema no tempo t , a constante de Boltzmann, o número de graus de liberdade do sistema e a velocidade do átomo i no tempo t .

- 3. Integração dos movimentos dos átomos.** O algoritmo de integração produz os movimentos dos átomos no tempo t e resolve as equações de movimento (Equação 4 à Equação 6). Dessa forma, a velocidade e força sobre os átomos são determinados e os átomos são deslocados, gerando um novo conjunto de posições e velocidades. Isso acontece sucessivamente em pequenos intervalos de tempo dt , até que o tempo de simulação estipulado seja alcançado.

2.6.1 Condições Periódicas de Contorno

Sistemas reais são normalmente estudados em fase condensada e são muito grandes para serem simulados computacionalmente. Geralmente, diminui-se o tamanho do sistema para uma quantidade razoável, representativa e computacionalmente viável. Com isso, alguns efeitos de superfície aparecem na interface entre a fase condensada e o vácuo. Esses efeitos são dominantes e interferem drasticamente no comportamento dos sistemas, e principalmente no cálculo de suas propriedades. O problema é reduzido criando imagens periódicas da caixa de simulação em todas as direções do espaço, de modo que os átomos da imagem copiem o movimento dos átomos da caixa original. [68], [69], [94] Com isso, o potencial de interação de pares não-covalentes é modificado para incluir a interação dos átomos da caixa original com os átomos das imagens.

2.6.2 Interações de Curto e Longo Alcance

O cálculo das interações entre pares de átomos não-covalentes em uma simulação de dinâmica molecular é computacionalmente mais caro do que o cálculo das interações entre átomos covalentes, uma vez que o número de termos covalentes cresce proporcionalmente com o número total de átomos do sistema (N), enquanto que o número de termos não-covalentes aumenta com o quadrado de N . Então, existe uma atenção especial em limitar o número de interações não-covalentes sem prejudicar a qualidade dos resultados.

As interações não-covalentes são divididas em potencial de Lennard-Jones e Eletrostático. O potencial de Lennard-Jones alcança, no máximo, os átomos das imagens vicinais (conversão mínima de imagens) e decai rapidamente a zero com o aumento da distância entre os dois átomos. Então, para minimizar o tempo computacional, calcula-se as interações entre os átomos que estão dentro de um raio de corte, normalmente ajustado para ser não mais que a metade do comprimento do menor lado da caixa de simulação. Com isso, o potencial é truncado e todas as interações com os átomos fora do raio de corte são zeradas. Já o potencial eletrostático alcança os átomos da série infinita de caixas periódicas (n_xL, n_yL, n_zL), bem como a interação entre os átomos das imagens. Neste caso, o potencial é modificado para incluir a interação entre esses átomos, adotando a seguinte forma:

$$U_{\text{ele}} = \frac{1}{2} \sum_{\mathbf{n}} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 |\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}|} \quad \text{Equação 17}$$

Em que \mathbf{n} é a posição (n_xL, n_yL, n_zL) da réplica na série de imagens periódicas, n_x, n_y e n_z são números inteiros e L o comprimento da caixa cúbica. É evidente que a série não inclui a interação quando $i = j$ e $\mathbf{n} = 0$, haja visto que a interação ocorre fora da caixa de simulação e entre pares de átomos.

A soma da Equação 17 possui termos positivos e negativos ao longo da série, constituindo uma série convergente condicionada que decai muito lentamente. Esse problema é resolvido usando o método da soma de Ewald. No método de Ewald, a carga pontual é circundada por uma distribuição gaussiana de cargas de sinal oposto para blindar o efeito das interações carga-carga. Esse efeito é eliminado adicionando uma nova distribuição de carga, agora na forma esférica, em cada carga pontual. A soma é transferida para o

espaço recíproco, onde converge com mais rapidez do que a soma das cargas pontuais no espaço real. Assim, a equação no espaço real adquire a forma

$$\begin{aligned}
 U_{\text{ele}} = & \frac{1}{2} \sum_{\mathbf{n}} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0} \frac{\text{erfc}(\alpha|\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}|)}{|\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}|} \\
 & + \frac{1}{2} \sum_{\mathbf{k} \neq 0} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{1}{\pi L^3} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0} \frac{e4\pi^2}{k^2} \exp\left(-\frac{k^2}{4\alpha^2}\right) \cos(\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}_{ij}) \\
 & - \frac{\alpha}{\sqrt{\pi}} \sum_{i=1}^N \frac{q_i^2}{4\pi\epsilon_0}
 \end{aligned} \quad \text{Equação 18}$$

Em que $\text{erfc}(x)$ é a função de distribuição de carga, \mathbf{k} são os vetores recíprocos e α está relacionado à largura de $\text{erfc}(x)$. O primeiro termo é a interação entre as cargas pontuais e a distribuição gaussiana de cargas de sinal oposto, o segundo termo é a interação entre as cargas pontuais e a distribuição esférica e o terceiro termo é o termo de auto interação. Na maneira como a função é escrita, o tempo computacional gasto é proporcional a N^2 . Entretanto, modifica-se a expressão para usar a Transformada de Fourier Rápida (FFT, *Fast Fourier Transform*), reduzindo o tempo computacional para $N^{3/2}$.

2.6.3 Simulação à Temperatura e Pressão Constante

O tipo de análise usado para delinear as propriedades físico-químicas do sistema depende de como o sistema é definido (*ensemble*). Em nossas simulações, utilizamos o *ensemble* NPT, onde são mantidos constante o número de partículas, a pressão e a temperatura. Com ele é possível calcular propriedades físico-químicas importantes em sistemas biológicos.

2.6.3.1 Controle da Temperatura

A temperatura do sistema pode ser calculada a partir da velocidade dos átomos e está relacionada à energia cinética total do sistema. As velocidades são computadas a partir das equações de movimento Newtoniano e escalonadas para manter a temperatura constante. Na prática, o ajuste das velocidades resulta em trajetórias não Newtonianas (i.e.,

não seguem a segunda lei de Newton).[68] Este problema é contornado usando um termostato, tal qual o acoplamento de Langevin.[95] Na dinâmica de Langevin uma força de fricção (banho térmico) é incluída nos átomos para eliminar os desvios significativos na velocidade durante o escalonamento.

$$m\vec{a}_i(t) = \vec{F}_i(t) + \gamma(t)\vec{v}_i(t) \quad \text{Equação 19}$$

Em que $\vec{a}_i(t)$, $\vec{F}_i(t)$, $\gamma_i(t)$ e $\vec{v}_i(t)$ são a aceleração, força derivada do potencial do sistema, coeficiente de amortecimento e velocidade atômica real do átomo i de massa m no tempo t .

2.6.3.2 Controle da Pressão

A pressão é uma variável termodinâmica que também é mantida constante em sistemas biológicos, e pode ser calculada assumindo a força aditiva de pares, como na Equação 20.

$$P(t) = \frac{1}{V(t)} \left[Nk_B T(t) + \frac{1}{3} \sum_i^N \sum_{j>i}^N \vec{F}_{ij} \vec{r}_{ij} \right], \quad \text{Equação 20}$$

Em que $P(t)$, $V(t)$ e $T(t)$ são a pressão, o volume e a temperatura do sistema no instante t , N é o número de partículas, k_B a constante de Boltzmann e \vec{F} e \vec{r} são a força e a distância entre os átomos i e j .

Similar ao acoplamento da temperatura, o acoplamento da pressão requer a adição de um termo extra, τ (em unidade de tempo), que afeta a mudança da pressão por meio da variação volume.[96] Para isso usa-se um fator escalar, μ , que mede a variação do comprimento da caixa de simulação, segundo a equação abaixo.

$$\mu = \left[1 - \frac{\Delta t}{\tau} (P - P_0) \right]^{1/3} \quad \text{Equação 21}$$

Em que Δt é o passo temporal, P a pressão instantânea e P_0 a pressão desejada.

2.6.4 Análises Estruturais

2.6.4.1 RMSD

A superfície de energia potencial (SEP) de uma proteína é muito rugosa, podendo assumir várias conformações devido ao seu grande número de graus de liberdade e da complexidade estrutural da proteína. Logo, a pouca variação na estrutura é um indicativo de estabilidade molecular, por muitas vezes associados aos valores de menor energia da SEP *para uma determinada região* (mínimo local). Isso é feito acompanhando a variação do desvio quadrático médio (RMSD, *Root Mean Square Deviation*) dos átomos do *backbone* (C, C α N e O) da proteína com relação à uma estrutura de referência, comumente a primeira estrutura da dinâmica (Equação 22).

$$\text{RMSD}_i = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\xi_{i,j} - \xi_{i,0})^2}{N}} \quad \text{Equação 22}$$

Em que N é o número de átomos da macromolécula, $\xi_{i,j}$ é a posição do átomo i na j-ésima estrutura da trajetória e $\xi_{i,0}$ é a posição do átomo i na estrutura de referência, que neste caso é a primeira estrutura da dinâmica. Na prática, o RMSD mede a diferença geométrica

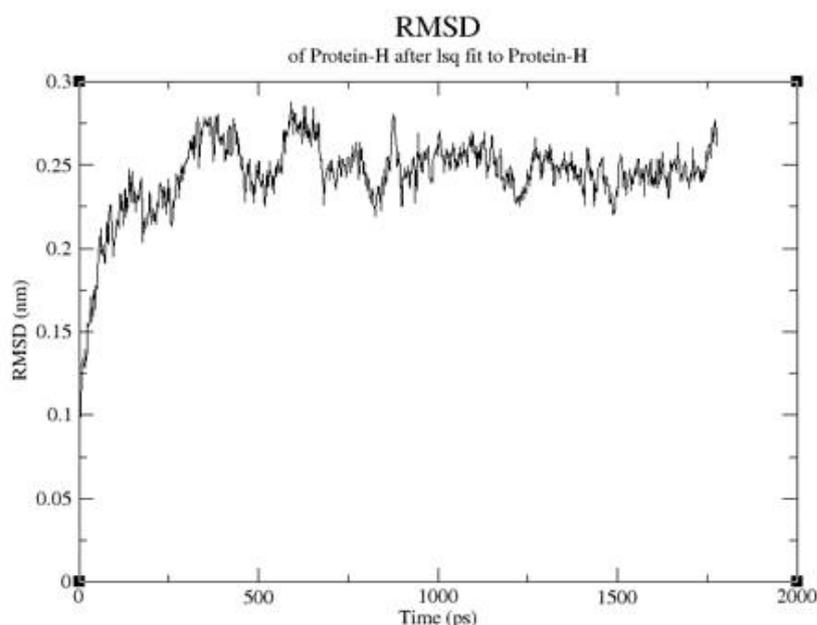


Figura 10: Exemplo que ilustra a evolução do RMSD de uma proteína em função do tempo.[97]

de uma ou mais estruturas com relação a uma estrutura de referência. Considera-se uma proteína equilibrada quando a variação do RMSD é pequena e converge para um valor específico. No exemplo mostrado na **Figura 10**, a proteína está equilibrada após 500 ps, quando o RMSD atinge um valor médio de aproximadamente 0,25 nm.

2.6.4.2 RMSF

Em bioinformática, a flutuação quadrática média (RMSF, *Root Mean Square Fluctuation*) oferece uma medida da flexibilidade da proteína. Para isso são normalmente usados os átomos do *backbone* (C, C α N e O).

$$\text{RMSF}_i = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \sqrt{(\xi_i(j) - \tilde{\xi}_i)^2} \quad \text{Equação 23}$$

Em que N é o número de estruturas da trajetória, $\xi_i(j)$ é a coordenada cartesiana do átomo i na posição j da trajetória, e $\tilde{\xi}_i$ é a média estrutural dos átomos na simulação.

2.6.4.3 Estrutura Secundária

O conhecimento tridimensional da proteína é importante porque está estreitamente relacionado com a sua função. No entanto, é falho avaliar a estrutura de uma proteína com base na sua geometria estática. As proteínas são moléculas dinâmicas cuja função depende de interações com outras moléculas. Estas interações promovem mudanças, por vezes sutis, na dinâmica da proteína, podendo resultar em mudanças significativas na sua conformação e função.

Em bioinformática, a estrutura secundária de uma proteína pode ser avaliada usando o Método de Identificação Estrutural (STRIDE, *Structural Identification Method*).[98] Este método usa funções empíricas (por exemplo, energia da ligação de hidrogênio) e os ângulos de torções do *backbone* para identificar a estrutura secundária da proteína. Os padrões são então comparados e reconhecidos usando um banco de dados de estruturas secundárias de proteínas (DSSP, *Dictionary of Secondary Structure of Proteins*).[99] Na simulação, este procedimento é feito repetidamente para cada estrutura da trajetória.

2.7 Encaixe Molecular

Descreverei nessa sessão a técnica usada em um dos mais populares programas de encaixe molecular, o AutoDock[100], [101]. Lembrando que as funções e os algoritmos apresentados aqui podem ser diferentes das usadas por outros programas.[102], [103]

O encaixe molecular, como o próprio nome sugere, é uma técnica que consiste no alinhamento e encaixe de uma dada molécula em um sítio específico da proteína ou receptor, comumente chamado de sítio funcional. Para tal cria-se uma malha de pontos em torno deste sítio (**Figura 11**). Em cada ponto da malha é colocada uma sonda de prova. Essas sondas interagem com os átomos da proteína via potenciais de interações empíricos (que incluem termos de dispersão/repulsão, ligação de hidrogênio, eletrostático e dessolvatação) para gerar os mapas de afinidade. Sua função é guiar a ligação do ligante dentro do sítio da

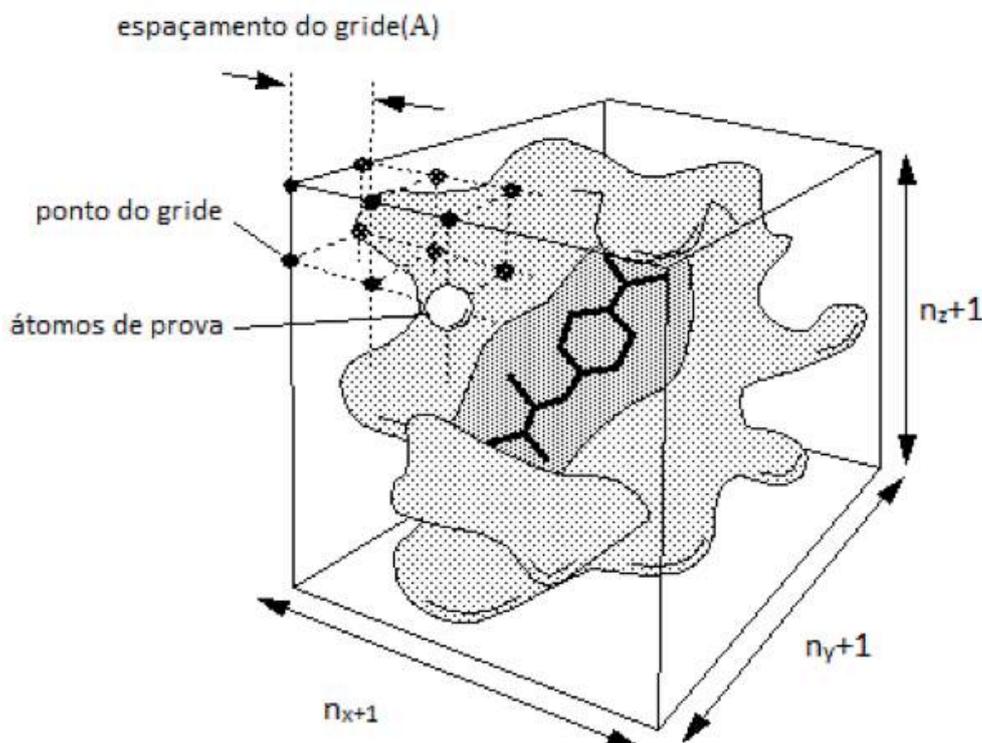


Figura 11: Esquema ilustrativo da malha de pontos criada durante processo de encaixe molecular. A molécula é encaixada dentro dos limites da caixa, onde está localizado o sítio funcional [Figura modificada da referência 72].

proteína.

O encaixe é feito segundo vários níveis de precisão, podendo abranger inúmeras técnicas. A técnica mais simples considera a proteína e o ligante como dois corpos rígidos. As outras técnicas, essas mais precisas, consideram partes da proteína e/ou do ligante flexíveis. Nestas é permitida a torção de determinadas ligações da proteína e do ligante além, obviamente, dos movimentos de rotação e translação. Os movimentos internos do ligante e do receptor (os de torção) são geralmente governados por um campo de forças que pode estar sujeito a algum tipo de restrição estrutural. Mesmo para um ligante relativamente pequeno, existe uma grande variedade de configurações que ele pode adotar quando ligado a uma proteína. Portanto, recorre-se a algoritmos de busca conformacional e técnicas de previsão da energia livre de ligação (ELL). Os cálculos de energia livre são computacionalmente dispendiosos, de modo que se faz necessário apelar para funções empíricas chamadas de *scoring functions*. [104] Elas são capazes de capturar com rapidez os efeitos entrópicos e do solvente, e são calculadas em dois passos. No primeiro passo são avaliadas as energias intramoleculares do ligante e da proteína individualmente, e no segundo passo são calculadas as energias intermoleculares da combinação do ligante e da proteína no seu estado ligado e não-ligado.

As *scoring functions* usadas no AutoDock incluem seis pares de interações (V), mais um termo que representa a entropia conformacional perdida após ligação (ΔS_{conf}): [100]

$$\Delta G = (U_{\text{ligado}}^{\text{L-L}} - U_{\text{não-ligado}}^{\text{L-L}}) + (U_{\text{ligado}}^{\text{P-P}} - U_{\text{não-ligado}}^{\text{P-P}}) + (U_{\text{ligado}}^{\text{P-L}} - U_{\text{não-ligado}}^{\text{P-L}} + T\Delta S_{\text{Conf}})$$

Equação 24

Em que L corresponde ao ligante e P à proteína. Cada termo de energia da equação acima é avaliado em termos da dispersão/repulsão, das ligações de hidrogênio, da energia eletrostática e dessolvatação:

$$U = W_{\text{vdw}} \sum_{ij} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{\text{LH}} \sum_{ij} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + W_{\text{elet}} \sum_{ij} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} + W_{\text{sol}} \sum_{ij} (S_i V_j + S_j V_i) e^{(-r_{ij}^2/2\sigma^2)}$$

Equação 25

Em que W_{vdw} , W_{LH} , W_{elet} e W_{sol} são pesos usados para calibrar a energia livre baseada em um conjunto de constantes de ligação experimental, as constantes A_{ij} , B_{ij} , C_{ij} e D_{ij} são baseadas

em dados experimentais. O primeiro termo é um potencial típico de interação de dispersão/repulsão 6-12 baseado no campo de força AMBER. O segundo termo é um potencial que descreve a ligação de hidrogênio, e é baseado no potencial 10-12. Nesta equação, a função $E(t)$ determina direção da ligação de hidrogênio (LH) baseada no melhor ângulo t , e os parâmetros C e D são calibrados para terem no máximo $5,0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $1,9 \text{ \AA}$ para LH's entre oxigênio e nitrogênio e $1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $2,5 \text{ \AA}$ para LH's com enxofre. O terceiro termo é o potencial eletrostático de Coulomb. O termo final é o potencial de dessolvatação baseado no volume dos átomos vicinais que protegem o ligante do solvente, com o expoente σ do parâmetro de solvatação (S) igual a $3,5 \text{ \AA}$.

2.8 Previsão de Sítios de Ligação

Por décadas, o estudo da catálise e do reconhecimento molecular foram baseados nas estruturas previstas por resultados cristalográficos e de RMN.[105], [106] São estas, portanto, técnicas cruciais para o desenho racional de moléculas (fármacos) com alguma atividade biológica, algo que só é possível através do conhecimento e aperfeiçoamento das interações entre o ligante e o alvo. No entanto, nem sempre é possível determinar o sítio de ligação de uma proteína por cristalografia. Há também casos em que a geometria do ligante é desconhecida, dificultando a racionalização e construção de moléculas para determinados fins. Daí surge à necessidade de conhecer os sítios funcionais.

Existem várias abordagens com esta finalidade, podendo ser divididas em três categorias: comparação genômica,[107], [108] forma do ligante correspondente,[109]–[111] e busca por sítios de ligação ou *Pocket Search* (PS).[112] A técnica de comparação genômica consiste em prever o sítio de ligação através de comparações dos resíduos homólogos do sítio de ligação com os resíduos do sítio funcional de um conjunto de proteínas da mesma família. Por outro lado, os métodos baseados na forma do ligante constroem a estrutura molecular baseados em parâmetros geométricos e químicos. Os métodos de PS talvez sejam os mais simples, consistindo apenas na análise da topologia da superfície da proteína. Assim, PS é uma ferramenta rápida e de baixo custo computacional, que pode ser encontrada em diversos programas de bioinformática, incluindo o programa Chimera.[113] A versão mais simples deste método consiste em determinar a superfície da proteína rolando uma esfera

de diâmetro compatível com o da molécula de água. Em seguida, as esferas de prova são agrupadas no interior das cavidades. Por fim, o volume de cada cavidade é calculado usando o número e o volume das esferas de prova. O método é empírico e nos dá apenas uma noção de uma possível posição do sítio de ligação. Um método mais preciso, desenvolvido recentemente, é o utilizado pelo programa Autoligand.[114]

2.9 Autoligand

O *AutoLigand* é um programa do pacote de programas do *AutoDock Tools* (ADT) destinado à identificação de sítios funcionais sem conhecimento prévio da estrutura do ligante.[114] O programa usa a representação atômica do ligante (átomos do tipo carbono, hidrogênio, oxigênio e enxofre) e os mapas de afinidades da proteína para gerar uma imagem contínua do ligante na superfície da proteína chamada de *envoltório* (**Figura 12**). Primeiramente, calcula-se os mapas de afinidades em torno da proteína, e, em seguida, começa o processo de preenchimento e otimização do sítio de ligação, dos quais serão

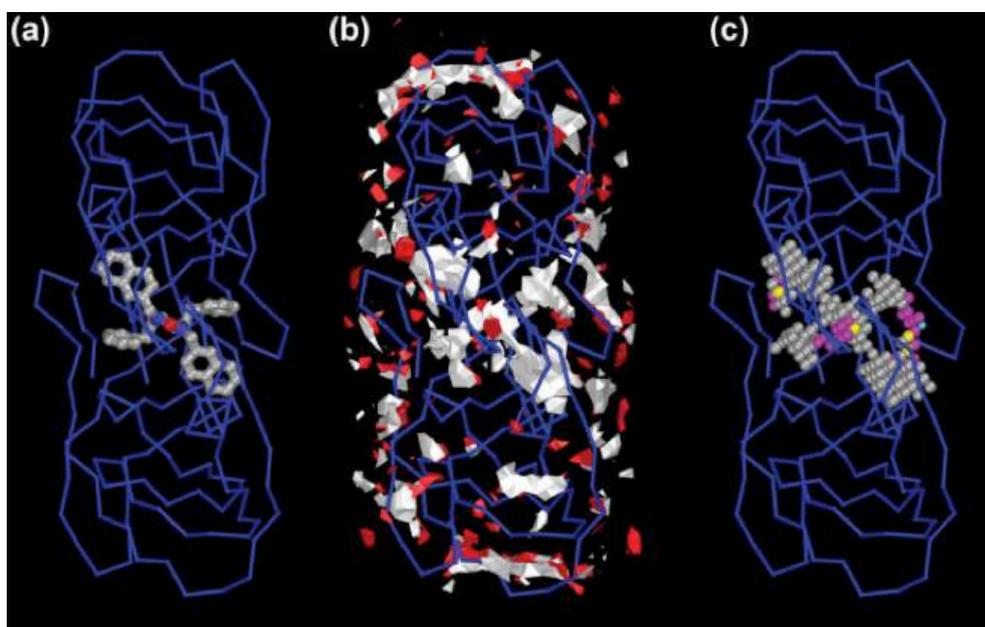


Figura 12: A figura mostra a previsão do sítio de ligação do inibidor na protease HIV-I (código do PDB: 1HPS). O *backbone* da proteína é mostrado em tubo azul, o inibidor é mostrado em bolas-e-tubos, com os carbonos, nitrogênios e oxigênios colorido de cinza, azul e vermelho, respectivamente. A figura em (a) mostra o local de ligação do inibidor na proteína, em (b) é mostrado os mapas de afinidade e em (c) os envoltórios que definem o local de ligação do inibidor.[114]

identificados apenas os envoltórios de menor ELL (maior afinidade) que englobam um determinado número de átomos.

Os potenciais de afinidade são calculados através de um procedimento similar visto na sessão *Encaixe Molecular*. Nestes casos, os potenciais de interação são criados para seis tipos de átomos; carbono alifático, carbono aromático, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre, usando uma malha com espaçamento igual a 1,0 Å e fator de amortecimento igual a 0,5 Å. Por fim, os tipos de átomos usados são colocados um a um e lado a lado nas regiões de maior afinidade com a proteína até que acabe o número de átomos designado pelo usuário.

2.10 Cálculo da Energia Livre

Mudanças de estado podem ser avaliadas através da análise do perfil de energia livre. Para estes fins, foram elaboradas técnicas que estimam o potencial de força média (PMF) $\mathcal{W}(\xi)$ ao longo da coordenada de reação ξ ,

$$\mathcal{W}(\xi) = \mathcal{W}(\xi^*) - k_B T \ln \left[\frac{\langle \rho(\xi) \rangle}{\langle \rho(\xi^*) \rangle} \right] \quad \text{Equação 26}$$

Em que ξ^* e $\mathcal{W}(\xi^*)$ são constantes arbitrárias e $\langle \rho(\xi) \rangle$ a função de distribuição média ao longo da coordenada ξ , obtida da média ponderada de Boltzmann.

$$\langle \rho(\xi) \rangle = \frac{\int dR \delta(\xi'[R] - \xi) e^{-U(R)/k_B T}}{\int dR e^{-U(R)/k_B T}} \quad \text{Equação 27}$$

Em que $U(R)$ representa a energia total do sistema em função das coordenadas R e $\xi'[R]$ ($\xi'[R]$ pode ser uma distância, ângulo, diedro, ou uma ou mais funções do sistema de coordenadas cartesianas). Dentre as técnicas mais populares para estimar o PMF de reações enzimáticas, a usada nessa tese é a *Umbrella Sampling* (US).[115]–[119]

2.10.1 Umbrella Sampling

A técnica consiste em dividir a coordenada de reação ξ em n partes, comumente chamadas de janelas (**Figura 13**). Cada janela da umbrella é uma simulação restrita por um

potencial artificial $w(\xi)$ chamado de potencial de restrição. Este potencial tem a forma de um potencial harmônico $w(\xi) = \frac{1}{2} \kappa (\xi - \xi_c)^2$ e sua função é manter as simulações no centro da janela ξ_c , ajudando a obter uma amostragem mais eficiente nestas regiões, algo que não aconteceria habitualmente no tempo de simulação disponível. Com isso, as simulações restritas passam a ser geradas usando o potencial de energia $U(R) + w(\xi)$. No final da dinâmica, combina-se o resultado das várias janelas e elimina-se o potencial de restrição para estimar os valores de $\mathcal{W}(\xi)$. [115]–[119]

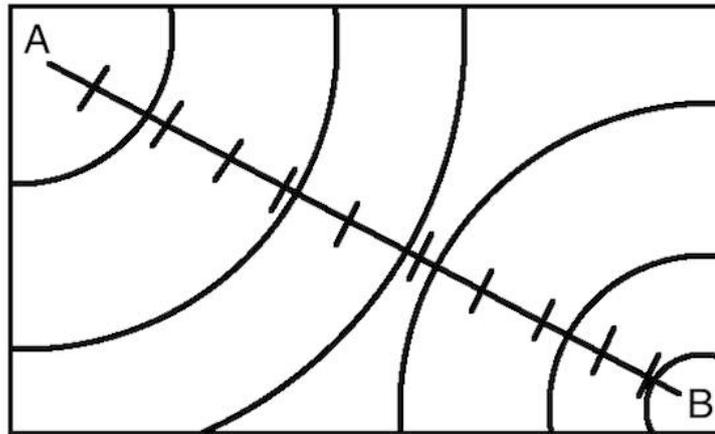


Figura 13 A ilustração mostra a superfície de energia livre da transição do estado A para o estado B em curvas de níveis. O perfil de energia ao longo do caminho AB (coordenada de reação) pode ser calculada usando *umbrella sampling*. As janelas da *umbrella* são representadas na coordenada de reação.

A função de distribuição restrita $\langle \rho(\xi) \rangle_{(i)}$ é obtida a partir de um conjunto de i simulações irrestritas $\langle \rho(\xi) \rangle$, e tem a forma:

$$\langle \rho(\xi) \rangle_{(i)} = \frac{e^{-w_i(\xi)/k_B T}}{\langle e^{-w_i(\xi)/k_B T} \rangle} \langle \rho(\xi) \rangle \quad \text{Equação 28}$$

Sendo assim, o PMF irrestrito da i -ésima janela é

$$\mathcal{W}(\xi) = \mathcal{W}(\xi^*) - k_B T \ln \left[\frac{\langle \rho(\xi) \rangle_{(i)}}{\langle \rho(\xi^*) \rangle} \right] - w_i(\xi) + F_i \quad \text{Equação 29}$$

Em que a constante indeterminada F_i é definida a partir de

$$e^{-F_i/k_B T} = \langle e^{-w_i(\xi)/k_B T} \rangle \quad \text{Equação 30}$$

A função representa a energia associada ao incorporar o potencial de restrição. Este último passo é comumente executado usando o método de análise do histograma ponderado (WHAM, *Weight Histogram Analysis Method*).[120]

O PMF é sensível às condições da DM, ao passo que a constante de restrição e o tamanho das janelas devem ser ajustados para produzir um histograma contínuo de uma amostragem de estruturas energeticamente descorrelacionadas. Os deslocamentos ξ devem ser distribuídos em torno do centro de cada janela, de modo que seja permitida apenas a ocorrência de pequenas sobreposições entre as janelas adjacentes.

2.10.2 WHAM

Para n simulações restritas de uma US, o método WHAM (*Weighted Histogram Analysis Method*) combina as n funções de variações de ξ das simulações irrestritas $[\langle \rho(\xi) \rangle]_{(i)}^{\text{irr}}$ para obter a probabilidade de distribuição total $\langle \rho(\xi) \rangle$.

$$[\langle \rho(\xi) \rangle]_{(i)}^{\text{irr}} = e^{w_i(\xi)/k_B T} \langle \rho(\xi) \rangle_{(i)} e^{-F_i/k_B T} \quad \text{Equação 31}$$

Assim, $\langle \rho(\xi) \rangle$ é uma combinação linear de n -distribuições dependentes de probabilidade irrestritas:

$$\langle \rho(\xi) \rangle = \sum_{i=1}^n [\langle \rho(\xi) \rangle]_{(i)}^{\text{irr}} \times \left[\frac{\eta_i e^{-[w_i(\xi)-F_i]/k_B T}}{\sum_{j=1}^n \eta_j e^{-[w_j(\xi)-F_j]/k_B T}} \right] \quad \text{Equação 32}$$

Substituindo a Equação 32 na Equação 28, temos a densidade de probabilidade total:

$$\langle \rho(\xi) \rangle = \sum_{i=1}^n \eta_i \langle \rho(\xi) \rangle_{(i)} \times \left[\frac{1}{\sum_{j=1}^n \eta_j e^{-[w_j(\xi)-F_j]/k_B T}} \right] \quad \text{Equação 33}$$

A energia livre da transição é a soma do produto da densidade de probabilidade e da função de energia associada ao deslocamento:

$$e^{-F_i/k_B T} = \int e^{-w_i(\xi)/k_B T} \langle \rho(\xi) \rangle d\xi \quad \text{Equação 34}$$

As constantes de energia livre F_j são calculadas iterativamente até a convergência do processo.

2.11 Constante de Velocidade

As reações são tipicamente calculadas usando a teoria do estado de transição (TST, *Transition State Theory*), também conhecida como teoria do complexo ativado ou teoria da constante de reação absoluta.[121]–[123] A TST é baseada em três princípios básicos:

1. A reação de um estado inicial para um estado final caminha ao longo da superfície de energia potencial e atravessa um estado de maior energia localizado na coordenada de reação entre os reagentes e produtos, comumente chamado de estado de transição ou complexo ativado;
2. As espécies químicas do estado de transição estão em equilíbrio com o estado reagente;
3. A constante de reação é igual ao produto da concentração das espécies do estado de transição (formado a partir do estado reagente) e da frequência com que essas espécies passam para o estado produto.

Portanto, se numa reação enzimática as espécies químicas entre o reagente e o estado de transição caminham sobre uma superfície de energia potencial modelada por métodos híbridos e dirigida por potenciais de força que satisfazem a TST, então a constante de velocidade pode ser expressa por uma forma alternativa da equação de Arrhenius dependente da temperatura, T .

$$k(T) = \gamma(T) \frac{k_B T}{h} e^{(-\Delta G^\ddagger(T)/RT)} \quad \text{Equação 35}$$

Em que $k(T)$ é a constante de velocidade obtida da teoria do estado de transição, $\gamma(T)$ o coeficiente de transmissão, h a constante de Planck e ΔG^\ddagger a energia livre de ativação de Gibbs, definida por

$$\Delta G^\ddagger = W(T, z^\ddagger) - [W(T, z_R) + G^R(z)] + C(T, z) \quad \text{Equação 36}$$

Em que z_R e z^\ddagger são os valores da coordenada de reação no estado reagente e no estado de transição, $G^R(z)$ a energia livre do reagente ao longo da coordenada de reação z , $C(T, z)$ um termo de correção da coordenada de reação não retilínea e $W(T, z)$ o PMF obtido através da equação

$$W(T, z) = -RT \ln[\rho(T, z)] + W^0 \quad \text{Equação 37}$$

Em que $\rho(T, z)$ é função de densidade de probabilidade de z , que pode ser obtida de uma técnica de perturbação de energia livre, como, por exemplo, a *Umbrella Sampling*, e W^0 é o a constante de integração.

Nessa tese, discutiremos a cinética da reação em termos da constante de velocidade relativa, obtida a partir da divisão da constante de velocidade da reação sem ATP com e com ATP, expressa por

$$k_R = e^{\frac{\Delta G_{\text{cATP}}^\ddagger - \Delta G_{\text{sATP}}^\ddagger}{k_B T}} \quad \text{Equação 38}$$

Em que $\Delta G_{\text{cATP}}^\ddagger$ e $\Delta G_{\text{sATP}}^\ddagger$ são as energias livre de ativação da reação com e sem ATP, respectivamente. Dessa forma, o fator pré-exponencial A é eliminado, simplificando a análise dos resultados.

3. PROCEDIMENTO COMPUTACIONAL

3.1 Simulação de Dinâmica Molecular Revela o Mecanismo de Inibição da IDE pelo ATP na Quebra do A β 42

Na tentativa de elucidar o mecanismo de inibição da IDE pelo ATP na clivagem do amilóide- β 42, criamos três sistemas: IDE-A β 42 (sem íons), IDE-A β 42 na presença do ATP (IDE-A β 42+ATP) e na presença de NaCl (IDE-A β 42+NaCl). A estrutura inicial de cada sistema foi construída a partir da estrutura cristalográfica da IDE monomérica complexada com o A β 42 (código no PDB: 2WK3). Nesta estrutura, todas as cisteínas e o GLU111 foram modificados durante o processo de purificação e cristalização para manter a enzima na forma inativa (ver **Tabela 1**). Como resultado, uma molécula de água importante para o mecanismo catalítico, que estaria ligada ao GLU111 e ao zinco, também não aparece na estrutura cristalográfica. Devido a grande mobilidade do A β 42 dentro da câmara catalítica, apenas dois pequenos fragmentos foram detectados na difração de raios-X, os fragmentos 1-3 e 16-22. O mesmo problema ocorre na detecção de um alça flexível entre os resíduos SER965 e ASN979 da IDE. Portanto, para restaurar a sua forma ativa, foi necessário (i) desfazer as mutações das cisteínas e GLU111, (ii) reconstruir o A β 42 e a alça 965-979, (iii) ajustar e alinhar o amilóide dentro da câmara catalítica com os fragmentos cristalográficos fixos na posição experimental. Os passos (i) e (ii) foram executados usando o programa DeepView[124] (SwissPDB), (iii) foi realizado com o programa LEaP,[91] parte do pacote de programas AmberTools12, e o último passo (iv) usando a interface do AutoDock Tools e os programas AutoGrid4.2 e AutoDock4.2.[125] Neste último foi permitido rotacionar as ligações não-peptídicas dos átomos do *backbone* do A β 42, totalizando 60 rotâmeros. É importante salientar que o programa AutoDock foi estruturado para fazer encaixes de pequenas moléculas, sendo assim o programa executa encaixes flexíveis com até 32 rotâmeros. O A β 42, por sua vez, é um polipeptídeo de 42 resíduos que possui, pelo menos, 200 rotâmetros, sendo 67 essenciais, dos quais 60 foram utilizados, 28 rotâmetros a mais do que permitido. Este problema foi contornado modificando os parâmetros que definem o número máximo de torções. Foram utilizados no encaixe uma malha de pontos centrada em 20,975, 2,171 e 20,14 Å, com dimensões iguais a 27,75, 43,50 e 37,50 Å e espaçamento igual

a 0,357 Å. Cinquenta populações cada com 2.500.000 ajustes foram calculadas usando o algoritmo genético Lamarckiano de busca conformacional. Por fim, o estado de protonação dos resíduos foram determinados com o MolProbity.[126]

Construímos o modelo molecular do sistema IDE–Aβ42+ATP a partir das coordenadas da IDE–Aβ42 sem íons (ver **Figura 14**). O ATP foi encaixado na IDE entre os resíduos que compõem o sítio de ligação (SER901, LYS898, LYS899 e ARG429).[127] Nestes cálculos foi

Tabela 1: Mutações introduzidas no complexo IDE+Aβ42 durante o processo de purificação e cristalização.

Número do Resíduo	Resíduo Nativo	Resíduo Mutante
110	LEU	CYS
111	GLU	GLN
171	SER	CYS
178	ALA	CYS
257	VAL	CYS
414	LEU	CYS
573	ASN	CYS
590	SER	CYS
789	SER	CYS
812	ALA	CYS
819	ALA	CYS
904	SER	CYS
966	ASN	CYS
974	ALA	CYS

permitido rotacionar algumas ligações dos aminoácidos do sítio catiônico e do ATP. Para tal, foram utilizados um malha de pontos centrada em -15,054, 8,689 e -24,777 Å, com dimensões iguais a 15,000, 15,000 e 15,000 Å e espaçamento igual a 0,357 Å. Assim como no encaixe do Aβ42, cinquenta populações cada com 2.500.000 ajustes foram calculadas

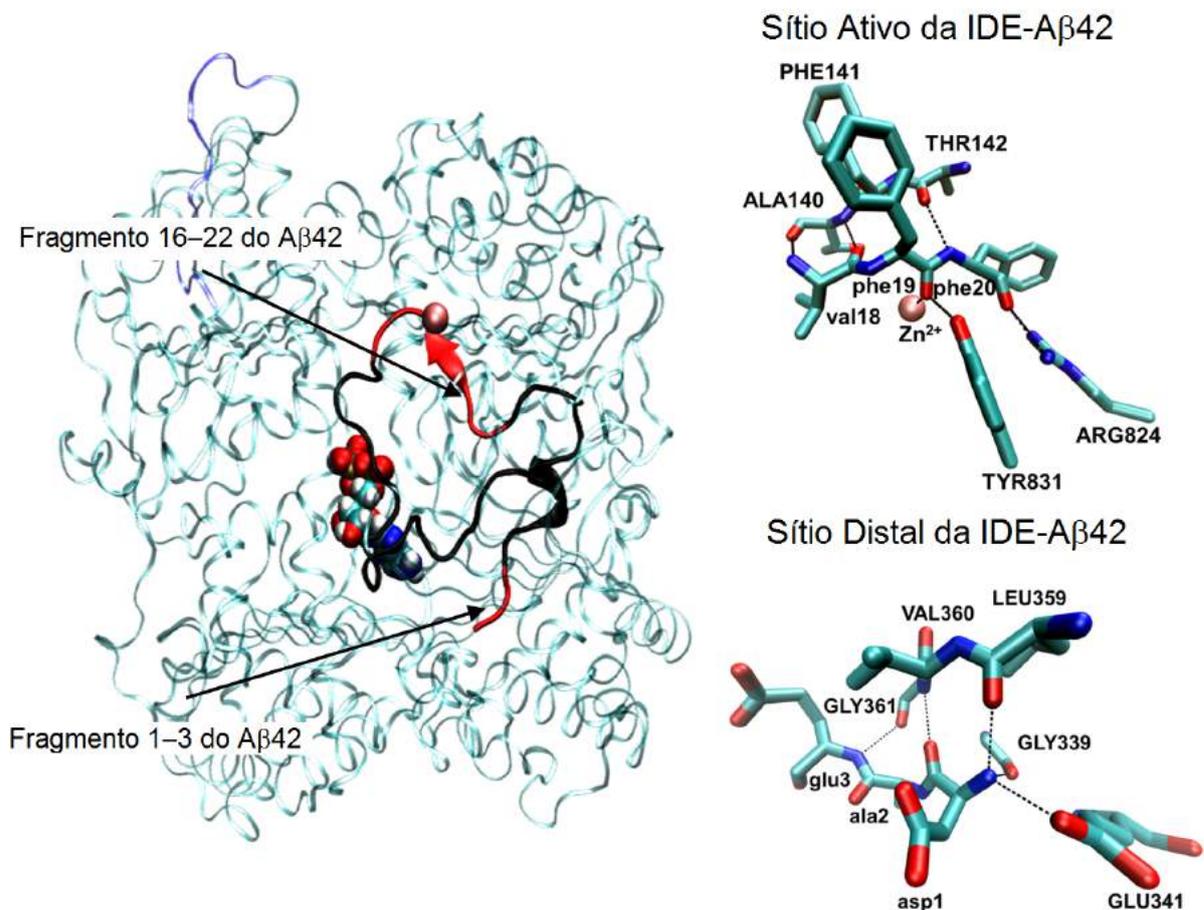


Figura 14: Estrutura inicial da simulação IDE-Aβ42 mais ATP após o tratamento do arquivo PDB descrito no texto. As moléculas de água são ocultadas para facilitar a visualização. O fragmento do amilóide em preto não é detectável no raio-X, e foi construído a partir da posição experimental dos fragmentos 1-3 e 16-22 (em vermelho). O fragmento reconstruído 966-978 é mostrado e azul.

usando o algoritmo genético Lamarckiano de busca conformacional. O encaixe do Aβ42 e do ATP foram combinados para montar o sistema IDE-Aβ42+ATP.

O modelo molecular da IDE-Aβ42+NaCl (em solução salina de cloreto de sódio) foi construído a partir das coordenadas do sistema IDE-Aβ42 sem íons. Cinco unidades extras de Na⁺ e Cl⁻ foram adicionadas aleatoriamente usando um potencial Coulômbico em uma malha com 1,0 Å de resolução em torno da IDE. Posteriormente, todos os sistemas foram hidratados com moléculas de água do tipo TIP3P em uma caixa octaédrica com 10 Å de distância entre a borda da caixa de simulação e a enzima (*buffer*). As cargas totais dos dois sistemas solvatados foram neutralizadas adicionando íons de Na⁺. A adição dos íons e a

solvatação dos sistemas foi feita usando o programa LEaP. Os dados de cada um dos sistemas estão disponíveis na **Tabela 2**.

O procedimento computacional adotado para todas as simulações é usual e será descrito a seguir. Inicialmente, possíveis conflitos estruturais entre as moléculas de água e a

Tabela 2: Número de moléculas d'água, íons de Na⁺ e Cl⁻ e átomos dos sistemas sem íons (IDE-Aβ42), com ATP (IDE-Aβ42 + ATP) e em solução salina de NaCl (IDE-Aβ42 + NaCl).

Sistemas	Águas	Íons Na ⁺	Íons Cl ⁻	Átomos
IDE-Aβ42	20.161	22	-	76.884
IDE-Aβ42+ATP	20.303	26	-	77.357
IDE-Aβ42+NaCl	20.325	27	5	77.386

enzima foram removidos através de sucessivas etapas de otimização estrutural: 1.000 passos usando o algoritmo *steepest descent*, seguidos de 9.000 passos com o algoritmo *conjugate gradient*. Em ambos os casos, foi permitido mover apenas as moléculas de água. Em seguida, a estrutura do sistema inteiro foi otimizada usando o mesmo procedimento, agora sem nenhuma restrição estrutural. Todos os sistemas foram aquecidos lentamente de 0 a 300 K durante 800 ps, seguidos de 2 ns na temperatura final, com passo temporal de 1,0 fs, a volume constante e com os fragmentos 1–3 e 16–22 do Aβ42 restritos na posição experimental. Finalmente, os sistemas foram simulados por pelo menos 40 ns com 2,0 fs de passo temporal, à 1,0 atm e 300 K e sem nenhuma restrição estrutural. Em todos os casos, a temperatura foi controlada usando o termostato de Langevin[128] com frequência de colisão igual a 2 ps⁻¹ e a pressão usando o barostato de Berendsen[129] com tempo de relaxação de 2 ps. O algoritmo SHAKE foi usado em todas as simulações, o raio de corte utilizado para as interações não-covalentes foi 12 Å e as interações de longo alcance foram calculadas usando o *Particle Mesh Ewald* (PME). O zinco do sítio ativo foi tratado como uma carga 2+, de acordo com trabalhos anteriores de Bora et al.[65] O campo de força AMBER ff99SB foi usado para o peptídeo e a proteína.[91] Os parâmetros do ATP foram obtidos a partir de Meagher e colaboradores,[130] e dos íons Na⁺ e Cl⁻ de Åqvist.[131], [132] Todos os cálculos de minimização de energia e DM foram conduzidos com os programas *Sander* e *PMEMD*, e os resultados tratados com o programa *ptraj*, parte do pacote de programas AMBER12.[91] O mapa de estrutura secundária foi gerado usando o método STRIDE,[133] disponível como parte do programa Visual Molecular Dynamics (VMD).[134]

A energia de interação IDE–A β 42 foi estimada usando o método *Umbrella Sampling*. [135], [136] O ATP foi gradualmente separado do amilóide através de sucessivos cálculos de dinâmica molecular no qual um potencial harmônico (*bias*) de 60 kcal·mol⁻¹·Å⁻² foi usado para restringir a distância entre o centro de massa (CM) dos átomos do ATP e o CM dos carbonos- α dos resíduos ser26 e lys28. Trinta janelas separadas por 0,3 Å foram necessárias para cobrir toda a coordenada de reação. Inicialmente, a estrutura inicial de cada janela foi gerada por sucessivas otimizações de geometria restritas, iniciadas a partir da geometria otimizada da janela anterior. Em cada otimização, 1.000 passos com o algoritmo *steepest descent* seguidos de 9.000 passos com o algoritmo *conjugate gradient* foram usados. Em seguida, cada janela da *umbrella* foi submetida a 1,8 ns de simulação com a pressão e temperatura de 1,0 atm e 300 K. Finalmente, os resultados foram convertidos em PMF usando o método WHAM, [137], [138] com tolerância de convergência de 0,00001 na energia livre (adimensional), usando apenas o último 1,0 ns de cada trajetória.

O movimento dos átomos nos cálculos de DM é governado pelas leis de Newton e as velocidades iniciais geradas aleatoriamente de acordo com a distribuição indicada na Equação 16. O processo é caótico e os resultados são obtidos calculando a média das propriedades termodinâmicas, de modo que estes valores estão diretamente associados à amostragem. O tempo de simulação nos cálculos de DM é finito, o que pode levar a resultados tendenciosos, provenientes de artifícios da simulação. Então surge a necessidade de aumentar a amostragem. Isto pode ser feito avaliando o comportamento de um número de réplicas do sistema. O ponto central do nosso trabalho gira em torno da existência de interações intermoleculares entre o ATP e o amilóide, uma vez que estas interações podem ser responsáveis por prender a IDE na forma inativa. Portanto, uma réplica de cada sistema proposto foi simulada para avaliar a existência de possíveis artifícios da simulação. A estrutura inicial de cada réplica foi escolhida combinando as trajetórias originais em três conjuntos (*clusters*) com o algoritmo hierárquico, [139] usando como métrica o RMSD dos átomos do *backbone* do amilóide. A estrutura representativa do cluster de menor ocorrência foi usado como estrutura inicial da dinâmica molecular das réplicas, e as simulações conduzidas usando o mesmo protocolo do sistema original, porém com as velocidades iniciais geradas a partir de sementes diferentes. No caso da simulações sem íons, a ligação entre a TYR831 e o phe19 (d9), que existe na estrutura cristalográfica, não existe na

estrutura inicial da réplica escolhida, levando a resultados inconsistentes (ver a discussão). Portanto, executamos uma terceira réplica deste sistema iniciando a partir da estrutura representativa do grupo 2 (2º mais populoso).

3.2 Elucidação do Mecanismo de Degradação do A β 42 pela IDE na Ausência e Presença do ATP

Das trajetórias obtidas anteriormente, foi escolhida uma estrutura representativa de cada sistema para dar início as reações que serão apresentadas neste sessão (sistema sem e com ATP). Em ambas as estruturas, o nitrogênio da HIS108 e HIS112, os dois oxigênios carboxílicos do GLU189, o oxigênio carbonílico da phe19, e o oxigênio da molécula de água reativa estão ligados no íon Zn²⁺ formando a primeira esfera de coordenação. Os resíduos GLU111, GLU182, THR220, ARG824 e TYR831 formam a segunda esfera de coordenação, e desempenham uma função chave no processo de reconhecimento, ligação e quebra do substrato, e estabilização da estrutura do sítio ativo.[140], [141] O GLU111 participa ativamente no processo catalítico auxiliando na transferência do próton H2 de O1 para N7, enquanto que a cadeia lateral da ARG824 e TYR831 ajuda na fixação do substrato e estabilização das estruturas da reação: o grupo amino da ARG824 interage com o oxigênio carbonílico da phe20, assim como o grupo hidroxila da TYR831 interage com o oxigênio carbonílico da phe19. Todas essas interações são observadas na ausência e presença do ATP, com exceção da última, que é desfeita na presença do ATP, como mostrado na **Figura 15**. Neste último caso, a população de ligações de hidrogênio TYR831–phe19 é reduzida, enquanto que a ligação de hidrogênio TYR831–ala21 é formada. As reações investigadas começam a partir das estruturas de maior incidência.

Em nosso esquema QM/MM, a energia da região QM foi calculada usando o método SCC-DFTB[142] e o resto da enzima foi tratado com o campo de forças AMBER FF99SB.[143] De acordo com o método QM/MM,[144] o sistema é dividido em duas regiões: QM e MM. A região QM inclui os dois resíduos do A β 42 envolvidos na quebra da ligação peptídica (phe19 e phe20), os resíduos do sítio ativo (HIS108, HIS112, GLU189 e Zn²⁺), o aminoácido catalítico GLU111 e a molécula de água ligada ao zinco. Para reduzir os efeitos da fronteira QM/MM, o carbono- α da val18 e o nitrogênio da ala21 foram adicionados na região QM. *Link atoms* de

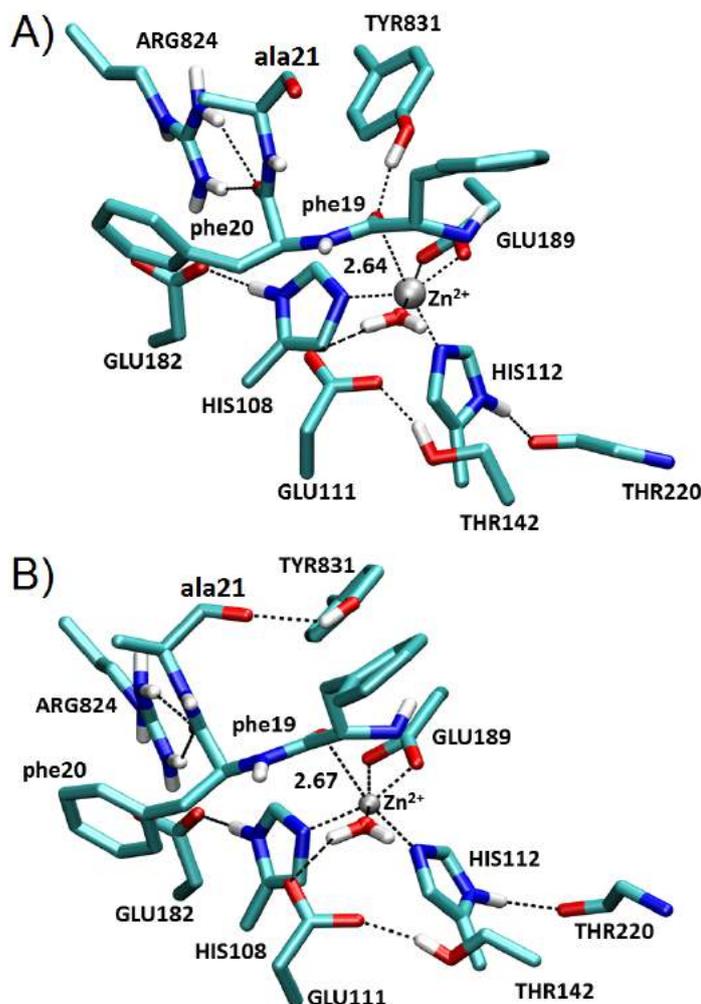


Figura 15: Geometria inicial dos resíduos em torno do sítio ativo dos sistemas (A) IDE-A β 42 sem íons e (B) com ATP.

hidrogênio foram adicionados para completar a valência dos átomos da fronteira QM/MM, totalizando 120 átomos QM (ver **Figura 16**). O resto do sistema (região MM) é composto por mais de setenta mil átomos.

As reações na ausência e presença do ATP foram conduzidas controlando apenas a distância entre os átomos envolvidos na formação da ligação química C6–O1 [$r(\text{C6-O1})$] e N7–H2 [$r(\text{N7-H2})$]. Ao fazer isto, nenhum controle é imposto aos outros átomos, permitindo que esses se movimentem livremente na direção de menor energia. A superfície de energia livre completa, resultado da escolha dessas duas coordenadas, foi calculada testando combinações de $r(\text{C6-O1})$ e $r(\text{N7-H2})$, totalizando 66 janelas. A determinação do perfil das reações usando US requer um compromisso entre a constante de força da restrição e a

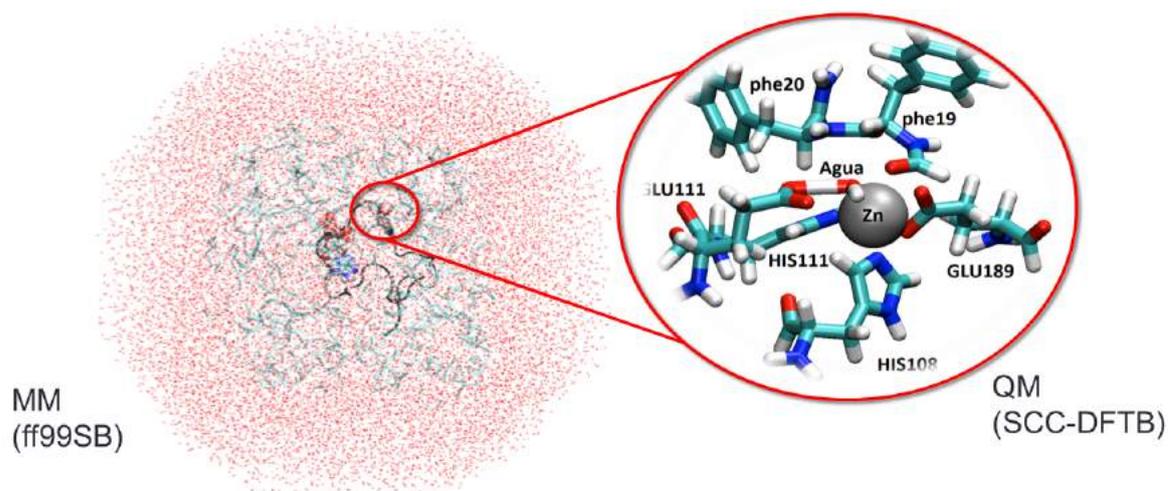


Figura 16: Átomos que compõe a região MM e QM.

distância entre as janelas. A DM das janelas sob tais condições produz um histograma de deslocamento atômico contínuo ao longo da coordenada de reação cujo PMF, interpretado como energia livre, é obtido a partir da análise WHAM.[138] Essas energias são extremamente sensíveis às condições da dinâmica, ao passo que o ajuste da janela e da constante de restrição é arbitrário. Logo, a determinação desses parâmetros é um trabalho de experimentação. Notamos que deveríamos combinar dois tipos de janelas para estes sistemas: as janelas próximas dos estados fundamentais, tais como os reagentes, intermediários e produtos são separadas por 0,2 Å de distância e restritas por um potencial harmônico com constante de restrição, k_{bias} , igual $400 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{Å}^{-2}$, já as janelas próximas aos estados críticos, tais como os estados de transição, são separadas por 0,1 Å de distâncias e restritas por um potencial harmônico com k_{bias} igual a $800 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{Å}^{-2}$. Com a varredura é possível obter o mecanismo de reação, o caminho de menor energia e a etapa determinante da reação.

Em todos os casos, a geometria inicial de cada janela foi determinada por sucessivos cálculos de otimização de geometria restrita, usando o método *steepest descent*, com 1.000 ciclos de minimização. Após a minimização, cada janela foi aquecida continuamente de 0 a 300 K por 3 ps, com passo temporal de 0,5 fs, em volume constante. Em seguida, as janelas foram simuladas durante 22,0 ps com passo temporal de 1,0 fs, em temperatura e pressão constantes de 300 K e 1 atm, totalizando mais de 4,0 ns de simulação. Toda as análises consideram apenas os 15,0 ns finais de cada simulação. Em todas simulações, as interações

de longo alcance foram tratadas com o método PME, e as interações eletrostáticas e de van der Waals com o raio de corte igual a 10 Å. A temperatura foi controlada usando o termostato de Langevin com frequência de colisão igual a 2,0 ps⁻¹, e a pressão usando o termostato de Berendsen com 2,0 ps de tempo de relaxação da pressão. Todos os cálculos foram executados com o programa *Sander*, e os resultados tratados com o programa *ptraj*, ambos parte do pacote de simulação de dinâmica molecular AMBER12.[145] Finalmente, o WHAM foi usado para calcular o potencial de força médio, com tolerância de 0,0001 na energia livre.

4. RESULTADOS, DISCUSSÕES E CONCLUSÕES

4.1 Simulação de Dinâmica Molecular Revela o Mecanismo de Inibição da IDE pelo ATP na Quebra do A β 42

4.1.1 Resultados

Neste estudo, a IDE complexada com o amilóide foi simulada em três situações diferentes: sem íons, na presença do ATP, e em solução de cloreto de sódio, na tentativa de elucidar o mecanismo pelo qual o ATP inibe a IDE na quebra do amilóide. Para esta suposição, foi necessário determinar o sítio de ligação dos íons, analisar a dinâmica da IDE e do amilóide na presença e ausência dos íons em termos do RMSD, RMSF e análise de estrutura secundária, e estimar a energia de ligação ATP–A β 42. Para maior clareza dos resultados apresentados nesta tese, atribuiremos aos resíduos do A β 42 um código de três letras *minúsculas* e os da IDE um código de três letras *maiúsculas*.

4.1.1.1 Equilibração

As simulações de DM foram monitoradas através da evolução dos valores do desvio médio da raiz quadrática (RMSD) dos átomos do *backbone* da IDE em função do tempo (**Figura 17** e **Figura 18**), tendo como referência a estrutura inicial de cada simulação. Os valores de RMSD para sistemas sem íons, com o ATP (ATP) e em solução salina (NaCl) estabilizaram depois de aproximadamente 10, 15 e 20 ns, respectivamente. Todas as análises que serão apresentadas de agora em diante foram realizadas desconsiderando a trajetória antes da estabilização do RMSD.

4.1.1.2 Localização do ATP

O ATP foi inicialmente encaixado na posição experimental entre resíduos de ARG429, LYS898, LYS899 e SER901.[127] No entanto, no decorrer da simulação, ATP migra para uma região vizinha rica em aminoácidos polares, perdendo as interações com LYS898, LYS899 e SER901 e estabelecendo novas conexões com a enzima e o substrato. O nucleotídeo mantém a forte interação com a ARG429 e forma novas ligações de hidrogênio com LYS85, ARG431 e ARG892 da IDE através do grupo trifosfato e, ao mesmo tempo, com o ser26 e lys28 do amilóide (**Figura 19**), como mostrado na **Tabela 3**. As ligações de hidrogênio formadas entre o ATP-IDE e ATP-A β 42 são mantidas durante todo o tempo de simulação, como mostrado na **Figura 21** (para fins de análise, assumimos que uma ligação de hidrogênio ocorre sempre que a distância entre o átomo doador (D) e aceitador (A) for menor 3,0 Å e o ângulo A-H-D maior que 110°).[146] O mesmo comportamento foi observado na réplica (ver **Figura 20**).

O fato de que as interações do ATP com a enzima e o amilóide ocorrerem através do grupo trifosfato sugere que outros nucleotídeos produzam o mesmo efeito do ATP. De fato, existem relatos na literatura que o mecanismo de inibição da IDE depende não apenas do ATP, mas também de outros nucleotídeos, tais como GTP, ADP e PPi, em concordância com o mecanismo de inibição aqui proposto.[49]

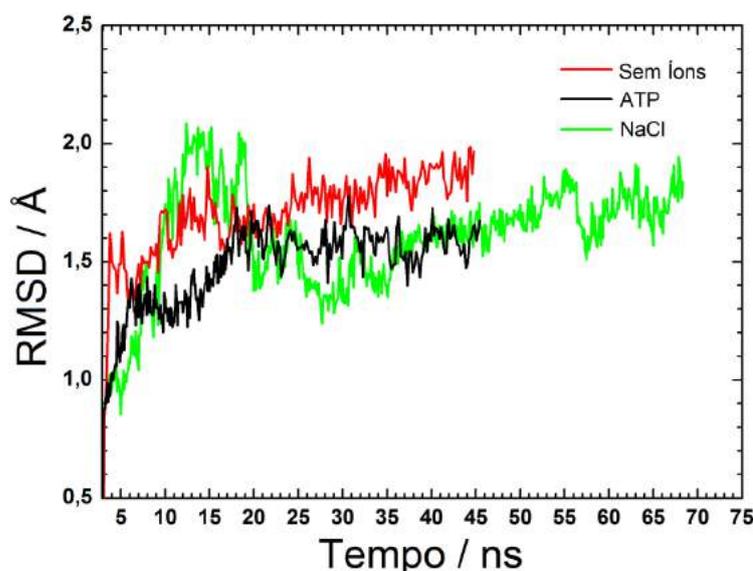


Figura 17: RMSD dos átomos do *backbone* da IDE (C, N e O) como função do tempo, tomando como referência a primeira estrutura de cada simulação.

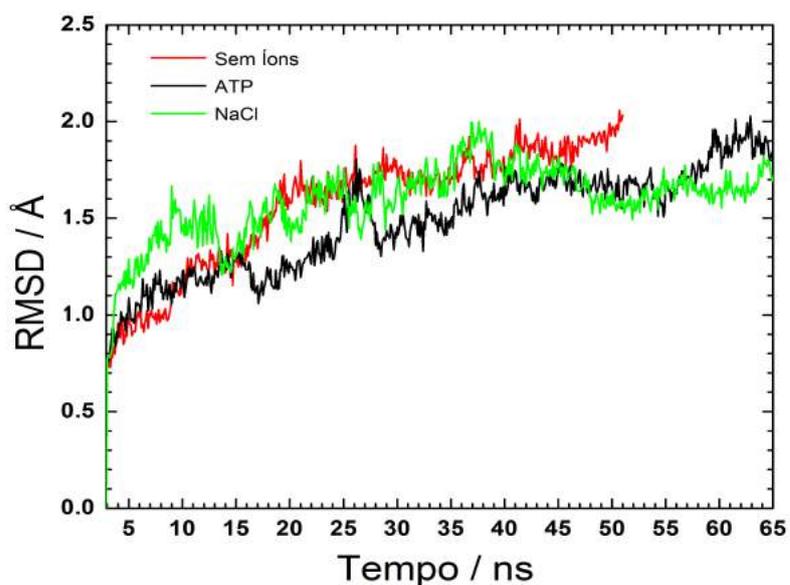


Figura 18: RMSD dos átomos do backbone da IDE em função do tempo para as réplicas dos sistemas sem íons (vermelho), com ATP (preto) e em NaCl (verde).

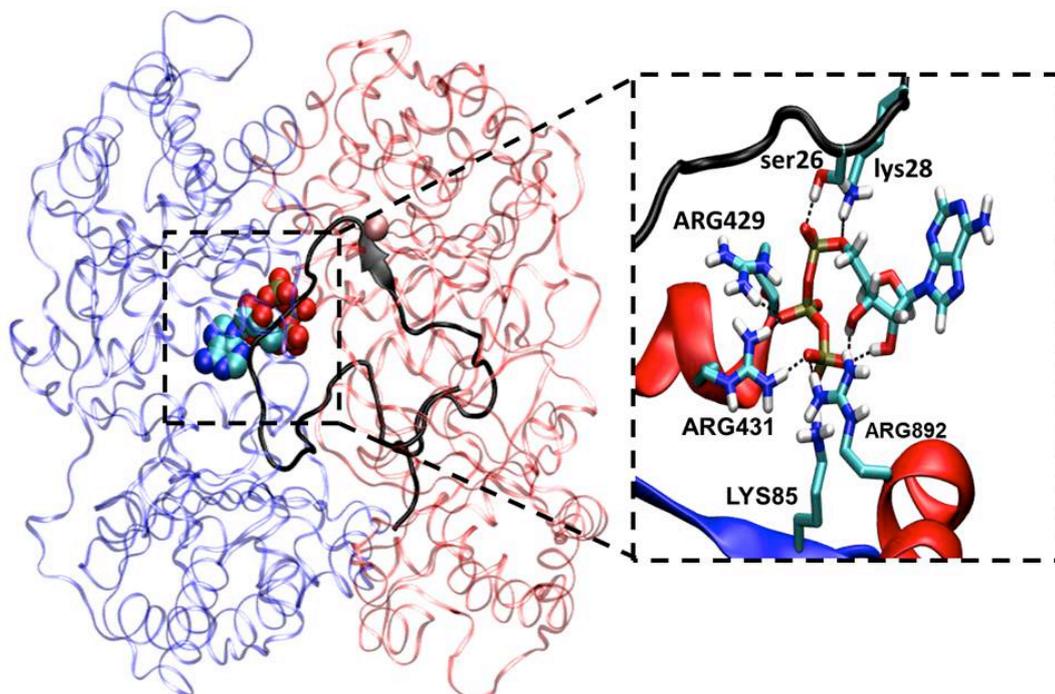


Figura 19: Esquerda; A estrutura da enzima é representada em fitas, enquanto que as esferas representam o ATP (carbono: azul claro, nitrogênio: azul, oxigênio: vermelho e hidrogênio: branco), e o Zn (salmão). As ligações entre o ATP e a parede interna da IDE-C (vermelho) e IDE-N (azul) é mostrado. Direita; Visão ampliada do sítio de ligação do ATP, mostrando as principais interações ATP-IDE e ATP-Aβ42.

Tabela 3: Ocupação das ligações de hidrogênio formadas pelo ATP. Os valores em parênteses indicam a ocupação da réplica.

Resíduo	Ocorrência (%)
ARG429	98 (96)
LYS85	35 (13)
ARG431	83 (99)
ARG892	45 (23)
ser26	26 (23)
lys28	28(99)

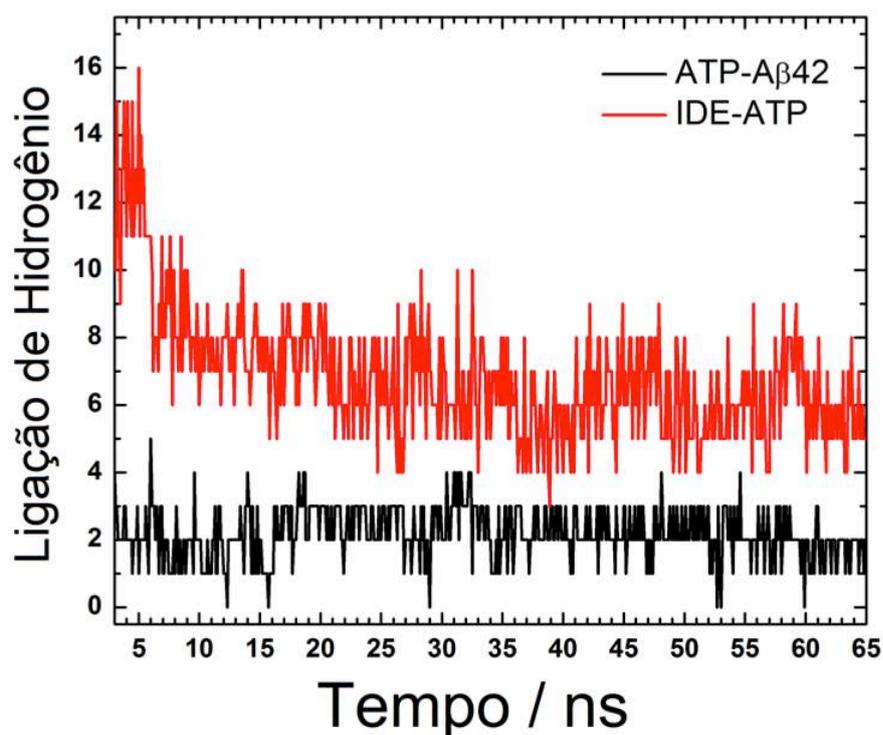


Figura 20: Número de ligações de hidrogênio entre o ATP e a A β 42 (linha preta) e o ATP e a IDE (linha vermelha) na réplica, como uma função do tempo.

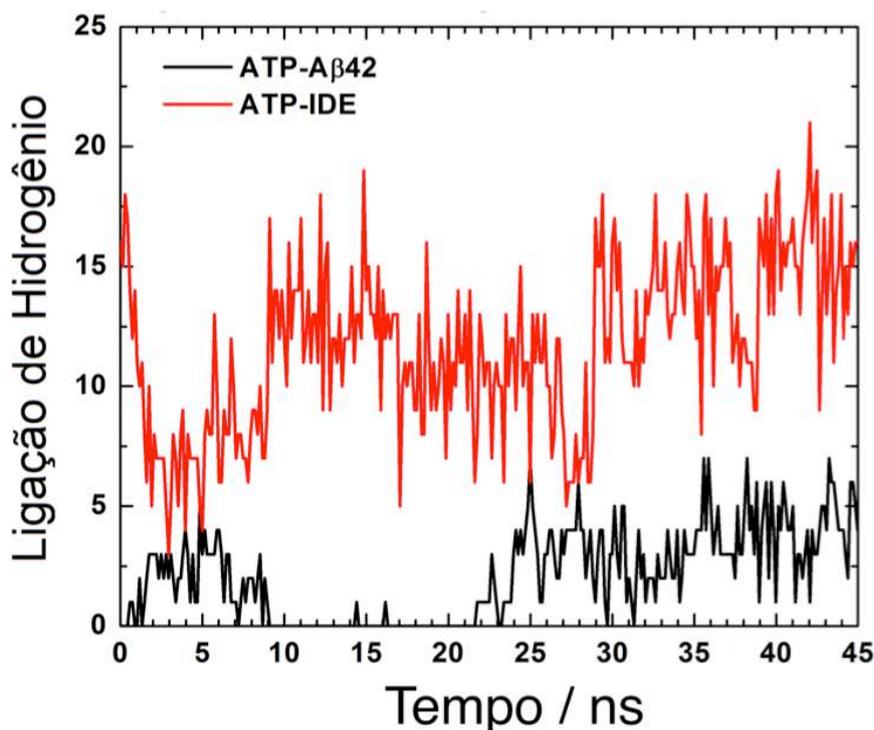


Figura 21: Numero de ligações de hidrogênio entre o ATP e o A β 42 (linha preta) e o ATP e a IDE (linha vermelha) no complexo IDE–A β 42 mais ATP.

4.1.1.3 Localização dos Íons Cloretos

Não só o ATP, mas também outros ânions têm a habilidade de ligar-se no sítio catiônico e ativar a IDE via efeito alostérico. Altas concentrações de NaCl também produzem efeito similar.[127] Portanto, avaliamos também o comportamento da IDE complexada com o amilóide na presença de cinco unidades extras de Na⁺ e Cl⁻, permitindo, com isso, diferenciar entre os fenômenos originados da carga e da estrutura do ATP.

As simulações indicam que os íons cloreto possuem uma clara preferência por regiões específicas da IDE. Então, para determinar os principais sítios de ligação, usamos a afinidade dos íons cloreto por aminoácidos positivos. A porcentagem total de estruturas em que os íons aparecem próximos a uma distância de 4,0 Å da cadeia lateral dos aminoácidos ALA e LYS formam os sítios de ligação dos íons cloreto na IDE. Os sítios com a maior ocorrência são mostrados na **Figura 22**. É possível distinguir três sítios de ligação, aqui chamados de S1, S2 e S3, com 41%, 36% e 13% de ocupação. O mesmo padrão é observado nas réplicas (S1, S2 e S3 com 50%, 84% e 26% de ocupação, respectivamente), reforçando os

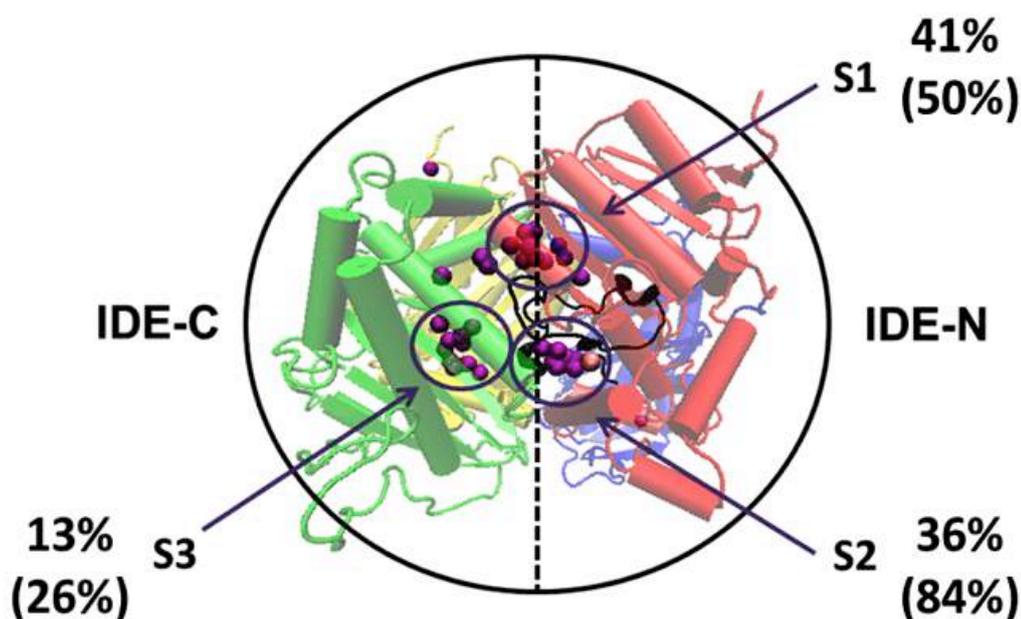


Figura 22: Ocorrência de íons Cl^- a pelo menos 4,0 Å de distância das cadeias laterais dos aminoácidos LYS e ALA. Visão de cima dos principais sítios de ligação dos íons Cl^- na IDE (S1, S2 e S3). A ocupação do sistema original é mostrado e em parênteses o da réplica.

resultados aqui apresentados. O sítio S1 situa-se na IDE-C e é composto pelos aminoácidos ARG429, ARG892, LYS898 e LYS899. Este local tem sido experimentalmente relacionado com a ativação alostérica da IDE por ânions, incluindo o ATP e o Cl^- . O segundo sítio situa-se na IDE-N, a cerca de 10 Å de distância do sítio ativo e é formado por um aminoácido da IDE (LYS192) e outro do amilóide (lys16). É possível que a curta distância entre o íon cloreto conectado no S2 e o sítio ativo da metaloprotease modifique a distribuição de cargas do centro catalítico, resultando em mudanças significativas no perfil da reação. Finalmente, S3 está localizado na IDE-C e é composto pelos aminoácidos LYS632, ARG687 e LYS697. No entanto, a baixa ocorrência de íons cloreto (cerca de 13% no sistema original e 26% na réplica) indica pouca ou nenhuma influência sobre o mecanismo de ativação. Nenhuma interação específica foi observada entre os íons cloreto ligados no sítio catiônico (S1) e o peptídeo A β 42.

4.1.1.4 Efeito dos Íons na Dinâmica do Amilóide

O efeito dos íons na ativação da IDE foi documentado na literatura,[127] mas a sua influência no mecanismo de inibição ainda não foi esclarecida. Os resultados apresentados

sugerem que algumas interações moleculares são relevantes para o entendimento do mecanismo regulatório da IDE pelo ATP. Tais interações ocorrem sempre entre a IDE, ATP e o amilóide, e não foram previstas em publicações anteriores.[49] Portanto, foi necessário uma análise estrutural do amilóide sob tais condições. O impacto dos íons ATP e cloreto na estrutura do A β 42 foi analisado em termos do desvio da RMSF e do mapa de estrutura secundária do peptídeo.

O RMSF dos átomos do *backbone* do A β 42 (**Figura 23A**) nos três sistemas investigados é comparado com o mapa de estrutura secundária do amilóide de cada sistema (**Figura 23B, C e D**). O mapa de estrutura secundária na ausência e presença do ATP mostra a formação de pontes isoladas no aminoácido ala2 e a manutenção da folha- β no fragmento 18–19, ambos com baixo valor de RMSF (baixa flexibilidade). Na ausência do ATP, pontes isoladas instáveis são formadas entre os aminoácidos ser26 e lys28 após 12 ns. Estas interações são fracas e incapazes de reduzir significativamente a flexibilidade desta região. Por outro lado, na presença do ATP, o baixo valor de RMSF do fragmento 22–33 pode ser atribuído às fortes interações entre o ATP e a ser26 e lys28.

O fluxo de íons cloreto dentro da câmara catalítica muda o ambiente eletrostático da enzima, de modo que a conformação em folha- β 1–3 é perdida (**Figura 23D**). Isto ocorre com aumento significativo da flexibilidade nesta região (**Figura 23A**), indicando o desprendimento do fragmento 1–3 do sítio distal. Além dessas, outras estruturas são visíveis durante a maior parte do tempo. Por exemplo, a presença de íons cloreto induz a formação de hélices- α e hélices 3–20 nos fragmentos 5–9 e 33–35 do amilóide, respectivamente. O primeiro ocorre logo após o descolamento da cauda N-terminal do amilóide 1–3 (13 ns) e o segundo após 25 ns de simulação. Ambas são estruturas estáveis e ocorrem com uma redução na flexibilidade dos fragmentos 5–9 e 33–35. Finalmente, notamos ao longo da trajetória a formação intermitente de pontes envolvendo a his13. De modo geral, os íons cloreto produzem modificações drásticas na estrutura secundária do substrato e compromete a estabilidade da ligação IDE–amilóide. O ATP interage com a cauda C-terminal do amilóide reduzindo a flexibilidade desta região e, com isso, diminuindo o grau de liberdade do substrato dentro da câmara catalítica.

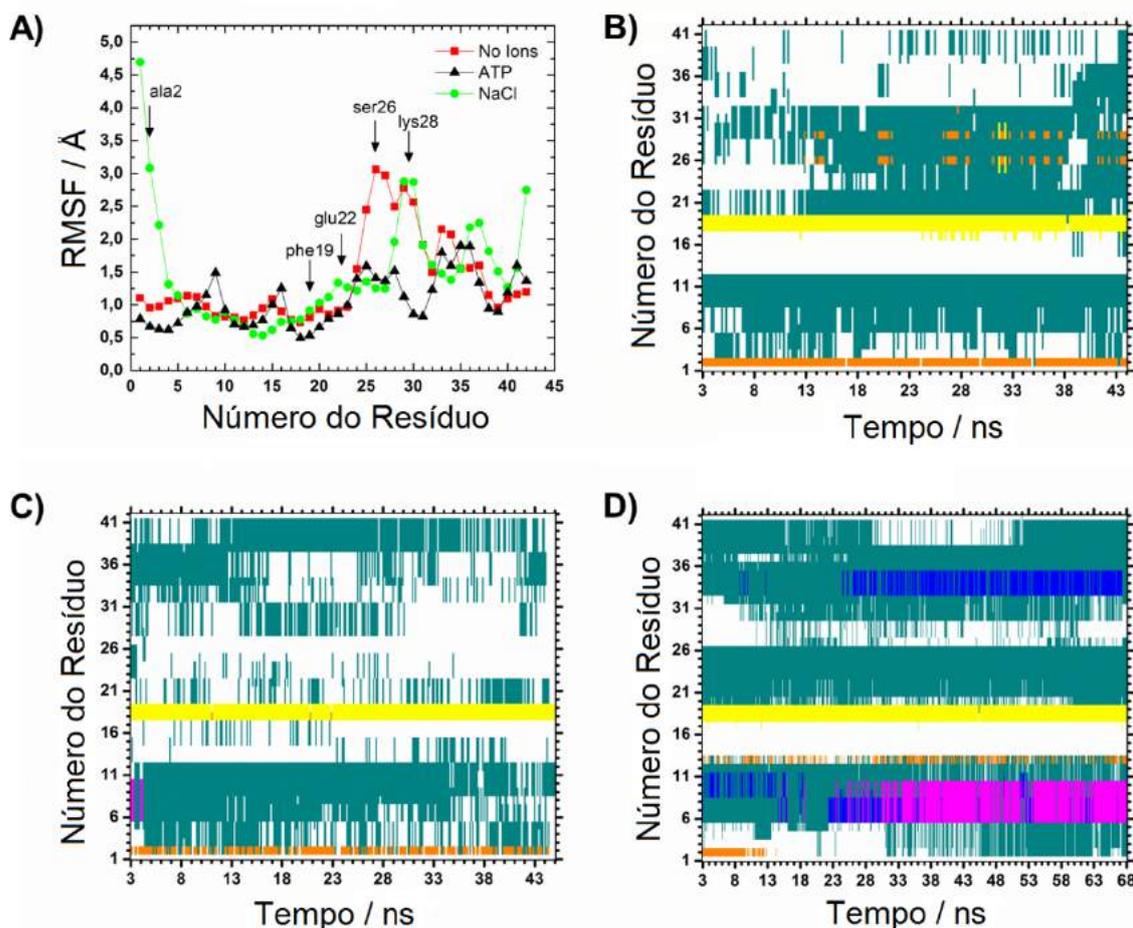


Figura 23: (A) RMSF do *backbone* do A β 42 obtido para os sistemas sem íons (quadrado vermelho), na presença do ATP (triângulo preto) e em solução salina (círculos verdes). Os resíduos phe19 e lys28 do substrato, envolvidos na ligação com a IDE, são indicados. (B-D) Estrutura secundária da IDE-A β 42 no sistema sem íons (B), na presença do ATP (C) e em NaCl (D). Verde: *turn*, amarelo: folhas- β , laranja: pontes isoladas, rosa: hélice- α , azul: hélice 3–20 e branco: *coil*.

4.1.1.5 Efeito dos Íons na Dinâmica da IDE

A presença dos íons resulta em mudanças por vezes significativas na dinâmica do IDE, provavelmente relacionadas com o movimento de abertura da enzima. A **Figura 24** mostra a flexibilidade relativa dos átomos do *backbone* da IDE nos sistema com ATP (preto) e solução salina (verde), tomando como referência a IDE no sistema sem íons, oferecendo uma visão geral da flexibilidade da IDE-N e IDE-C após a adição dos íons. A flexibilidade relativa da IDE-N (domínios 1 e 2) na presença dos íons é próxima de zero, indicando que esta parte da IDE

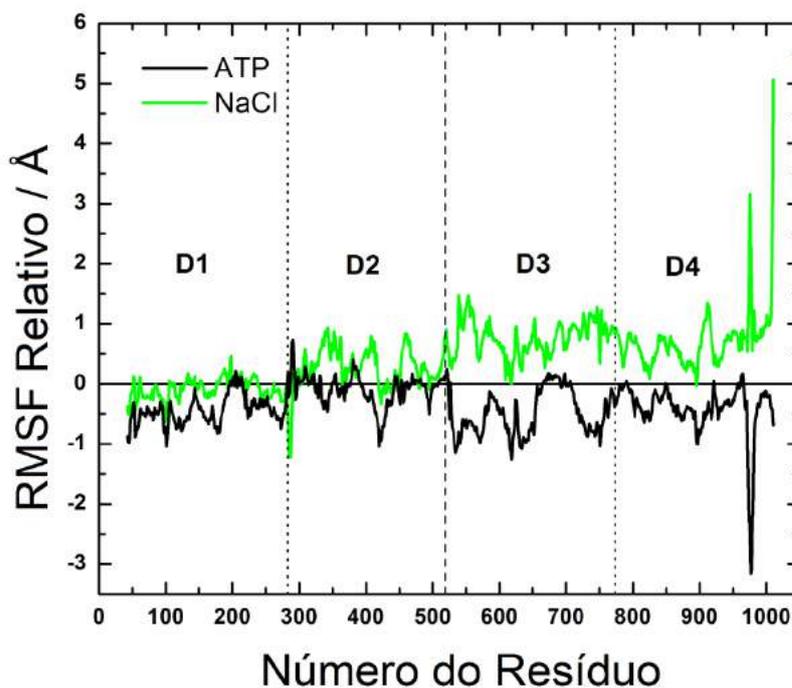


Figura 24: RMSF dos átomos do *backbone* da IDE (C, CA, N) nos sistemas com ATP (preto) e em solução salina (verde), ambos relativo ao sistema sem íons.

não sofre influência direta dos íons. De fato, os íons estão ligados em um sítio comum localizado na IDE-C e não no IDE-N, justificando tal comportamento. A flexibilidade do IDE-C na presença de ATP é reduzida, enquanto que na presença de sal é aumentada. O aumento da flexibilidade da IDE-C em solução salina e o fato de não existir interações entre os íons cloreto ligados no sítio catiônico, indicam que a carga negativa aumenta a flexibilidade da IDE, e, conseqüentemente, de seus movimentos. Em contraposição, na presença do ATP, a interação IDE-ATP e ATP- $A\beta_{42}$ cria uma conexão que prende as metades da IDE na conformação fechada, restringindo o movimento da enzima e opondo-se ao efeito ativador da carga. Entretanto, estes não são os únicos fenômenos observados decorrentes da presença dos íons. Mudanças pontuais na estrutura em torno do sítio ativo também são observadas e serão descritas na próxima sessão.

4.1.1.6 Energia Livre de Ligação ATP- $A\beta_{42}$

Em nossa abordagem, o ATP ligado ao sítio catiônico interage com o amilóide, que está conectado na outra metade da IDE, criando um ponte que conecta as duas metades da IDE, reduzindo o movimento da enzima e supostamente prendendo a IDE em sua forma

fechada (inativa). Portanto, acreditamos que a energia desta interação é o incremento necessário para abrir a enzima, comparado com a energia de abertura da IDE quando complexado apenas com o amilóide. Como teste para esta hipótese, calculamos a energia de interação ATP–A β 42. A **Figura 25** mostra a variação do PMF em função da distância entre o ATP e o fragmento 26–28 do amilóide. Um mínimo de energia é localizado quando a distância entre os centros de massa (CM) dos dois grupos é 9,3 Å, indicando que a interação ATP–A β 42 é mais efetiva à essa distância. À medida que a distância é aumentada, as interações ATP–A β 42 são quebradas. A primeira interação quebrada é a ATP–ser6, quando os CM encontram-se a 11,3 Å de distância, com um custo energético de 4,5 kcal·mol⁻¹. Quando a distância é igual a 12,8 Å, a interação ATP–lys28 é quebrada, requerendo cerca de 7,8 kcal·mol⁻¹ no processo global.

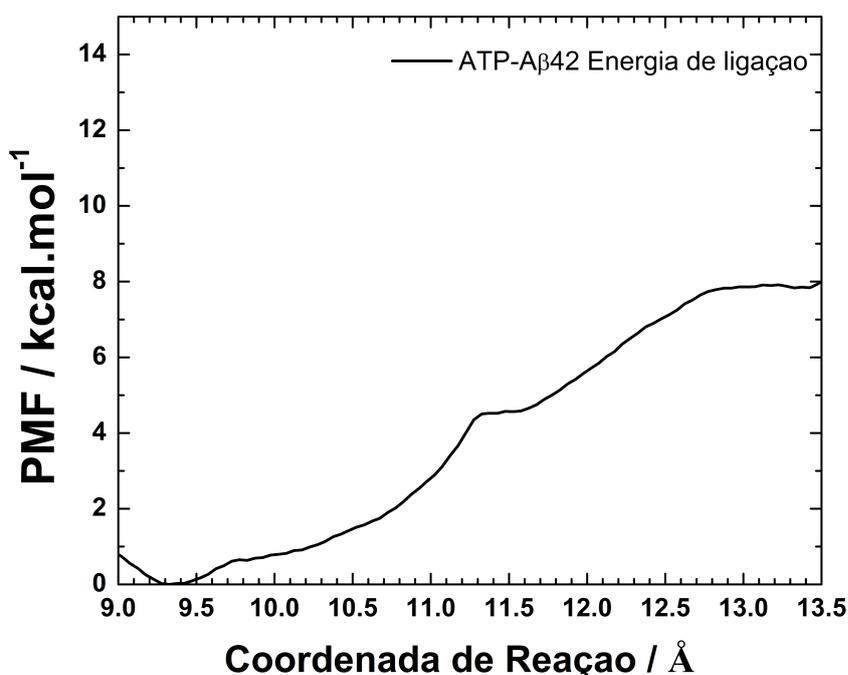


Figura 25: Variação da energia-livre de ligação ATP–A β 42 em função da distância que separa os centro de massas dos átomos do ATP e o CM dos átomos de carbono- α da ser26 e lys28 do substrato (coordenada de reação).

4.1.1.7 Efeitos dos Íons na Ligação IDE–A β 42

O A β 42 conecta-se à IDE através de dois pequenos fragmentos, 1–3 e 16–22.[140] O primeiro fragmento interage com o sítio distal formando uma pequena folha- β com

fragmento 341–363 da IDE-N. Ao mesmo tempo, o segundo fragmento interage com os resíduos do sítio ativo e com o fragmento 140–145 da IDE-N para formar outra discreta folha- β . Todas essas interações fazem parte do mecanismo de reconhecimento da enzima-substrato e foram reproduzidas recentemente por simulações de dinâmica molecular.[147] Estruturas semelhantes foram também detectadas em nossas simulações.

Observamos que a cauda N-terminal do amilóide interage com o sítio distal e forma uma ponte isolada entre a VAL360 e a ala2, a qual é estabilizada pelas ligações de hidrogênio d1–d4 (**Figura 26A**). As interações d3, d2 e d1 são formadas entre o nitrogênio asp1 e resíduos, GLY339, ALA359 e GLU341, respectivamente, enquanto que d4 é formada entre o oxigênio do *backbone* da GLY361 e o nitrogênio da asp1. Enquanto isso, os resíduos val18 e

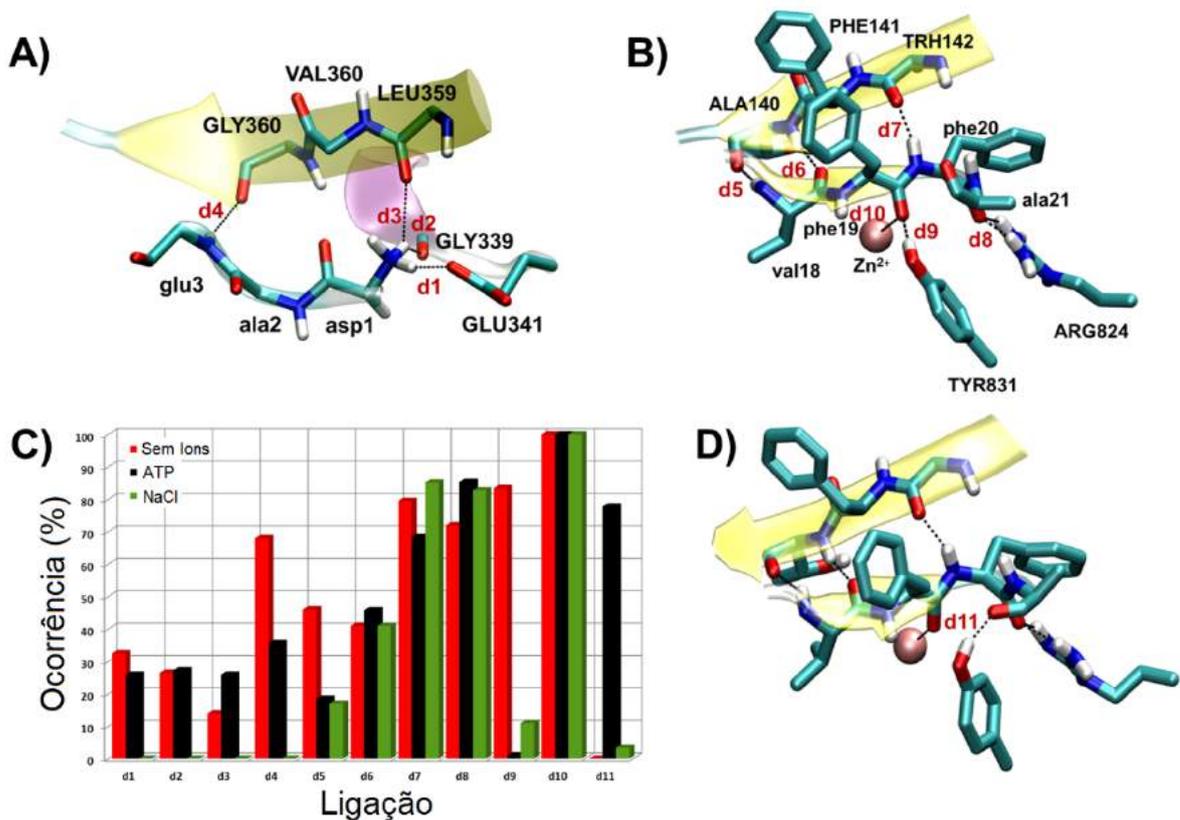


Figura 26: Estrutura representativa do fragmento 1–3 e 18–21 do A β 42 ligado na IDE. (A) As principais interações entre o fragmento 1–3 do A β 42 e o sítio distal (d1–d4); (B) interações entre o fragmento 18–21 do A β 42 e o sítio ativo da IDE (d5–d10); (C) Ocupação das ligações de hidrogênio entre o fragmento 1–3 do amilóide e o sítio distal e o fragmento 18–21 do amilóide e o sítio ativo e (D) a ligação de hidrogênio d10 formada entre os resíduos TYR831 e a ala21.

phe20 do substrato interagem com os resíduos THR142 (d5 e d6) e ALA140 (d7) da IDE para formar uma pequena folha- β (**Figura 26B**), que é estabilizada pelas ligações de hidrogênio estabelecidas entre os grupos amina da ARG824 e o oxigênio da phe20 (d8), e entre o oxigênio da hidroxila do aminoácido TYR831 e o oxigênio da carbonila da phe19 (d9). Além disso, o íon zinco interage fortemente com o peptídeo e forma, com a HIS108, HIS112 e GLU189, um complexo de coordenação metal-ligante. Esta última estrutura é mantida ao longo da simulação, com a distância entre o zinco e o oxigênio da phe19 iguais a 2,9 ($\pm 0,7$), 3,0 ($\pm 0,7$) e 2,1 ($\pm 0,5$) Å para os sistemas sem íons, ATP e em NaCl, respectivamente.

A presença dos íons, ATP em particular, induz modificações específicas no modo de ligação do A β 42 na IDE. Observamos que a ocupação das ligações de hidrogênio no sítio distal (d1–d4) é afetada na presença de ATP, sendo 35% inferior no caso d4 (**Figura 26C**). Por outro lado, não foi observada qualquer ocorrência de ligação de hidrogênio entre o sítio distal e o amilóide em solução salina, caracterizando, assim, o desmanche da folha- β seguido do rompimento da cauda N-terminal do amilóide do sítio distal. Das interações responsáveis por manter o amilóide no sítio ativo (d5–d9 e d10), pode-se notar uma diminuição acentuada na ocupação de d5 e o completo desaparecimento de d9 na presença do ATP (**Figura 26C**). Por outro lado, o nucleotídeo interage fortemente com a cauda C-terminal do amilóide, induzindo alterações conformacionais na região do sítio ativo. Essa interação é responsável pelo desaparecimento de d9 e formação da ligação de hidrogênio entre o hidrogênio da hidroxila TYR831 e o oxigênio carbonílico da ala21 (d10) (**Figura 26D**). A perda da interação d9 reduz as interações responsáveis por fixar o substrato em uma posição adequada para a reação catalítica, desestabilizando a estrutura do sítio ativo. Espera-se assim um aumento da barreira de energia e redução da velocidade da reação. Esta hipótese foi investigada por meios de cálculos híbridos do tipo QM/MM na ausência e presença do ATP, e seus resultados serão mostrados no tópico 4.2 abaixo (“Elucidação do Mecanismo de Degradação do A β 42 pela IDE na Ausência e Presença do ATP”).

Utilizando o método de *clustering*, as trajetórias de cada sistema foram agrupadas em três grupos (*clusters*), como listado na **Tabela 4**, ordenados da menor para a maior ocorrência.

Tabela 4: População percentual dos grupos amostrados das simulações originais.

Grupo	Sem Íons	ATP	NaCl
1	24,3	3,6	19,4
2	35,2	21,8	21,5
3	40,5	74,6	59,1

Para a simulação das réplicas, escolhemos como estrutura inicial a estrutura representativa do grupo de menor ocorrência. No entanto, para o sistema sem íons, a réplica levou a resultados inconsistentes com os dados cristalográficos. Por exemplo, a ligação TYR831–phe19 (d9), que é detectada na difração de raios-X, foi quebrada no início do cálculo porque a cauda C-terminal do amilóide se torce e adota uma conformação que favorece a ligação TYR831–glu3. Portanto, para esse sistema, uma terceira réplica foi simulada usando a estrutura representativa do segundo grupo como estrutura inicial da simulação. Esta última simulação mostrou um comportamento similar à do sistema original, indicando que a conformação do amilóide dentro da enzima determina o padrão de ligação IDE–A β 42. Por outro lado, as réplicas dos outros sistemas (ATP e NaCl) reproduziram todos

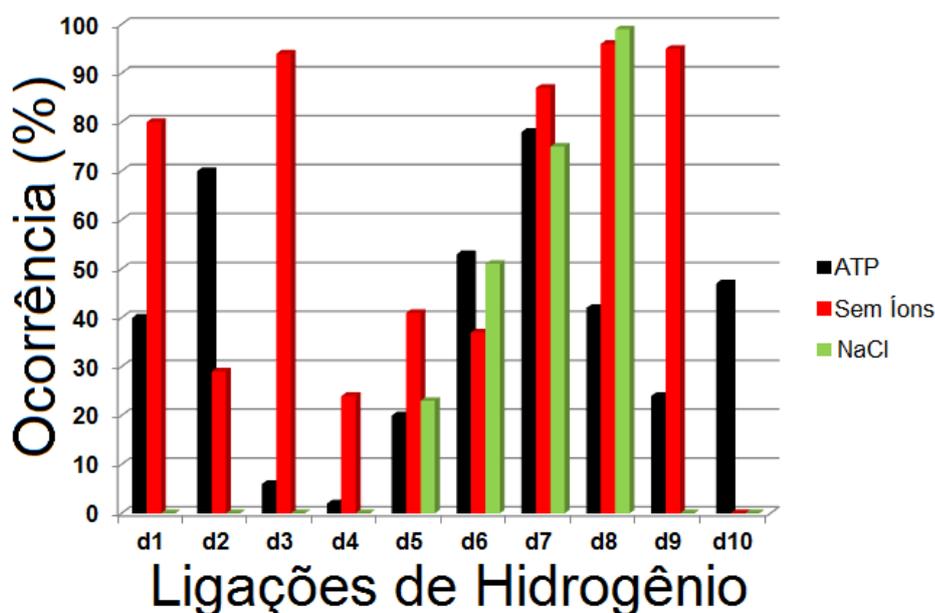


Figura 27: Ocorrência em porcentagem de frames das ligações de hidrogênio em torno do sítio ativo nas réplicas dos sistemas sem íons (vermelho), com ATP (preto) e em NaCl (verde).

os resultados das simulações originais (**Figura 27**), indicando que a presença de ATP resulta em fenômenos genuínos que estão intimamente relacionados com a carga do ATP e com interações específicas entre IDE–ATP, ATP–A β 42 e A β 42–IDE.

4.1.2 Discussões

A IDE pode ser ativada de duas maneiras: ativação alostérica homotrópica ou heterotrópica por pequenos substratos ou ATP.[59], [127], [140], [148] A ativação homotrópica ocorre quando um substrato longo interage com o sítio distal de uma das subunidades do dímero, induzindo alterações conformacionais na subunidade vizinha. Este modelo de ativação está fortemente relacionado com o conceito de ativação alostérica simétrica, na qual uma molécula ligada na subunidade A produz efeito alostérico que culmina na ativação da subunidade B. Por outro lado, a ativação alostérica heterotrópica por pequenos peptídeos acontece quando um peptídeo pequeno mimetiza o efeito ativador de um substrato longo. A ativação alostérica heterotrópica pelo ATP ocorre quando o nucleotídeo quebra a conexão entre as subunidades do dímero, induzindo modificações conformacionais na unidade em que o ATP está ligado, o que acontece apenas durante a degradação de substratos pequenos. Este tipo de ativação é compatível com o mecanismo de ativação alostérica sequencial, em que a molécula ativadora interage e ativa a mesma enzima. Curiosamente, a ativação da IDE pelo ATP só acontece durante a degradação de substratos pequenos, e não na presença de um substrato grande. Independentemente do mecanismo de ativação, se homotrópico ou heterotrópico ou se simétrico ou sequencial, todos os mecanismos de ativação ocorrem com o aumento da população de IDE aberta (ativa),[53], [140] indicando que a inibição da IDE deve estar relacionada com o favorecimento da sua forma fechada (inativa).

A inibição da degradação da insulina pelo ATP *in vivo* foi relatada pela primeira vez em 1987 por Hashimoto[149] e posteriormente induzida por fluoreto de alumínio e ATP.[150] Em 2001, Camberos e colaboradores demonstraram que o ATP, na presença de Mn²⁺ (ou Mg²⁺), inibe a atividade da IDE purificada (*in vitro*) na degradação da insulina.[49] Desde então, especula-se que ATP e outras moléculas quimicamente semelhantes podem ligar-se em um domínio comum, reduzindo, assim, o volume disponível para a complexação

do substrato ou induzir mudanças conformacionais no substrato, que toma uma configuração proteoliticamente inadequada.[58] Os fatos apresentados resumem uma década de debates, e o mecanismo de inibição da IDE pelo ATP permanece ainda desconhecido. Isto reflete a dificuldade envolvida nesses processos e abre caminho para modelagem molecular e o estudo sistemático de interações proteína-proteína. Motivados pelas últimas descobertas, criamos o modelo molecular da IDE complexada com o amilóide na presença e ausência do ATP. Para justificar a presença do ATP dentro da IDE complexada com o A β 42 e explorar essa hipótese, fizemos as seguintes suposições: é sabido que o ATP interage com o sítio catiônico localizado na IDE-C,[127], [151] enquanto que o substrato liga-se à outra metade da enzima (IDE-N: metade catalítica). Então é razoável supor que, sendo uma molécula pequena e com poucos graus de liberdade, o ATP atinge o sítio catiônico e liga-se na IDE mais facilmente que o amilóide, um substrato longo. Sabe-se também que íons Mn^{2+} ou Mg^{2+} são requeridos para inibição. Estes íons protegem a IDE da desnaturação, e são acessórios para a ligação do ATP na proteína.[49] Neste presente estudo, uma vez que já consideramos o ATP ligado na proteína e que a escala de tempo da simulação não promove a desnaturação, consideramos pouco provável que a sua presença influencie os resultados. Assim, optamos por não incluí-los nas simulações, o que nos permite isolar a contribuição ATP na inibição.

Uma vez dentro do IDE e na ausência de substrato, o ATP quebra o suposto equilíbrio eletrostático que mantém a enzima na conformação fechada, aumentando a população de enzimas abertas.[127] Dada a distância entre os dois sítios, é razoável supor que o amilóide possa ligar-se na IDE aberta, com o ATP ligado no sítio catiônico. Após a ligação do amilóide, a IDE fecha e tenta iniciar o mecanismo de reconhecimento do substrato. Neste cenário, presumimos que o ATP e amilóide possam coexistir dentro da IDE e iniciar o efeito que leva à inibição da atividade enzimática. Para explorar esta hipótese, criamos o modelo molecular da IDE complexada com o A β 42 e ATP. Nossas simulações mostram que a ligação IDE-ATP é estável na presença de amilóide, sugerindo que o complexo de Michaelis-Menten pode existir nesta configuração.

O amilóide é uma proteína desordenada e insolúvel, com grande capacidade de formar agregados na forma de folhas- β . [152]–[156] Do ponto de vista computacional, as

simulações de dinâmica molecular de proteínas desordenadas semelhantes ao A β em solução requerem um longo tempo de simulação para amostrar o espaço configuracional e determinar eventos de nucleação e formação de agregados moleculares.[153], [157] No nosso caso, no entanto, uma unidade do amilóide é capturada pela IDE e confinada dentro da câmara catalítica da enzima, com volume de 1.300 Å³. Em seguida, o amilóide interage com a câmara através do sítio ativo e distal, formando estruturas estáveis de modo que alguns resíduos são detectados na difração de raios-X: fragmentos 1–3 e 16–22 estão ancorados dentro da câmara catalítica da IDE, limitando o movimento do amilóide e permitindo novas possibilidades de interação.[140], [158] O resultado mostra que o amilóide, que é uma estrutura desordenada em solução, adota uma conformação mais ordenada dentro da IDE. Na presença do ATP, o volume acessível ao substrato diminui, restringindo o movimento do substrato dentro do ambiente confinado. Com isso, as simulações de dinâmica molecular sob essas condições permitem amostrar o espaço conformacional do amilóide em algumas dezenas de nanossegundos, como foi observado em estudos anteriores por Bora e colaboradores.[159] Similarmente, a estrutura das nossas simulações é estabilizada em cerca de 10–20 ns.

Optamos posicionar o amilóide dentro da enzima de tal modo que fosse possível reproduzir as interações mencionadas, mas é evidente que a conformação adotada pelo peptídeo dentro da IDE não pode ser limitada a um caso: A IDE é uma enzima versátil, capaz de quebrar o amilóide em várias posições (val12–his13, his14–gln15, phe19–phe20, lys28–gly29, etc.) permitindo um grande número de conformações. Entretanto, o fato da difração de raios-X mostrar o amilóide interagindo com o sítio ativo através dos resíduos phe19–phe20 sugere que esta configuração é a mais provável.

Nossas simulações mostram que o ATP liga-se na IDE-C e interage com o amilóide, que está conectado na IDE-N, criando um ponte que conecta as duas metades terminais da IDE restringindo o movimento da enzima e substrato. Tais interações induzem mudanças conformacionais no substrato que parecem ser proteoliticamente desfavoráveis para reação catalítica, e contribuem para aumentar a energia de abertura da IDE em, no mínimo, 8 kcal·mol⁻¹. Considerando que o movimento de abertura das enzimas é na ordem da energia

térmica, K_bT (entre 0,5 e 1,0 kcal·mol⁻¹), [160], [161] um aumento de 8 kcal·mol⁻¹ no processo de abertura é o suficiente para prender a enzima na conformação fechada.

Os dados apresentados são, na verdade, insuficientes para descrever um movimento em grande escala, como é o movimento de abertura da IDE. Esta suposição poderia ser completamente refinada calculando a energia da transição conformacional da IDE-A β 42 fechada para aberta na ausência e presença do ATP. Atualmente, estamos investigando esta transição usando o método *Nudged Elastic Band* (NEB) [162] e simulações de dinâmica molecular com *Umbrella Sampling* [135], [136] para clarificar esses efeitos.

A ideia de o mecanismo de inibição da IDE pelo ATP na quebra do amilóide ocorrer através de um efeito que favoreça a forma fechada da IDE não é o primeiro exemplo deste tipo de inibição. A literatura relata efeitos similares em proteínas que tem o mesmo comportamento. Por exemplo, a enzima *fosfotransferase adenylate kinase* (AdK) é uma proteína multiconfiguracional que muda o panorama conformacional com a ligação do inibidor. [161] De acordo com os autores, no estado ligado, as interações do inibidor com as duas metades da AdK favorecem a forma fechada, enquanto que a forma aberta da enzima é favorecida no estado não-ligado. Juntos, esses efeitos reduzem o ciclo catalítico e levam a uma aparente redução da afinidade da IDE pelo amilóide, em concordância com os dados experimentais.

4.1.3 Conclusões

O mecanismo de inibição da IDE pelo ATP durante a proteólise do A β 42 foi estudado. Nós avaliamos as mudanças estruturais do sistema IDE ligado ao A β 42 na presença e ausência do ATP ligado ao sítio catiônico, bem como na presença de cinco unidades extras de Na⁺ e Cl⁻. A dinâmica revela a existência de três sítios de ligação dos íons cloreto dentro da cavidade catalítica, e um desses sítios coincide com o local de ligação do ATP. A presença dos íons cloreto, apesar de favorecer a abertura da IDE, induz mudanças conformacionais que podem comprometer a atividade enzimática. Por outro lado, o ATP interage com A β 42 para criar uma conexão entre as duas metades da enzima, capaz de prender a IDE na forma fechada. Estes efeitos só ocorrem na presença de substratos longos capazes de interagir simultaneamente com a IDE-N e a IDE-C por intermédio do ATP. Mudanças estruturais foram

também detectadas em nossas análises. Na presença dos íons a interação TYR831–phe19, importante durante o processo de reconhecimento, fixação do substrato e estabilização dos intermediários da reação, é perdida, comprometendo o desempenho da reação catalítica.

A possibilidade da inibição ocorrer com o substrato dentro da câmara catalítica abre novas perspectivas para a modelagem de drogas contra a DA, que atuem bloqueando o sítio catiônico, aumentando assim a atividade enzimática. Novos estudos experimentais devem ser desenvolvidos para evidenciar a presença simultânea do amilóide e ATP dentro da IDE.

4.2 Elucidação do Mecanismo de Degradação do A β 42 pela IDE na Ausência e Presença do ATP

4.2.1 Resultados

Nesta sessão, o mecanismo da reação de degradação do amilóide pela IDE foi simulado na ausência (condição natural) e presença do ATP na tentativa de elucidar o perfil das reações usando uma representação atômica completa. Primeiramente, calculamos a superfície de energia-livre da reação para investigar o panorama da reação, determinar o caminho reacional e a etapa determinante da reação enzimática. Investigamos o efeito do ATP em termos da estrutura, carga e velocidade de reação. A superfície de energia-livre (SEL) obtida com a varredura bidimensional das coordenadas C6–O1 e N7–H2 na ausência e presença do ATP podem ser visualizados nas **Figura 28** e **Figura 29**, respectivamente. Os perfis de energia podem ser alternativamente visualizados na **Figura 30**. A estrutura dos reagentes, intermediários, os estados de transição e o produto da reação são mostrados na **Figura 31** (sem ATP) e **Figura 32** (com ATP).

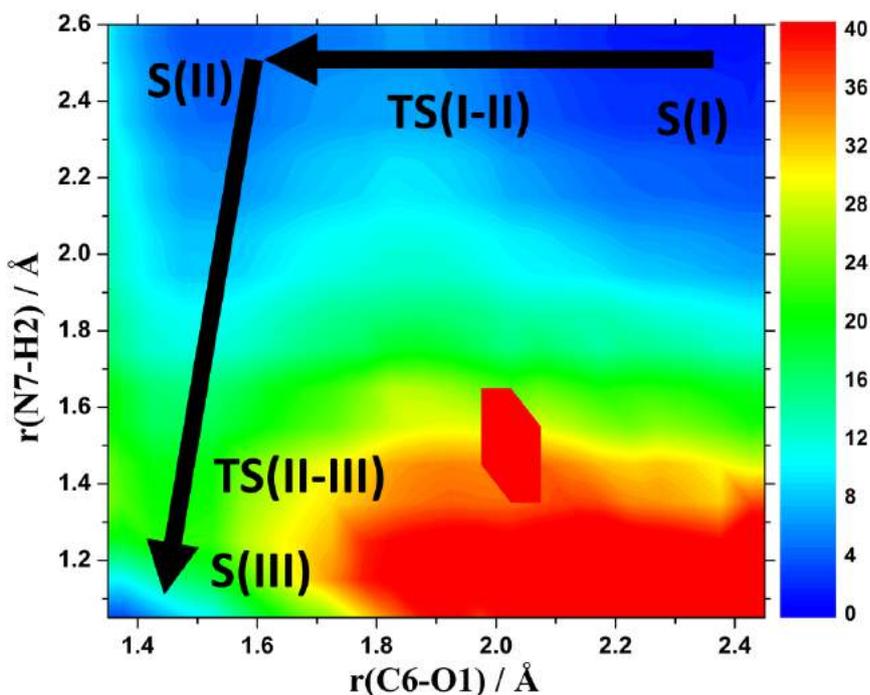


Figura 28: Superfície de energia-livre da reação de degradação do amilóide na ausência do ATP. O caminho de menor energia sugerido e o rótulo das estruturas da reação são mostrados na figura

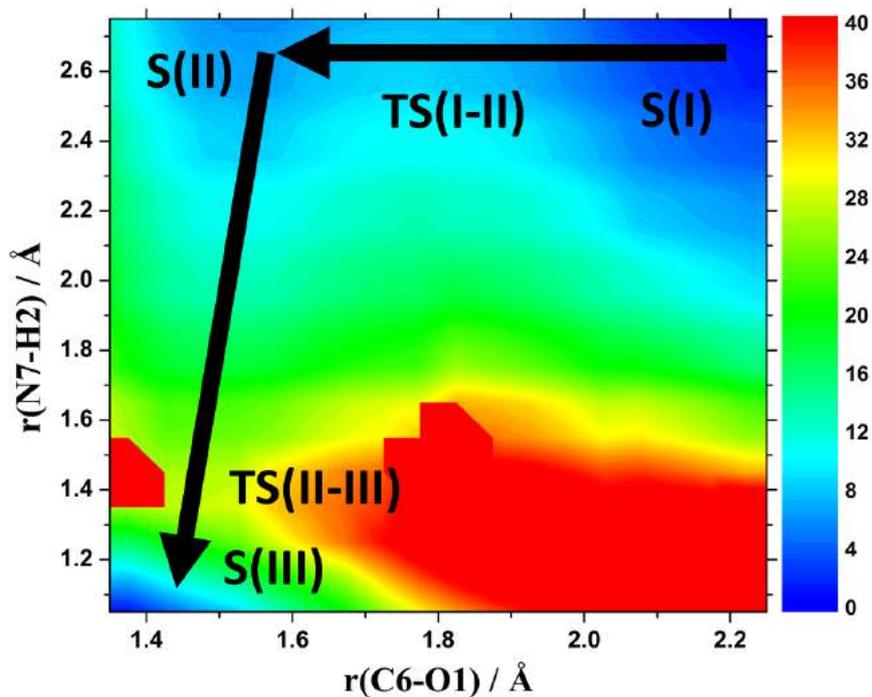


Figura 29: Superfície de energia-livre da reação de degradação do amilóide na presença do ATP. O caminho de menor energia sugerido e o rótulo das estruturas da reação são mostrados na figura.

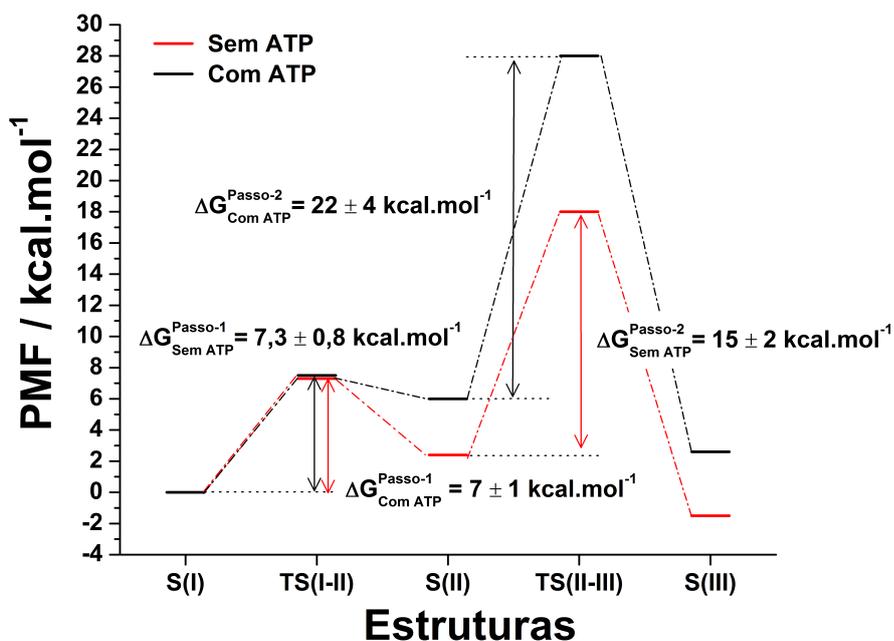


Figura 30: Perfil de energia-livre ao longo do caminho de menor energia na ausência e presença do ATP.

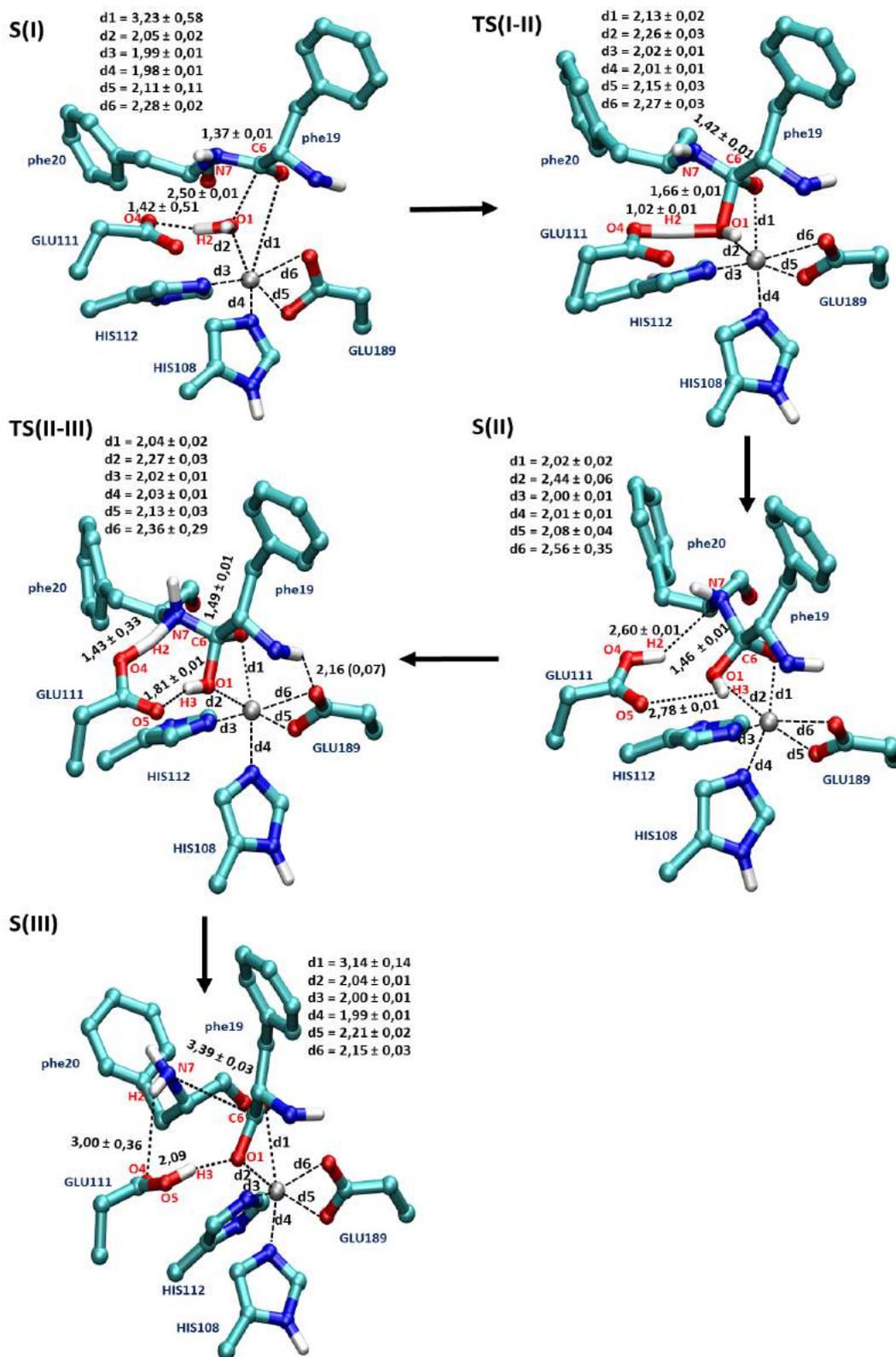


Figura 31: Estruturas da reação na ausência do ATP. Reagente: S(I), estado de transição do passo-1: TS(I-II), intermediário: S(II), estado de transição do passo-2: TS(II-III) e produto: S(III). O valor médio e o erro padrão das principais distâncias em Ångströms é mostrado.

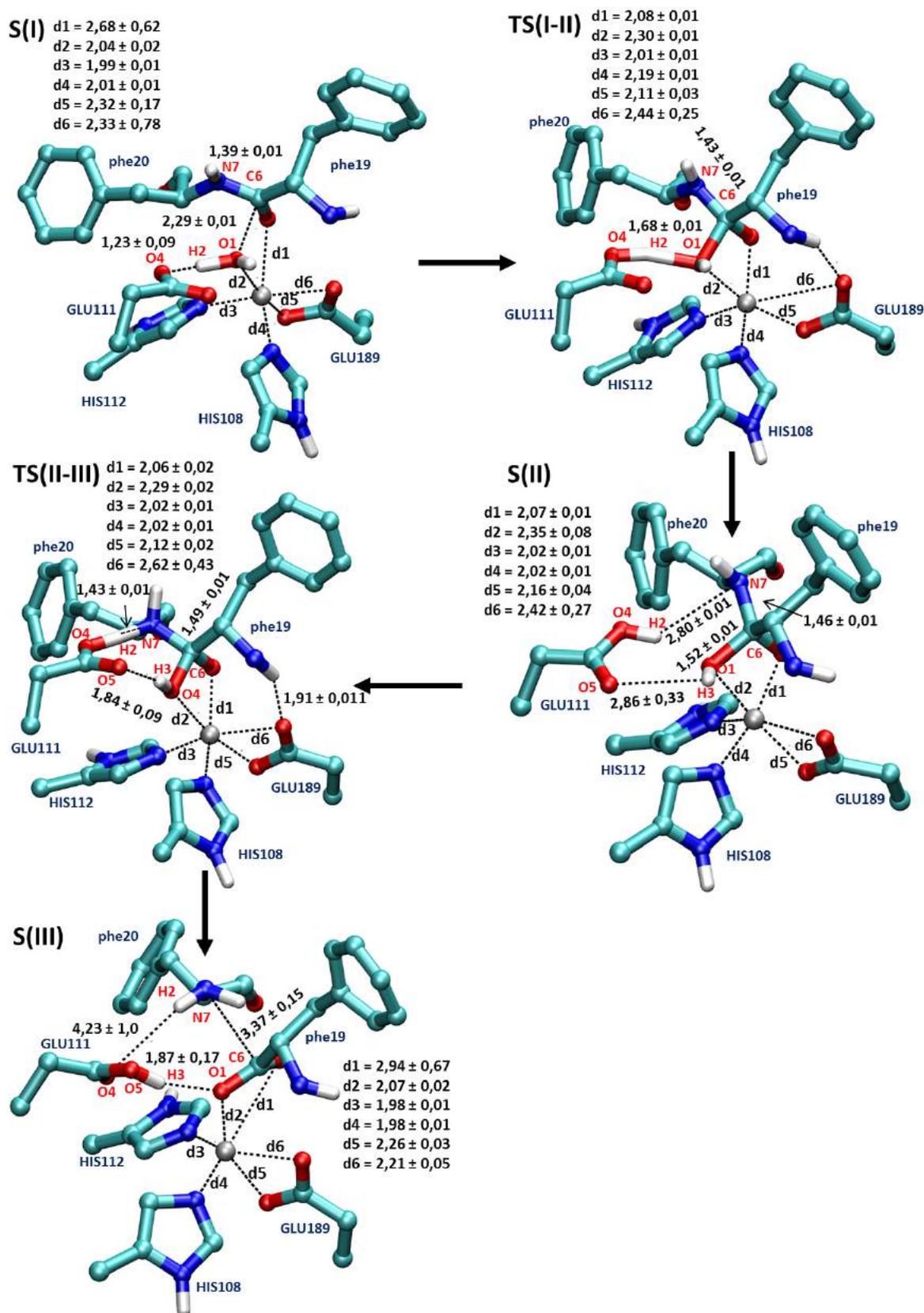


Figura 32: Estruturas da reação na presença do ATP. Reagente: S(I), estado de transição do passo-1: TS(I-II), intermediário: S(II), estado de transição do passo-2: TS(II-III) e produto: S(III). O valor médio e o erro padrão das distâncias em Ångströms é mostrado.

4.2.1.1 Superfície de Energia-Livre

É possível identificar na SEL (**Figura 28** e **Figura 29**) que o caminho de menor energia é compatível com uma reação de dois passos (passo 1 e 2): o primeiro, representado pela redução da coordenada $r(\text{C6-O1})$, resulta na ativação da molécula de água reativa e formação do intermediário gen-diol, e o segundo passo, representada pela redução da coordenada $r(\text{N7-H2})$, é caracterizado pela quebra da ligação peptídica do substrato, quer na presença ou ausência do ATP. Os mecanismos e o perfil de energia das reações serão descritos com detalhes nas próximas seções.

4.2.1.2 Perfil da Reação

De acordo com o caminho de menor energia, no passo-1, representado pela redução da coordenada $r(\text{C6-O1})$, a carbonila do aminoácido phe19 (C6) ataca o oxigênio da molécula de água ligada ao zinco (O1), ao mesmo tempo que o oxigênio carboxílico do GLU111 (O4) abstrai o próton da água reativa (H2), levando ao intermediário metaestável S(II) através do estado de transição TS(I-II), como mostrado na **Figura 28**. O último ataque não é controlado em nossas simulações e acontece espontaneamente quando dirigimos o primeiro. No próximo passo, representado pela redução da coordenada $r(\text{N7-H2})$, o GLU111 doa o próton capturado na etapa anterior para o nitrogênio da phe20 (N7), enquanto que o próton H3 é abstraído pelo oxigênio carboxílico do GLU111 (O5). A ligação peptídica phe19-phe20 (C6-N7) é quebrada, gerando o produto da reação S(III) por intermédio do estado de transição TS(II-III). Este mecanismo está de acordo com o mecanismo de reação proposto experimentalmente por David Christianson[64] (**Figura 9**, pág. 28) para a termosilina[163] e sugerido para IDE, reforçando os resultados aqui apresentados.

No reagente, o zinco está coordenado a uma molécula de água, duas histidinas (HIS108 e HIS112) e um glutamato (GLU189) através das ligações d2, d3, d4, d5 e d6 com $2,05 \pm 0,02$, $1,99 \pm 0,01$, $2,11 \pm 0,11$ e $2,28 \pm 0,02$ Å de comprimento, formando um complexo penta-coordenado S(I), como mostrado na **Figura 31**. Nessa estrutura, o substrato está desconectado do sítio ativo, representado pela distância entre o oxigênio da phe19 e o zinco do sítio ativo (d1) de $3,23 \pm 0,58$ Å. No decorrer da reação, o substrato se aproxima do sítio ativo à medida que a coordenada $r(\text{C6-O1})$ é reduzida de $2,50 \pm 0,01$ Å em S(I) para

1,66 ± 0,01 Å em TS(I-II), atingindo um máximo de energia em 7,3 ± 0,8 kcal·mol⁻¹ acima da energia dos reagentes. Neste ponto, o substrato liga-se ao zinco formando a ligação d1 com 2,13 ± 0,02 Å em comprimento, resultando no estado de transição octaédrico, e na polarização e enfraquecimento da ligação peptídica C6–N7, representada pelo aumento da distância de 1,37 ± 0,01 Å em S(I) para 1,42 ± 0,01 Å em TS(I-II). Ao mesmo tempo, o oxigênio O4 move-se em direção ao hidrogênio H2, sugerindo que o ataque nucleofílico e a abstração do próton aconteçam sincronamente: a formação do intermediário metaestável é agora iminente. Em seguida, com a progressiva redução de r(C6–O1), a ligação C6–O1 é formada e o próton H2 é completamente transferido para o GLU111, alcançando um mínimo de energia com 2,4 ± 0,1 kcal·mol⁻¹ acima da energia do reagente. A ligação d6 é alongada de 2,27 ± 0,03 Å em TS(I-II) para 2,56 ± 0,35 Å em S(II), caracterizando a quebra desta ligação e formação de um intermediário metaestável penta-coordenado.

No passo-2, a transferência do próton é conduzida pela redução da coordenada r(N7–H2). Simultaneamente, o oxigênio carboxílico do GLU111 O5 alinha-se com hidrogênio H3 da hidroxila formada no passo anterior (distância O5–H3 igual a 2,78 ± 0,01 Å), indicando que a transferência do próton H2 para N7 acontece ao mesmo tempo da captura do próton H3 pelo GLU111. A distância N7–H2 é reduzida de 2,66 ± 0,01 Å em S(II) para 1,43 ± 0,33 Å em TS(I-II), polarizando e enfraquecendo a ligação peptídica phe19–phe20 do substrato, culminando no sutil aumento dessa ligação de 1,46 ± 0,01 Å em S(II) para 1,49 ± 0,01 Å em TS(II-III). A ligação d6 é reduzida para 2,36 ± 0,29 Å, favorecendo a formação dessa ligação e o estado de transição hexa-coordenado com energia de ativação igual a 15 ± 2 kcal·mol⁻¹. Finalmente, o próton H2 é completamente transferido para o nitrogênio N7 e o átomo H3 definitivamente capturado para o GLU111, resultando na quebra da ligação peptídica phe19–phe20 e formação do produto da reação, S(III). Neste ponto, a energia atinge o menor nível com energia livre global negativa, ΔG, de -1,5 ± 0,6 kcal·mol⁻¹, indicando que a reação enzimática é espontânea e termodinamicamente favorável. Esta última etapa da reação é lenta, sendo, portanto, a etapa determinante da reação.

A função essencial do GLU111 é claramente demonstrada no caminho de menor energia: primeiro como uma base geral para abstrair o próton da água reativa e posteriormente como ácido, para entregar o próton para o nitrogênio do substrato. Baseado

nisso, nós avaliamos as interações do GLU111 com os resíduos vicinais (**Figura 33**). Na estrutura cristalográfica, assim como nas estruturas iniciais, o oxigênio carboxílico da GLU111 interage com o hidrogênio da hidroxila da THR142 via ligação de hidrogênio (GLU111–THR142). No entanto, no decorrer da reação, essa ligação é quebrada. A Figura mostra a ocorrência da interação GLU111–THR142 no reagente S(I), intermediário S(II) e produto S(III), considerando que a ligação de hidrogênio existe apenas quando a distância entre o átomo doador (D) e aceitador (A) é menor que 3,0 Å e o ângulo D-H-A maior que 110°.[146] Verificamos que essas interações são maiores em S(I), quando o GLU111 atua como base, do que em S(II), quando ele atua como ácido, indicando que a ligação de hidrogênio GLU111–THR142 é responsável pela estabilização do grupo carboxílico do GLU111 na primeira etapa da reação.

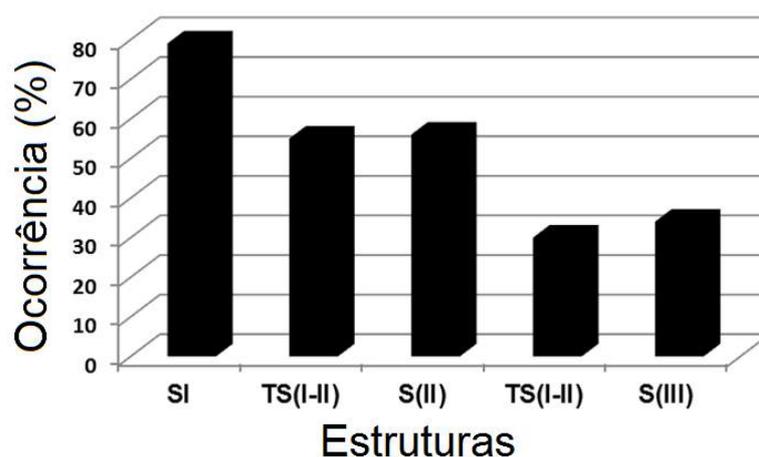


Figura 33: Ocupação da ligação de hidrogênio GLU111–THR142 em porcentagem de estruturas de S(I), TS(I-II), S(II), TS(II-III) e S(III).

4.2.1.3 Efeito do ATP

Assim como na reação sem ATP, a estrutura do reagente na presença do ATP mostra um complexo penta-coordenado, com o zinco ligado a uma molécula de água, duas histidinas e um glutamato, como mostra a **Figura 32**. O mecanismo de reação é similar ao da reação assistida pelo GLU111 sem ATP, mas com mudanças significativas na geometria dos estados de transição, especialmente no TS(II-III). Nessa estrutura, a distância d6 é drasticamente aumentada de $2,42 \pm 0,27$ Å em S(II) para $2,62 \pm 0,43$ Å em TS(II-III), enquanto que a ligação de hidrogênio entre o oxigênio carboxílico do GLU189 e o hidrogênio amino da

phe19 é formada. Com isso, é gerado um estado de transição TS(II-III) penta-coordenado, em contraposição ao TS(II-III) hexa-coordenado gerado na ausência do nucleotídeo. Como resultado, o perfil de energia da reação na presença do ATP tem energias maiores que na ausência do ATP, como mostrado na **Figura 30**. Por exemplo, a maior diferença foi observada na energia de ativação da etapa decisiva da reação, que aumentou de $15 \pm 2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ para $22 \pm 4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (ver **Tabela 5**). Em termos da velocidade da reação, isso representa um fator de aumento igual 10^5 vezes. Efeito similar foi observado na remoção catalítica dos grupos acetil das caudas das histonas pela histona deacetilase zinco-dependente 8 (HDA8), com um íon K^+ localizado a cerca de $7,0 \text{ \AA}$ de distância do íon Zn^{2+} catalítico.[164]

Tabela 5: A energia de ativação da etapa determinante da reação (passo-2) foi calculada subtraindo a energia do TS(II-III) da energia do intermediário, S(II), e a constante cinética relativa usando a Equação 38. Foram usadas as seguintes constantes físicas: constante de Boltzmann (k_B) e temperatura iguais a R e 300 K, respectivamente.

Sistema	$\Delta G_{\text{TS(II-III)}}^\ddagger$ ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$)	k_R
Sem Íons	15 ± 2	10^5
Com ATP	22 ± 4	1

Do ponto de vista estrutural, a interação ATP–substrato induz modificações na região do sítio ativo que afetam, conseqüentemente, o modo de ligação do amilóide no sítio catalítico (**Figura 34**). A diminuição da incidência de TYR831–phe19 e favorecimento da TYR831–ala21, detectada apenas na presença do ATP, aumenta a flexibilidade da phe19 do substrato, interferindo no modo de ligação zinco–substrato. A perda da interação TYR831–phe19 favorece, por sua vez, a troca de coordenação do zinco no TS(II-III) de hexa-coordenado na ausência do ATP para penta-coordenado na presença do ATP, o que resulta no aumento da energia de ativação da etapa decisiva da reação. No produto, a interação

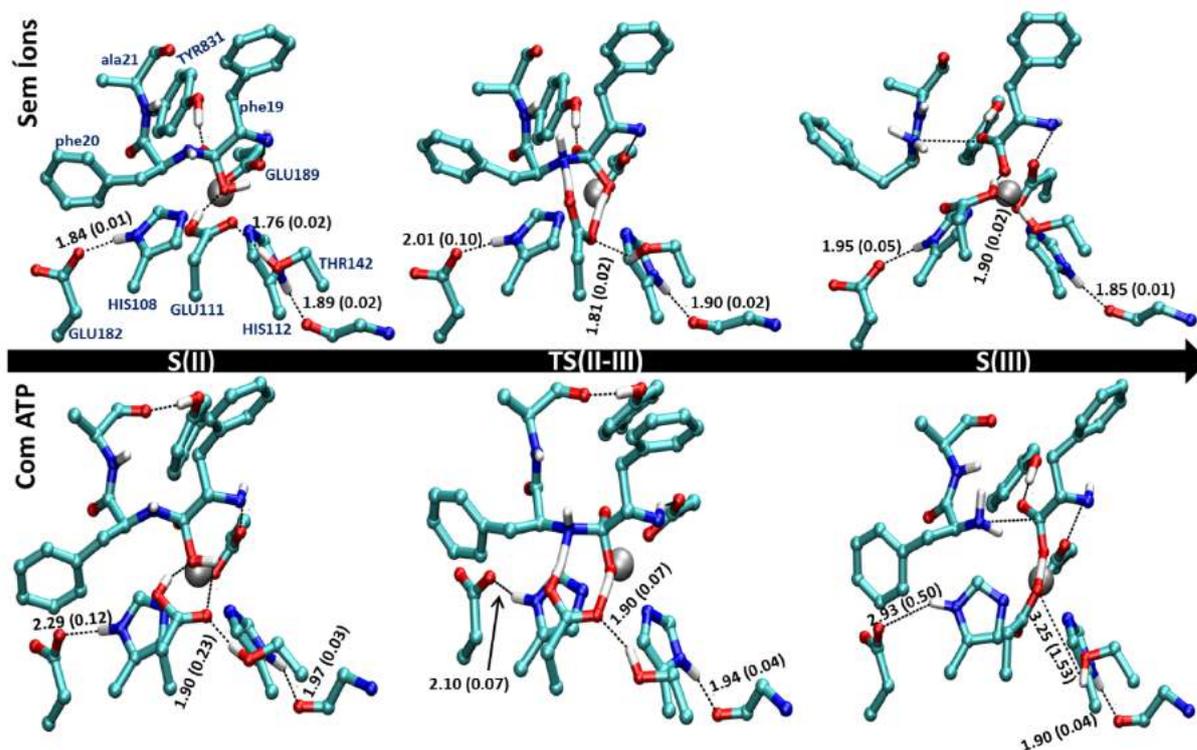


Figura 34: Estrutura da primeira e segunda esfera de coordenação do zinco ao longo do segundo passo da reação. A média do comprimento de ligação é mostrado e o desvio padrão entre parênteses.

TYR831–phe19 é restituída. Outras modificações menores acontecem apenas na presença do ATP, e contribuem também para as mudanças no perfil da reação. Por exemplo, o alongamento da distância HIS108–GLU182 e GLU111–THR142 em S(III) para valores próximos a 3,0 Å, resultando na perda das interações (originalmente responsáveis por estabilizar a estrutura do sítio ativo), justificando a instabilidade do produto na presença do ATP.

Para avaliar o efeito do ATP na reação, analisamos a carga parcial do íon Zn^{2+} e do átomo de nitrogênio N7 no intermediário S(II), ver **Figura 35**. Em princípio, a carga positiva do íon Zn^{2+} polariza e enfraquece as ligações O1–H3 e C6–N7, contribuindo respectivamente para abstração do próton H3 pelo GLU111 e a quebra da ligação peptídica do substrato, fazendo do íon zinco um ácido de Lewis. Ao mesmo tempo, a carga negativa do átomo N7 atua como uma base geral para aceitar o próton H2 do GLU111, fazendo do átomo N7 uma importante base de Lewis. Portanto, a carga mais positiva no Zn faz dele um ácido de Lewis mais forte para ativar a água reativa, enquanto que a carga mais negativa no átomo N7 faz

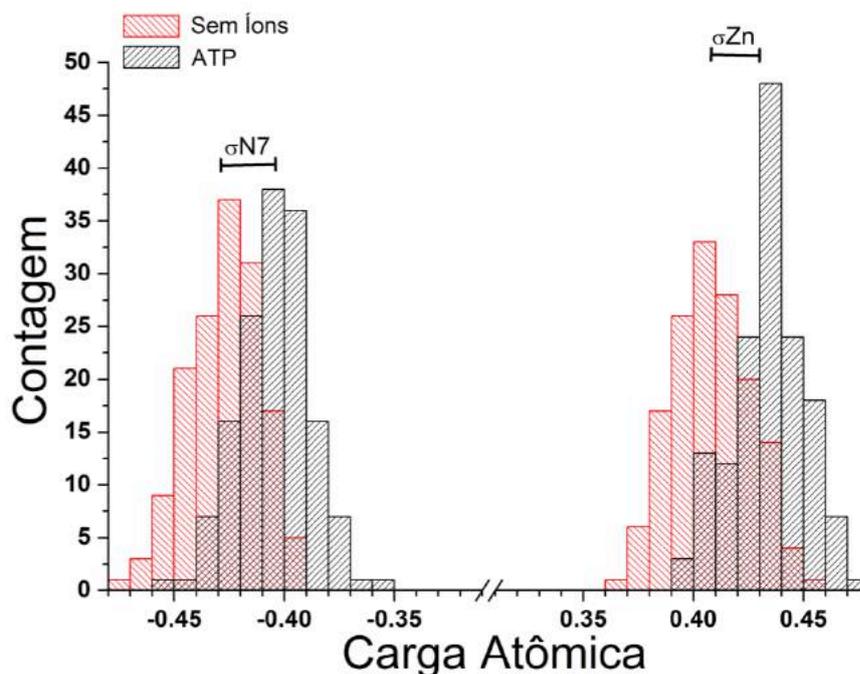


Figura 35: Distribuição da carga atômica do nitrogênio N7 e do íon zinco no intermediário, S(III), da reação catalítica.

dele uma base de Lewis mais forte para abstrair próton. Nossos resultados mostram a redução da carga negativa do nitrogênio N7 na presença do ATP, sugerindo que o N7 é uma base menos efetiva na presença do ATP. Por outro lado, a presença ATP aumenta a carga positiva do Zn, fazendo dele uma ácido de Lewis mais forte do que na ausência do nucleotídeo. Assim, o N7 adquire um caráter menos básico para abstrair o próton H1, enquanto que o Zn possui um caráter mais ácido, facilitando a abstração do próton H2 pelo GLU111. O gráfico mostra a redução da carga negativa do átomo N7, indicando que o caráter básico do nitrogênio é reduzido, desfavorecendo com isso a captura do próton H3 pelo N7. Ao mesmo tempo, observa-se que o caráter ácido do Zn é aumentado, sugerindo que a abstração do próton H3 pelo GLU111 seja facilitada. Estes resultados sugerem que o efeito básico do nitrogênio N7 é predominante e, quando na presença do ATP, contribui para o aumento da energia de ativação TS(II-III).

Esses resultados reforçam as hipóteses levantadas no capítulo anterior, de que a presença do ATP induz modificações conformacionais no substrato levando à uma conformação proteoliticamente ineficiente, reduzindo a velocidade de degradação do

amilóide e mantendo as interações IDE–ATP, ATP–substrato e substrato–IDE, responsáveis por manter a IDE na conformação fechada (inativa).

4.2.2 Discussões

As metaloproteases exercem uma importante função em diversos processos biológicos, incluindo anfigêneses, cicatrização de feridas e na metástases do câncer.[165], [166] A IDE faz parte do mecanismo de limpeza do cérebro e está estreitamente relacionada à patologia de doenças graves, assim como diabetes e a DA.[167] Portanto, entender o seu mecanismo de regulação é fundamental para o planejamento racional de fármacos que atuem na patologia dessas doenças.

O mecanismo desta reação foi anteriormente estudado por modelos supramoleculares da IDE complexada com o amilóide na tentativa de estimar as energias dos estados estacionários e críticos da reação catalítica.[168] Nesses estudos, os autores consideraram apenas os principais aminoácidos envolvidos na reação: a tríade de aminoácidos ligados ao zinco, a molécula de água ligada ao metal, o aminoácido catalítico GLU111, o próprio Zn, e o par de resíduos phe19–phe20 cuja ligação peptídica será quebrada. Algumas aproximações são incluídas no modelo para mimetizar a enzima, como, por exemplo, o uso de uma constante dielétrica igual a 4,3 (correspondente ao do éter). Além disso, os autores usaram restrições posicionais nos carbonos- α para prender a geometria na sua posição experimental. O mecanismo de reação seguido é muito similar ao proposto nesta tese; no entanto, as energias envolvidas neste processo em nada se comparam com as apresentadas aqui. No modelo proposto por Bora, a degradação ocorre em três passos: o primeiro associado a ativação da molécula de água, o segundo é a formação do intermediário gen-diol e o terceiro resulta na quebra da ligação peptídica do substrato, da quais o passo-1 é a etapa determinante da reação e ocorre com energia de ativação igual a $16,6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Os processos seguintes ocorrem com energias de ativação menores que $10,0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Em nossas simulações, descobrimos dois mecanismos de reação: o mecanismo assistido pelo GLU111 e o mecanismo não-assistido pelo GLU111, sendo o primeiro de menor energia. O mecanismo assistido pela GLU111 acontece em dois passos: o primeiro passo culmina na formação do intermediário metaestável gen-diol e tem

energia de ativação aproximadamente igual a $7,3 \pm 0,8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, e o segundo passo leva à quebra da ligação peptídica e ocorre com energia de ativação igual a $15 \pm 2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, sendo portanto a etapa decisiva da reação. A função do aminoácido THR142 foi descoberto através dessa descrição atomística: estabilização do GLU111.

Na presença do ATP, o mecanismo de reação também acontece em dois passos, e o segundo passo é a etapa determinante da reação com energia de ativação igual a $22 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, sendo $7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ maior do que na ausência do nucleotídeo. Essa energia é maior que as energias de ativação dos na ausência do ATP. Isto reflete a importância da análise da superfície de energia-livre da reação e da descrição atomística completa da enzima e substrato na determinação do perfil de reações enzimáticas.

A velocidade da reação na presença do ATP é reduzida em função do aumento da energia de ativação da etapa determinante da reação. A princípio, dois fatores poderiam contribuir para este resultado: o desbalanceamento das cargas do centro catalítico e/ou a perda da interação TYR831–phe19. Notamos que a carga negativa do ATP modifica a distribuição de carga na região do sítio ativo, reduzindo o caráter básico do nitrogênio N7, essencial na etapa determinante da reação, e que a perda da interação TYR831–phe19, importante para a estabilização dos intermediários da reação catalítica, fixação e conhecimento do substrato,[66], [140] contribuem juntamente para as mudanças do perfil da reação.

A constante de velocidade é um parâmetro pode ser usado para estimar a velocidade das reações, e é calculado teoricamente usando métodos de química computacional. Estudos experimentais mostram que a constante cinética da IDE sem ATP é alta para pequenos peptídeos, com valores maiores que 2.000 s^{-1} , e pequenas para substratos longos, tal qual a insulina, com cerca de $0,56 \text{ min}^{-1}$. [59], [169] Supomos que o tempo de abertura e fechamento da IDE em ambos os casos seja semelhante, diferenciando apenas o tempo de reconhecimento e ligação do substrato, uma vez que um substrato grande requer um nível maior de organização do que um substrato pequeno. Por exemplo, para ligar-se à IDE, um substrato grande precisa interagir primeiramente com o sítio distal e posteriormente com o sítio ativo. Por outro lado, duas unidades de um substrato pequeno ligam-se diretamente no sítio distal e ativo cada, produzindo o mesmo efeito ativador de um substrato grande –

ativação alostérica homotrópica simétrica.[170], [171] Portanto, o tempo de reconhecimento nestes casos determina a eficiência da IDE.

Na presença do ATP, a degradação do substrato grande é inibida e a do substrato pequeno é aumentada.[50], [172] Nessas circunstâncias, o ATP elimina a ativação alostérica simétrica, e exibe um mecanismo de ativação alostérica sequencial.[173] No caso de um substrato grande, vimos que o ATP interage com a cauda C-terminal do substrato criando uma ponte que conecta e mantém as metades da enzima na conformação fechada e induz modificações estruturais no substrato e na IDE que levam a uma configuração proteoliticamente ineficiente, reduzindo a constante de velocidade da reação. Neste caso, a constante cinética é limitada pela velocidade do movimento de abertura e fechamento da IDE e pelo tempo necessário para o reconhecimento e ligação do substrato.

4.2.3 Conclusões

Do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo realizado para a determinação do mecanismo de degradação do A β 42 pela IDE considerando o ambiente completo da enzima e na presença do ATP. A reação de energia mínima acontece em duas etapas. A primeira envolve a ativação da molécula de água e a formação do complexo tetragonal gen-diol, enquanto que a segunda está relacionada com a quebra da ligação peptídica, sendo esta a etapa determinante da reação com energia de ativação igual a $15 \pm 2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. A presença do ATP aumenta a energia de ativação da etapa determinante em $7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ e reduz a velocidade catalítica da reação em um fator de 10^5 , determinando a inatividade enzimática.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O mecanismo regulatório da IDE pelo ATP é estudado há mais uma década, porém pouco se sabe sobre os fenômenos que regem o comportamento enzimático.

O ATP ativa a IDE na quebra de substratos pequenos e ao mesmo tempo inibe a enzima na quebra de substratos longos. Esta ambiguidade produz efeitos distintos que tornam a IDE seletiva ao tamanho do substrato. Atualmente, sabe-se que a presença do ATP troca o estado de agregação da IDE de dímeros para monômeros. O ATP liga-se no sítio catiônico localizado na IDE-C, não interage com um *substrato pequeno* e quebra o suposto equilíbrio eletrostático que mantém a IDE na forma fechada, aumentando a população de enzimas na conformação aberta (ativa). O mesmo efeito é observado para outros íons. No entanto, pouco se sabe sobre o mecanismo de inibição da IDE pelo ATP na quebra de *substratos longos*. Sabe-se, apenas, que a inibição depende de interações entre o IDE-ATP, é alostérica e resulta na redução da afinidade da enzima pelo substrato. Com base nisso propomos o primeiro modelo molecular da IDE complexada com o A β 42 e o ATP na tentativa de elucidar o seu mecanismo de inibição. Os resultados de DM mostram que o complexo IDE-A β 42 mais ATP é estável e que a manutenção de interações específicas entre o a IDE, ATP e A β 42 favorecem a forma inativa da enzima. Essas implicações são reforçadas pelo fato de que o ATP reduz a velocidade da reação proteolítica, aumentando, assim, o tempo de vida do substrato dentro da câmara catalítica e das interações que mantêm a enzima na conformação inativa.

É evidente que o trabalho apresentado depende unicamente da presença do ATP e do A β 42 dentro da IDE, algo que até então não foi confirmado experimentalmente. Mas é razoável supor que ambos, ATP e A β 42, possam estar ligados simultaneamente na IDE, uma vez que o sítio catiônico está localizado na IDE-C e o sítio catalítico, no qual o A β 42 se liga, está localizado na outra metade da enzima. A grande distância entre esses sítios nos faz crer que a ligação do ATP é independente da ligação do A β 42 na IDE e vice-versa.

6. PERSPECTIVAS

Foi mostrado no capítulo 3 que a IDE comporta-se de forma diferente quando na presença dos íons e das interações IDE, ATP e A β 42. Os movimentos da enzima são reduzidos na presença do ATP e das suas interações com a IDE e o substrato e aumentados em solução salina de cloreto de sódio. Suspeitamos que este comportamento esteja associado ao desfavorecimento no caso do ATP ou, no caso dos íons cloreto, favorecimento do movimento de abertura da IDE. Embora os resultados sejam coerentes, o tempo de simulação não permite julgar com clareza todas as suposições levantadas, tornando necessária uma abordagem mais abrangente. Portanto, pretendemos determinar a energia livre da transição conformacional da IDE fechada para aberta nos seguintes sistemas: IDE livre, na presença do amilóide, no sistema IDE–A β 42 mais ATP e em solução salina.

6.1 Estrutura da IDE aberta

Em primeiro lugar, para construir o perfil energético da transição conformacional da IDE fechada para aberta, são necessárias as estruturas inicial e final da coordenada de reação, i.e., das conformações da IDE aberta e fechada. No entanto, apenas a IDE na conformação fechada é disponível atualmente nos bancos de dados de estrutura cristalográfica. A pitrilisina é uma proteína da mesma família da IDE, de tamanho compatível, com 30% de homologia, morfológicamente e funcionalmente semelhante à IDE. Mas, diferentemente da IDE, apenas a conformação aberta da pitrilisina foi determinada experimentalmente, tornando-a um excelente molde para a modelagem molecular por homologia.

Pretendemos construir a IDE aberta usando a pitrilisina como molde para modelagem molecular por homologia. Após a completa validação e estabilização estrutural da IDE aberta, daremos início aos cálculos de abertura da IDE.

6.2 Abertura da IDE

A estrutura da IDE é complexa e a sua abertura envolve um grande número de variáveis, tornando o mecanismo de abertura da IDE um desafio metodológico e

computacional. Em vista desta dificuldade, combinaremos o método *Nudged Elastic Band* (NEB) e o *Replica Exchange Molecular Dynamics* (REMD) para determinar a energia livre da abertura da IDE complexada com o A β 42 (IDE–A β 42), IDE–A β 42 na presença do ATP (IDE–A β 42+ATP) e a IDE+A β 42 em solução de NaCl (IDE–A β 42+NaCl). Nestes métodos, várias estruturas são combinadas ao longo do caminho reacional e conectadas umas às outras por molas. As molas realizam movimentos oscilatórios que estão sujeitos às condições da dinâmica, portanto passíveis de experimentação.

Inicialmente, combinaremos 32 estruturas com constante de força de restrição igual a 50 Kcal·mol⁻¹·Å⁻². Depois de estabelecida a condição ideal da dinâmica, construiremos os perfis reacionais e avaliaremos a barreira de energia livre do processo nos diferentes ambientes estudados.

A hipótese mais aceita atualmente é a de que a presença de íons na câmara catalítica quebra o equilíbrio eletrostático que prende a enzima na conformação fechada. Para verificar essa hipótese, acompanharemos a mudança da energia eletrostática durante o processo de abertura da IDE dos três sistemas investigados. Caso esta hipótese seja confirmada, espera-se que a barreira de transição conformacional da IDE–A β 42 seja menor que a na presença do ATP e maior na presença dos íons, visto que a presença do ATP aumenta as interações intermoleculares entre as metades terminais da enzima, e que os íons Cl⁻ modificam o ambiente eletrostático da IDE a favor da sua conformação aberta.

6.3 Busca por Ativadores da IDE

Os cálculos anteriores fornecerão um conjunto de estruturas equilibradas da IDE na conformação aberta, que serão usadas para encontrar sítios funcionais e pequenas moléculas que favoreçam a forma ativa da IDE (aberta), por meios de técnicas que visam a determinação dos sítios funcionais sem conhecimento prévio da estrutura molecular do ligante e encaixar milhares de moléculas conhecidas nos sítios encontrados através do *screening docking*. Selecionaremos os melhores encaixes moleculares para fazer simulações de dinâmica molecular do sistema IDE complexada com o A β 42 mais a pequena molécula, e analisaremos o raio de giro da enzima ao longo da simulação a fim de averiguar o favorecimento da forma ativa da IDE (aberta).

Essas simulações permitirão um melhor entendimento do funcionamento da IDE, além de evidenciar as contribuições de energia eletrostática para o processo de abertura/fechamento da enzima e fornecer um conjunto de estruturas representativas para realizarmos uma busca por sítios nas superfícies interna e externa da IDE capazes de alojar pequenas moléculas que favoreçam a conformação ativa. A realização e continuidade desta pesquisa ajudarão no desenvolvimento de novas terapias para a DA.

REFERÊNCIAS

- [1] Alzheimer's Association, "Basics of Alzheimer's Disease," London, 2005.
- [2] Alzheimer's Association, "2009: The Year in Alzheimer Science," London, 2009.
- [3] N. Ertekin-Taner, "Amyloid Beta-Protein and the Genetics of Alzheimer's Disease," *Alzheimers. Res. Ther.*, vol. 2, no. 1, p. 3, Jan. 2010.
- [4] Alzheimer's Association, "Alzheimer's Disease Facts And Figures," London, 2012.
- [5] Alzheimer's Disease International, "World Alzheimer Report 2012: Overcoming the stigma of dementia," London, 2012.
- [6] E. Herrera, P. Caramelli, A. Silvia, B. Silveira, and R. Nitrini, "Epidemiologic Survey of Dementia in a Community-Dwelling Brazilian Population," vol. 16, no. 2, pp. 103–108, 2002.
- [7] J. T. Tschanz, C. Corcoran, I. Skoog, A. S. Khachaturian, J. Herrick, K. M. Hayden, K. A. Welsh-Bohmer, T. Calvert, M. C. Norton, P. Zandi, J. C. S. Breitner, and the C. C. S. Group, "Dementia: The leading predictor of death in a defined elderly population," *Neurol.*, vol. 62, no. 7, pp. 1156–1162, Apr. 2004.
- [8] B. P. Imbimbo, S. Ottonello, V. Frisardi, V. Solfrizzi, A. Greco, D. Seripa, A. Pilotto, and F. Panza, "Solanezumab for the treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease.," *Expert Rev. Clin. Immunol.*, vol. 8, no. 2, pp. 135–49, Feb. 2012.
- [9] K. Blennow, H. Zetterberg, J. O. Rinne, S. Salloway, J. Wei, R. Black, M. Grundman, and E. Liu, "Effect of immunotherapy with bapineuzumab on cerebrospinal fluid biomarker levels in patients with mild to moderate Alzheimer disease.," *Arch. Neurol.*, vol. 69, no. 8, pp. 1002–10, Aug. 2012.
- [10] G. A. Kerchner and A. L. Boxer, "Bapineuzumab.," *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 10, no. 7, pp. 1121–30, Jul. 2010.
- [11] A. POLLACK, "http://www.nytimes.com/2014/07/17/business/roche-reports-mixed-results-in-trial-of-an-alzheimers-drug.html?_r=0," *New York Times*, 2014. [Online]. Available: http://www.nytimes.com/2014/07/17/business/roche-reports-mixed-results-in-trial-of-an-alzheimers-drug.html?_r=0.
- [12] B. BERKROT, "Pfizer, J&J scrap Alzheimer's studies as drug fails," *Reuters*, 2012. [Online]. Available: <http://www.reuters.com/article/2012/08/06/us-pfizer-alzheimers-idUSBRE8751F120120806>.
- [13] J. Votano and M. Parham, *Alzheimer's Disease - Advances in Genetics, Molecular and Cellular Biology*. Springer, 2006, p. 286.

- [14] J. Hardy and G. Higgins, "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis," *Science (80-.)*, vol. 256, no. 5054, pp. 184–185, Apr. 1992.
- [15] A. I. Bush, "Metals and neuroscience.," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 4, no. 2, pp. 184–91, Apr. 2000.
- [16] V. P. Reddy, X. Zhu, G. Perry, and M. A. Smith, "Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease.," *J. Alzheimers. Dis.*, vol. 16, no. 4, pp. 763–74, Jan. 2009.
- [17] D. Galimberti, C. Fenoglio, and E. Scarpini, "Inflammation in neurodegenerative disorders: friend or foe?," *Curr. Aging Sci.*, vol. 1, no. 1, pp. 30–41, Mar. 2008.
- [18] G. V De Ferrari and N. C. Inestrosa, "Wnt signaling function in Alzheimer's disease.," *Brain Res. Brain Res. Rev.*, vol. 33, no. 1, pp. 1–12, Aug. 2000.
- [19] R. T. Bartus, R. L. Dean, B. Beer, and A. S. Lippa, "The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction.," *Science*, vol. 217, no. 4558, pp. 408–14, Jul. 1982.
- [20] A. Tiiman, P. Palumaa, and V. Tõugu, "The missing link in the amyloid cascade of Alzheimer's disease - metal ions.," *Neurochem. Int.*, vol. 62, no. 4, pp. 367–78, Mar. 2013.
- [21] T. C. Saido and NetLibray Inc., *A β Metabolism and Alzheimer ' s Disease*. Georgetown, Tex.: Eurekah.com / Landes Bioscienc, 2003, pp. 1–16.
- [22] C. Diego, "A Cascata Sintomatológica: Princípios," *quimicalzheimer*, 2013. .
- [23] H. Lin, R. Bhatia, and R. Lal, "Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology.," *FASEB J.*, vol. 15, no. 13, pp. 2433–44, Nov. 2001.
- [24] A. K. Dunker, I. Silman, V. N. Uversky, and J. L. Sussman, "Function and structure of inherently disordered proteins," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 18, no. 6, pp. 756–764, Dec. 2008.
- [25] J. Baudier and R. Cole, "Phosphorylation of tau proteins to a state like that in Alzheimer's brain is catalyzed by a calcium/calmodulin-dependent kinase and modulated by phospholipids.," *J. Biol. Chem.*, vol. 262, no. 36, pp. 17577–83, Dec. 1987.
- [26] M. Gleichmann and M. P. Mattson, "Neuronal calcium homeostasis and dysregulation.," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 14, no. 7, pp. 1261–73, Apr. 2011.
- [27] J. Hardy and D. J. Selkoe, "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics.," *Science*, vol. 297, no. 5580, pp. 353–6, Jul. 2002.

- [28] S. Oddo, A. Caccamo, L. Tran, M. P. Lambert, C. G. Glabe, W. L. Klein, and F. M. LaFerla, "Temporal profile of amyloid-beta (Abeta) oligomerization in an in vivo model of Alzheimer disease. A link between Abeta and tau pathology.," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 3, pp. 1599–604, Jan. 2006.
- [29] D. M. Walsh, B. P. Tseng, R. E. Rydel, M. B. Podlisny, and D. J. Selkoe, "The Oligomerization of Amyloid β -Protein Begins Intracellularly in Cells Derived from Human Brain[†]," *Biochemistry*, vol. 39, no. 35, pp. 10831–10839, Aug. 2000.
- [30] A. Kinoshita, H. Fukumoto, T. Shah, C. M. Whelan, M. C. Irizarry, and B. T. Hyman, "Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes.," *J. Cell Sci.*, vol. 116, no. Pt 16, pp. 3339–46, Aug. 2003.
- [31] H. Xu, P. Greengard, and S. Gandy, "Regulated formation of Golgi secretory vesicles containing Alzheimer beta-amyloid precursor protein.," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 40, pp. 23243–5, Oct. 1995.
- [32] J. Ghiso, A. Rostagno, J. E. Gardella, L. Liem, and P. D. Gorevictt, "A 109-amino-acid C-terminal fragment of Alzheimer ' s-disease amyloid precursor protein contains a sequence , -RHDS- , that promotes cell adhesion," vol. 288, pp. 1053–1059, 1992.
- [33] A. Granzotto, S. Bolognin, J. Scancar, R. Milacic, and P. Zatta, "Beta-amyloid toxicity increases with hydrophobicity in the presence of metal ions," *Monatshefte für Chemie - Chem. Mon.*, vol. 142, no. 4, pp. 421–430, Mar. 2011.
- [34] S. L. Sabo, a F. Ikin, J. D. Buxbaum, and P. Greengard, "The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement.," *J. Cell Biol.*, vol. 153, no. 7, pp. 1403–14, Jun. 2001.
- [35] F. M. LaFerla, K. N. Green, and S. Oddo, "Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease.," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 8, no. 7, pp. 499–509, Jul. 2007.
- [36] G. Thinakaran and E. H. Koo, "Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function.," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 44, pp. 29615–9, Oct. 2008.
- [37] C. Patterson, J. W. Feightner, A. Garcia, G.-Y. R. Hsiung, C. MacKnight, and A. D. Sadovnick, "Diagnosis and treatment of dementia: 1. Risk assessment and primary prevention of Alzheimer disease.," *CMAJ*, vol. 178, no. 5, pp. 548–56, Feb. 2008.
- [38] J. Näslund, A. Schierhorn, U. Hellman, L. Lannfelt, A. D. Roses, L. O. Tjernberg, J. Silberring, S. E. Gandy, B. Winblad, and P. Greengard, "Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 18, pp. 8378–82, Aug. 1994.
- [39] A. Mukherjee and L. B. Hersh, "Regulation of amyloid beta-peptide levels by enzymatic degradation.," *J. Alzheimers. Dis.*, vol. 4, no. 5, pp. 341–8, Oct. 2002.

- [40] S. Y. Guénette, "Mechanisms of Abeta clearance and catabolism.," *Neuromolecular Med.*, vol. 4, no. 3, pp. 147–60, Jan. 2003.
- [41] A. B. Becker and R. A. Roth, "Insulysin and pitrilysin: Insulin-degrading enzymes of mammals and bacteria," *Methods Enzymol.*, vol. 248, pp. 693–703, 1995.
- [42] F. Authier, B. I. Posner, and J. J. Bergeron, "Insulin-degrading enzyme.," *Clin. Invest. Med.*, vol. 19, no. 3, pp. 149–60, Jun. 1996.
- [43] W. Farris, S. Mansourian, Y. Chang, L. Lindsley, E. a Eckman, M. P. Frosch, C. B. Eckman, R. E. Tanzi, D. J. Selkoe, and S. Guenette, "Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 7, pp. 4162–7, Apr. 2003.
- [44] W. Q. Qiu and M. F. Folstein, "Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis.," *Neurobiol. Aging*, vol. 27, no. 2, pp. 190–8, Feb. 2006.
- [45] H.-G. Bernstein, S. Ansorge, P. Riederer, M. Reiser, L. Frölich, and B. Bogerts, "Insulin-degrading enzyme in the Alzheimer's disease brain: prominent localization in neurons and senile plaques," *Neurosci. Lett.*, vol. 263, no. 2–3, pp. 161–164, Mar. 1999.
- [46] I. A. MIRSKY and R. H. BROH-KAHN, "The inactivation of insulin by tissue extracts; the distribution and properties of insulin inactivating extracts.," *Arch. Biochem.*, vol. 20, no. 1, pp. 1–9, Jan. 1949.
- [47] P. Li, W.-L. Kuo, M. Yousef, M. R. Rosner, and W.-J. Tang, "The C-terminal domain of human insulin degrading enzyme is required for dimerization and substrate recognition," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 343, no. 4, pp. 1032–1037, May 2006.
- [48] N. Noinaj, E. S. Song, S. Bhasin, B. J. Alper, W. K. Schmidt, L. B. Hersh, and D. W. Rodgers, "Anion Activation Site of Insulin-degrading Enzyme," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 1, pp. 48–57, Nov. 2011.
- [49] M. C. Camberos, A. Perez, A. A. Pérez, D. P. Udrisar, M. I. Wanderley, and J. C. Cresto, "ATP inhibits insulin-degrading enzyme activity.," *Exp. Biol. Med. (Maywood).*, vol. 226, no. 4, pp. 334–41, Apr. 2001.
- [50] M. Camberos and A. Perez, "ATP inhibits insulin-degrading enzyme activity," *Exp. Biol. Med.*, vol. 226, no. 4, pp. 334–41, Apr. 2001.
- [51] Y. Shen, A. Joachimiak, M. R. Rosner, and W.-J. Tang, "Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism.," *Nature*, vol. 443, no. 7113, pp. 870–4, Oct. 2006.

- [52] M. Manolopoulou, Q. Guo, E. Malito, A. B. Schilling, and W.-J. Tang, "Molecular basis of catalytic chamber-assisted unfolding and cleavage of human insulin by human insulin-degrading enzyme.," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 21, pp. 14177–88, May 2009.
- [53] H. Im, M. Manolopoulou, E. Malito, Y. Shen, J. Zhao, M. Neant-Fery, C.-Y. Sun, S. C. Meredith, S. S. Sisodia, M. A. Leissring, and W.-J. Tang, "Structure of substrate-free human insulin-degrading enzyme (IDE) and biophysical analysis of ATP-induced conformational switch of IDE.," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 35, pp. 25453–63, Aug. 2007.
- [54] J. P. Maianti, A. McFedries, Z. H. Foda, R. E. Kleiner, X. Q. Du, M. a Leissring, W.-J. Tang, M. J. Charron, M. a Seeliger, A. Saghatelian, and D. R. Liu, "Anti-diabetic activity of insulin-degrading enzyme inhibitors mediated by multiple hormones.," *Nature*, May 2014.
- [55] M. A. Leissring, E. Malito, S. Hedouin, L. Reinstatler, T. Sahara, S. O. Abdul-Hay, S. Choudhry, G. M. Maharvi, A. H. Fauq, M. Huzarska, P. S. May, S. Choi, T. P. Logan, B. E. Turk, L. C. Cantley, M. Manolopoulou, W.-J. Tang, R. L. Stein, G. D. Cuny, and D. J. Selkoe, "Designed inhibitors of insulin-degrading enzyme regulate the catabolism and activity of insulin.," *PLoS One*, vol. 5, no. 5, p. e10504, Jan. 2010.
- [56] F. G. Hamel, R. G. Bennett, and W. C. Duckworth, "Regulation of multicatalytic enzyme activity by insulin and the insulin-degrading enzyme.," *Endocrinology*, vol. 139, no. 10, pp. 4061–6, Oct. 1998.
- [57] J.-P. Lee, K.-C. Cheng, H.-H. Chung, H.-T. Wu, C.-T. Chen, and J.-T. Cheng, "Inhibition of insulin degrading enzyme by racecadotril in the brain of Wistar rats.," *Horm. Metab. Res.*, vol. 43, no. 7, pp. 489–93, Jun. 2011.
- [58] C. Cabrol, M. A. Huzarska, C. Dinolfo, M. C. Rodriguez, L. Reinstatler, J. Ni, L.-A. Yeh, G. D. Cuny, R. L. Stein, D. J. Selkoe, and M. A. Leissring, "Small-Molecule Activators of Insulin-Degrading Enzyme Discovered through High-Throughput Compound Screening," *PLoS One*, vol. 4, no. 4, p. e5274, Jan. 2009.
- [59] E.-S. Song, M. A. Juliano, L. Juliano, and L. B. Hersh, "Substrate activation of insulin-degrading enzyme (insulysin). A potential target for drug development.," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 50, pp. 49789–94, Dec. 2003.
- [60] E. Gerasimovskaya and E. Kaczmarek, *Extracellular ATP and adenosine as regulators of endothelial cell function: Implications for health and disease*, 1st ed. Springer, 2010, p. 248.
- [61] M. Del Carmen Camberos and J. C. Cresto, "Insulin-degrading enzyme hydrolyzes ATP.," *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, vol. 232, no. 2, pp. 281–92, Feb. 2007.

- [62] E.-S. Song, M. A. Juliano, L. Juliano, and L. B. Hersh, "Substrate activation of insulin-degrading enzyme (insulysin). A potential target for drug development.," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 50, pp. 49789–94, Dec. 2003.
- [63] C. Cabrol, M. a Huzarska, C. Dinolfo, M. C. Rodriguez, L. Reinstatler, J. Ni, L.-A. Yeh, G. D. Cuny, R. L. Stein, D. J. Selkoe, and M. a Leissring, "Small-molecule activators of insulin-degrading enzyme discovered through high-throughput compound screening.," *PLoS One*, vol. 4, no. 4, p. e5274, Jan. 2009.
- [64] D. W. Christianson and W. N. Lipscomb, "Carboxypeptidase A," *Acc. Chem. Res.*, vol. 22, no. 2, pp. 62–69, Feb. 1989.
- [65] R. P. Bora, M. Ozbil, and R. Prabhakar, "Elucidation of insulin degrading enzyme catalyzed site specific hydrolytic cleavage of amyloid beta peptide: a comparative density functional theory study.," *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 15, no. 4, pp. 485–95, May 2010.
- [66] G. Grasso, E. Rizzarelli, and G. Spoto, "Human Insulin-Degrading Enzyme Working Mechanism," *J. Mass Spectrom.*, vol. 44, no. 5, pp. 735–41, May 2009.
- [67] A. Grossfield, "WHAM: the weighted histogram analysis method, version 2.0.9, <http://membrane.urmc.rochester.edu/content/wham>." 2013.
- [68] C. Cramer, *Essentials of computational chemistry: theories and models*, Second Edi. West Sussex: John Wiley & Sons, Inc., 2013, p. 670.
- [69] F. Jensen, *Introduction to computational chemistry*, Second Edi. 1999.
- [70] A. R. Leach, *Molecular Modelling: Principles and Applications*, Second edi., vol. 2, no. 2. Prentice Hall, 2001, p. 784.
- [71] N. L. Allinger, "Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 99, no. 25, pp. 8127–8134, Dec. 1977.
- [72] N. L. Allinger, Y. H. Yuh, and J. H. Lii, "Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. 1," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 111, no. 23, pp. 8551–8566, Nov. 1989.
- [73] MacKerell A. D., D. Bashford, Bellott, Dunbrack R. L., J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F. T. K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D. T. Nguyen, B. Prodhom, W. E. Reiher, B. Roux, M. Schlenkrich, J. C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiórkiewicz-Kuczera, D. Yin, and M. Karplus, "All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins†," *J. Phys. Chem. B*, vol. 102, no. 18, pp. 3586–3616, Apr. 1998.

- [74] J. Hermans, H. J. C. Berendsen, W. F. Van Gunsteren, and J. P. M. Postma, "A consistent empirical potential for water-protein interactions," *Biopolymers*, vol. 23, no. 8, pp. 1513–1518, 1984.
- [75] S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. A. Case, U. C. Singh, C. Ghio, G. Alagona, S. Profeta, and P. Weiner, "A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 106, no. 3, pp. 765–784, Feb. 1984.
- [76] D. a. Pearlman, D. a. Case, J. W. Caldwell, W. S. Ross, T. E. Cheatham, S. DeBolt, D. Ferguson, G. Seibel, and P. Kollman, "AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules," *Comput. Phys. Commun.*, vol. 91, no. 1–3, pp. 1–41, Sep. 1995.
- [77] M. Elstner, D. Porezag, G. Jungnickel, J. Elsner, M. Haugk, T. Frauenheim, S. Suhai, and G. Seifert, "Self-consistent-charge density-functional tight-binding method for simulations of complex materials properties," *Phys. Rev. B*, vol. 58, no. 11, pp. 7260–7268, Sep. 1998.
- [78] W. Kohn, A. D. Becke, and R. G. Parr, "Density Functional Theory of Electronic Structure," vol. 0, no. 96, pp. 12974–12980, 1996.
- [79] D. Porezag, T. Frauenheim, T. Köhler, G. Seifert, and R. Kaschner, "Construction of tight-binding-like potentials on the basis of density-functional theory: Application to carbon," *Phys. Rev. B*, vol. 51, no. 19, pp. 12947–12957, May 1995.
- [80] X. Zhang, S. Y. Reddy, and T. C. Bruice, "Mechanism of methanol oxidation by quinoprotein methanol dehydrogenase," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, no. 3, pp. 745–749, 2007.
- [81] X. Zhang and T. C. Bruice, "Diels-Alder ribozyme catalysis: a computational approach.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 4, pp. 1001–7, Jan. 2007.
- [82] Q. Xu, H. Guo, A. Wlodawer, and H. Guo, "The importance of dynamics in substrate-assisted catalysis and specificity.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 18, pp. 5994–5, May 2006.
- [83] L. Walewski, D. Krachtus, S. Fischer, J. C. Smith, P. Bala, and B. Lesyng, "SCC-DFTB energy barriers for single and double proton transfer processes in the model molecular systems malonaldehyde and porphycene," *Int. J. Quantum Chem.*, vol. 106, no. 3, pp. 636–640, 2006.
- [84] G. de M Seabra, R. C. Walker, M. Elstner, D. A. Case, A. E. Roitberg, and G. M. Seabra, "Implementation of the SCC-DFTB method for hybrid QM/MM simulations within the amber molecular dynamics package.," *J. Phys. Chem. A*, vol. 111, no. 26, pp. 5655–64, Jul. 2007.

- [85] M. Elstner, "The SCC-DFTB method and its application to biological systems," *Theor. Chem. Acc.*, vol. 116, no. 1–3, pp. 316–325, Dec. 2005.
- [86] M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, and J. J. P. Stewart, "Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 107, no. 13, pp. 3902–3909, Jun. 1985.
- [87] J. J. P. Stewart, "Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method," *J. Comput. Chem.*, vol. 10, no. 2, pp. 209–220, Mar. 1989.
- [88] M. Head-Gordon, J. A. Pople, and M. J. Frisch, "MP2 energy evaluation by direct methods," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 153, no. 6, pp. 503–506, Dec. 1988.
- [89] N. Reuter, A. Dejaegere, B. Maigret, M. Karplus, and I. Nancy, "Frontier Bonds in QM / MM Methods : A Comparison of Different Approaches," pp. 1720–1735, 2000.
- [90] J. Gao and P. Amara, "A generalized hybrid orbital (GHO) method for the treatment of boundary atoms in combined QM/MM calculations," *J. Phys. Chem. A*, vol. 5639, no. 98, pp. 4714–4721, 1998.
- [91] D. a Case, T. E. Cheatham, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K. M. Merz, A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang, and R. J. Woods, "The Amber biomolecular simulation programs," *J. Comput. Chem.*, vol. 26, no. 16, pp. 1668–88, Dec. 2005.
- [92] L. Verlet, "Computer 'Experiments' on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules," *Phys. Rev.*, vol. 159, no. 1, pp. 98–103, Jul. 1967.
- [93] W. C. Swope, "A computer simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules: Application to small water clusters," *J. Chem. Phys.*, vol. 76, no. 1, p. 637, 1982.
- [94] T. E. I. Cheatham, J. L. Miller, T. Fox, T. A. Darden, and P. A. Kollman, "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.*, vol. 117, no. 14, pp. 4193–4194, Apr. 1995.
- [95] S. A. Adelman and J. D. Doll, "Generalized Langevin equation approach for atom/solid-surface scattering: General formulation for classical scattering off harmonic solids," *J. Chem. Phys.*, vol. 64, no. 6, pp. 2375–2388, 1976.
- [96] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, and J. R. Haak, "Molecular dynamics with coupling to an external bath," *J. Chem. Phys.*, vol. 81, no. 8, p. 3684, 1984.

- [97] R. Zhou, "Global Structure Analysis," *Gezelter Lab University of Notre Dame*, 2005. [Online]. Available: <http://www3.nd.edu/~gezelter/Teaching/650-Fall-2005/exercises/gromacs/index.html>. [Accessed: 03-Aug-2014].
- [98] D. Frishman and P. Argos, "Knowledge-based protein secondary structure assignment.," *Proteins*, vol. 23, no. 4, pp. 566–79, Dec. 1995.
- [99] W. Kabsch and C. Sander, "Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features.," *Biopolymers*, vol. 22, no. 12, pp. 2577–637, Dec. 1983.
- [100] W. Forli, S. Halliday, R. Belew, and A. Olson, "AutoDock Version 4.2," *Citeseer*, pp. 1–49, 2010.
- [101] G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, and A. J. Olson, "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility.," *J. Comput. Chem.*, vol. 30, no. 16, pp. 2785–91, Dec. 2009.
- [102] R. Thomsen and M. H. Christensen, "MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking.," *J. Med. Chem.*, vol. 49, no. 11, pp. 3315–21, Jun. 2006.
- [103] M. L. Verdonk, J. C. Cole, M. J. Hartshorn, C. W. Murray, and R. D. Taylor, "Improved protein-ligand docking using GOLD.," *Proteins*, vol. 52, no. 4, pp. 609–23, Sep. 2003.
- [104] B. S. P. Bentham Science Publisher, "Scoring Functions for Protein-Ligand Docking," *Curr. Protein Pept. Sci.*, vol. 7, no. 5, pp. 407–420, Oct. 2006.
- [105] W. C. Van Voorhis, W. G. J. Hol, P. J. Myler, and L. J. Stewart, "The role of medical structural genomics in discovering new drugs for infectious diseases.," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 5, no. 10, p. e1000530, Oct. 2009.
- [106] N. Mirkovic, Z. Li, A. Parnassa, and D. Murray, "Strategies for high-throughput comparative modeling: applications to leverage analysis in structural genomics and protein family organization.," *Proteins*, vol. 66, no. 4, pp. 766–77, Mar. 2007.
- [107] P. Aloy, E. Querol, F. X. Aviles, and M. J. Sternberg, "Automated structure-based prediction of functional sites in proteins: applications to assessing the validity of inheriting protein function from homology in genome annotation and to protein docking.," *J. Mol. Biol.*, vol. 311, no. 2, pp. 395–408, Aug. 2001.
- [108] A. Stark, A. Shkumatov, and R. B. Russell, "Finding functional sites in structural genomics proteins.," *Structure*, vol. 12, no. 8, pp. 1405–12, Aug. 2004.
- [109] I. D. Kuntz, "Structure-based strategies for drug design and discovery.," *Science*, vol. 257, no. 5073, pp. 1078–82, Aug. 1992.

- [110] T. E. Exner, M. Keil, and J. Brickmann, "Pattern recognition strategies for molecular surfaces. I. Pattern generation using fuzzy set theory.," *J. Comput. Chem.*, vol. 23, no. 12, pp. 1176–87, Sep. 2002.
- [111] J. Günther, A. Bergner, M. Hendlich, and G. Klebe, "Utilising Structural Knowledge in Drug Design Strategies: Applications Using Relibase," *J. Mol. Biol.*, vol. 326, no. 2, pp. 621–636, Feb. 2003.
- [112] A. T. R. Laurie and R. M. Jackson, "Methods for the prediction of protein-ligand binding sites for structure-based drug design and virtual ligand screening.," *Curr. Protein Pept. Sci.*, vol. 7, no. 5, pp. 395–406, Oct. 2006.
- [113] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, and T. E. Ferrin, "UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis.," *J. Comput. Chem.*, vol. 25, no. 13, pp. 1605–12, Oct. 2004.
- [114] R. Harris, A. A. J. Olson, and D. D. S. Goodsell, "Automated prediction of ligand-binding sites in proteins," *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, vol. 70, no. 4, pp. 1506–1517, 2008.
- [115] M. Mezei, "Adaptive umbrella sampling: Self-consistent determination of the non-Boltzmann bias," *J. Comput. Phys.*, vol. 68, no. 1, pp. 237–248, Jan. 1987.
- [116] S. Marsili, A. Barducci, R. Chelli, P. Procacci, and V. Schettino, "Self-healing umbrella sampling: a non-equilibrium approach for quantitative free energy calculations.," *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, no. 29, pp. 14011–3, Jul. 2006.
- [117] J. Kästner, H. M. Senn, S. Thiel, N. Otte, and W. Thiel, "QM/MM Free-Energy Perturbation Compared to Thermodynamic Integration and Umbrella Sampling: Application to an Enzymatic Reaction," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 2, no. 2, pp. 452–461, Mar. 2006.
- [118] R. J. Dimelow, R. a Bryce, A. J. Masters, I. H. Hillier, and N. a Burton, "Exploring reaction pathways with transition path and umbrella sampling: application to methyl maltoside.," *J. Chem. Phys.*, vol. 124, no. 11, p. 114113, Mar. 2006.
- [119] J. Wang, Y. Gu, and H. Liu, "Determination of conformational free energies of peptides by multidimensional adaptive umbrella sampling.," *J. Chem. Phys.*, vol. 125, no. 9, p. 094907, Sep. 2006.
- [120] J. S. Hub, B. L. de Groot, and D. van der Spoel, "g_wham—A Free Weighted Histogram Analysis Implementation Including Robust Error and Autocorrelation Estimates," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 6, no. 12, pp. 3713–3720, Dec. 2010.
- [121] J. Gao, S. Ma, D. T. Major, K. Nam, J. Pu, and D. G. Truhlar, "Mechanisms and free energies of enzymatic reactions.," *Chem. Rev.*, vol. 106, no. 8, pp. 3188–209, Aug. 2006.

- [122] D. G. Truhlar, J. Gao, C. Alhambra, M. Garcia-Viloca, J. Corchado, M. L. Sánchez, and J. Villà, "The Incorporation of Quantum Effects in Enzyme Kinetics Modeling," *Acc. Chem. Res.*, vol. 35, no. 6, pp. 341–349, Jun. 2002.
- [123] J. Gao and D. G. Truhlar, "Quantum mechanical methods for enzyme kinetics.," *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 53, pp. 467–505, Jan. 2002.
- [124] N. Dorman, "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling.," *Biotechniques*, vol. 53, no. 2, p. 69, Aug. 2012.
- [125] G. G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, and A. J. Olson, "AutoDock4 and AutoDockTools4 : Automated Docking with Selective Receptor Flexibility," *Receptor*, 2009.
- [126] V. B. Chen, W. B. Arendall, J. J. Headd, D. a Keedy, R. M. Immormino, G. J. Kapral, L. W. Murray, J. S. Richardson, and D. C. Richardson, "MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography.," *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, vol. 66, no. Pt 1, pp. 12–21, Jan. 2010.
- [127] N. Noinaj, E. Song, and S. Bhasin, "Anion activation site of insulin-degrading enzyme," *J. Biol. ...*, vol. 287, no. 1, pp. 48–57, Jan. 2012.
- [128] S. A. Adelman and J. D. Doll, "Generalized Langevin equation approach for atom/solid-surface scattering: General formulation for classical scattering off harmonic solids," *J. Chem. Phys.*, vol. 64, no. 6, p. 2375, 1976.
- [129] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, and J. R. Haak, "Molecular dynamics with coupling to an external bath," *J. Chem. Phys.*, vol. 81, no. 8, p. 3684, 1984.
- [130] K. Meagher, "Development of polyphosphate parameters for use with the AMBER force field," *J. Comput. Chem.*, vol. 24, no. 9, pp. 1016–25, Jul. 2003.
- [131] L. X. Dang, "Mechanism and Thermodynamics of Ion Selectivity in Aqueous Solutions of 18-Crown-6 Ether: A Molecular Dynamics Study," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 117, no. 26, pp. 6954–6960, Jul. 1995.
- [132] J. Aqvist and J. Åqvist, "Ion-water interaction potentials derived from free energy perturbation simulations," *J. Phys. Chem.*, vol. 94, no. 21, pp. 8021–8024, Oct. 1990.
- [133] D. Frishman and P. Argos, "Knowledge-based protein secondary structure assignment.," *Proteins*, vol. 23, no. 4, pp. 566–79, Dec. 1995.
- [134] W. Humphrey, a Dalke, and K. Schulten, "VMD: visual molecular dynamics.," *J. Mol. Graph.*, vol. 14, no. 1, pp. 33–8, 27–8, Feb. 1996.

- [135] G. N. Patey and J. P. Valleau, "A Monte Carlo method for obtaining the interionic potential of mean force in ionic solution," *J. Chem. Phys.*, vol. 63, no. 6, p. 2334, 1975.
- [136] G. Torrie and J. Valleau, "Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling," *J. Comput. Phys.*, vol. 23, pp. 187–199, 1977.
- [137] S. Kumar, J. M. Rosenberg, D. Bouzida, R. H. Swendsen, and P. A. Kollman, "THE weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method," *J. Comput. Chem.*, vol. 13, no. 8, pp. 1011–1021, Oct. 1992.
- [138] M. Souaille and B. Roux, "Extension to the weighted histogram analysis method: combining umbrella sampling with free energy calculations," *Comput. Phys. Commun.*, vol. 135, no. 1, pp. 40–57, Mar. 2001.
- [139] J. Shao, S. W. Tanner, N. Thompson, and T. E. Cheatham, "Clustering Molecular Dynamics Trajectories: 1. Characterizing the Performance of Different Clustering Algorithms," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 3, no. 6, pp. 2312–2334, 2007.
- [140] Y. Shen, A. Joachimiak, M. R. Rosner, and W.-J. Tang, "Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism.," *Nature*, vol. 443, no. 7113, pp. 870–4, Oct. 2006.
- [141] O. Amata, T. Marino, N. Russo, and M. Toscano, "Human insulin-degrading enzyme working mechanism.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, no. 41, pp. 14804–11, Oct. 2009.
- [142] M. Elstner, T. Frauenheim, E. Kaxiras, G. Seifert, and S. Suhai, "A Self-Consistent Charge Density-Functional Based Tight-Binding Scheme for Large Biomolecules," *Phys. Status Solidi*, vol. 217, no. 1, pp. 357–376, Jan. 2000.
- [143] T. Tuccinardi, A. Martinelli, E. Nuti, P. Carelli, F. Balzano, G. Uccello-Barretta, G. Murphy, and A. Rossello, "Amber force field implementation, molecular modelling study, synthesis and MMP-1/MMP-2 inhibition profile of (R)- and (S)-N-hydroxy-2-(N-isopropoxybiphenyl-4-ylsulfonamido)-3-methylbutanamides.," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 14, no. 12, pp. 4260–76, Jun. 2006.
- [144] H. Hu and W. Yang, "Development and application of ab initio QM/MM methods for mechanistic simulation of reactions in solution and in enzymes," *J. Mol. Struct. THEOCHEM*, vol. 898, no. 1–3, pp. 17–30, Mar. 2009.
- [145] D. a. Pearlman, D. a. Case, J. W. Caldwell, W. S. Ross, T. E. Cheatham, S. DeBolt, D. Ferguson, G. Seibel, and P. Kollman, "AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules," *Comput. Phys. Commun.*, vol. 91, no. 1–3, pp. 1–41, Sep. 1995.
- [146] G. A. Jeffrey, *An Introduction to Hydrogen Bonding*. Oxford University Press, 1997, p. 303.

- [147] R. P. Bora and R. Prabhakar, "Elucidation of interactions of Alzheimer amyloid beta peptides (A β 40 and A β 42) with insulin degrading enzyme: a molecular dynamics study.," *Biochemistry*, vol. 49, no. 18, pp. 3947–56, May 2010.
- [148] E. S. Song, M. A. Juliano, L. Juliano, M. G. Fried, S. L. Wagner, and L. B. Hersh, "ATP effects on insulin-degrading enzyme are mediated primarily through its triphosphate moiety.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 52, pp. 54216–20, Dec. 2004.
- [149] N. Hashimoto, F. W. Robinson, Y. Shibata, J. E. Flanagan, and T. Kono, "Diversity in the effects of extracellular ATP and adenosine on the cellular processing and physiologic actions of insulin in rat adipocytes.," *J. Biol. Chem.*, vol. 262, no. 31, pp. 15026–32, Nov. 1987.
- [150] D. P. Udrisar and M. I. Wanderley, "Fluoride and phosphatidylserine induced inhibition of cytosolic insulin-degrading activity.," *Acta Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.*, vol. 42, no. 3, pp. 183–96, Jan. 1992.
- [151] H. Yao and L. B. Hersh, "Characterization of the binding of the fluorescent ATP analog TNP-ATP to insulin.," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 451, no. 2, pp. 175–81, Jul. 2006.
- [152] R. Roychaudhuri, M. Yang, M. M. Condrón, and D. B. Teplow, "Structural dynamics of the amyloid β -protein monomer folding nucleus.," *Biochemistry*, vol. 51, no. 19, pp. 3957–9, May 2012.
- [153] B. Urbanc, L. Cruz, D. B. Teplow, and H. E. Stanley, "Computer simulations of Alzheimer's amyloid beta-protein folding and assembly.," *Curr. Alzheimer Res.*, vol. 3, no. 5, pp. 493–504, Dec. 2006.
- [154] O. Crescenzi, S. Tomaselli, R. Guerrini, S. Salvadori, A. M. D'Ursi, P. A. Temussi, and D. Picone, "Solution structure of the Alzheimer amyloid beta-peptide (1-42) in an apolar microenvironment. Similarity with a virus fusion domain.," *European journal of biochemistry / FEBS*, vol. 269, no. 22, pp. 5642–8, Nov-2002.
- [155] G. Wei and J.-E. Shea, "Effects of Solvent on the Structure of the Alzheimer Amyloid- β (25-35) Peptide 10.1529/biophysj.105.079186," *Biophys. J.*, vol. 91, no. 5, pp. 1638–1647, 2006.
- [156] T. Lührs, C. Ritter, M. Adrian, D. Riek-Loher, B. Bohrmann, H. Döbeli, D. Schubert, and R. Riek, "3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 48, pp. 17342–7, Nov. 2005.
- [157] C. Lee and S. Ham, "Characterizing amyloid-beta protein misfolding from molecular dynamics simulations with explicit water.," *J. Comput. Chem.*, Aug. 2010.
- [158] Q. Guo, M. Manolopoulou, Y. Bian, A. B. Schilling, and W.-J. Tang, "Molecular Basis for the Recognition and Cleavages of IGF-II, TGF- α , and Amylin by Human Insulin-Degrading Enzyme," *J. Mol. Biol.*, vol. 395, no. 2, pp. 430–43, Jan. 2010.

- [159] R. P. Bora and R. Prabhakar, "Elucidation of interactions of Alzheimer amyloid beta peptides (Abeta40 and Abeta42) with insulin degrading enzyme: a molecular dynamics study.," *Biochemistry*, vol. 49, no. 18, pp. 3947–56, May 2010.
- [160] D. a Potoyan, P. I. Zhuravlev, and G. a Papoian, "Computing free energy of a large-scale allosteric transition in adenylate kinase using all atom explicit solvent simulations.," *J. Phys. Chem. B*, vol. 116, no. 5, pp. 1709–15, Feb. 2012.
- [161] K. Arora and C. L. Brooks, "Large-scale allosteric conformational transitions of adenylate kinase appear to involve a population-shift mechanism.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 47, pp. 18496–501, Dec. 2007.
- [162] G. Henkelman and H. Jónsson, "Improved tangent estimate in the nudged elastic band method for finding minimum energy paths and saddle points," *J. Chem. Phys.*, vol. 113, no. 22, p. 9978, 2000.
- [163] J. Blumberger, G. Lamoureux, and M. L. Klein, "Peptide Hydrolysis in Thermolysin: Ab Initio QM/MM Investigation of the Glu143-Assisted Water Addition Mechanism," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 3, no. 5, pp. 1837–1850, Sep. 2007.
- [164] R. Wu, S. Wang, N. Zhou, Z. Cao, and Y. Zhang, "A proton-shuttle reaction mechanism for histone deacetylase 8 and the catalytic role of metal ions.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 27, pp. 9471–9, Jul. 2010.
- [165] R. Holz, "Co-catalytic metalloproteinases as pharmaceutical targets," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 7, no. 2, pp. 197–206, Apr. 2003.
- [166] B. Cauwe, P. E. Van den Steen, and G. Opdenakker, *The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases.*, vol. 42, no. 3. 2007, pp. 113–85.
- [167] F. Authier, B. Posner, and J. Bergeron, "Insulin-degrading enzyme.," *Clin. Invest. Med.*, vol. 19, no. 3, pp. 149–60, Jun. 1996.
- [168] R. P. Bora, M. Ozbil, and R. Prabhakar, "Elucidation of insulin degrading enzyme catalyzed site specific hydrolytic cleavage of amyloid beta peptide: a comparative density functional theory study.," *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 15, no. 4, pp. 485–95, May 2010.
- [169] E. Malito, L. Ralat, and M. Manolopoulou, "Molecular Bases for the Recognition of Short Peptide Substrates and Cysteine-Directed Modifications of Human Insulin-Degrading Enzyme†," *Biochemistry*, vol. 47, no. 48, pp. 12822–34, Dec. 2008.
- [170] S. S. Kukday, S. P. Manandhar, M. C. Ludley, M. E. Burriss, B. J. Alper, and W. K. Schmidt, "Cell-permeable, small-molecule activators of the insulin-degrading enzyme.," *J. Biomol. Screen.*, vol. 17, no. 10, pp. 1348–61, Dec. 2012.

- [171] B. Çakir, O. Dağliyan, E. Dağyildiz, İ. Bariş, I. H. Kavakli, S. Kizilel, and M. Türkay, "Structure based discovery of small molecules to regulate the activity of human insulin degrading enzyme.," *PLoS One*, vol. 7, no. 2, p. e31787, Jan. 2012.
- [172] H. Im, M. Manolopoulou, E. Malito, Y. Shen, J. Zhao, M. Neant-Fery, C.-Y. Sun, S. C. Meredith, S. S. Sisodia, M. a Leissring, and W.-J. Tang, "Structure of substrate-free human insulin-degrading enzyme (IDE) and biophysical analysis of ATP-induced conformational switch of IDE.," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 35, pp. 25453–63, Aug. 2007.
- [173] E. S. Song, C. Cady, M. G. Fried, and L. B. Hersh, "Proteolytic fragments of insulysin (IDE) retain substrate binding but lose allosteric regulation.," *Biochemistry*, vol. 45, no. 50, pp. 15085–91, Dec. 2006.

APÊNDICE

Inputs dos Cálculos de Dinâmica Molecular

Minimização do Solvente

```
&cntrl
  imin=1, ntx=1,
  ntmin=1,maxcyc=10000, ncyc=1000, ntp=100,
  ntb=1, ntf=1, ntr=1, igb=0, cut=12.0,
  restraint_wt=100.0,
  restraintmask=':1-1012'
/
```

Minimização Global

```
&cntrl
  imin=1, ntx=1,
  ntmin=1, maxcyc=10000, ncyc=1000, ntp=100,
  ntb=1, ntf=1, igb=0, cut=12.0,
/
```

Aquecimento

```
&cntrl
  imin=0, irect=0, ntx=1,
  ntb=1, ntt=3, gamma_ln=2.0,
  tempi=0.0, temp0=300.0, nmropt=1,
  cut=12.0, iwrap=1, nscm=1,
  ntc=2, ntf=2, ntp=0,
  nstlim=2800000, dt=0.001,
  ntp=10000, ntwx=10000, ntwr=10000,
  ntr=1,
  restraint_wt=100.0,
  restraintmask=':1-3,16-22,'
/

&wt
  type='TEMP0', istep1=0, istep2=800000,
  value1=0.0, value2=300.0,
/

&wt
  type='TEMP0', istep1=800000, istep2=2800000,
  value1=300.0, value2=300.0,
/
```

Produção

```
&cntrl
  nstlim=8000000, dt=0.002, ntx=5, irect=1,
  ntp=100000, ntwr=100000, ntwx=100000,
```

```
temp0=300.0, ntt=3, gamma_ln=2.0
ntb=2, ntp=1, pres0=1, taup=0.1,
ntc=2, ntf=2,
iwrap=1,
/
```

Inputs do Cálculo de Energia livre de ligação ATP-A β 42

Otimização de Geometria das Janelas para *Umbrella Sampling*

```
&cntrl
imin=1, maxcyc=10000, ntmin=2,
cut=12.0, ntpr=10, ntwr=10000,
iwrap=1, drms=0.00001,
ntpr=100, ntwx=1000, ntwr=1000,
nmropt=1,
/
```

```
&wt type='DUMPFREQ', istep1=1,
/
```

```
&wt type='END',
/
```

```
DISANG=rst.in
DUMPAVE=rst.out
LISTIN=POUT
LISTOUT=POUT
```

Produção das Janelas para *Umbrella Sampling*

```
&cntrl
imin=0, irest=0,
ntb=2,
ntt=3, gamma_ln=2.0,
temp1=300.0, temp0=300.0,
cut=12.0, iwrap=1,
ntc=2, ntf=2, ntp=1, pres0=1.0, tautp=0.1,
nstlim=900000, dt=0.002,
ntpr=1000, ntwx=1000, ntwr=1000,
nmropt=1,
/
```

```
&wt type='DUMPFREQ', istep1=1,
/
```

```
&wt type='END',
/
```

```
DISANG=rst.in
DUMPAVE=rst.out
LISTIN=POUT
```

```
LISTOUT=POUT
```

Arquivo de Restrição Usado Nesta Seção

```
&rst
  iat=-1,-1, r1=0., r2=<Centro da Janela>,
              r3=<Centro da Janela>,
  r4=99., rk2=30., rk3=30.,
  igr1=<Índice dos Átomos do ATP>
  igr2=<Índice dos Átomos de Cα da Ser26 e Ly28>
/
```

Inputs dos Cálculos de Reação QM/MM

Otimização MM da Estrutura Inicial

```
&cntrl
  imin=1, maxcyc=10000, ntmin=1, ncyc=1000,
  cut=12, ntp=50, ntwr=10000,
  iwrap=1, drms=0.00001,
/
```

Otimização QM/MM da Estrutura Inicial

```
&cntrl
  imin=1, maxcyc=1000, ntmin=0,
  cut=12.0, ntp=12, ntwr=100,
  iwrap=1,
  noshakemask=':20,19,108,111,112,189,1086,1012 |
              :18@C,O | :21@N,H',
  ifqnt=1, drms=0.00001,
/
```

```
&qmmm
  diag_routine=0,
  qmmask=':20,19,108,111,112,189,1086,1012 |
          :18@C,O | :21@N,H',
  qmcharge=0, qmshake=0,
  qm_theory='DFTB',
  qmcut=12.0,
  dftb_telec=100,
  writepdb=1,
/
```

Otimização QM/MM das Janelas para *Umbrella Sampling*

```
&cntrl
  imin=1, maxcyc=1000, ntmin=0,
  cut=12, ntp=50, ntwr=50, iwrap=1,
  noshakemask=':20,19,108,111,112,189,1086,1012 |
              :18@C,O | :21@N,H',
  ifqnt=1, nmropt=1, drms=0.00001,
/
```

```
&qmmm
  diag_routine=0,
  qmmask=':20,19,108,111,112,189,1086,1012 |
          :18@C,O | :21@N,H',
  qmcharge=0, qmshake=0,
  qm_theory='DFTB',
  qmcut=12.0,
  dftb_telec=100,
  writepdb=1,
/
```

```
&wt type='DUMPFREQ', istep1=1,
/
```

```
&wt type='END',
/
```

```
DISANG=rst.in
DUMPAVE=rst.out
LISTIN=POUT
LISTOUT=POUT
```

Aquecimento QM/MM das Janelas para *Umbrella Sampling*

```
&cntrl
  imin=0, irest=0, ntx=1,
  ntb=1, ntt=3, gamma_ln=1000.0,
  temp0=300.0, tempi=0.0, nmropt=1,
  cut=12, tol=0.00005,
  iwrap=1, ifqnt=1, ntc=2, ntf=2, ntp=0,
  nstlim=3000, dt=0.001,
  ntpr=100, ntwx=1000, ntwr=1000,
  noshakemask=':19,20,108,111,112,189,1086,1012 |
               :18@C,O | :21@N,H'
/
```

```
&qmmm
  diag_routine=0,
  qmmask=':20,19,108,111,112,189,1086,1012 |
          :18@C,O | :21@N,H'
  qmcharge=0, qmshake=0,
  qm_theory='DFTB',
  qmcut=12.0,
  dftb_telec=100,
  writepdb=1,
/
```

```
&wt
type='DUMPFREQ', istep1=1,
/
```

```

&wt
type='TEMP0', istep1=0, istep2=2000,
value1=0.0, value2=300.0,
/

&wt
type='TEMP0', istep1=2001, istep2=3000,
value1=300., value2=300.0,
/

&wt
type='END',
/

```

```

DISANG=rst.in
DUMPAVE=rst.out
LISTIN=POUT
LISTOUT=POUT

```

Produção QM/MM das Janelas para *Umbrella Sampling*

```

&cntrl
  imin=0, irect=1, ntx=5,
  ntb=2, ntt=3, gamma_ln=2.0,
  tempi=300.0, temp0=300.0,
  cut=12.0,
  iwrap=1,
  ntc=2, ntf=2, ntp=1, pres0=1.0, tautp=0.1,
  nstlim=22000, dt=0.001, ntp=100, ntwx=1000, ntwr=1000,
  ifqnt=1, nmropt=1,
  noshakemask=':20,19,108,111,112,189,1086,1012 |
               :18@C,O | :21@N,H',
/

&qmmm
  diag_routine=0,
  qmmask=':20,19,108,111,112,189,1086,1012 |
          :18@C,O | :21@N,H'
  qmcharge=0, qmshake=0, printcharges=1,
  qm_theory='DFTB'
  qmcut=12.0,
  dftb_telec=100,
  writepdb=1,
/

&wt type='DUMPFREQ', istep1=1,
/

&wt type='END',
/

```

```
DISANG=rst.in  
DUMPAVE=rst.out  
LISTIN=POUT  
LISTOUT=POUT
```

Arquivo de Restrição Usado Nessa Seção

```
&rst iat=0,0,0, r1=0., r2=<Centro da Janela>,  
      r3=<Centro da Janela>, r4=99.,  
      rk2=400., rk3=400.,  
      restraint='distance ( :1086@O , :19@C )'  
/  
  
&rst iat=0,0,0, r1=0., r2=<Centro da Janela>,  
      r3=<Centro da Janela>, r4=99.,  
      rk2=400., rk3=400.,  
      restraint='distance ( :1086@H1 , :20@N )'  
/
```