UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA MEDICINAL E MODELAGEM MOLECULAR
LABORATÓRIO DE PLANEJAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

CLAUBER HENRIQUE SOUZA DA COSTA

Estudo do mecanismo conformacional da proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A Redutase (HMGR) com as estatinas e substrato através de Dinâmica Molecular, PCA e Energia Livre

Belém
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA MEDICINAL E MODELAGEM MOLECULAR
LABORATÓRIO DE PLANEJAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

CLAUBER HENRIQUE SOUZA DA COSTA

Estudo do mecanismo conformacional da proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A Redutase (HMGR) com as estatinas e substrato através de Dinâmica Molecular, PCA e Energia Livre

Defesa de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Química Medicinal e Modelagem Molecular.
Orientador: Prof. Dr. Jerônimo Lameira Silva.

Belém
2017

Dados Internacionais de Catalogação na
Publicação (CIP) Sistema de Bibliotecas da
Universidade Federal do Pará

Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos
pelo(a) autor(a)

C837e Costa, Clauber Henrique Souza da

Estudo do mecanismo conformacional da proteína 3-hidroxi-3- metilglutaril Coenzima A Redutase (HMGR) com as estatinas e substrato através de Dinâmica Molecular, PCA e Energia Livre / Clauber Henrique Souza da Costa. — 2017

85 f. : il. color

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular (PPGQM3), Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Jerônimo Lameira Silva

1. Colesterol. 2. domínio Flap. 3. Dinâmica Molecular. 4. Análise de Componentes Principais. I. Silva, Jerônimo Lameira, *orient.* II. Título

---

CDD 541.2

CLAUBER HENRIQUE SOUZA DA COSTA

Estudo do mecanismo conformacional da proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A Redutase (HMGR) com as estatinas e substrato através de Dinâmica Molecular, PCA e Energia Livre

Defesa de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Química Medicinal e Modelagem Molecular.
Orientador: Prof. Dr. Jerônimo Lameira Silva.

Data da Apresentação: 03 / 08 / 2017

Conceito: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Jerônimo Lameira Silva
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA – Orientador

Prof. Dr. Agnaldo da Silva Carneiro
Instituto de Ciências da Saúde/UFPA – Membro

Profª. Drª. Gleiciane Leal Moraes Pinheiro
Universidade Federal do Pará Campus Breves – Membro

FRASES

Seja qual for o seu problema
Fale com Deus, Ele vai ajudar você
Após a dor vem a alegria
Pois Deus é amor e não te deixará sofrer
[...]
E ainda se vier noites traiçoeiras
Se a cruz pesada for, Cristo estará contigo
O mundo pode até fazer você chorar
Mas Deus te quer sorrindo.
Noites Traiçoeiras – Padre Marcelo Rossi

Ainda vejo o mundo com os olhos de criança
Que só quer brincar e não tanta responsa
Mas a vida cobra sério e realmente não dá pra fugir
Livre pra poder sorrir, sim
Livre pra poder buscar o meu lugar ao sol
[...]
Caro pai, como é bom ter por que se orgulhar
A vida pode passar, não estou sozinho
Eu sei se eu tiver fé eu volto até a sonhar
Livre pra poder sorrir, sim
Livre pra poder buscar o meu lugar ao sol.
Lugar Ao Sol – Charlie Brown Jr.

When you lose small mind
You free your life.
Aerials – System of a Down

But it was all in the name of liberty
All in the name of liberty
I got to be free.
Jailbreak – AC/DC

Na vida, nada deve ser temido,
Apenas compreendido.
Marie Curie

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me concedido força, paciência e determinação. Por todas as vitórias, mesmo nos momentos de maiores dificuldades. Agradeço a Deus, por cada lágrima, por cada noite mal dormida, por cada dor sentida. No fim, tenho a certeza, tudo foi necessário para que eu pudesse chegar até aqui e ir além.

Aos **meus pais** (Carlos Augusto Gomes da Costa e Maria Neuda Silva de Souza) e ao meu irmão Clark Costa, pela força, por acreditarem em mim e estarem sempre ao meu lado apoiando as minhas decisões, agradeço pelo aprendizado que me passaram e pelo amor.

Ao Prof. Dr. Jerônimo Lameira Silva, pela orientação, ensinamentos, apoio e confiança depositada para executar esse trabalho e pela oportunidade concedida de fazer parte desse grupo incrível do LPDF.

Ao Prof. Dr. Antonio Florêncio de Figueiredo, por todo o apoio, ensinamentos, amizade e confiança depositada durante o período da graduação e até hoje.

Ao Prof. Dr. Ricardo Miranda que proporcionou uma larga experiência na iniciação científica, agradeço muito pelas oportunidades, pelas orientações e confiança e por ter cedido o espaço do LQC/IFPA para executar uma grande parte desse Trabalho de Pesquisa.

Ao Prof. Dr. João Elias (“o Papa do Minitab”) que colaborou com meu crescimento e desenvolvimento profissional e pessoal.

À minha namorada Amanda Ruslana Santana Oliveira, pela ajuda, compreensão, apoio, paciência e pelo companheirismo.

Aos novos amigos do LPDF que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, para a concretização desse trabalho. Aos amigos do IFPA que ainda sim continuam fazendo parte da minha jornada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e FAPESPA pelo auxílio financeiro concedido durante a realização da pesquisa.

À Universidade Federal do Pará – UFPA pelos recursos e infraestrutura disponibilizados para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular – PPGQMMM pela oportunidade de realizar esta Pós-Graduação.

Ao meu ex-rim (direito) que seguiu comigo durante a minha vida toda e no primeiro ano dessa Pós-Graduação resolveu se separar de mim.

À todos que direta e indiretamente estão fazendo parte desta trajetória.

Muito obrigado!

RESUMO

O colesterol é uma substância de extrema importância para todos os animais. Entretanto, seu alto nível no corpo humano está ligado às duas principais doenças que mais matam no mundo: cardiopatia isquêmica e AVC. Um dos medicamentos sintéticos já utilizados no tratamento da hipercolesterolemia são as estatinas, inibidoras da 3-hidroxi-3-metilglutaril Coezima A redutase (HMGR), que agem principalmente no fígado inibindo a conversão do substrato HMG-CoA em ácido mevalônico, que é o metabólito precursor do colesterol. Realizou-se estudos de Dinâmica Molecular (DM) combinados com Análise de Componentes Principais (PCA) para verificar o mecanismo das mudanças conformacionais do domínio *Flap* no C-terminal (resíduos His861, Leu862, Val863, Lys864, Ser865 e His866) após a ligação do substrato e de estatinas eficientes na inibição da enzima HMGR. Um total de 500 ns de Tempo de simulação de DM foram realizados neste estudo. Empregou-se cálculos de Energias Livres de Ligação, que indicaram que o mecanismo estrutural do *Flap* está relacionado diretamente com a ação da proteína HMGR, uma vez que esse domínio controla o acesso ao sítio ativo da enzima. Os resultados mostram também que a modificação estrutural do *Flap* aumenta a contribuição energética do sistema ao permitir maiores interações com os resíduos catalíticos e, consequentemente, a capacidade de inibir a produção do colesterol, como foi observado para a His866 catalítica, que tem contribuição bastante favorável quando o *Flap* está no estado fechado, com energia de -14,802 Kcal/mol, e quando o *Flap* passa para o estado aberto a contribuição é menos favorável, com -1,022 Kcal/mol, para o inibidor 1, mostrando que no estado fechado o resíduo catalítico está envolvido diretamente e contribui de modo favorável para o sistema, nos levando a uma melhor compreensão das mudanças conformacionais de HMGR após a ligação dos ligantes estatínicos e substrato HMG-CoA.

Palavras-chave: Colesterol, domínio *Flap*, Dinâmica Molecular, Análise de Componentes Principais.

ABSTRACT

Cholesterol is a substance of paramount importance for all animals. However, its high level in the human body is linked to the two major diseases that kill the world: ischemic heart disease and stroke. One of the synthetic drugs used in the treatment of hypercholesterolemia are statins, inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Cozyme A reductase (HMGR), which act primarily on the liver by inhibiting a conversion of the HMG-CoA substrate into mevalonic acid, which is the metabolite Cholesterol precursor. Studies Molecular Dynamics (MD) combined with Principal Component Analysis (PCA) were performed to verify the mechanism of the changes in the C-terminal *Flap* domain form (residues His861, Leu862, Val863, Lys864, Ser865 and Hys866) after binding substrate and efficient statins in inhibiting the HMGR enzyme. A total of 500 ns of MD simulation time were performed in this study. Binding Free Energies calculations were used, which estimate that the structural mechanism of the *Flap* is related to an action of the HMGR protein, since domain control or access to the active site of the enzyme. The results also show that the structural modification of *Flap* increases the energy contribution of the system by involving larger interactions with catalytic residues and, consequently, an ability to inhibit cholesterol production, as observed for the catalytic His866, which has a very favorable contribution when the *Flap* is in the closed state, with energy of -14,802 Kcal/mol, and when the *Flap* passes to the open state the contribution is less favorable, with -1,022 Kcal/mol, for 1 inhibitor, showing that in the closed state the catalytic residue is directly involved and contributes in a favorable way to the system, leading to a better understanding of the conformational changes of HMGR after a binding of statin derivatives and HMG-CoA substrate.

Keywords: Cholesterol, *Flap* domain, Molecular Dynamics, Principal Component Analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Biossíntese do Colesterol a partir de Acetil-CoA 16

Figura 2 – Estutura tridimencional da proteína HMGR (encontrado no PDB com o código 1DQ9), possuíndo o substrato HMG-CoA 18

Figura 3 – Estutura tridimencional do dímero da cadeia C da proteína 1DQ9 (HMGR) 19

Figura 4 – Estutura tridimencional do sitio ativo da proteina HMGR que contem o domínio do *Flap*, complexado com o substrato HMG-CoA..... 20

Figura 5 – Estrutura molecular do HMG-CoA, ácido mevalônico e HMG-estatinas, demostrando a semelhança nos grupos estruturais 21

Figura 6 – Estruturas bidimensionais do substrato HMG-CoA e inibidores. **RM IC_{50} (nM)**: Inibição da síntese do colesterol de microssomal da HMG-CoA redutase de rato 22

Figura 7 – Gráfico de RMSD (em Å) dos complexos (em preto) e para os domínio: N (460-527, cadeia C em verde claro e cadeia D em verde escuro); L1 (528-590, cadeia C em magenta, cadeia D em roxo) L2 (694-866, cadeia C em Laranja, 694-865 cadeia D em ciano); S (592-682, cadeia C em vermelho e cadeia D em marrom) *versus* o Tempo de DM (em ns). a) inibidor 1; b) inibidor 2; c) substrato HMG-CoA; d) Apo-proteína 33

Figura 8 – a) Gráfico de RMSD (em Å) para o complexo da Atorvastatina e dos domínios da proteína *vs* tempo de DM (em ns); b) Gráfico de RMSF (em Å) das cadeias C (em Verde) e cadeia D (em Azul) para o complexo do Liptor 34

Figura 9 – Gráfico de RMSF (em Å) das cadeias C (em Verde) e cadeia D (em Azul) para o complexo dos inibidores 1 e 2, substrato HMG-CoA e Apo-proteína 36

Figura 10 – Gráfico de PC *vs* PC para o **inibidor 1**; a) gráfico do PC1 *vs* PC2; b) gráfico PC1 *vs* PC3; c) PC2 *vs* PC3, a coloração nos gráficos de PC *vs* PC é referente a trajetória, azul 0 ns; verde 50 ns; vermelho 100 ns. d) gráfico de RMSF dos resíduos da proteína para o PC1, PC2 e PC3 37

Figura 11 – Movimentação da proteína em PC1 para o sistema do **inibidor 1**, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em verde. Os vetores do PC1 é mostrado em verde para os bastões e as setas em vermelho 38

Figura 12 – Movimentação da proteína em PC2 para o sistema do **inibidor 1**, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em verde. Os vetores do PC2 é mostrado em verde para os bastões e as setas em vermelho 39

Figura 13 – Movimentação da proteína em PC3 para o sistema do **inibidor 1**, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em cinza. Os vetores do PC3 é mostrado em verde para os bastões e as setas em vermelho 40

Figura 14 – Movimentação da proteína em PC1 para o sistema do **inibidor 2**, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em verde. Os vetores do PC1 é mostrado em verde para os bastões e as setas em vermelho 41
Figura 15 – Movimentação da proteína em PC2 para o sistema do **inibidor 2**, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em ciano. Os vetores do PC2 é mostrado em verde para os bastões e as setas em vermelho 42
Figura 16 – Movimentação da proteína em PC3 para o sistema do **inibidor 2**, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em cinza. Os vetores do PC3 é mostrado em verde para os bastões e as setas em vermelho 43
Figura 17 – Gráfico de PC *vs* PC para o **inibidor 2**; a) gráfico do PC1 *vs* PC2; b) gráfico PC1 *vs* PC3; c) PC2 *vs* PC3, a coloração nos gráficos de PC *vs* PC é referente a trajetória, azul 0 ns; verde 50 ns; vermelho 100 ns. d) gráfico de RMSF dos resíduos da proteína para o PC1, PC2 e PC3 44
Figura 18 – Movimentação da proteína em PC1, PC2 e PC3 para o sistema do **Substrato HMG-COA** com os vetores (bastões verde e setas em vermelho) indicando a amplitude e direção do movimento, em evidencia (em amarelo) a porção dos resíduos 861-866 que compõem o *FLAP* 46
Figura 19 – Gráfico de PC *vs* PC para o **substrato HMG-CoA**; a) gráfico do PC1 *vs* PC2; b) gráfico PC1 *vs* PC3; c) PC2 *vs* PC3, a coloração nos gráficos de PC *vs* PC é referente a trajetória, azul 0 ns; verde 50 ns; vermelho 100 ns. d) gráfico de RMSF dos resíduos da proteína para o PC1, PC2 e PC3 47
Figura 20 – Movimentação da proteína em PC1 para o sistema do **Substrato HMG-CoA**, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em verde 49
Figura 21 – Movimentação da proteína em PC2 para o sistema do **Substrato HMG-CoA**, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em ciano 50
Figura 22 – Movimentação da proteína em PC3 para o sistema do **Substrato HMG-CoA**, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em cinza 51
Figura 23 – Movimentação da proteína em PC1 para o sistema da Apo-proteína, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em cinza. Os vetores do PC1 é mostrado em verde para os bastões e as setas em vermelho 52
Figura 24 – Gráfico de PC *vs* PC para a **Apo-porteina**; a) gráfico do PC1 *vs* PC2; b) gráfico PC1 *vs* PC3; c) PC2 *vs* PC3, a coloração nos gráficos de PC *vs* PC é referente a trajetória, azul 0 ns; verde 50 ns; vermelho 100 ns. d) gráfico de RMSF dos resíduos da proteína para o PC1, PC2 e PC3 53

Figura 25 – Movimentação da proteína em PC2 para o sistema da Apo-proteína, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em ciano. Os vetores do PC2 é mostrado em verde para os bastões e as setas em vermelho 54
Figura 26 – Movimentação da proteína em PC3 para o sistema da Apo-proteína, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em ciano. Os vetores do PC3 é mostrado em verde para os bastões e as setas em vermelho 55
Figura 27 – Gráfico de PC *vs* PC para a **Atorvastatina**; a) gráfico do PC1 *vs* PC2; b) gráfico PC1 *vs* PC3; c) PC2 *vs* PC3, a coloração nos gráficos de PC *vs* PC é referente a trajetória, azul 0 ns; verde 50 ns; vermelho 100 ns. d) gráfico de RMSF dos resíduos da proteína para o PC1, PC2 e PC3 57
Figura 28 – Movimentação da proteína em PC1 para o sistema da Atorvastatina, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em verde 58
Figura 29 – Movimentação da proteína em PC2 para o sistema da Atorvastatina, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em ciano 59
Figura 30 – Movimentação da proteína em PC3 para o sistema da Atorvastatina, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em cinza 60
Figura 31 – Inibidor 1 no sítio ativo da proteína HMGR; Conformação estrutural do *Flap* no estado fechado (a cima) e no estado aberto (a baixo) demonstrado pelo PCA 61
Figura 32 – Energia de interação (Kcal/mol) por resíduos, para o sistema do inibidor 1 que apresentou dois estados conformacionais em relação ao *Flap* 63
Figura 33 – Inibidor 2 ligado ao sítio ativo de ligação da proteína HMGR, estrutura gerada por meio da clusterização 65
Figura 34 – a) Principais interações feitas pelo substrato HMG-CoA no sítio ativo, ligações de hidrogênio (linhas pretas) e contatos moleculares (linhas em rosa); b) Resíduos que desempenham ligações de hidrogênio; c) Contatos hidrofóbicos exercidos pelo sítio ativo e *Flap* 68
Figura 35 – Superfície eletrostática, aplicado a Apo-proteína, a) no estado semiaberto, e b) para o estado totalmente aberto do domínio *Flap* 72
Figura 36 – Atorvastatina ligado ao sítio ativo de ligação da proteína HMGR, exercendo as interações adicionais 75

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – RMSF (em Å) dos resíduos do *Flap* (860-866) para o substrato HMG-CoA (em verde), inibidor 1 (em azul), inibidor 2 (em roxo) e Apo-proteína (em vermelho) 35
Gráfico 2 – Gráfico de RMSD (em Å) dos resíduos do *Flap* (860-866) para o substrato HMG-CoA (em verde) e para a Apo proteína (em Azul) *versus* 200 ns de simulação de DM..... 56
Gráfico 3 – Energias de interação (E_{int}, em Kcal/mol) entre os resíduos da HMGR e o Inibidor 2 66
Gráfico 4 – Energias de interação (E_{int}, em Kcal/mol) entre os resíduos da HMGR e o substrato HMG-CoA 69
Gráfico 5 – Energia Livre de Ligação (em Kcal/mol) ao longo do Tempo de DM (em frames) para a Atorvastatina 76
Gráfico 6 – Energia Livre de Ligação (em Kcal/mol) ao longo do Tempo de DM (em frames) para o ligante 1 77
Gráfico 7 – Energia Livre de Ligação (em Kcal/mol) ao longo do Tempo de DM (em frames) para o ligante 2 78
Gráfico 8 – Energia Livre de Ligação (em Kcal/mol) ao longo do Tempo de DM (em frames) para o substrato HMG-CoA 79

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

Å	Angstrom
β	Beta
δ	Delta minúsculo
AMBER	Construção Assistida de Modelos com Refinamento de Energia (*Assisted Model Building with Energy Refinement)*
DM	Dinâmica Molecular
dGbind	Variação de Energia Livre de Ligação
dGelec	Variação de Energia Eletrostatica
dGGB	Variação de Energia Polar
dGnonpolar	Variação de Energia Apolar
dGvdW	Variação de Energia de Van der Waals
dGsolv	Variação de Energia de Solvatação
E_Cavity	Energia de Cavidade
E_{inter}	Energia de Interação
E_VdW	Energia de Van der Waals
E_SIE	Energia pelo Método SIE
E_MMGBSA	Energia pelo Método MMGBSA
fs	femtossegundos
HDL	Lipoproteínas de densidade alta (*high density lipoprotein)*
HEP IC_{50}	Inibição de hepatócitos de fígado de rato
HMG	Hidroximetilglutarílico
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A
HMGR	3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A Redutase
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry)*
L6 IC_{50}	Inibição de miócitos do músculo de rato
L6/HEP	Proporção de miócitos do músculo para inibição de hepatócitos do fígado
LDL	Lipoproteínas de densidade baixa (*low density lipoprotein)*
MM	Mecânica Molecular
MMGBSA	*Molecular Mechanics of Generalized Born Surface Area*
ns	Nanosegundos
PDB	Banco de Dados de Proteína (*Protein Data Bank)*
PCA	Análise de Componentes Principais *(Principal Component Analysis)*
ps	Picosegundos
OMS	Organização Mundial da Saúde
RESP	*Restrained Electrostatic Potentials*
RM IC_{50}	Inibição da síntese do colesterol de microssomal da HMG-CoA Redutase de rato
RMSD	Raiz do Desvio Quadrático Médio (*Root Mean Square Deviation)*
RMSF	Raiz da Flutuação Quadrática Média (*Root Mean Square Fluctuation*)
SIE	*Solvated Interaction Energy*
VLDL	Lipoproteínas de densidade muito baixa (*very low density lipoprotein*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13

2 REFERENCIAL TEÓRICO 14

3 OBJETIVOS 23
3.1 Objetivo geral 23
3.2 Objetivos específicos 23

4 MÉTODOS COMPUTACIONAIS 24
4.1 Dinâmica Molecular (DM) 24
4.2 Procedimento Computacional: DM 27
4.3 Análise de Componentes Principais (PCA) 28
4.4 Procedimento Computacional: PCA 30
4.5 Energia Livre de ligação - MMGBSA, SIE e Decomposição 31

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 32
5.1 DM 32
5.2 PCA 36
5.3 Energia Livre de Ligação - MMGBSA, SIE e Decomposição 60
5.4 MM/GBSA e QMMM/GBSA 80

CONCLUSÃO 80

REFERÊNCIAS 82

1 INTRODUÇÃO

As sete décadas de investigação sobre o mecanismo de HMG-CoA Redutase forneceram uma via de reação detalhada para o que é uma das enzimas mais importantes biomédica e mecanisticamente os mais complexos. HMGR é o alvo de estatinas que são prescritas para melhorar a qualidade de vida de milhões de pessoas em todo o mundo e, mais recentemente, tem sido identificada como um alvo para o desenvolvimento de agentes antimicrobianos (HAINES, 2013).

A compactina, simvastatina, fluvastatina, cerivastatina, atorvastatina e rosuvastatina são as principais estatinas capazes de manter os níveis toleráveis de LDL (lipoproteínas de baixa densidade) no sangue. Produzem efeitos adversos tais como: desconforto gastrointestinal, enxaqueca, rachaduras na pele, dores musculares, disfunção sexual, sonolência, náuseas, constipação e neuropatia periférica. A afinidade dessas estatinas por HMGR são superiores a 10.000 vezes em relação à HMG-CoA, indicando que esses medicamentos são potentes inibidores da produção de colesterol pelo fígado (ENDO, 1976).

Além disso, o efeito mais comum associado à estatinas é a mialgia, que se manifesta por rigidez e fraqueza muscular, fadiga e cãibras. Pensa-se que a causa desse efeito secundário é a inibição da enzima HMGR. Tem sido sugerido que as estatinas com maior hepatosseletividade podem ajudar a reduzir o efeito colateral, já que os compostos estarão menos disponíveis para tecidos musculares (PARK, 2008). Tendo em vista que o aumento da hidrofilicidade garante maior característica hepatosseletiva, essa estratégia favorece a disponibilidade de novas estatinas mais potentes e mais eficazes que poderiam, em doses iniciais, reduzir os níveis de LDL.

Estão sendo explorados estudos de modelagem molecular associados a recursos computacionais, reduzindo o tempo e o custo na descoberta e produção de novos fármacos. Neste trabalho foram selecionados os compostos estatínicos de alta hepatosseletividade, eficientes na inibição enzimática da HMGR humana, capazes de provocar o fechamento do *Flap* do C-terminal (resíduos 861-866), abordando um composto 1 estatínico que desempenha o comportamento do *Flap* aberto, o composto 2 que provoca o fechamento do *Flap* (observados por Sarver em 2008) e foram efetuados estudos com substrato HMG-CoA da HMGR. Foram utilizados estudos de Dinâmica Molecular (DM) com intuito de conhecer o modo do mecanismo conformacional da enzima HMGR a nível molecular, associados a técnicas estatísticas

de Análise de Componentes Principais (PCA) e contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos capazes de inibir a síntese no colesterol.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O colesterol é uma substância de extrema importância para todos os animais. Essa substância é um dos componentes essenciais das membranas biológicas e utilizada pelas células na síntese de ácidos biliares, digestão e absorção de lipídios e vitaminas lipossolúveis no intestino delgado, síntese de hormônios esteróides e vitamina D. A biossíntese do colesterol é uma das vias bioquímicas mais intensivamente estudas devido à sua relevância bem conhecida para a saúde humana (LUDKE, 1999; HUFF, 2005).

Entretanto, segundo relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS), publicado em 2011 e atualizado em maio de 2017 (WHO, 2017), o alto nível de colesterol está ligado às duas primeiras doenças que mais matam no mundo: cardiopatia isquêmica e derrame e outras doenças vasculares cerebrais. Ambas são agravadas, dentre outros fatores de risco, pelo nível de colesterol elevado. Estudos apontam que os principais fatores para o aumento do risco de doenças cardiovasculares são: idade elevada, hipertensão, hipercolesterolemia, tabagismo e diabetes (SARVER, 2008).

O colesterol, triacilgliceróis e os ésteres de colesteril são insolúveis em água e não podem ser transportados na circulação como moléculas livres. Os transportes de lípideos de origem hepática se agregam com os fosfolipídeos e proteínas anfipáticas para formar partículas esféricas macromoleculares conhecidas como lipoproteínas. As lipoproteínas de densidade muito baixa ou *very low density lipoprotein* (VLDL) são sintetizadas no fígado. Transportam triacilgliceróis e colesterol endógenos para os tecidos extrahepáticos. No transporte das VLDL através do organismo, os triacilgliceróis são hidrolizados progressivamente pela lipoproteína−lipase até ácidos graxos livres e glicerol (VOET, 2000; MORAN et al., 2012).

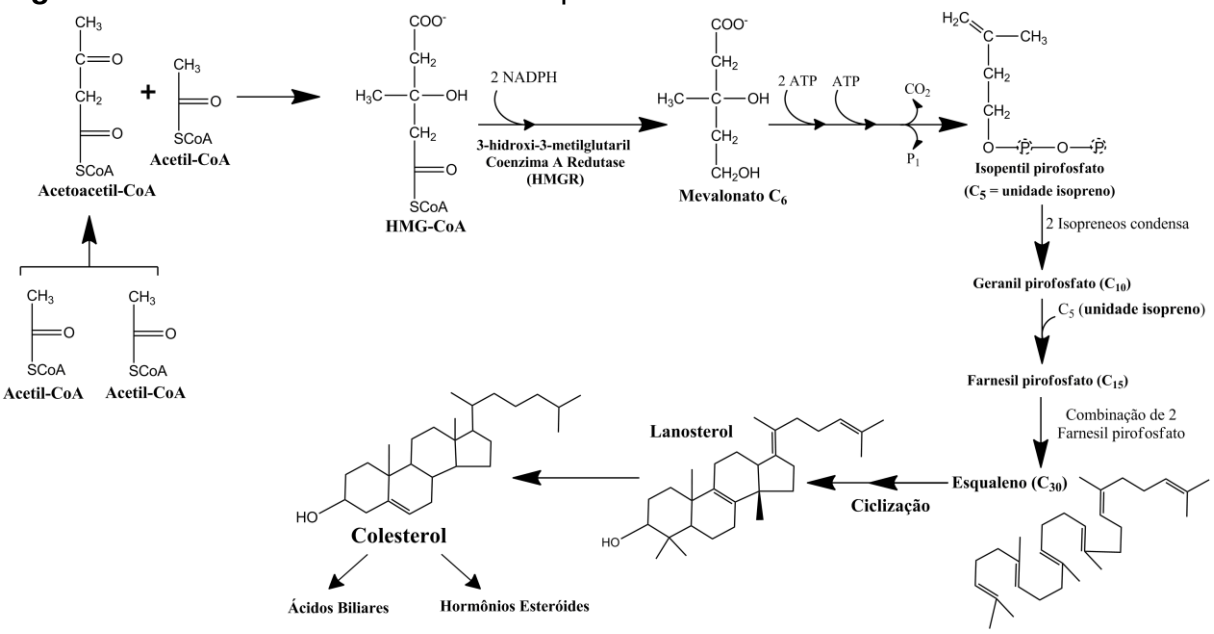
As lipoproteínas de densidade baixa ou *low density lipoprotein* (LDL) são enriquecidas de colesterol e ésteres de colesteril transportam esses lipídeos para os tecidos periféricos. As partículas de LDL são formadas a partir das VLDL. A remoção de LDL da circulação é mediada por receptores de LDL (sítios específicos de ligação) encontrados tanto no fígado como em tecidos extrahepáticos. Um complexo formado entre a LDL e o receptor celular entra na célula por endocitose (engolfamento). As

lípases dos lisossomos e proteases degradam as LDL. O colesterol liberado é incorporado nas membranas celulares ou armazenado como ésteres de colesteril. A deficiência de receptores celulares para as LDL desenvolve hipercolesterolemia familiar, na qual o colesterol acumula no sangue e é depositado na pele e artérias (VOET, 2000; MORAN et al., 2013). Por essa lipoproteína levar o coleterol do figado para a corrente saguínea é chamada vulgarmente por “colesterol ruim”.

Já as lipoproteínas de densidade alta ou *high density lipoprotein* (HDL), removem o colesterol do plasma e dos tecidos extrahepáticos, transportando-o para o fígado. Na superfície hepática, a HDL se liga ao receptor SR-B1 e transfere o colesterol e os ésteres de colesteril para o interior do hepatócito. A partícula de HDL com menor conteúdo de lipídeos retorna ao plasma. No fígado o colesterol pode ser convertido em sais biliares, que são excretados na vesícula. O risco de aterosclerose (depósito de colesterol nas artérias) diminui com a elevação dos níveis de HDL e aumenta com a elevação da concentração das LDL (VOET, 2000; MORAN et al., 2013). O HDL é conhecido como “colesterol bom” por remover o coleterol depositado nas arterias e transportá-lo até o figado, onde será reutilizado.

A biossíntese do colesterol no fígado é uma rota complexa, que requer 20 enzimas para combinar 30 carbonos a partir de acetil-CoA-redutase em uma estrutura de 27 carbonos que incluem quatro aneis. Das 20 enzimas da via, a 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A Redutase (HMGR) é exclusivamente adequada para servir como ponto principal da via de regulação, porque catalisa uma reação irreversível no início da rota, contendo a 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A (HMG-CoA) como substrato naturaral da ezima. Assim, um decréscimo na atividade enzimática de HMGR pode regular a formação do ácido mevalônico, o precursor do colesterol (SIPERSTEIN e GUEST, 1960). A bissíntese do colesterol é mostrada na Figura 1.

Figura 1 – Biossíntese do Colesterol a partir de Acetil-CoA



Fonte: adaptado de MORAN et al., 2013.

A síntese do colesterol pode ser dividida em três etapas:

1. **Síntese de HMG−CoA (3-hidróxi−3−metilglutaril−Coenzima A) a partir de acetil−CoA:** no citosol, duas moléculas de acetil−CoA condensam-se para formar acetoacetil−CoA (também conhecida como β−cetobutiril−CoA) em reação catalisada pela tiolase. Na reação seguinte, o acetoacetil−CoA condensa com uma terceira molécula de acetil−CoA para formar 3−hidróxi−3−metilglutaril−CoA (HMG−CoA). A reação é catalisada pela β−hidróxi−β−metilglutaril−CoA−sintase (HMG−CoA−sintase). Na mitocôndria, o HMG−CoA é um intermediário para a síntese de corpos cetônicos.
2. **Conversão do HMG−CoA a esqualeno:** a etapa seguinte da síntese do colesterol inicia com a redução da HMG−CoA para formar mevalonato (um composto de 6C) pela ação da HMG−CoA−redutase. O NADPH é o agente redutor. A HMG−CoA−redutase é a enzima limitante da velocidade de síntese de colesterol. Acúmulo de colesterol na célula proveniente tanto da síntese endógena como da dieta ou degradação, reduz a atividade da HMG−CoA−redutase de dois modos: (a) inibe a atividade da enzima e (b) aumenta a degradação da enzima existente. A atividade e a concentração da HMG−CoA−redutase, localizada na superfície citoplasmática do retículo endoplasmático, é afetada em vários graus pela concentração de produtos intermediários da via (por exemplo, mevalonato,

farnesil, esqualeno e 7−diidrocolesterol). O mecanismo preciso pelo qual essa importante enzima é regulada, entretanto, permanece obscuro.

O isopentenil−pirofosfato é convertido a seguir em seu isômero dimetilalil−pirofosfato pela isopentenil−pirofosfato isomerase (um grupo CH2=CH−CH2- sobre uma molécula orgânica é muitas vezes chamadas de grupo alil). O geranil−pirofosfato é produzido durante uma reação de decondensação entre isopentenil−pirofosfato e dimetilalil−pirofosfato. O pirofosfato é também um produto da reação e duas reações subsequentemente. A geranil−transferase catalisa a reação decondensação entre o geranil−pirofosfato e isopentenil−pirofosfatoque forma farnesil−pirofosfato. O esqualeno é sintetizado quando afarnesil−transferase (uma enzima microssomal) catalisa acondensação de duas moléculas de farnesil−pirofosfato. Afarnesil−transferase as vezes é chamada de esqualeno−sintase. Essareação requer NADPH como um doador de elétrons.

3. **Conversão do esqualeno em colesterol:** a última fase da via biossintética do colesterol inicia com a ligação do esqualeno a uma proteína transportadora específica chamada proteína transportadora de esterol. A conversão do esqualeno a lanosterol ocorre enquanto os intermediários estão ligados a essa proteína. A esqualeno−monoxigenase acrescenta um átomo de oxigênio do O_2 na extremidade da cadeia do esqualeno, produzindo um epóxido e, subsequentemente, a ciclização (esqualeno−2,3−epóxido−lanosterol−ciclase) que resulta na formação de lanosterol localizada nos microssomos. A esqualeno−monoxigenase requer NADPH e FAD para a sua atividade. Após sua síntese, o lanosterol (que contém os quatro aneis do núcleo esteróide) liga-se a uma segunda proteína transportadora, que permanece ligada durante as reações restantes. As atividades das enzimas que catalisam as restantes 20 reações necessárias para a conversão do lanosterol a colesterol estão embebidas nas membranas microssomiais. Em uma série de transformações envolvendo NADPH e algum oxigênio, o lanosterol é convertido a 7−diidrocolesterol. Esse produto é então reduzido pelo NADPH para formar colesterol (MORAN et al., 2013).

A enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coezima A redutase (HMGR) presente na biossíntese do colesterol (Figura 1), responsável pela reação de redução na presença de NADPH, envolve a formação do intermediário mevaldil-CoA, protonado, que se

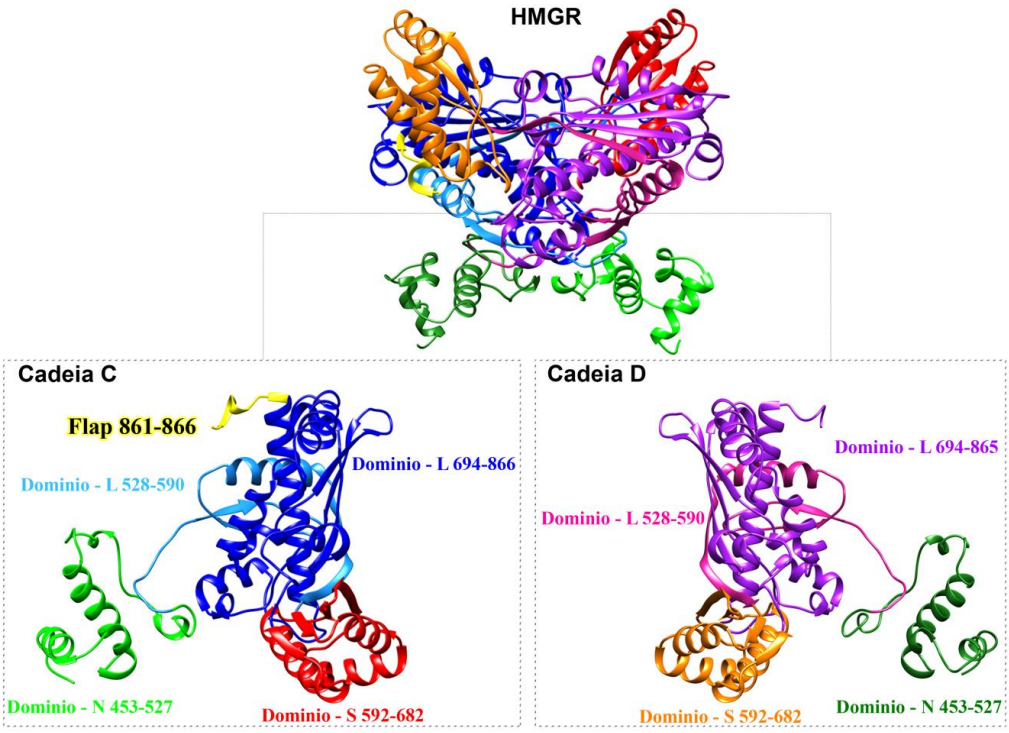
decompõe a mevaldeído e CoASH, posteriomente a molecula de $NADP^+$ é substituída por outra molécula de NADPH para promover a segunda reação de redução, ou seja, conversão do mevaldeído a mevalonato:

(S)-HMG-CoA + 2 NADPH + 2 H+ → (R)-Mevalonato + 2 $NADP^+$ + CoASH

A HMG−CoA−redutase é a enzima limitante da velocidade de síntese de colesterol.

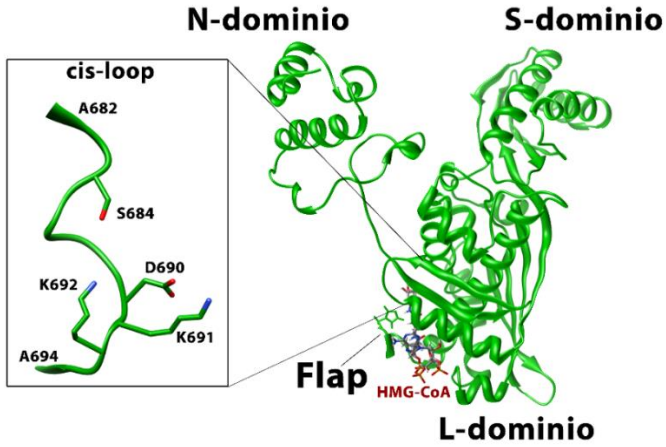
HMGR humano apresenta-se na forma de um tetrâmero e cada dímero possui um sítio catalítico formado pela interação de seus dois monômeros. Consistida por três domínios em sua estrutura cristalográfica: (I) N-terminal chamado de N-domínio (resíduos 460-527) a baixa densidade eletrônica envolvendo os resíduos 460-477 que indicam mobilidade, (II) S-domínio (resíduo 592-682) e (III) L-domínio (resíduos 528-590 e 694-866) (Figura 2). O sítio catalítico conta com região de aminoácidos ligados em forma de *cis* chamada de *cis-loop* (sequência de 682-694) adequadamente posicionado para orientar os resíduos, C699 a T689 (Figura 3), fundamentais que participam das reações de redução, essa característica químico-estrutura está presente apenas nos organismos eucariontes (ISTVAN et al., 2000; CAMPO, 2007).

FIGURA 2 – Estutura tridimencional da proteína HMGR (encontrado no PDB com o código 1DQ9), possuíndo o substrato HMG-CoA



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

FIGURA 3 – Estutura tridimencional do dímero da cadeia C da proteína 1DQ9 (HMGR)



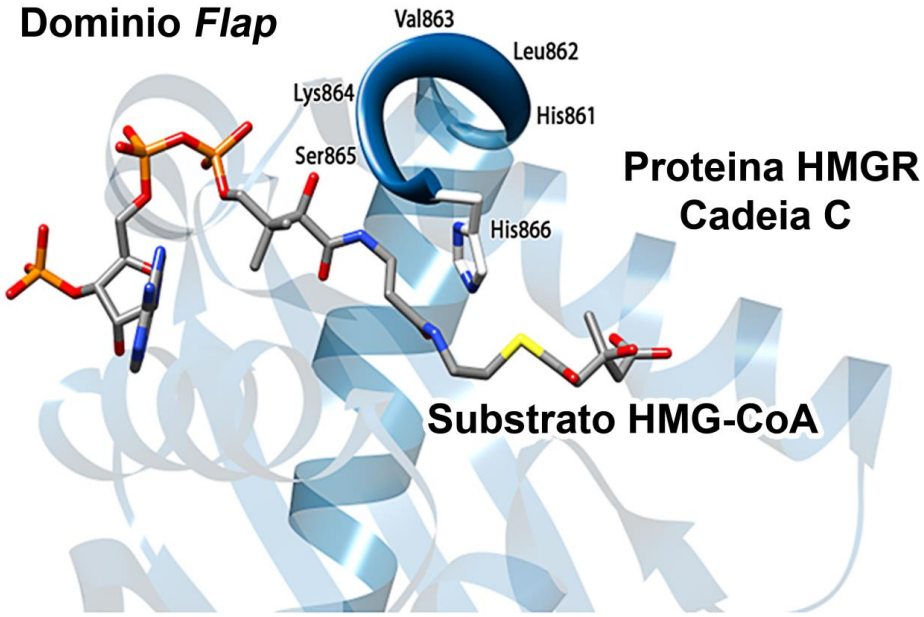
Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

Não é somente a estrutura tridimensional e o sítio catalítico de uma proteína que são responsáveis por sua ação, os movimentos e as mudanças conformacionais são importantes para a compreensão da sua função bioquímica. Por se tratarem de estruturas dinâmicas as proteínas muitas vezes sofrem alterações conformacionais após a ligação do ligante. É amplamente aceito que as regiões de *loop*s flexíveis têm um papel importante na função da enzima (GUNASEKARAN e NUSSINOV 2007).

A estrutura tridimensional 1DQ9 encontrada no banco de dados de proteína PDB (P*rotein Data Bank*), possui quatro cadeias, com HMG-CoA distribuídos nas quatro regiões do sítio ativo da proteína. A cadeia C possui uma sequência do C-terminal com mais resíduos (His861, Leu862, Val863, Lys864, Ser865 e His866) em relação às outras cadeias (Figura 4), essa estrutura foi selecionado da literatura por possuir a maior sequência de resíduos detectados pela cristalografia, contendo a His866 como o último resíduo na região *Flap* no domínio C-terminal.

A proteína nativa possui esse domínio *Flap* contendo em torno de 25-30 aminoácidos e está localizado na extremidade catalítica do C-terminal, que contribui para o sítio de ligação do substrato e a criação de uma tampa que cobre o sítio ativo quando o substrato se liga na proteína, contribuindo para a entropia envolvida no processo de ligação de substrato-enzima. Esse comportamento é observado somente para o substrato e não está envolvido no processo de ligação de inibidores dessa proteína (TABERNERO, et al., 1999; JAWAID, et al., 2010).

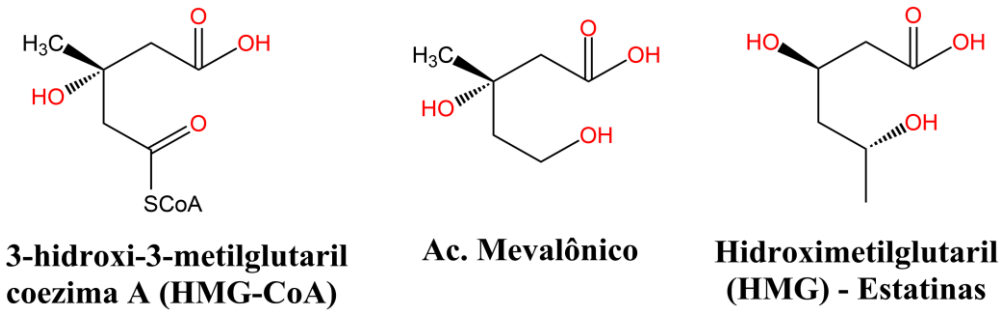
FIGURA 4 – Estutura tridimencional do sitio ativo da proteina HMGR que contem o domínio do *Flap*, complexado com o substrato HMG-CoA



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

As estatinas são inibidores utilizados na inibição da HMGR, que agem principalmente no fígado inibindo a conversão do substrato em ácido mevalônico que é o metabólito precursor do colesterol (LARSSON, 1996). Os inibidores estatínicos possuem grupos lipofílicos ligados a uma cadeia lateral, representada por unidade de ácido 3,5-di-hidroxivalérico ou β-δ-di-hidroxi-heptanóico, com grande analogia estrutural não só com o substrato natural HMG-CoA da enzima HMGR, mas também com o produto de ação enzimática, ácido mevalônico (Figura 5). Essas estatinas possuem um grupo hidroximetilglutarílico (HMG) que se liga na mesma região enzimática do grupo HMG do substrato, bloqueando seu acesso ao sítio catalítico, a ligação das estatinas demonstra que elas são inibidores competitivos com o substrato HMG-CoA, mas não competitivos com NADPH (ISTVAN, 2002; ENDO, 1976).

FIGURA 5 – Estrutura molecular do HMG-CoA, ácido mevalônico e HMG-estatinas, demostrando a semelhança nos grupos estruturais



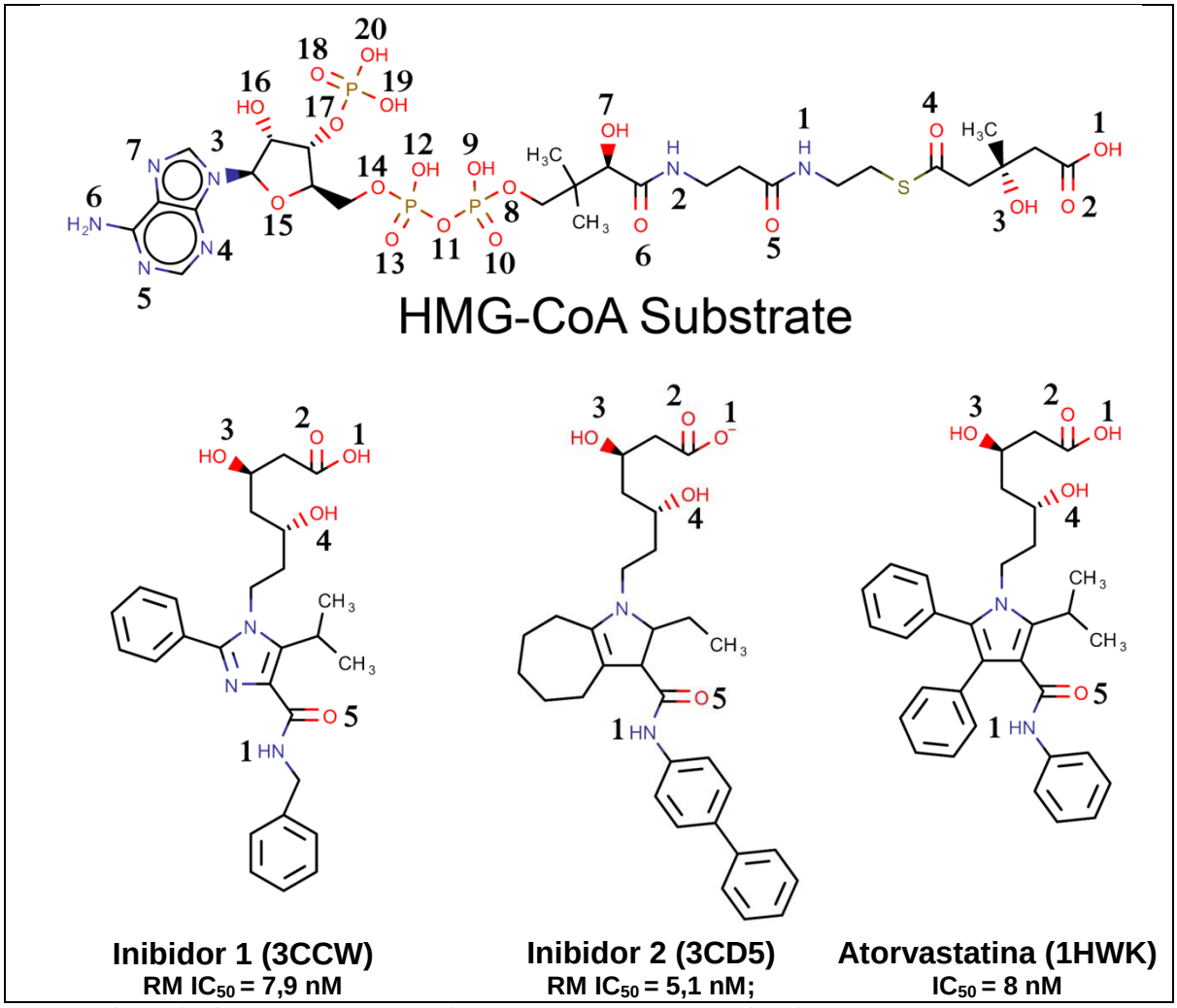
Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

No entanto, em 2008, Sarver e colaboradores desenvolveram uma série de inibidores, conhecidos como estatinas, com alta atividade na inibição da biossíntese do colesterol, agindo na inibição de HMGR, a reguladora da síntese do colesterol, esses compostos são capazes de provocar o fechamento do *Flap* no sítio ativo de ligação, favorecendo ainda mais a inibição da proteína, e outras séries que fazem o *Flap* se abrir.

Os compostos da classe das estatinas com atividade inibitória contra a enzima HMGR, foram selecionadas da literatura e foram testados em ensaios biológicos, microcalorimetria e cristalografia, em paralelo foram conduzidos testes para determinar parâmetros termodinâmicos, contribuindo para o reconhecimento de interações de ligação dos inibidores com a enzima HMGR, descrito no trabalho experimental de Sarver, R. W. et al*.,* (2008).

As estruturas dos inibidores selecionados para este estudo, foram retiradas dos complexos depositados no banco de dados de proteínas PDB, o inibidor 1 está complexado com a proteína HMGR com o código 3CCW (Sarver et al*.,* 2008) e o inibidor 2 está no sítio ativo da enzima HMGR de código 3CD5 (Sarver et al*.,* 2008). O substrato HMG-CoA está presente na proteína HMGR, 1DQ9 (ISTVAN, 2000). A Atorvastatina foi retirada da estrutura cristalográfica 1HWK do PDB (Istvan, E.S., e Deisenhofer, J., 2001). As estruturas moleculares 2D e os valores dos testes biológicos para os inibidores em estudo são mostrados na Figura 6.

FIGURA 6 – Estruturas bidimensionais do substrato HMG-CoA e inibidores. **RM IC_{50} (nM)**: Inibição da síntese do colesterol de microssomal da HMGCoA redutase de rato



Fonte: Adaptado de Sarver, R. W. et al., 2008; Istvan, E.S., e Deisenhofer, J., 2001.

Os inibidores 1 e 2 possuem valores conhecidos de **RM IC_{50} (nM)** (inibição da síntese do colesterol de microssomal da HMG-CoA redutase de rato), outros valores de testes biológicos para os inibidores podem ser encontrados no estudo realizado por Sarver, R. W. et al., em 2008. O valor de IC50 da Atorvastatina e de outras estatinas utilizadas na clínica podem ser encontrados no artigo de Istvan, E.S., e Deisenhofer, J., de 2001.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o mecanismo conformacional do domínio *Flap* presente na proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A Redutase (HMGR) afim de analisar as mudanças estruturais da Apo proteína e em diferentes ambientes Químicos, por meio de técnicas de Modelagem Molecular

3.2 Objetivos específicos

- Compreender o mecanismo estrutural das modificações conformacionais do domínio *Flap* presente na proteína HMGR, por meio de Dinâmica molecular (DM) combinado com a técnica estatística de Análise de Componentes Principais (PCA);
- Analisar o comportamento molecular do substrato 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A (HMG-CoA) e inibidores estatínicos, no sítio ativo da enzima (HMGR), por meio de Dinâmica Molecular;
- Investigar o comportamento das Principais Modificações Conformacionais domínio *Flap* dos complexos HMGR-inibidores, HMGR-HMG-CoA e da Apo-Proteína;
- Comparar as mudanças conformacionais dos domínios da proteína HMGR nativa com os sistemas proteicos de inibidores e substrato;
- Determinar as principais interações do substrato e inibidores estatínicos com o sítio ativo da enzima HMGR de acordo com as alterações do estado do *Flap*;
- Determinar o estado conformacional do domínio *Flap* energeticamente mais favorável para o sistema catalítico por meio de cálculos de Energias, com os métodos de MMGBSA, SIE e Decomposição por resíduo.

4 MÉTODOS COMPUTACIONAIS

4.1 Dinâmica Molecular (DM)

Com o desenvolvimento de computadores mais poderosos e com o avanço no entendimento dos determinantes da estrutura e da dinâmica proteica, tornaram-se possíveis os primeiros estudos acerca da dinâmica e do enovelamento de proteínas por simulações de dinâmica molecular por Michael Levitt e Arieh Warshel, nos anos de 1970, estudos estes agraciados com o prêmio Nobel de Química em 2013.

Segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), a "dinâmica molecular é um procedimento de simulação que consiste na computação do movimento dos átomos em uma molécula ou de átomos individuais ou moléculas em sólidos, líquidos e gases, de acordo com as leis de movimento de Newton". Em outras palavras, a dinâmica molecular (DM) descreve a variação do comportamento molecular como função do tempo (VERLI, 2014).

A metodologia de DM por métodos denominados Clássicos (também chamados de métodos de mecânica molecular) é baseada na física desenvolvida por Sir. Isaac Newton, em oposição aos métodos baseados na física quântica (que deram origem aos denominados métodos de mecânica quântica). Baseia-se na solução da 2ª Lei de Newton, onde F_{x_i} é a força aplicada ao átomo i na posição x, t é o tempo, v a velocidade e a_i aceleração do átomo i, como é mostrado equação 1,

$$F_{x_i} = \frac{d^2 x_i}{dt^2} m_i = \frac{\Delta v_i}{\Delta t} m_i = a_i m_i \qquad \text{(Eq. 1)}$$

que fornece informações sobre o comportamento dinâmico a nível molecular, dependente do tempo, dos átomos individuais que compõem o sistema. Para se obter as propriedades macroscópicas de interesse a aplicação da mecânica estatística é requerida, a qual tem a função de calcular propriedades observáveis macroscópicas (pressão, energia interna, volume, temperatura, entropia, energia livre, etc), a partir de outras microscópicas (NAMBA, SILVA, SILVA, 2008). O programa escolhido para realizar os cálculos de DM foi o AMBER (*Assisted Model Building with Energy Refinement*). O AMBER é um nome coletivo para um conjunto de programas que permitem os usuários de realizar as simulações de DM, particularmente em biomoléculas.

O campo de força empregado nos sistemas em estudo foi baseado no método da Mecânica Molecular (MM) muito utilizado na modelagem molecular em sistemas

biomoleculares (SENN, et al., 2009). Os campos de força contêm funções potenciais empíricas, isto é, informações precisas e calibradas obtidas experimentalmente e através de cálculos quânticos sobre as moléculas que compõem o sistema a ser estudado. Estas informações contidas no campo de força compreendem equações que descrevem ligações covalentes, ângulos de ligação entre átomos, ângulos rotação, interações entre átomos não ligados, atrações e repulsões de cargas (potenciais eletrostáticos) etc (ADCOCK; McCOMMON, 2006). Embora os principais campos de força empregados atualmente (AMBER, CHARMM, OPLS e GROMOS) sejam compostos por equações bastante semelhantes cada um foi construído a partir de decisões metodológicas distintas apresentando, portanto, particularidades importantes. A forma funcional do campo de força AMBER utilizado é (Equação 2):

$$E_{Total} = \sum \frac{1}{2}\, kl\, (l - l_o)^2 + \sum \frac{1}{2}\, k\theta\, (\theta - \theta_o)^2 + \sum \frac{1}{2}\, K_\varphi\, (1\cos(n_\varphi - \varphi_o))^2 + \sum 4\varepsilon\, (\frac{A}{r_{ij}^{12}}) - \left(\frac{B}{r_{ij}^{6}}\right) + \sum 4\varepsilon\, (\frac{q_i\, q_j}{4\pi\varepsilon_o\, r_{ij}}) \qquad \text{(Eq. 2)}$$

A equação 2 descreve o campo de força AMBER utilizado para o cálculo de energia total de um sistema, em que a equação é dividida em cinco termos energéticos: somatória do potencial de estiramento $\sum \frac{1}{2}\, kl\, (l - l_o)^2$; somatório do potencial de torção angular $\sum \frac{1}{2}\, k\theta\, (\theta - \theta_o)^2$; somatório que envolve as torção do ângulo diedro $\sum \frac{1}{2}\, K_\varphi\, (1\cos(n_\varphi - \varphi_o))^2$; potencial de Lennard-Jones e Potencial de Coulomb $\sum 4\varepsilon\, (\frac{A}{r_{ij}^{12}}) - \left(\frac{B}{r_{ij}^{6}}\right) + \sum 4\varepsilon\, (\frac{q_i\, q_j}{4\pi\varepsilon_o\, r_{ij}})$ que são utilizados para descrever as forças de interações entre átomos não ligados (DURRANT, 2011).

A técnica de solvatação na dinâmica molecular é essencial, uma caixa d'água contorna o sistema proteico, adicionando volume e condições de meio para a simulação, essa estratégia é denominada condições periódicas de contorno. Estas formas permitem que uma caixa de simulação seja replicada em todas as suas dimensões, de forma periódica. Estas réplicas são idênticas à caixa construída, de forma que um movimento molecular em uma será idêntico ao movimento da mesma molécula na outra. E, caso uma molécula saia da caixa central, uma de suas imagens entrará pela face oposta, mantendo o número de moléculas constante. Isto representa uma continuidade da solução, nos aproximando de condições experimentais (VERLI, 2014).

A cada simulação de Minimização, a energia do sistema diminui, com a redução de contatos desfavoráveis e a formação de interações intra e intermoleculares como ligações de hidrogênio. A minimização corresponde à otimização da geometria das moléculas e consiste em alterar as coordenadas cartesianas dos átomos de forma a encontrar o mínimo de energia potencial global, isto é, alterá-los para valores próximos ou iguais as suas posições de equilíbrio. Antes da simulação da dinâmica molecular é necessário realizar a minimização do modelo como forma de eliminar conflitos estéricos e distorções entre ângulos e comprimentos de ligação entre os átomos (ADCOCK; McCOMMON, 2006). Diversos métodos de minimização estão atualmente disponíveis, entre eles, dois são largamente utilizados: osteepest-descent e o método de gradiente conjugado.

A ideia de equilíbrio de uma simulação por DM se refere à estabilização de suas propriedades, ou seja, que estas alcancem um estado de equilíbrio. Considera-se que, antes de estarem equilibradas, as propriedades em estudo apresentam variações ou comportamentos não representativos das situações de interesse. Assim, é necessário que o tempo de simulação seja suficientemente longo para que as propriedades em estudo estejam adequadamente equilibradas (NAMBA, SILVA, SILVA, 2008; VERLI, 2014).

O cálculo de uma simulação por DM não gera informações contínuas, mas sim é dividida em pequenos passos, usualmente na escala de femtossegundos (fs). A sucessão destes passos dará origem as trajetórias, isto é, à evolução temporal do comportamento molecular na simulação realizada (VERLI, 2014).

A DM é fundamentada nas resoluções de equações do movimento da mecânica molecular (MM) para cada partícula constituinte do sistema. Nesta abordagem, cada átomo (ou conjunto de átomos) é considerado como sendo um ponto de massa interagindo com os demais pontos do sistema sendo, cada um, mantidos unidos por forças harmônicas ou elásticas (TUCKERMAN; MARTYNA, 2000). Os efeitos quânticos de interação dos orbitais moleculares são, portanto, desprezados. Resumidamente podemos dizer que o sistema é representado por bolas interligadas entre si por molas e as equações Newtonianas descrevem o movimento destas partículas. Esta abordagem é possível graças à aproximação de Born-Oppenheimer que consiste em tratar o núcleo e a eletrosfera como entidades diferentes (ADCOCK; McCOMMON, 2006). Esta aproximação supõe que a densidade eletrônica ajusta-se

instantaneamente às mudanças na posição dos núcleos, considerando seu livre movimento.

O sucesso da dinâmica molecular em reproduzir efeitos satisfatórios, mesmo desprezando os efeitos quânticos, se deve também à portabilidade dos campos de força, isto é, parâmetros utilizados para moléculas pequenas podem ser aplicados para descrever o comportamento de macromoléculas (carboidratos, proteínas, etc).

As análises de simulações por DM devem, preferencialmente, ser realizadas observando propriedades de complexidade crescente (o que costuma estar associado ao tempo requerido à equilibração desta propriedade). Assim, as primeiras propriedades a serem avaliadas são normalmente a pressão, o volume a densidade e a energia total do sistema. Todas estas propriedades devem alcançar um patamar estável, paralelo ao eixo x (tempo). Pode-se observar alguma variação no início da simulação, mas, em seguida, devem atingir este patamar e se manter neste nível ao longo da simulação. Estas costumam ser propriedades de rápida equilibração em simulações por DM (NAMBA, SILVA, SILVA, 2008; VERLI, 2014).

4.2 Procedimento Computacional: DM

Neste trabalho as simulações de Dinâmica Molecular foram realizadas no programa AMBER 12 (CASE et al., 2012), utilizando somente a cadeia C e D da proteína 1DQ9 (HMGR), devido ao sítio ativo ser entre duas cadeias, e a cadeia C possui região C-terminal mais completa (resíduos 861-866). Como as estruturas dos ligantes estão presentes no sítio ativo da proteína HMGR depositadas no PDB, não foi necessário utilizar nenhuma técnica para acoplá-los na proteína.

Primeiramente os inibidores e o substrato foram submetidos a cálculo de cargas RESP (SIEFFERT e WIPFF, 2007; CHEVROT e SCHURHAMMER, 2006) utilizando o programa Gaussian 03 (GAUSSIAN 03, 2004) com o método Hartree-Fock e o conjunto de bases 6-31G* (BAYLY et al., 1993), posteriormente extraídas utilizando o módulo antechamber, implementado no pacote AMBER12 (CASE et al., 2012). O campo de força geral do AMBER (GAFF) (Wang, 2004) e campo de força ff99SB (HORNAK et al., 2006) foram usados para descrever a coleção de átomos do sistema por forças newtonianas por meio da ferramenta LEaP (Wang, 2004) no AMBER 12 (CASE et al., 2012). O complexo foi solvatado com uma caixa octaédrica TIP3P (JORGENSEN, 1983) de moléculas de água com distância entre a parede da caixa e os átomos do sistema solvatados foi de 15,0 angstroms (Å). E o sistema foi

neutralizado com íons Cl^-, com o objetivo de manter a eletroneutralidade do sistema como forma de evitar a atração de moléculas de carga diferentes sendo adicionados 5 íons para a neutralização total do sistema. Para diminuir os contatos e o conteúdo energético do sistema, minimizamos os hidrogênios, moléculas de água e contra íons, e finalmente aplicamos minimização para todo o sistema. Realizou-se o aquecimento do sistema através de 50 picosegundos (ps) de dinâmica molecular com o objetivo de aumentar sua temperatura para 300 K com restrições de posição a volume constante, aplicando o algoritmo *Shake* (RYCKAERT, 1977). Em seguida, 10 nanosegundos (ns) de dinâmica foram executados com *ensemble* canônico, isto é, com P (1atm), T (300K) e N constantes, a fim de estabelecer o equilíbrio do sistema. E finalmente realizou-se as simulações de dinâmica molecular para cada complexo, um total de 500 ns de tempo de simulação, para cada sistema com inibidor e para a proteína livre, gerados e analisados neste estudo. Mais 200 ns de simulação foram aplicados para a proteína ligada e não ligada, como uma estratégia de extensão de simulação para verificar o comportamento dos sistemas além dos 100 ns de produção.

4.3 Análise de Componentes Principais (PCA)

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi gerada por meio do *Cpptraj* implementado no AmberTools 16 (CASE, 2016). O método PCA é descrito para identificar movimentos coletivos em proteínas a partir de trajetórias de Dinâmica Molecular ou Simulações de Modo Normal, utilizando as covariâncias das flutuações posicionais atômicas e por meio das comparações das matrizes de covariância e correlação cruzada mostra que os movimentos relativos têm muitas características semelhantes nas diferentes simulações de DM (HORIUCHI, 1991; ICHIYE, 1991; VAN AALTEN, 1997). Onde o PCA encontra "novas variáveis" denominadas componentes principais (PC), PC1 (primeiro componente principal), PC2 (segundo componente principal) e PCn (n componentes principais), podendo gerar gráficos que mostram as pontuações e dá relações gerais sobre as amostras (semelhanças e diferenças) com base nos descritores considerados (COSTA, 2015). O PCA é uma técnica que pode ser usada para transformar uma série de coordenadas de uma trajetória de DM, que descreve um sistema proteico, em um conjunto de vetores ortogonais chamados Componente Principais (PCs) que são capazes de descrever o comportamento das coordenadas cartesianas contidas na dinâmica de cada fragmento da proteína (GALINDO-MURILLO, 2014; 2015).

A estrutura tridimensional de uma proteína fornece informações importantes para a compreensão da sua função bioquímica e suas propriedades de interação em detalhes moleculares (LIMA, 2016), e o PCA é capaz de gerar informações estruturais acerca dos principais movimentos contidos em uma dinâmica de proteínas. Para um sistema de N átomos, o conjunto de dados de entrada para PCA, que foi obtido por meio de uma trajetória padrão com as coordenas xyz de cada átomo, pode ser uma matriz de dados estatísticos e cada coluna da matriz indica coordenada cartesiana para um átomo particular em cada frame da simulação, podendo ser separado em PC1, PC2 e PC3 (RAMIN, 2015). Para ser gerado cada PC a partir da DM foram considerados apenas átomos de Cα, excluindo as cadeias laterais para não considerar o deslocamento e as rotações da estrutura, mas sim a flutuação dos átomos a ser armazenada em uma matriz de Covariância (**C**) de coordenadas calculadas a partir de série temporal de coordenadas posicionais 3D, de modo que os PCs representarão os modos de movimento do sistema, cujo os termos são definidos como (Equação 3) (GROSSO, 2015; RAMIN, 2015).

$$C_{ij} = \langle q_i q_j \rangle = \frac{1}{K} \sum_{K=1}^{K} q_i^K \, q_j^K \qquad \text{Eq. 3}$$

onde a soma passa sobre as configurações K armazenadas durante uma simulação de DM equilibrada (Equação 4)

$$q_i^K = \sqrt{m_i} \left(x_i^k - \langle x_i \rangle \right) \qquad \text{Eq. 4}$$

é o deslocamento interno de massa-pessada de coordenadas cartesianas x_i^k do átomo i (i= 1,...,N; N = número de átomos na molécula) com massa m_i, e os suportes angulares representam a média obtida a partir das configurações k da simulação da DM equilibrada correspondente (GROSSO, 2015). A diagonalização da matriz C de covariância 3N × 3N que pode ser calculada (Equação 5)

$$\Lambda = L^T C L \qquad \text{Eq. 5}$$

onde Λ descreve a matriz diagonal representando a contribuição reativa de cada PCA e contendo os autovalores e L descreve uma matriz incluindo os 3N autovetores ortonormais. Os autovalores apresentam os deslocamentos quadráticos médios (MSD) de átomos de Cα (neste estudo), ao longo do autovetor usado, que descrevem os movimentos coletivos de flutuação da proteína (RAMIN, 2015; GROSSO, 2015) e a diagonalização gerar uma matriz reduzida com PC1, PC2 e PC3 para cada frame da simulação de DM.

4.4 Procedimento Computacional: PCA

Embora o PDB possua mais de 25 estruturas cristalográficas da enzima HMGR (*Homo sapiens*) de complexos ligante-receptor e sem ligante, devido a região do domínio *Flap* ter uma grande mobilidade (ISTVAN, 2000), o mecanismo de movimentação estrutural do *Flap* e suas contribuições são desconhecidas e as técnicas de modelagem computacional, como a simulação de DM, podem fornecer detalhes estruturais e dinâmicos essenciais para a compreensão de sua função no processo de ligação do substrato e inibidores e o PCA pode ajudar a identificar as flutuações locais e os movimentos coletivos que ocorrem simultaneamente, podendo filtrar os principais movimentos coletivos (muitas vezes lentos) e os de movimentos locais (muitas vezes rápidos) que contribuem para o esclarecimento do mecanismo conformacional da proteína.

Com as simulações da DM as trajetórias foram utilizadas para os cálculos de PCA, o primeiro passo foi a utilização das simulações de cada sistema para coletar as informações das flutuações X, Y e Z de cada átomo ao longo da trajetória para a construção da matriz de Covariância (**C**) utilizando o *Cpptraj* implementado no AmberTools 16 (CASE, 2016). No segundo passo é feito a diagonalização da matriz **C** gerando autovetores, ou seja, primeiro, segundo e terceiro componente principal (PC1, PC2 e PC3) e os autovalores (ou seja, o "peso" de cada PC), a nova matriz contém uma coluna com o número de frame da trajetória da DM e os três componentes principais PC1, PC2 e PC3. No terceiro passo é feito a plotagem do gráfico correlacionando o PC1 vs PC2 criando uma superfície de coloração que controlam os números de trajetórias de simulação de azul (0 ns) tendendo para o verde (50 ns) levando até o fim da DM em vermelho (100 ns). O quarto passo é a criação de trajetória com os movimentos de cada componente por meio do programa PCAsuite do grupo de modelagem molecular e Bioinformática (*Molecular Modelling & Bioinformatics Group.* OROZCO*, M. http://mmb.pcb.ub.es/software/pcasuite/pcasuite.html), on*de é possível o observar a direção e amplitude do movimento e assim gerar imagens que demonstrem a estrutura inicial, intermediarias e final que formam o movimento conformacional da proteína. Este estudo pretende investigar o mecanismo conformacional do domínio *Flap* devido à ligação do substrato e estatinas à proteína HMGR, uma vez que esse *Loop* encontra-se próximo do sítio ativo.

4.5 Energia Livre de ligação - MMGBSA, SIE e Decomposição

A energia livre de ligação é capaz de medir em valores a espontaneidade da ligação do ligante no receptor mostrando se a ligação é favorável durante a DM, calculou-se por *Molecular Mechanics of Generalized Born Surface Area* (MMGBSA) no AMBER 12 (HOU T, 2011), empregando as equações de 6 a 9:

$$\Delta G_{bind} = G_{Complex} - (G_{receptor} + G_{ligand}) \quad \text{Eq. 6}$$

$$\Delta G_{bind} = \Delta H - T\Delta S \approx \Delta E_{vacuum} + \Delta G_{solvated} - T\Delta S \quad \text{Eq. 7}$$

$$\Delta E_{vacuum} = \Delta E_{elet} + \Delta E_{VdW} \quad \text{Eq. 8}$$

$$\Delta G_{solvated} = \Delta G_{polar} + \Delta G_{non-polar} \quad \text{Eq. 9}$$

onde ΔG_{bind} é a energia livre de ligação total entre o ligante e o receptor, e $G_{Complex}$, $G_{receptor}$ e G_{ligand} são as energias do complexo, receptor e ligante, respectivamente. O ΔG_{bind} é descrito por vários termos: a entalpia em fase gasosa (ΔE_{vacuum}) que é a soma das interações eletrostáticas (ΔE_{elet}) e Van der Waals (ΔE_{VdW}), a energia livre de solvatação ($\Delta G_{solvated}$) que inclui os termos polar (ΔG_{polar}) e apolar ($\Delta G_{non-polar}$), e a entropia conformacional ($T\Delta S$) que é a contribuição das mudanças de entropia para a energia livre de ligação. Calculou-se também o *Solvated Interaction Energy* (SIE) (NAIM, 2007).

A energia de interação entre os inibidores e cada resíduo da proteína foi calculado aplicando o método de MMGBSA usando o AMBER 12 (KOLLMAN et al., 2000; TSUI; CASE, 2000), descrito por meio da equação 10:

$$\Delta G_{ligand-resid} = \Delta E_{elet} + \Delta E_{VdW} + \Delta G_{polar} + \Delta G_{non-polar} \quad \text{Eq. 10}$$

onde o termo $\Delta G_{ligand-resid}$ é a energia de interação ligante-resíduo, descrito pela contribuição eletrostática (ΔE_{elet}) e de Van der Waals (ΔE_{VdW}) em vácuo, e solvatação polar (ΔG_{polar}) e não polar ($\Delta G_{non-polar}$). Aqui neste trabalho, esse método foi essencial para verificar a mudança energética e contribuição de cada resíduo na mudança do ambiente, na mudança conformacional, verificando qual estado é energeticamente favorável para o sistema.

Por fim, foi utilizado o método MM/GBSA com o protocolo de análises de energia livre de Pin-Chih Su e colaboradores (PIN-CHIH SU et al., 2015), para obtenção das variações da energia de van der Waals (ΔG_{vdw}), energia eletrostática (ΔG_{elec}), energia polar (ΔG_{GB}), energia não polar ($\Delta G_{nonpolar}$), energia de solvatação

(ΔG_{solv}) e energia livre de ligação total (ΔG_{bind}) durante o tempo de simulação da dinâmica molecular.

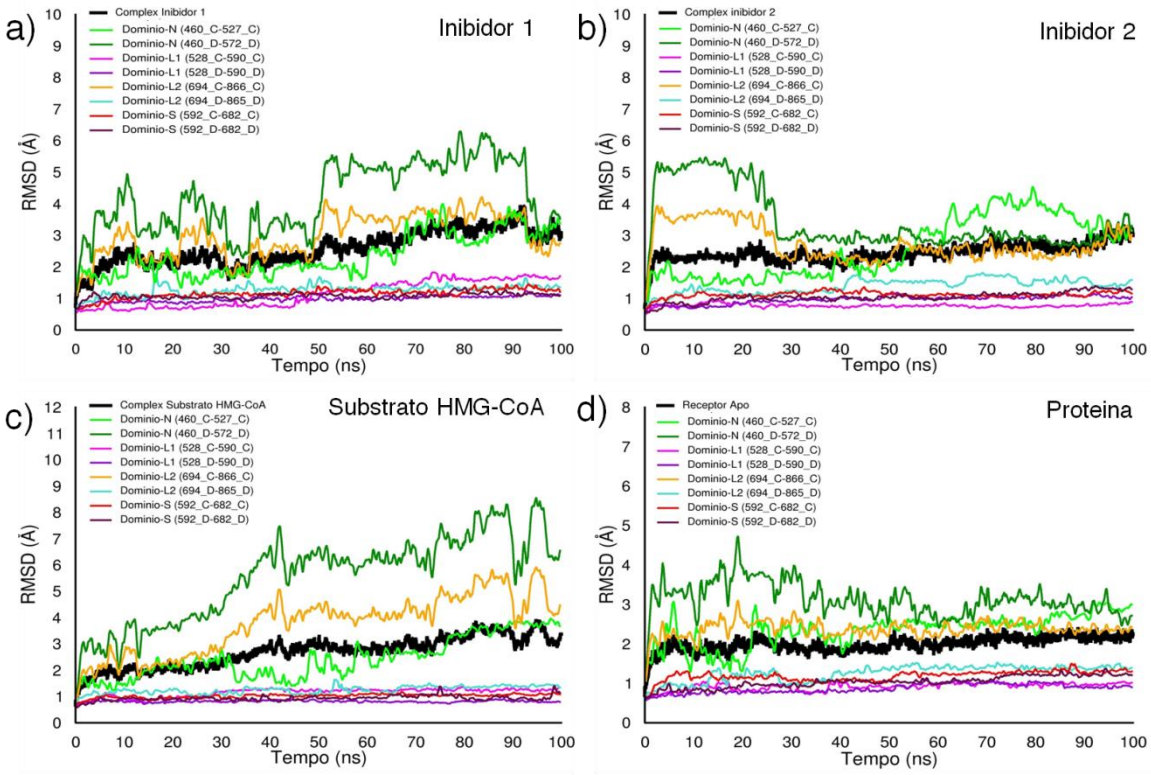
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DM

A DM, aplicando o método de Mecânica Molecular (MM), foi utilizada para descrever o mecanismo de alteração conformacional da proteína HMGR, focando principalmente no *Flap*, induzido pelo substrato e inibidores. Assim a estrutura inicial foi mantida como um ponto de referência, e essa estrutura contem a região do *Flap* fechada, ou seja, os desvios calculados como o gráfico do Raiz do Desvio Quadrático Médio (*Root Mean Square Deviation* - RMSD) irá comparar todas as estruturas ao longo da DM com a estrutura de referência estrutura da proteína com o *Flap* fechado). O RMSD para os sistemas estudados é apresentado na figura 7, os complexos de cada sistema são mostrados em preto, e o gráfico conta com a movimentação dos domínios da cadeia C: N 460-527 em verde claro, L1 528-590 em magenta, L2 694-866 em laranja e S 592-682 em vermelho, na cadeia D consistem os seguintes domínios: N 460-527 em verde escuro, L1 528-590 em roxo, L2 694-865 em ciano e S 592-682 em marrom. É possível notar que os domínios N da cadeia C (em verde claro), N da cadeia D (em verde escuro) e o L2 da cadeia C (em laranja) são responsáveis por sofrer maiores desvios no sistema, o inibidor 1 (Figura 7a) apresenta estabilidade em seu complexo, inibidor 2 (Figura 7b) se mantém com poucos desvios ao longo dos 100 ns e o substrato HMG-CoA (Figura 7c) sofre influência dos seus grupos volumosos, porém mantém-se estável em vários pontos da DM, somente para a Apo-proteína (Figura 7d) que o domínio L2 e N da cadeia C apresenta um RMSD abaixo de 3,0 Å, mesmo com essas movimentações desses domínios o complexo apresenta um bom padrão de desenvolvimento ao longo da simulação de DM.

Para todos os sistemas apresentados na Figura 7, temos movimentações do domínio L2 (694-866) da cadeia C, que contém os resíduos que compõem o *Flap* (861 a 866) e esse *loop* pode influenciar no RMSD de cada complexo, a sua permanência no sítio ativo garante uma estabilidade e baixos desvios, e sua instabilidade garante influência nos valores de RMSD (em Å), a partir desses resultados ainda não foi possível observar o comportamento isolado do *Flap*, mais adiante estudaremos essa porção da proteína com mais detalhes.

FIGURA 7 – Gráfico de RMSD (em Å) dos complexos (em preto) e para os domínios: N (460-527, cadeia C em verde claro e cadeia D em verde escuro); L1 (528-590, cadeia C em magenta, cadeia D em roxo) L2 (694-866, cadeia C em Laranja, 694-865 cadeia D em ciano); S (592-682, cadeia C em vermelho e cadeia D em marrom) *versus* o Tempo de DM (em ns). a) inibidor 1; b) inibidor 2; c) substrato HMG-CoA; d) Apo-proteína

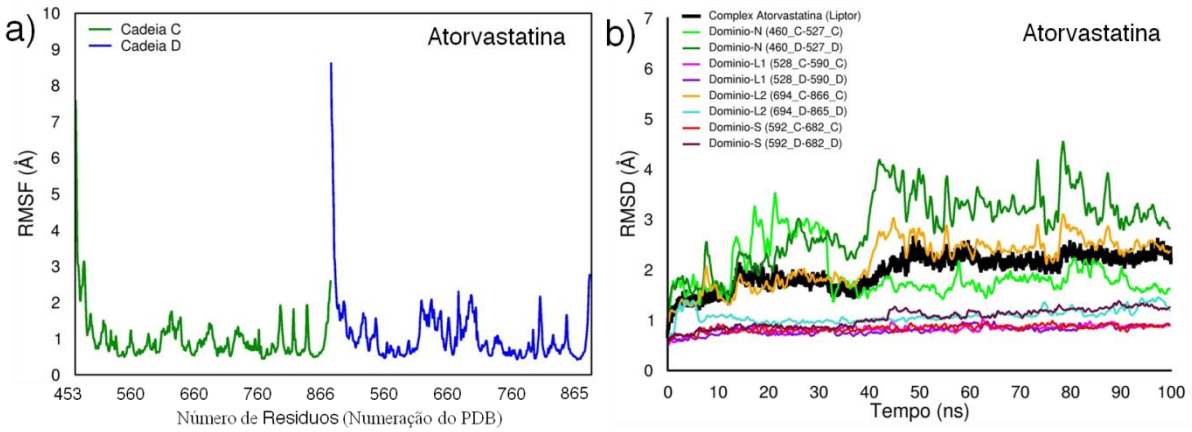


Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

A simulação da Atorvastatina conta com 100 ns de DM, o gráfico da Raiz da Flutuação Quadrática Média - *Root Mean Squared Fluctuation* (RMSF) mostra que na cadeia C temos flutuações abaixo de 2,0 Å, e na cadeia D temos os resíduos 600 a 720 com RMSF bem próximos de 2,0 Å e os C e N terminais contam com as maiores variações na proteína, o resíduo inicial da porção do *Flap,* His861, tem um RMSF igual a 1,429 Å e a His866 catalítica como último resíduo tem uma flutuação média de 2,588 Å (Figura 8a). O RMSD para o sistema da Atorvastatina é mostrado na Figura 8b, se mantendo em média a 2,0 Å demonstrando estabilidade no complexo. A literatura não cita se o *Flap* está envolvido no processo de inibição pela Atorvastatina, o domínio L1 tem um desvio mais discreto em relação aos outros sistemas apontando que a porção do *Flap* se mantém com baixa mobilidade ao longo da DM. A Atorvastatina foi introduzida nesses resultados por se um composto já utilizado pela clínica no controle

dos níveis de colesterol, porém não há estudo das conformações da proteína HMGR envolvendo as estatinas.

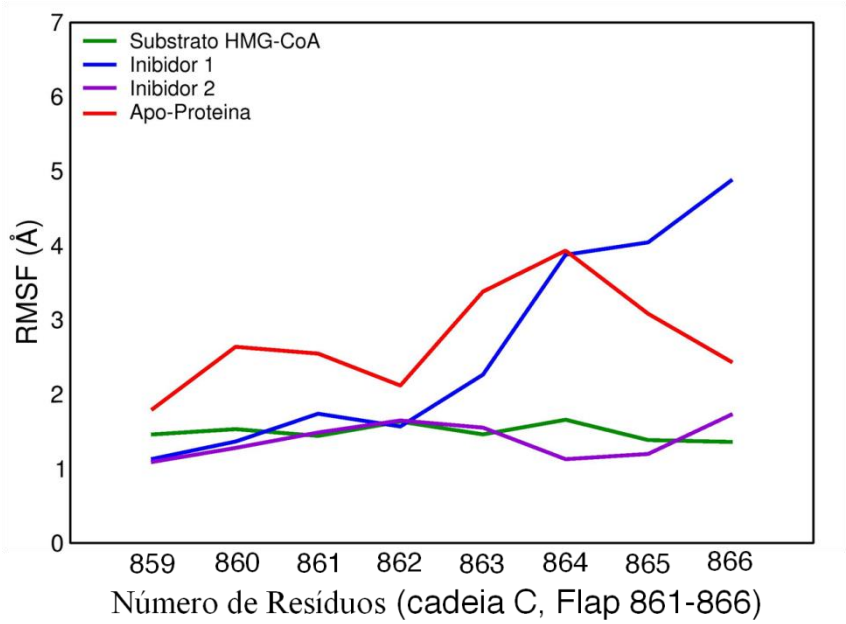
FIGURA 8 – a) Gráfico de RMSF (em Å) das cadeias C (em Verde) e cadeia D (em Azul) para o complexo da Atorvastatina; b) Gráfico de RMSD (em Å) para o complexo da Atorvastatina e dos domínios da proteína *versus* tempo de DM (em ns)



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

O mecanismo de movimentação da proteína no processo de catálise com o substrato é de extrema importância, acredita-se que as mudanças que ocorrem no *Flap* podem desfavorecer o sistema provocando decaimento no processo, e a His866 como resíduo catalítico está envolvida diretamente nesse sistema, e ao longo da simulação o *Flap* sofre influência dos ligantes, o Gráfico 1 tem o RMSF para os resíduos His861, Leu862, Val863, Lys864, Ser865 e His866, para o HMG-CoA a flutuação média demonstra que o *Loop* tampa a região do sítio ativo se mantendo fechado, e o inibidor 2 provoca o fechamento do *Flap*, mantendo um RMSF bem próximo do substrato, e o inibidor 1 já não possui essa característica e não induz o fechamento, a Apo-proteína tem uma flutuação que indica que o *Flap* está semi aberto para essa simulação de 100 ns. Os RMSF das duas cadeias para o inibidor 1, 2, substrato e Apo-proteína são mostrados na Figura 9.

GRÁFICO 1 – RMSF (em Å) dos resíduos do *Flap* (860-866) para o substrato HMG-CoA (em verde), inibidor 1 (em azul), inibidor 2 (em roxo) e Apo-proteína (em vermelho)

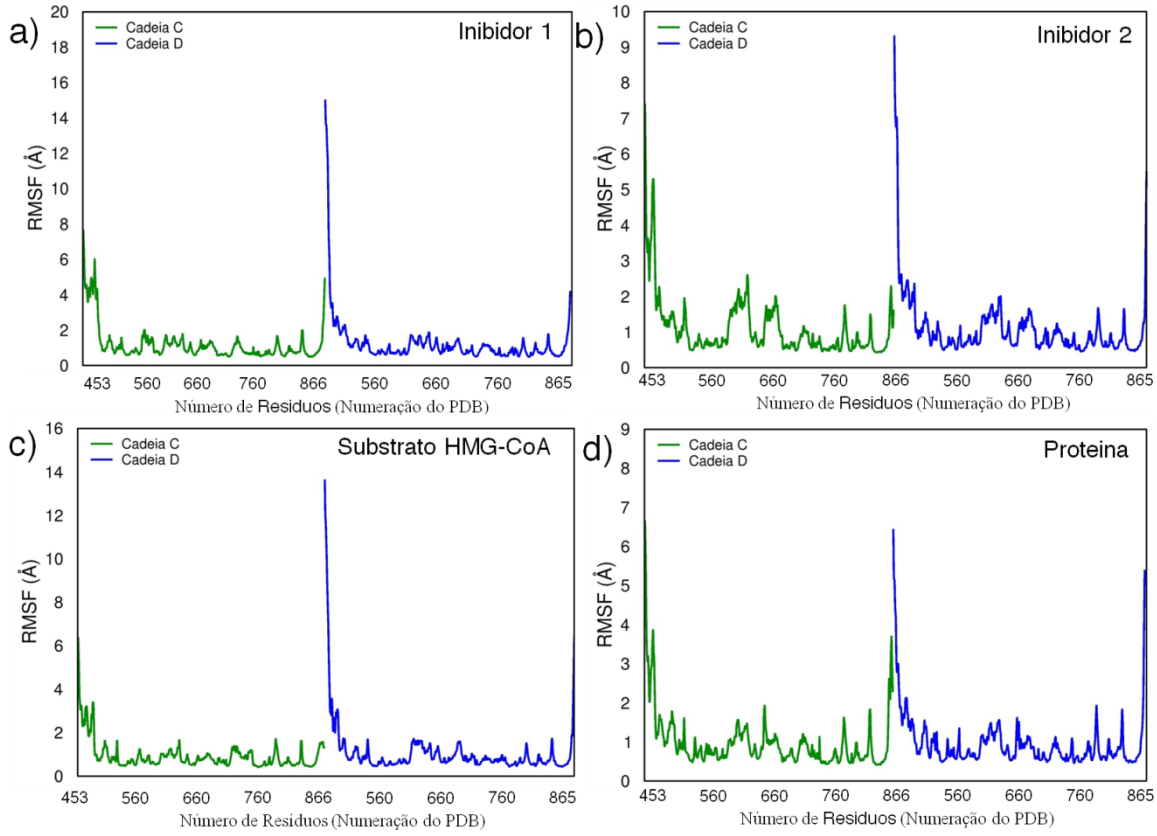


Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

A Figura 9a apresenta o RMSF da cadeia C e D do complexo HMGR-inibidor 1, os resíduos permanecem com uma flutuação abaixo de 2,0 Å, ja os C-terminais e N-terminais apresentam valores mais altos de flutuação, observando o domínio *Flap*, observa-se que possui um RMSF igual a 6,0 Å, indicando altas flutuações para esses resíduos (861-866). A Figura 9b mostra o complexo com o inibidor 1, que tem os intervalos dos aminoácidos 600 a 640 e 660 a 670 que demonstram-se com variações mais elevadas, tanto na cadeia C como na cadeia D, já os resíduos do *loop* têm baixas flutuações, próximo de 2,0 Å. O substrato HMG-CoA possui bons padrões de RMSF, os resíduos 861 a 866 possuem baixa média, indicando estabilidade na simulação, o domínio N-terminal da cadeia C possui alta mobilidade assim como para os outros complexos (Figura 9c).

A Apo-proteína possui movimentação nas cadeias C e D, o *Flap* mostrado no Gráfico 1 tem flutuações características de um estado semiaberto comparados aos demais sistemas, as flutuações de cada resíduo da proteína livre são apresentadas na Figura 9 que demonstram movimentações em todos os domínios.

FIGURA 9 – Gráfico de RMSF (em Å) das cadeias C (em Verde) e cadeia D (em Azul) para os complexo dos inibidores 1 e 2, substrato HMG-CoA e Apo-proteína



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

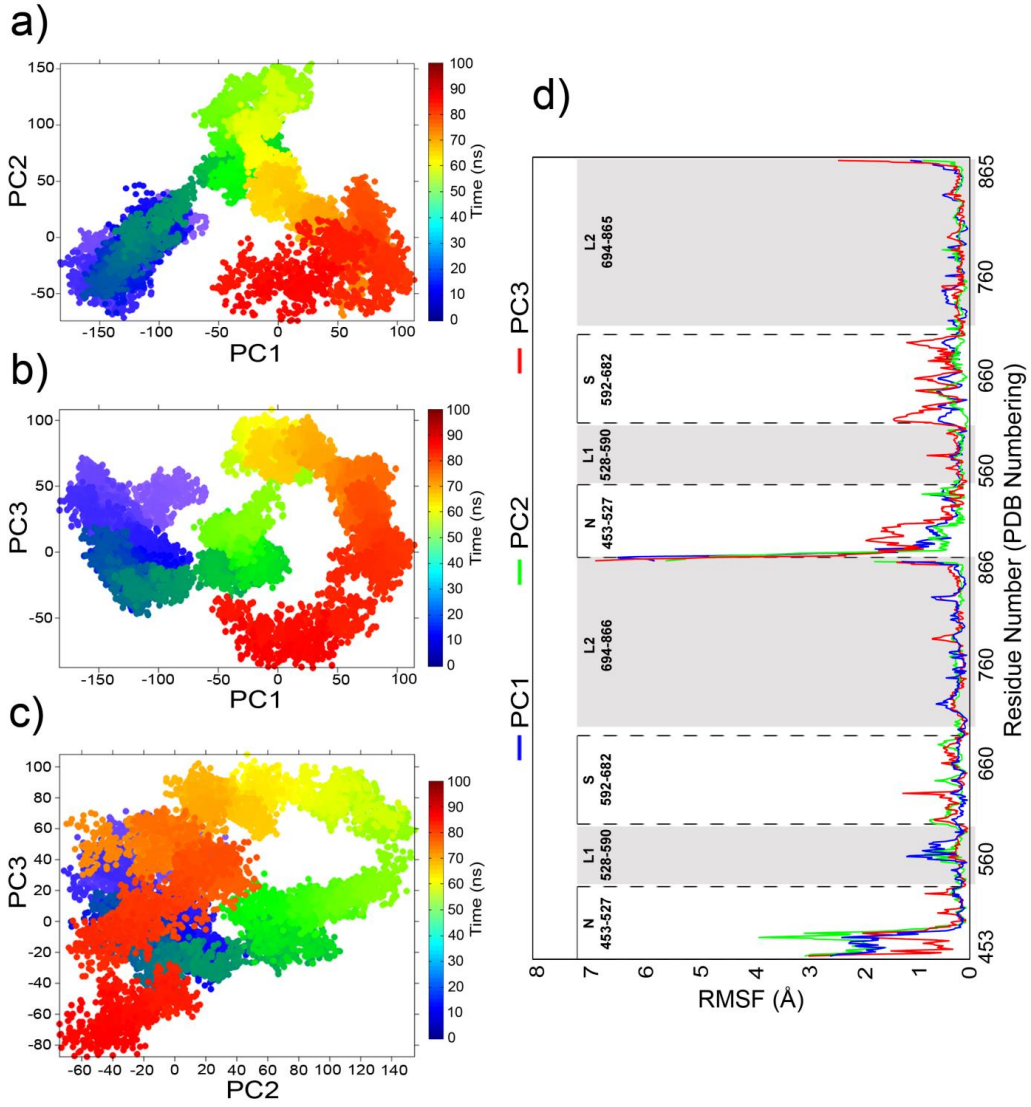
Os resultados do RMSF nos monstram as flutuações médias de cada complexo, porém não possui tanta precisão por se tratar de uma média de Flutuação, logo não é possivel observar as movimentações coletivas e individuais da proteína HMGR, o que se faz necessário um estudo mais detalhado desses sistemas, e a Análise de Componentes Principais (PCA) é capaz de separar os movimentos principais da proteína, observando cada domínio e suas modificações estruturais, os resultados de PCA serão apresentados no proximo tópico.

5.2 PCA

O agrupamento de projeções das estruturas recolhidas durante 100 ns de DM foram traçados em três perfis transversais, PC1-PC2, PC1-PC3 e PC2-PC3 para todos os sistemas, as colorações controlam os números de trajetórias de simulação de azul (0 ns) tendendo para o verde (50 ns) levando até o fim da DM em vermelho (100 ns). Os resultados de PCA mostram as modificações estruturais da proteína HMGR, demonstrando a influência do estado ligado e não ligado, tendo como foco a região dos resíduos do *Flap*. A Figura 10 mostra os PCs combinados entre si, para o

sistema do inibidor 1, e ainda demonstra o RMSF durante cada componente principal (Figura 10d). Em PC1 *vs* PC2 (Figura 10a) e PC1 *vs* PC3 (Figura 10b) temos a distribuição de estruturas em subconjuntos de acordo com sua similaridade tendo pontos agrupados, podendo ser divididos em dois grandes grupos em PC1 para os dois gráficos com estruturas de 0 a 40 ns e o outro grande grupo de estruturas de 50 a 100 ns e outros subgrupos se formam dentre essas estruturas. Já em PC2 *vs* PC3 temos uma dispersão das estruturas ao longo dos dois PCs (Figura 10c), o RMSF mostra o comportamento dos domínios para cada componente, mostrando o PC3 com maior variação.

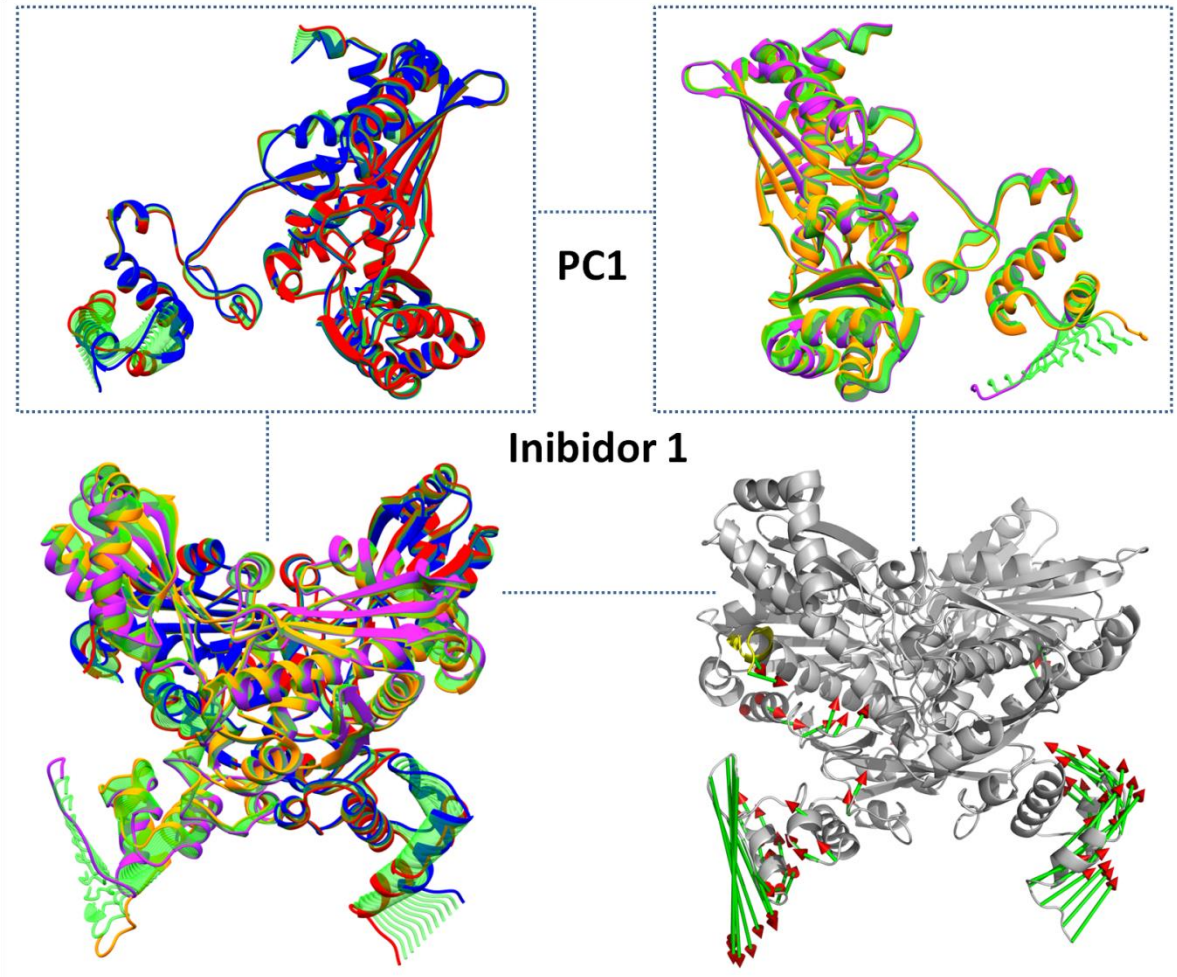
FIGURA 10 – Gráfico de PC *vs* PC para o **inibidor 1**; a) gráfico do PC1 *vs* PC2; b) gráfico PC1 *vs* PC3; c) PC2 *vs* PC3, a coloração nos gráficos de PC *vs* PC é referente a trajetória, azul 0 ns; verde 50 ns; vermelho 100 ns. d) gráfico de RMSF dos resíduos da proteína para o PC1, PC2 e PC3



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

O movimento em PC1 das estruturas para o complexo HMGR-inibidor 1 é mostrado na Figura 11, onde a estrutura inicial da cadeia C é mostrada em vermelho e a final em azul, e na cadeia D temos a estrutura rosa como a estrutura inicial e laranja para a estrutura final, as estruturas intermediarias são mostradas em verde, essas estruturas caracterizam o movimento de PC1 para esse sistema, observa-se que no início do movimento da cadeia C (estrutura em vermelho) o *Flap* se encontra aberto e se movimenta em direção ao sítio ativo, como pode ser observado na estrutura com os vetores, e os N domínios possuem bastante movimentação na cadeia C e D. Em PC1 o estado conformacional do *Flap* se encontra em movimentos que o direcionam para um estado fechado, indo em direção ao sítio ativo de ligação.

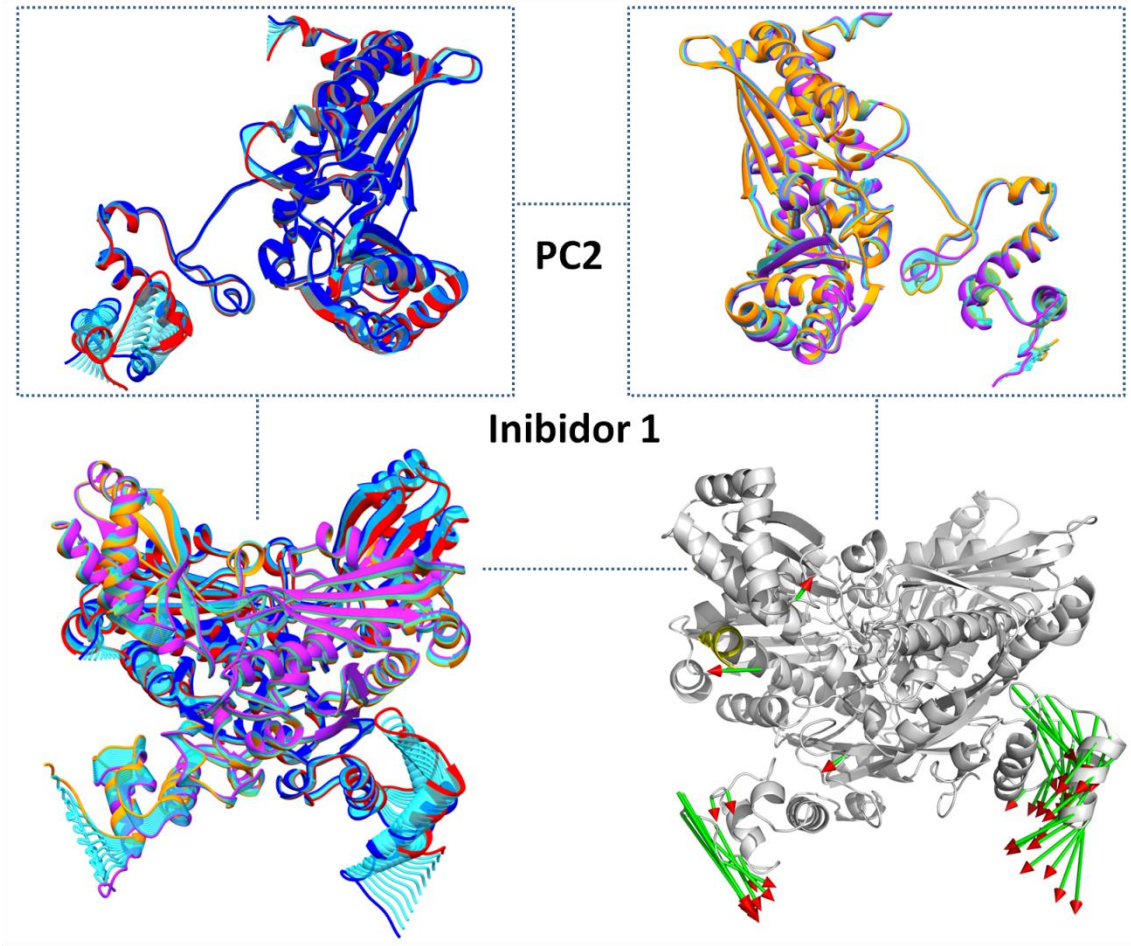
FIGURA 11 – Movimentação da proteína em PC1 para o sistema do **inibidor 1**, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em verde. Os vetores do PC1 é mostrado em verde para os bastões e as setas em vermelho



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

O segundo movimento principal (PC2) para a estrutura da proteína do sistema do inibidor 1 é mostrado na Figura 12. Em PC2 temos as estruturas intermediárias em cor ciano, a estrutura inicial em vermelho e final em Azul (cadeia C) e rosa para o movimento inicial e laranja na estrutura final (cadeia D), é possível observar que o *Flap*, encontrado na cadeia C, passa do estado fechado (identificado anteriormente pelo PC1) para o estado aberto, a estrutura final em azul demonstram um estado totalmente aberto do *loop*, indicando que a estrutura da HMGR ligada ao inibidor 1 possui dois estado conformacionais do domínio *Flap*, uma vez que o primeiro componente principal (PC1) identificou um estado e o segundo componente (PC2) identificou outro estado conformacional, e as contribuições desses dois componentes principais caracterizam o estado conformacional desse sistema.

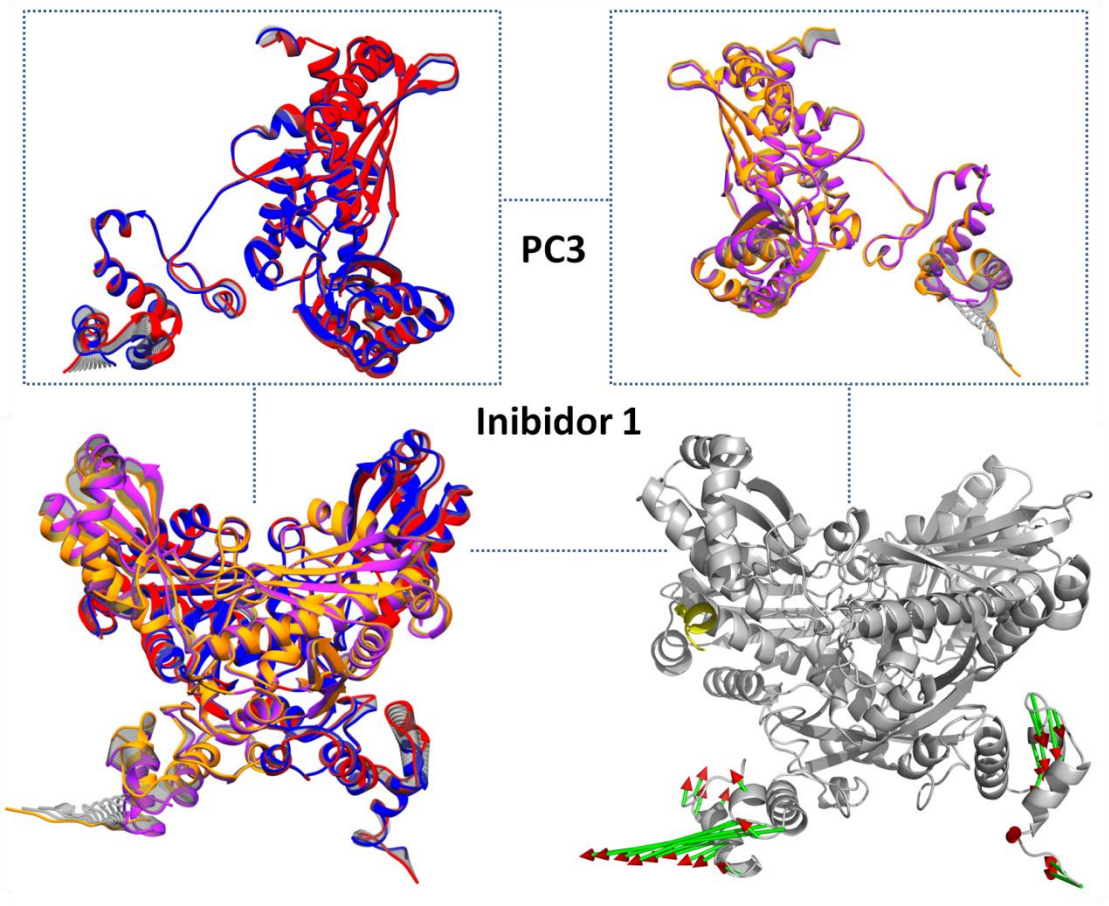
FIGURA 12 – Movimentação da proteína em PC2 para o sistema do **inibidor 1**, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em verde. Os vetores do PC2 é mostrado em verde para os bastões e as setas em vermelho



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

A Figura 13 traz os resultados de PC3 para a simulação da HMGR-inibidor 1, o terceiro componente costuma apresentar a terceira maior contribuição do movimento. O PC3 confirma que o inibidor 1 não é capaz de induzir o fechamento do *Flap* por completo, pois temos dois estados identificados (PC1 e PC2) e no terceiro movimento observa-se que o domínio *Flap* não possui movimentação, indicando que não possui uma terceira conformação estrutural, se mantendo entre o estado aberto e o estado fechado. A principal contribuição de PC3 são os N-terminais que possuem grande mobilidade, principalmente na cadeia D, que temos os resíduos se movimentando para "fora" como é mostrado na estrutura com os vetores, que mostram a direção e amplitude do movimento de PC3.

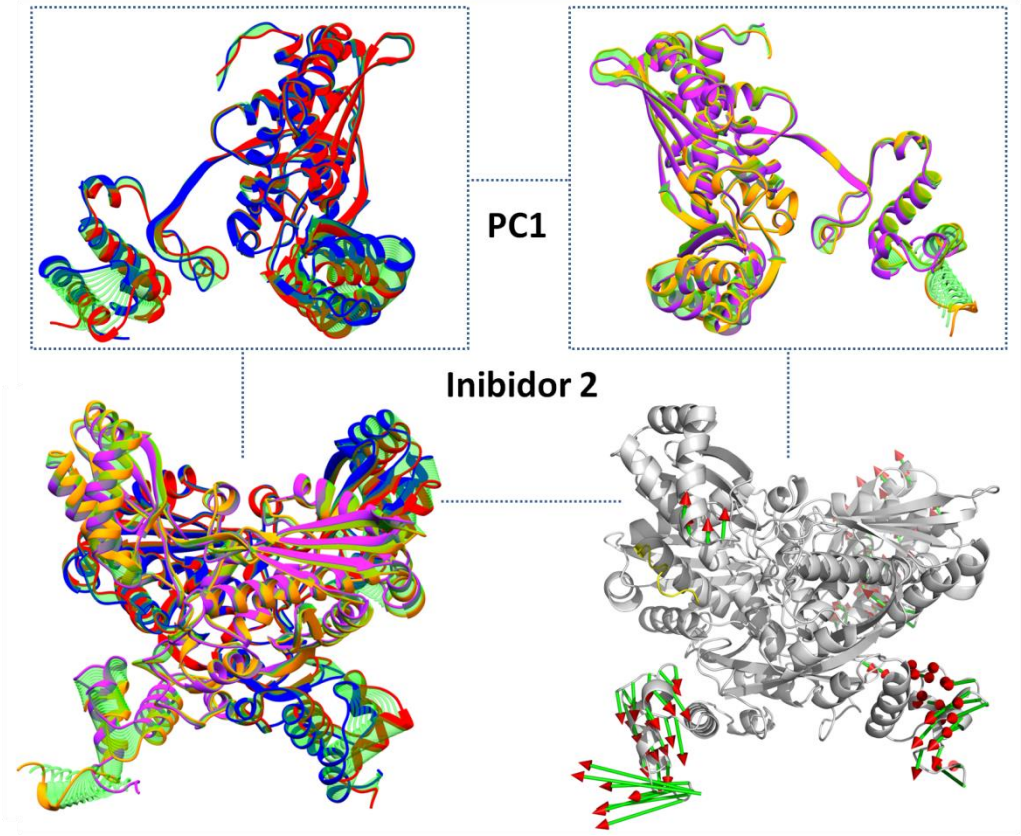
FIGURA 13 – Movimentação da proteína em PC3 para o sistema do **inibidor 1**, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em cinza. Os vetores do PC3 é mostrado em verde para os bastões e as setas em vermelho



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

Esses dois estados conformacionais observados para o complexo HMGR-inibidor 1 não são observados para o inibidor 2. Os resultados demonstram que o *Flap* cobre o sítio ativo durante toda simulação de DM, o PCA mostrou que para esse sistema temos o estado fechado do *loop* cobrindo o sítio ativo e o inibidor 2, podemos observar isso no mecanismo conformacional gerado pelo PC1, PC2 e PC3. O estado conformacional se encontra em um mínimo favorável uma vez que não sofre uma variação para outras conformações, contribuindo diretamente na ligação e na inibição pelo ligante 2, a Figura 14 mostra o primeiro componente principal (PC1), a Figura 15 apresenta as cadeias do dímero e os vetores em PC2, a Figura 16 mostra o PC3 da estatina 2.

FIGURA 14 – Movimentação da proteína em PC1 para o sistema do **inibidor 2**, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em verde. Os vetores do PC1 é mostrado em verde para os bastões e as setas em vermelho

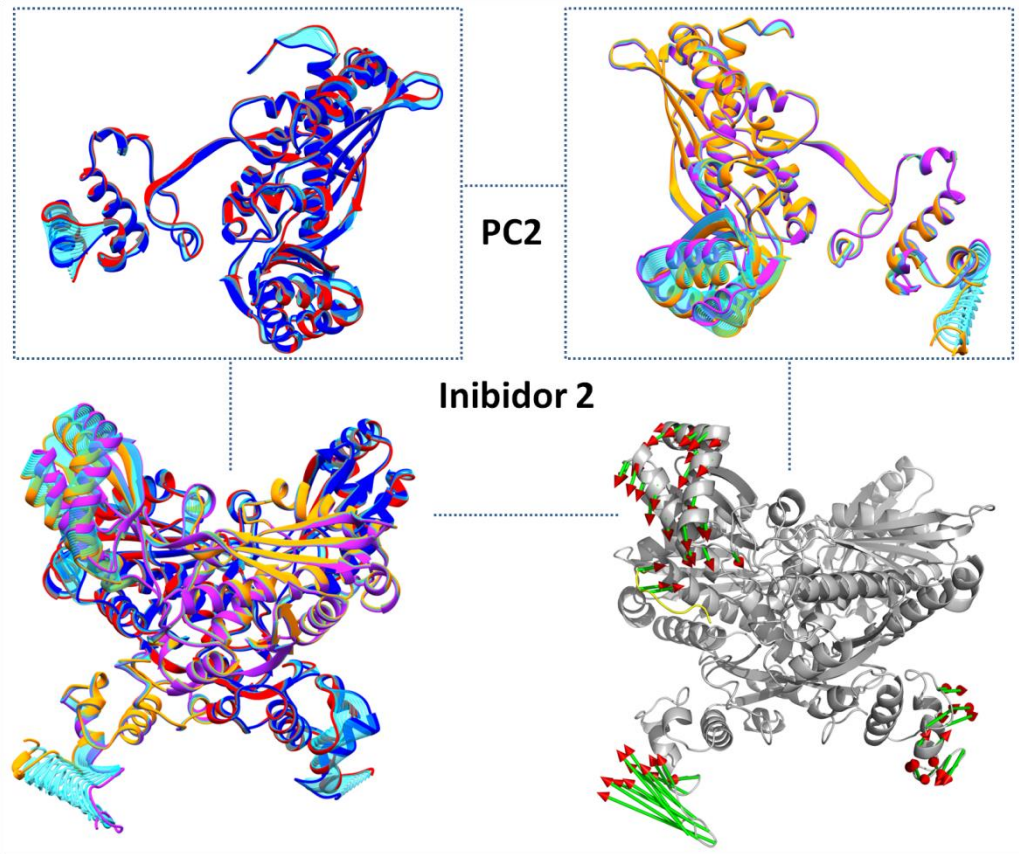


Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

Já em PC2 (Figura 15) temos o domínio S se movimentando para baixo, como pode ser observado na estrutura com os vetores que mostram a direção e amplitude

desse movimento, o *Flap* conta com os resíduos 861, 862 se acomodando em direção ao sítio ativo, ou seja, se movimenta para interagir com o inibidor 2 e fechar mais ainda o sítio de ligação, e os resíduos 863, 864, 865, e 866 não sofrem movimentações acentuadas, somente se deslocam para fechar mais o sítio, isso pode ser observado na estrutura da cadeia C (movimento inicial em vermelho e estrutura final em azul).

FIGURA 15 – Movimentação da proteína em PC2 para o sistema do **inibidor 2**, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em ciano. Os vetores do PC2 é mostrado em verde para os bastões e as setas em vermelho

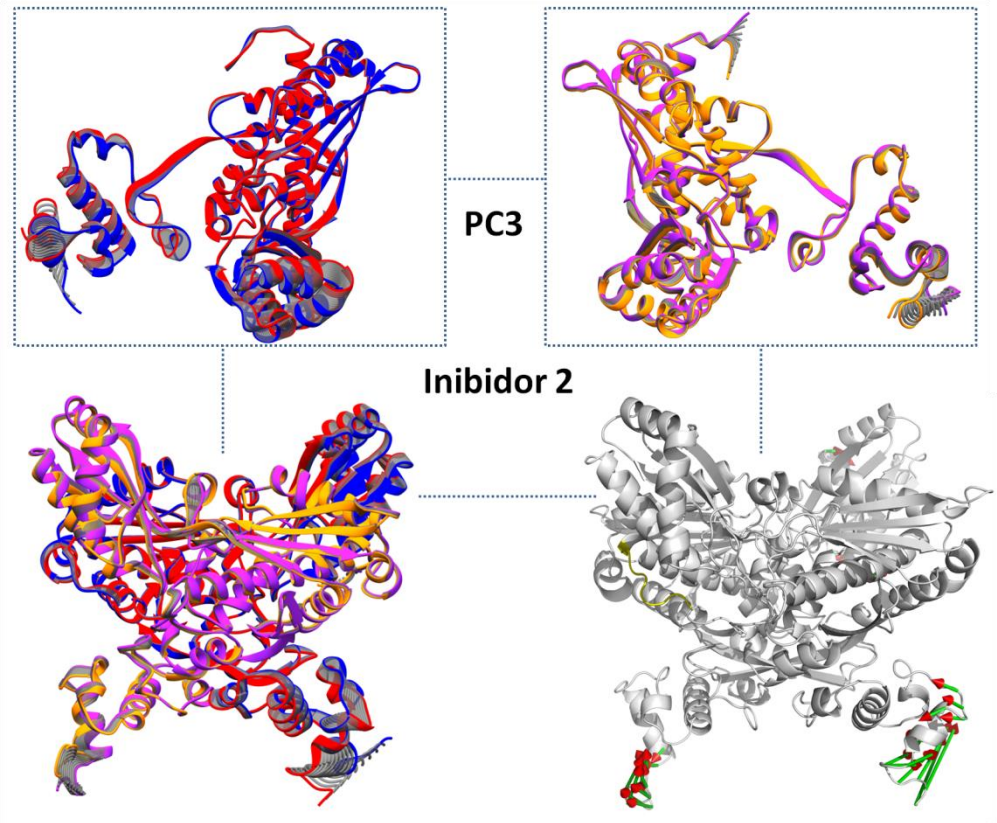


Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

Com a aplicação do PCA para o complexo HMGR-inibidor 2, podemos indicar que a movimentação do domínio *Flap* na presença do inibidor 2 se encontra fechado, cobrindo o ligante e tampando o sítio ativo, aumentando a estabilidade do complexo, pois o PC1 e PC2, nos mostram perfeitamente que os outros domínios têm maiores movimentações do que o *loop* que se encontra na região catalítica, e o PC3 (Figura 16) mostra que essa região permanece estável sem movimentações do início do movimento (estrutura em vermelho, cadeia C) e no final (estrutura azul, cadeia C), e

temos baixa movimentação para os outros domínios, vemos vetores bem menores, e se encontram somente na região do N-terminal, o domínio *Flap* tem sido observado por estar presente em regiões que interagem com o ligante, e sua presença no sítio pode influenciar até na permanência do inibidor na cavidade catalítica, uma vez que fechado impede a saída e instabilidade química do ligante.

FIGURA 16 – Movimentação da proteína em PC3 para o sistema do **inibidor 2**, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em cinza. Os vetores do PC3 é mostrado em verde para os bastões e as setas em vermelho

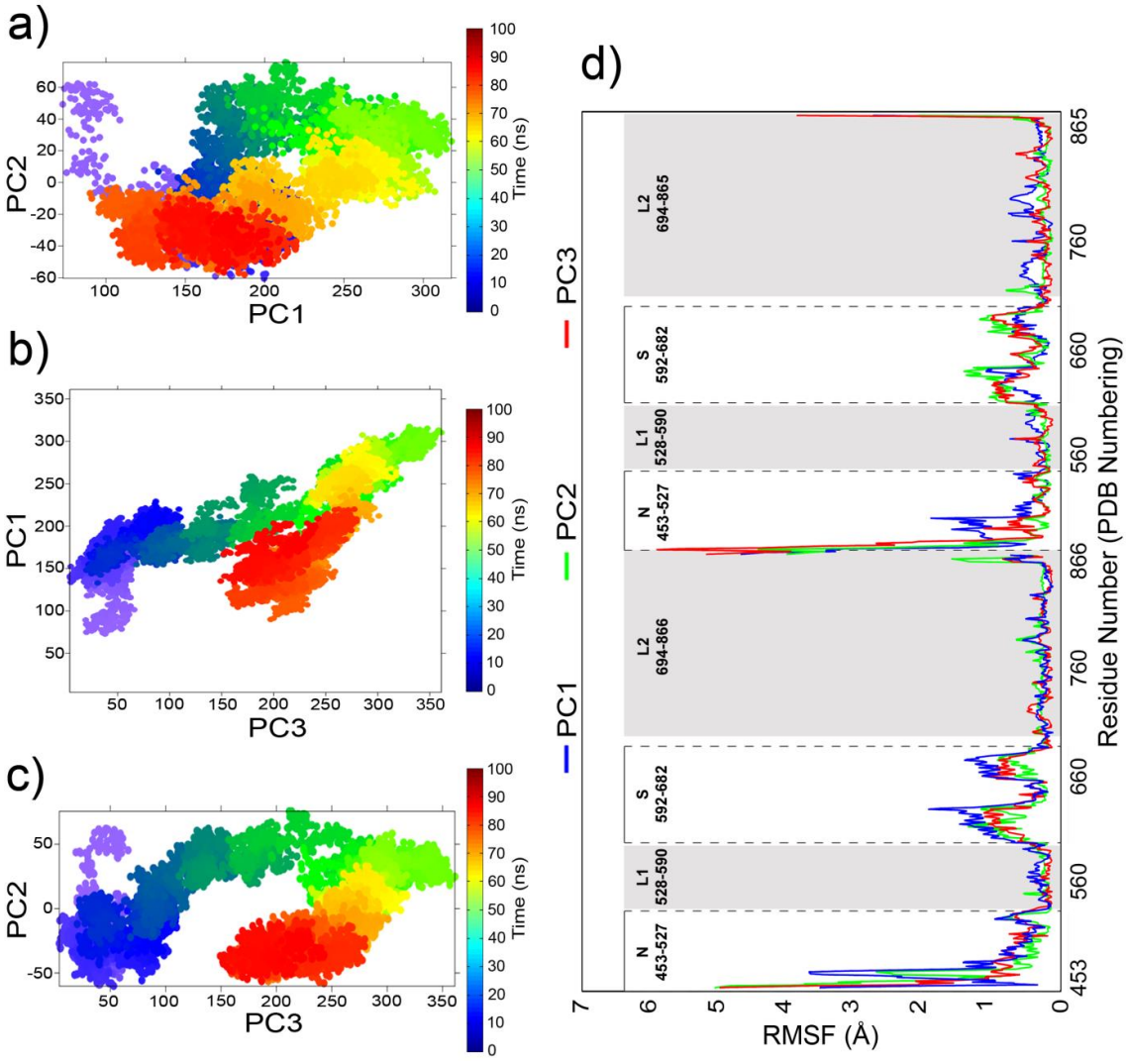


Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

Os valores de PC1 *vs* PC2, PC1 *vs* PC3 e PC2 *vs* PC3 em conjunto com RMSF de cada componente encontrados no complexo HMGR-inibidor 2 são apresentados na Figura 17, onde podemos perceber que PC1 e PC2 possui estruturas bem mais agrupadas se mantendo em grupos estruturais bem próximos e formando mínimos durante toda simulação de DM, o PC2 se distribui com os mesmo agrupamentos de estruturas de 0 a 100 ns e PC3 o agrupamento das estruturas percorrem o mesmo sentido dos outros PCs formando mínimos durante a DM, o RMSF nos possibilita a comparação da flutuação média de cada resíduo em PC1, PC2 e PC3, que para cada

domínio os resíduos seguem o mesmo comportamento para os PCs, logo podemos afirmar que o inibidor 2 provoca um estado conformacional da proteína estável, uma vez que as estruturas possuem similaridade durante toda simulação e não sofrem com alterações que evidenciem outros estados conformacionais, e a estrutura do *Flap* mostra que cobre o sítio ativo se mantendo estável, com flutuações abaixo de 1,0 Å, demonstrando alta estabilidade dos resíduos do *loop* com o sítio ativo e o inibidor 2.

FIGURA 17 – Gráfico de PC *vs* PC para o **inibidor 2**; a) gráfico do PC1 *vs* PC2; b) gráfico PC1 *vs* PC3; c) PC2 *vs* PC3, a coloração nos gráficos de PC *vs* PC é referente a trajetória, azul 0 ns; verde 50 ns; vermelho 100 ns. d) gráfico de RMSF dos resíduos da proteína para o PC1, PC2 e PC3

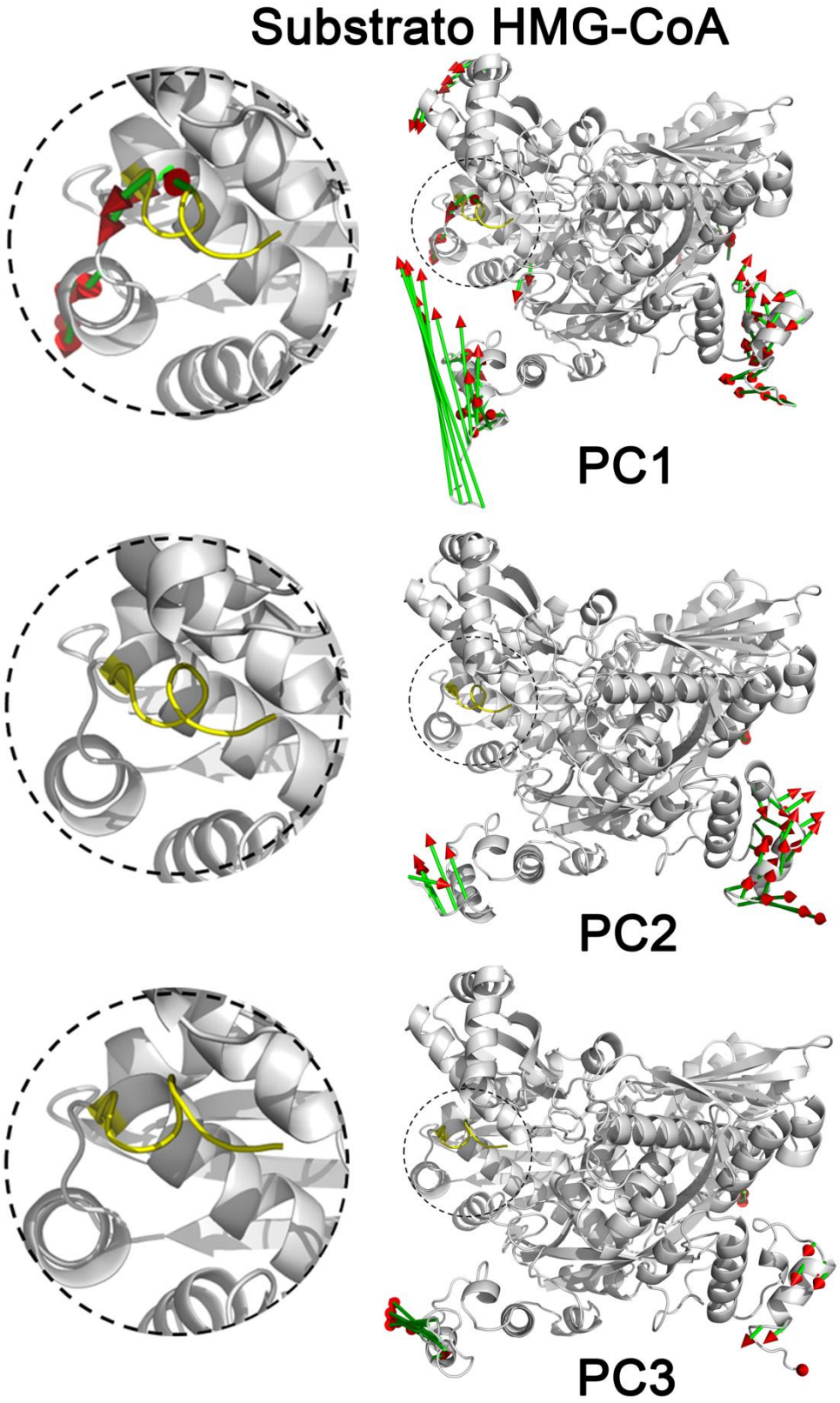


Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

A verificação da conformação do receptor ligado ao substrato HMG-CoA demonstra que o estado fechado do *Flap* é o principal estado conformacional do *loop* cobrindo o ligante, aqui o substrato induz o fechamento do *Flap* para que o sistema

comece o processo catalítico, e essa indução nos mostra que o fechamento do *Flap* favorece e estabelece um melhor ambiente de ligação tonando o sistema estável, a Figura 18 demonstra a amplitude e direção das movimentações da proteína através dos vetores, colocando em destaque a região do *loop* (em amarelo), que participa e contribui para o processo de ligação substrato-enzima, e se mantém fechado com o substrato ligado criando uma tampa que cobre o sítio ativo, uma vez que esse estado fechado mantém a estabilidade do sistema criando um impedimento espacial capaz de segurar o HMG-CoA para que ocorra a catálise. Esse comportamento foi observado para o substrato e não estava envolvido no processo de ligação de inibidores dessa proteína (TABERNERO, et al., 1999; JAWAID, et al., 2010), porém percebemos aqui que existem inibidores que provocam o fechamento desse *Flap* tornando a ligação inibidor-receptor mais favorável influenciando diretamente no processo de rendimento e estabilidade da inibição. Os vetores mostram ainda que os movimentos mais presentes da proteína se encontram no N-terminal.

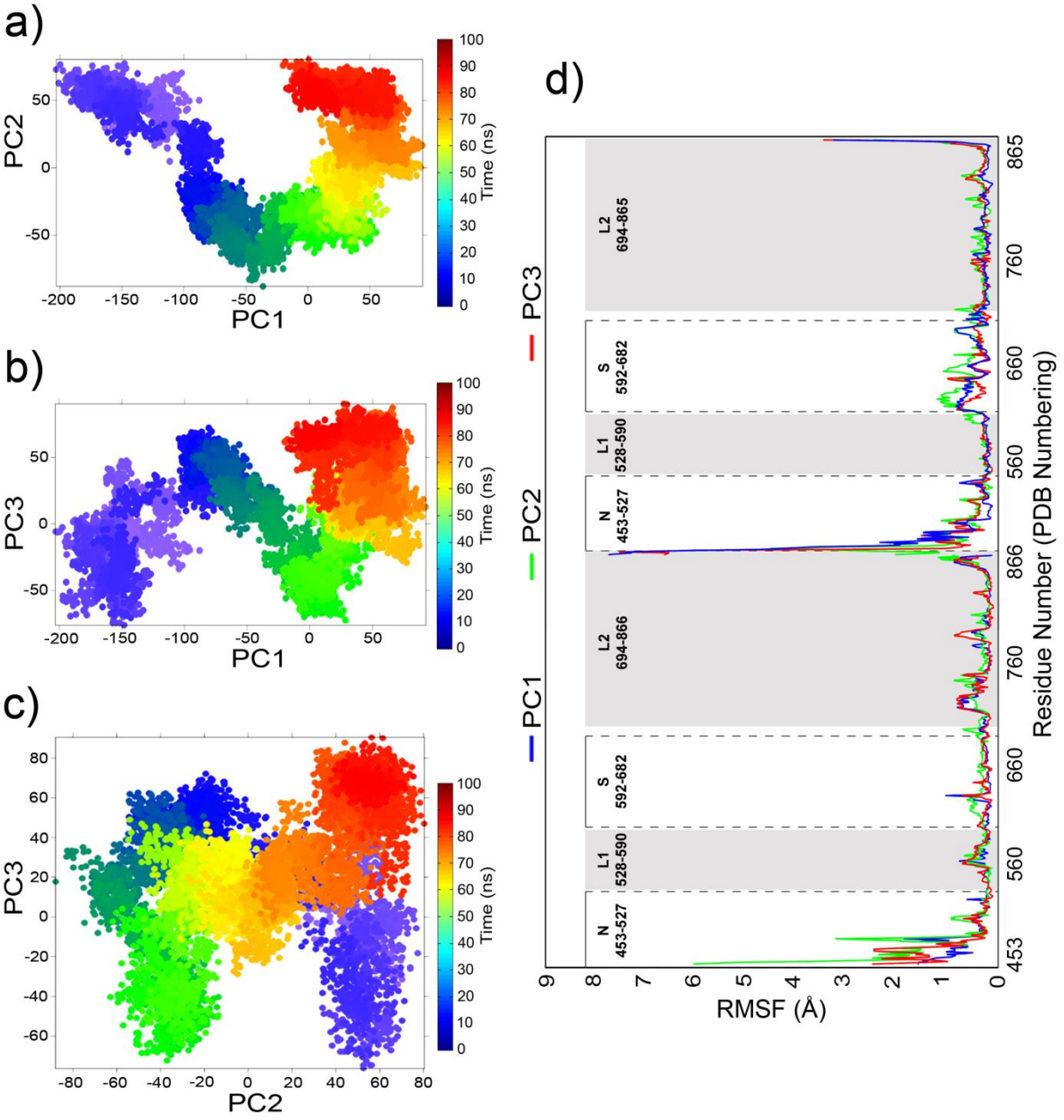
FIGURA 18 – Movimentação da proteína em PC1, PC2 e PC3 para o sistema do **Substrato HMG-COA** com os vetores (bastões verde e setas em vermelho) indicando a amplitude e direção do movimento, em evidencia (em amarelo) a porção dos resíduos 861-866 que compõem o *FLAP*



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

As Figuras 19a, b e c mostram os gráficos de PC1 *vs* PC2, PC2 *vs* PC3 e PC3 *vs* PC1, aplicando a superfície em cores referentes a cada momento da simulação de 100ns de DM do complexo HMGR-HMG-CoA. A Figura 19d, apresenta o RMSF para cada movimento encontrado pelo PC.

FIGURA 19 – Gráfico de PC *vs* PC para o **substrato HMG-CoA**; a) gráfico do PC1 *vs* PC2; b) gráfico PC1 *vs* PC3; c) PC2 *vs* PC3, a coloração nos gráficos de PC *vs* PC é referente a trajetória, azul 0 ns; verde 50 ns; vermelho 100 ns. d) gráfico de RMSF dos resíduos da proteína para o PC1, PC2 e PC3

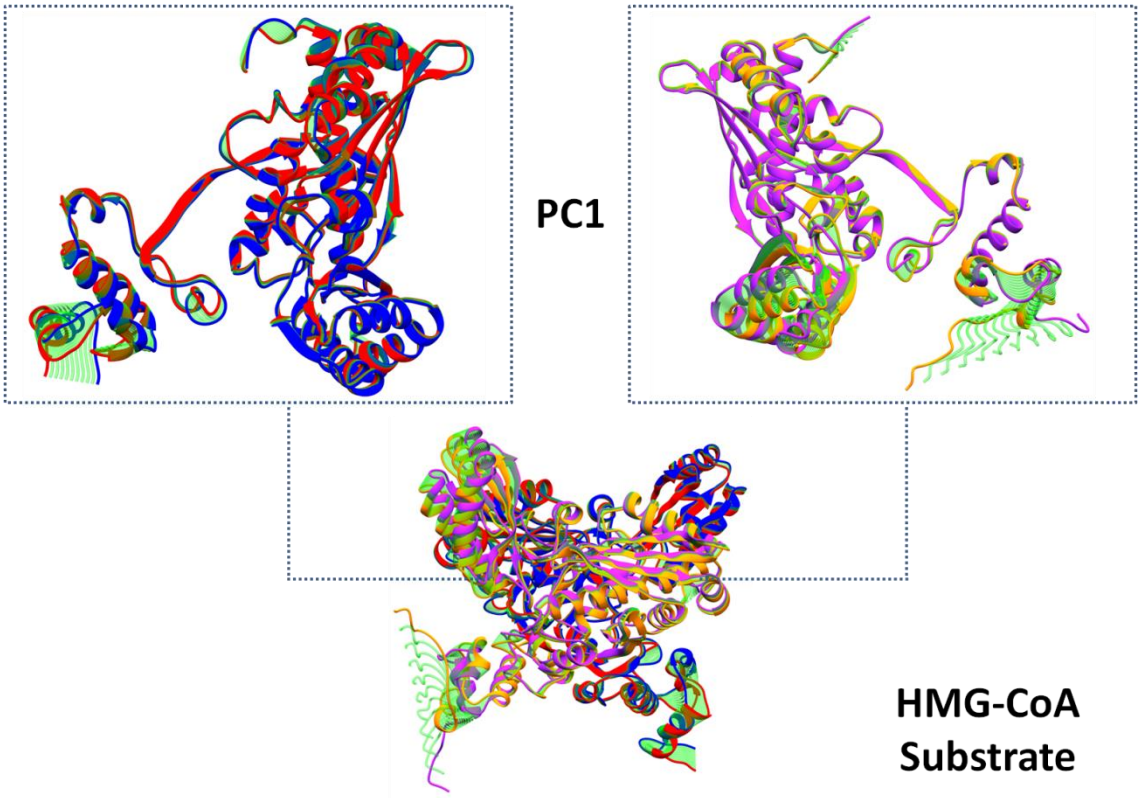


Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

O gráfico de PC1 *vs* PC2 (Figura 19a) plota as estruturas referentes ao primeiro e segundo movimentos encontrados durante a simulação, o deslocamento das estruturas é acompanhado pelo tempo de simulação em cores (cor azul em 0ns, verde em 50ns e 100ns em vermelho), as estruturas encontradas de 0 a 40 ns se agrupam em micro estados de similaridade que se deslocam ao longo do PC, o PC1 *vs* PC3, mostra um movimento parecido encontrado no primeiro gráfico, onde temos a caracterização de um deslocamento dessas estruturas características de cada movimento representado pelos componentes. O PC2 *vs* PC3 aponta uma correlação mais dispersa dessas estruturas, com pontos iniciais (0ns) com similaridades com outros pontos da DM. Quando plotado os gráficos de RMSF de cada componente (Figura 19d), percebemos que as flutuações medias de cada movimento se assemelham, indicando que os deslocamentos desses pontos possuem estruturas de cada domínio semelhantes.

As estruturas inicial (em vermelho, cadeia C) e final (em azul, cadeia C) do PC1 para o complexo HMGR-HMG-CoA (Figura S5), mostram que o *Flap* tem os resíduos 864 e 863 que tem uma pequena movimenta, porém essa movimentação não é suficiente para fazer esse *loop* se abrir (Figura 20).

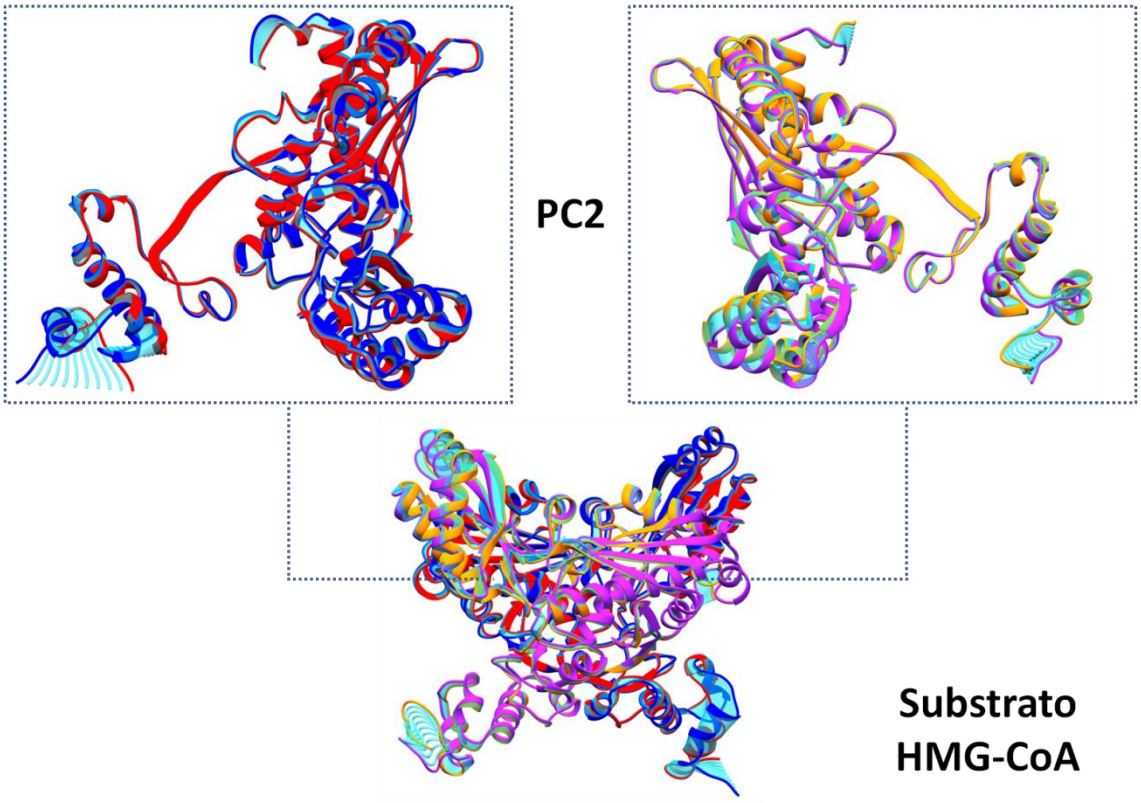
FIGURA 20 – Movimentação da proteína em PC1 para o sistema do **Substrato HMG-CoA**, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em verde



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

As estruturas de PC2 possuem características similares no domínio *Flap* de movimentações (Figura 21). As movimentações do *Loop* não fazem com que o *Flap* se abra, como foi observado na Figura 18 com os vetores, que por ser um movimento pequeno presente somente em PC1, os demais PCs não houve movimentos perceptível para criar uma direção e amplitude de movimento de vetores. As estruturas finais e iniciais da cadeia C e D (cadeia C – estrutura inicial em vermelho e final em azul, cadeia D – estrutura inicial em rosa em final em laranja, as estruturas intermediarias são mostradas em ciano) mostram o deslocamento principalmente do domínio N-terminal das duas cadeias, enquanto os outros domínios possuem baixas mobilidades.

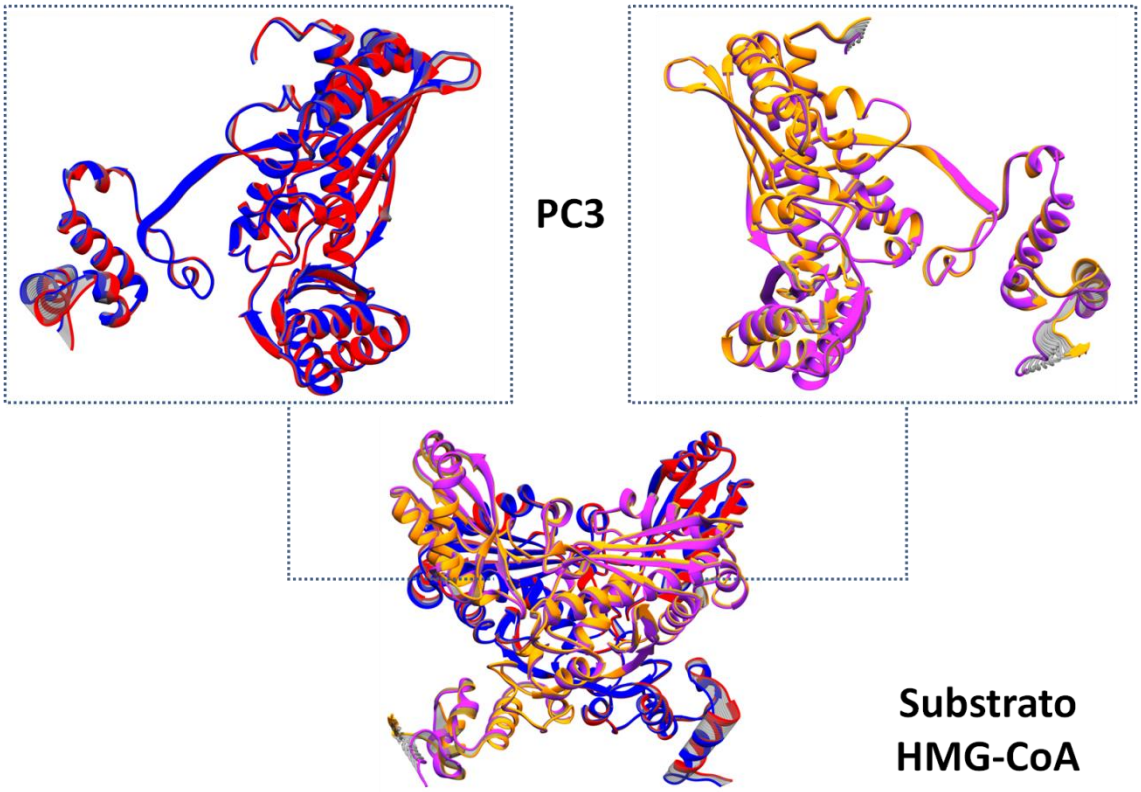
FIGURA 21 – Movimentação da proteína em PC2 para o sistema do **Substrato HMG-CoA**, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em ciano



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

Em PC3 temos as estruturas iniciais e finais do complexo HMGR-HMG-CoA, que não apresentam descolamento estruturais drásticos (Figura 22), principalmente na região dos resíduos do *Flap*, o C-terminal da cadeia D (que possui os resíduos de 861 a 865) sofrem uma movimentação nos resíduos finais, porém essas movimentações não são aqui avaliadas (isso se aplica para todos os complexos estudados) por não conter principalmente o resíduo catalítico His866 e pela presença do sítio ativo estudado estar localizado no lado oposto, não é possível observar uma relação de modificações estruturais que correlacionem os dois sítios ativos, pois o comportamento do *Flap* no sítio estudado possui comportamento diferente.

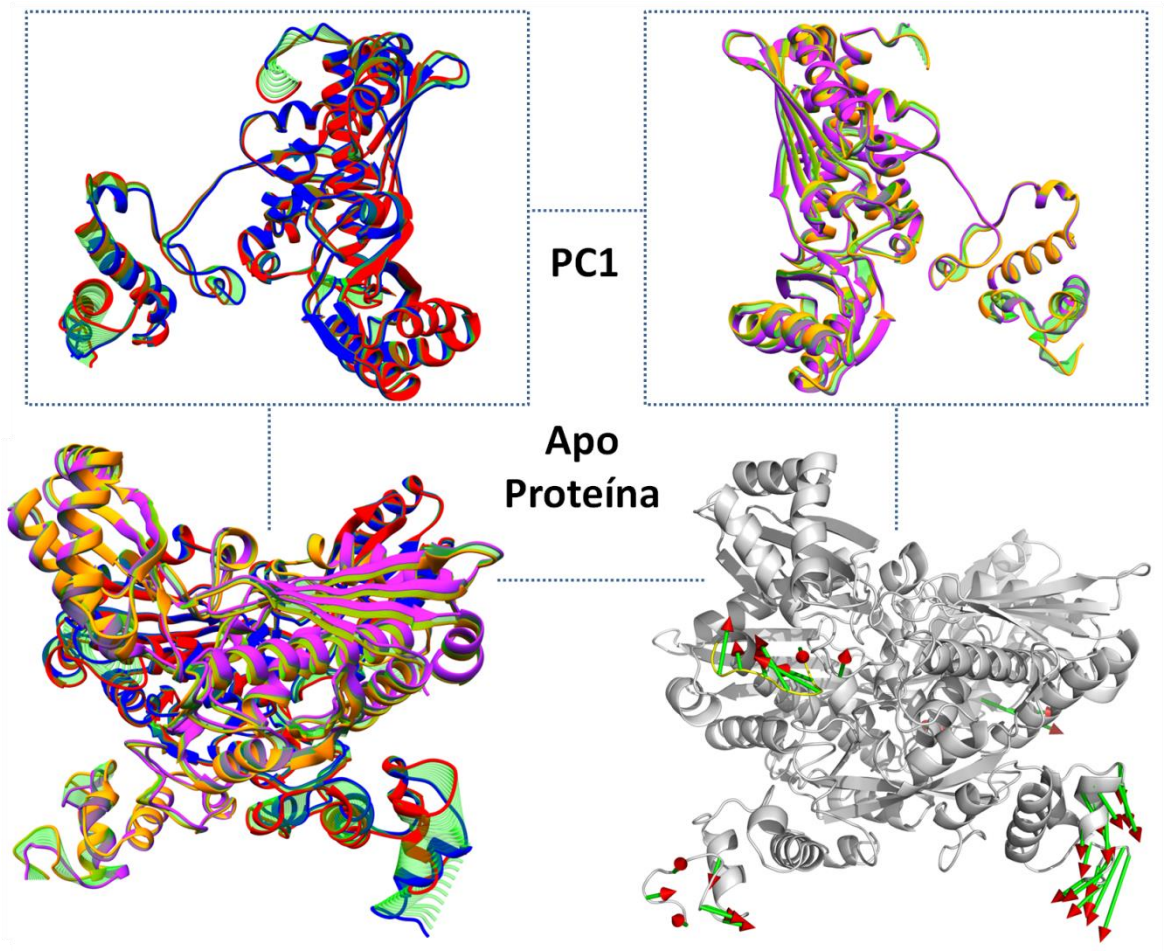
FIGURA 22 – Movimentação da proteína em PC3 para o sistema do **Substrato HMG-CoA**, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em cinza



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

O PCA da proteína livre sem ligante (utilizando somente 100 ns de DM) demonstra que há uma movimentação do *loop* do C-terminal, confirmando que o *Flap* está semiaberto. A Figura 23 mostra as estruturas de PC1 para a Apo-proteína, o *Flap* parte do estado fechado (estrutura inicial em vermelho, cadeia C) para o estado aberto (estrutura em azul) os vetores mostram a direção e a amplitude do movimento, e todos os demais domínios da proteína são conservados com baixa movimentação. Porém como observado anteriormente pelos resultados de RMSF (Figura 9) esse *loop* se abre, mas não a ponto de deixar a cavidade livre para um ligante com um volume maior, como o substrato HMG-CoA, e podemos perceber que nessa movimentação de PC1 temos o deslocamento dos resíduos em direção oposta à do sítio ativo, esse comportamento é bem nítido na estrutura com os vetores.

FIGURA 23 – Movimentação da proteína em PC1 para o sistema da Apo-proteína, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em cinza. Os vetores do PC1 são mostrados em verde para os bastões e as setas em vermelho

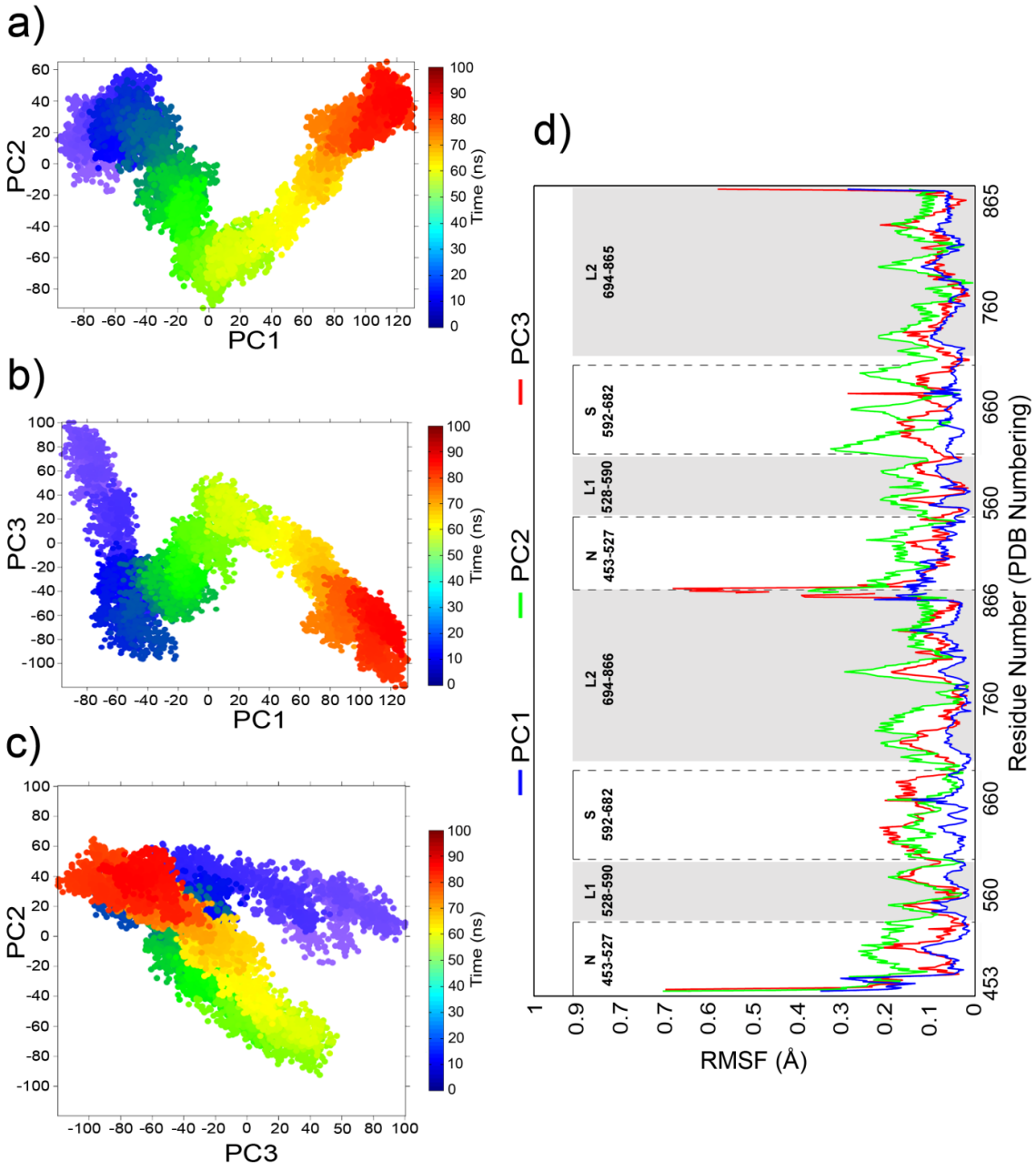


Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

A figura 24a mostra PC1 *vs* PC2, figura 24b PC1 *vs* PC3, figura 24c PC2 *vs* PC3 e a figura 24d mostra o gráfico de RMSF para cada PC. Há uma distribuição das estruturas durante os 100 ns de simulação sem apresentar grupos de estruturas nos intervalos, partindo de um ponto conformacional e variando até o final da DM, o RMSF mostra a baixíssima flutuação dos resíduos nos demais domínios, mostrando valores abaixo de 1,0 Å, isso indica que os domínios não sofrem alterações estruturais significativa e a região do *Flap* é que sofre as grandes variações conformacionais, mesmo em PC2 temos os domínios conservados, a região de *Flap* apresenta movimentação se mantendo no estado aberto (Figura 25), e PC3 mantendo-se no

mesmo estado (Figura 26) indicando que essa região sofre modificações estruturais sem o ligante.

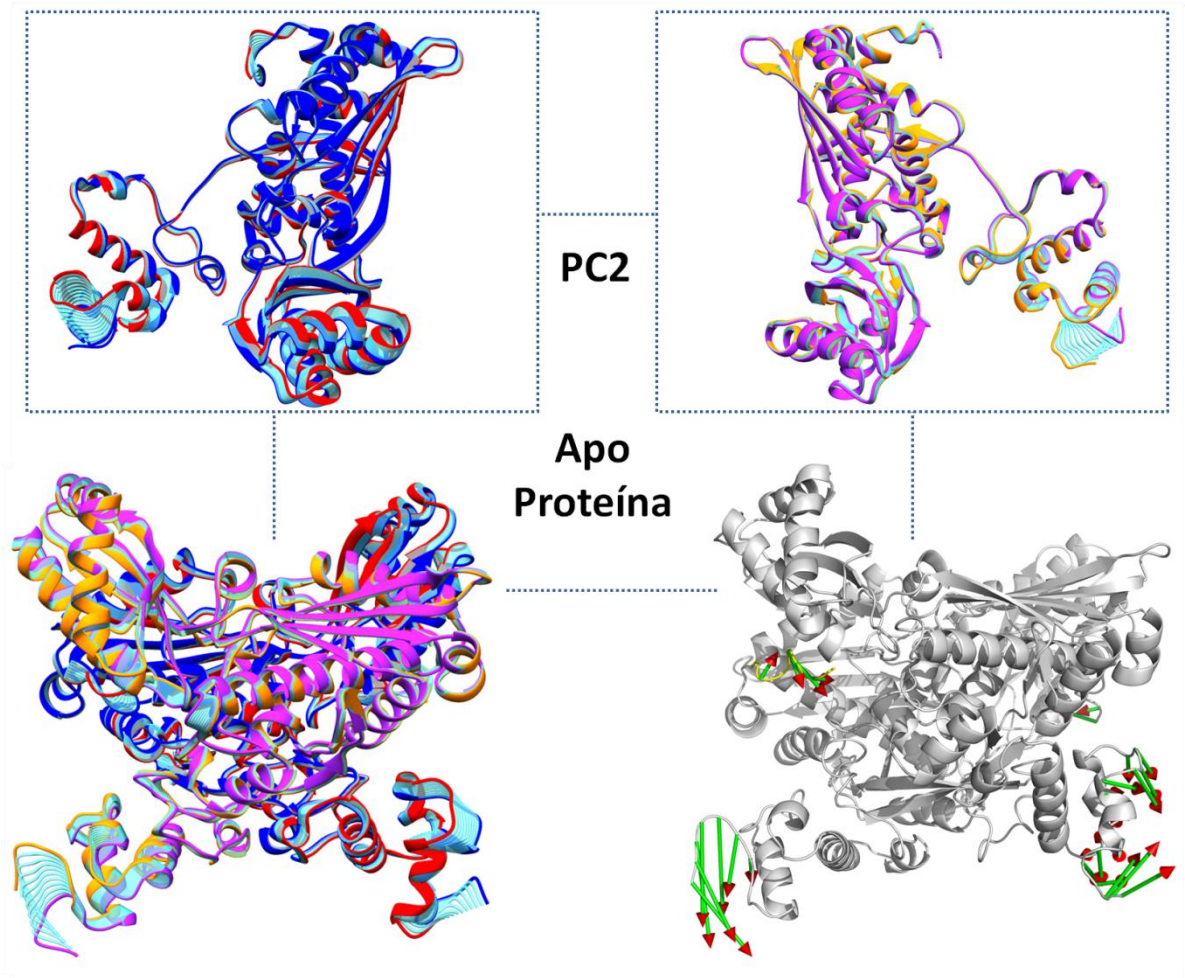
FIGURA 24 – Gráfico de PC *vs* PC para a **Apo-porteina**; a) gráfico do PC1 *vs* PC2; b) gráfico PC1 *vs* PC3; c) PC2 *vs* PC3, a coloração nos gráficos de PC *vs* PC é referente a trajetória, azul 0 ns; verde 50 ns; vermelho 100 ns. d) gráfico de RMSF dos resíduos da proteína para o PC1, PC2 e PC3



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

As estruturas referentes ao movimento de PC2 (Figura 25) tem os N-terminais com as movimentações maiores e os vetores presente no *Flap* não se voltam para região do sítio ativo.

FIGURA 25 – Movimentação da proteína em PC2 para o sistema da Apo-proteína, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em ciano. Os vetores do PC2 é mostrado em verde para os bastões e as setas em vermelho



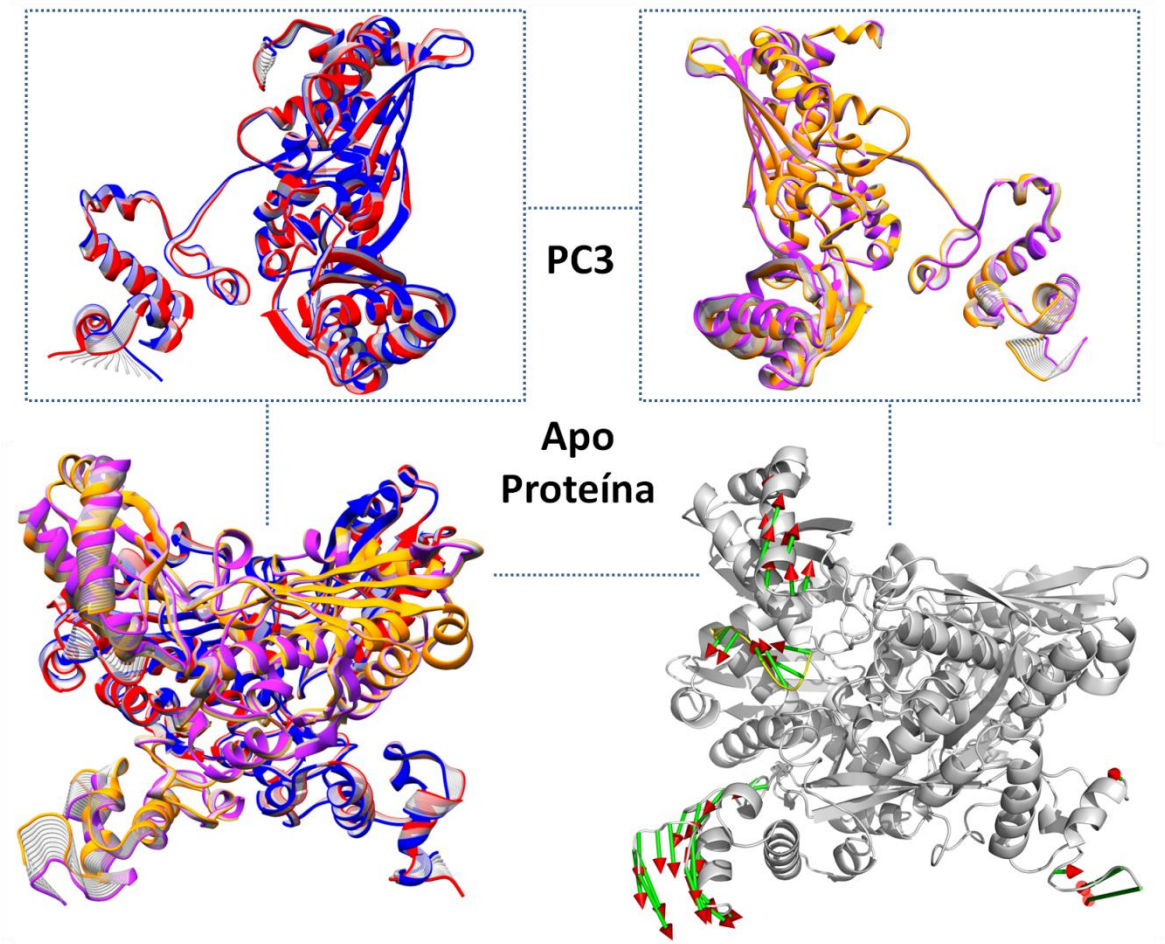
Fonte: dados extraídos desta pesquisa

As estruturas de PC3 (Figura 26) já tem amplitudes maiores para os vetores do *Flap* com uma parte dos resíduos sendo direcionadas para a região do sítio ativo, e o S-domínio (592-682) tem movimentações em suas β-folhas, e o N-teminal da cadeia D, se desloca em sentido rotatório em direção ao centro inferior da proteína.

A baixa flutuação dos outros domínios (não incluindo *Flap*) garante a conservação da estrutura nativa da proteína HMGR, observamos no RMSF que os domínios possuem movimentações abaixo de 1,0 Å. As estruturas de PCA da Apo-proteína manteve a ideia de que o *Flap* se encontra em constante movimentação sem a presença de um ligante, e essas modificações apontam que a região do sítio tem o *Flap* como mediador para um possível acoplamento. Como veremos a seguir com a

extensão de mais 100ns de simulação para a proteína não ligada e proteína ligada ao ligante.

FIGURA 26 – Movimentação da proteína em PC3 para o sistema da Apo-proteína, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em ciano. Os vetores do PC3 é mostrado em verde para os bastões e as setas em vermelho

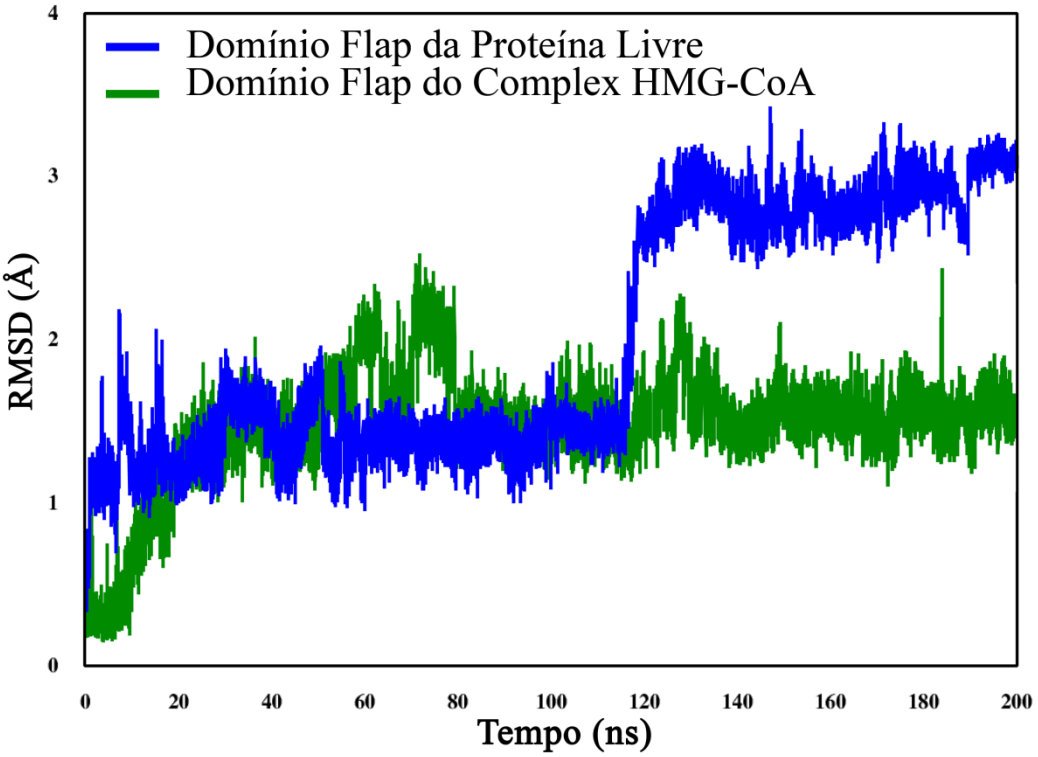


Fonte: dados extraídos desta pesquisa

Evidenciamos que o *Flap* se mantém fechado durante toda simulação quando o substrato se liga a proteína. Foram observados por meio de uma extensão da DM de 200 ns, onde o substrato continua induzindo o fechamento do *Flap*, como podemos observar no Gráfico 2 de RMSD dos resíduos do *Flap* (861-866), a proteína livre sem ligante passa de um estado semiaberto para o totalmente aberto do *Flap*, moldando-se para abrir completamente a cavidade e receber o substrato, e quando o HMG-CoA se liga no sítio ativo o *Flap* se fecha e mantêm-se fechado para que ocorra a catálise biológica. A estrutura de referência para o cálculo desse RMSD possui a estrutura

conformacional do Flap fechada, ou seja, quando menor o valor do desvio mais semelhante a estrutura de referência, logo o complexo do substrato possui a estrutura do Flap semelhante a estrutura de referência, se mantêm fechado.

GRÁFICO 2 – Gráfico de RMSD (em Å) dos resíduos do *Flap* (860-866) para o substrato HMG-CoA (em verde) e para a Apo proteína (em Azul) *versus* 200 ns de simulação de DM

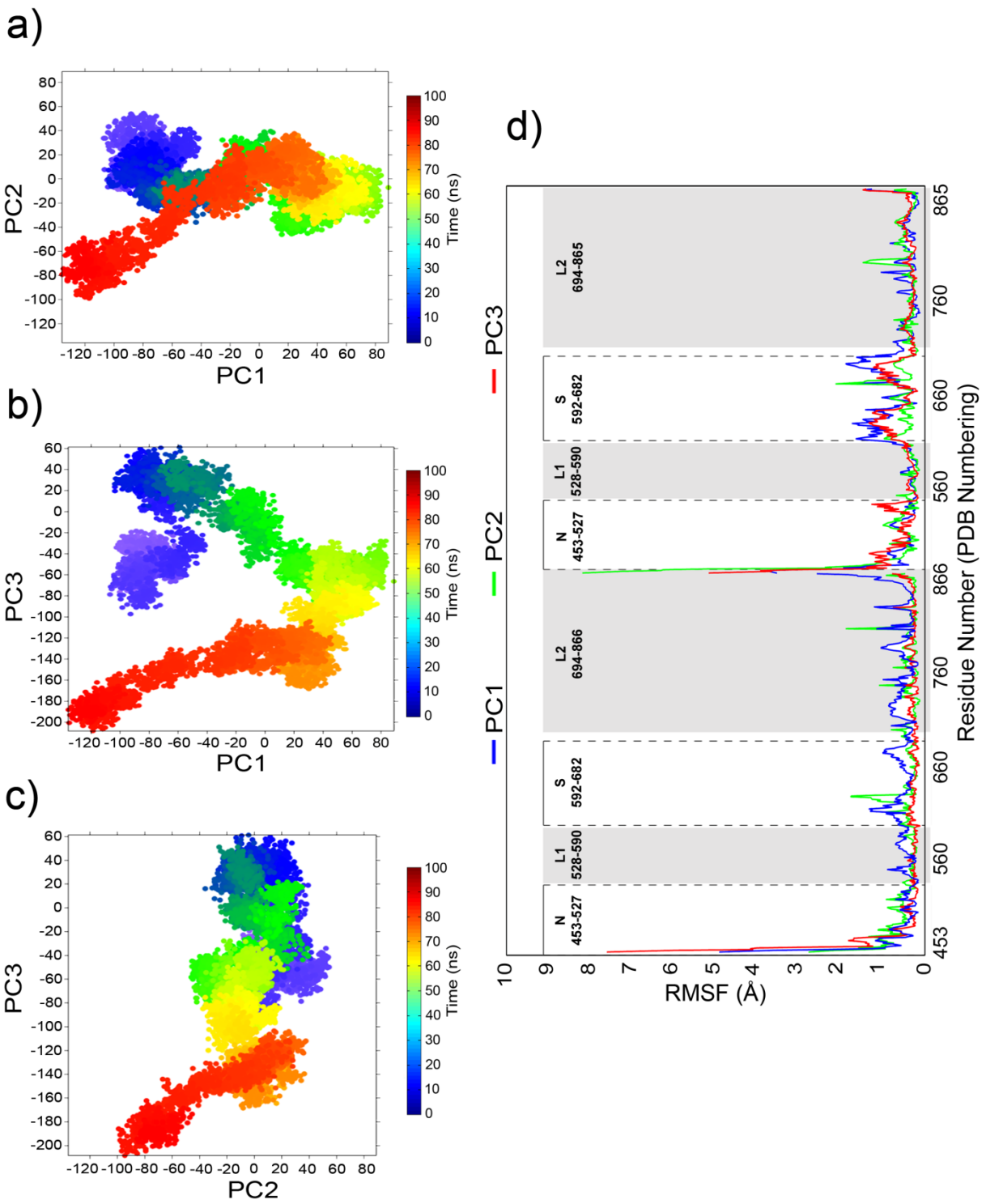


Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

A influência do *Flap* no sistema da Atorvastatina comprova que o estado do *loop* fechado está relacionado com o processo de inibição eficiente da proteína HMGR, uma vez que esse estado está relacionado com a estabilidade do complexo ligante-receptor e a presença de estruturas em PC1 está envolvido com a estabilidade desse complexo, pois o primeiro componente principal possui a maior contribuição mostrando a forma principal da estrutura, o maior agrupamento de estruturas em PC1 demonstra que existe um mínimo estável formando o movimento principal da estrutura, os valores de PCs combinados entre si e o RMSF de cada PC são mostrados na Figura 27, que mostra somente o estado fechado do *Flap* cobrindo o sítio ativo e a Atorvastatina podendo ser observados a conformação em PC1 na Figura

28, as conformações assumidas em PC2 são mostrados na Figura 29 e as estruturas presentes em PC3 são apresentados na Figura 30.

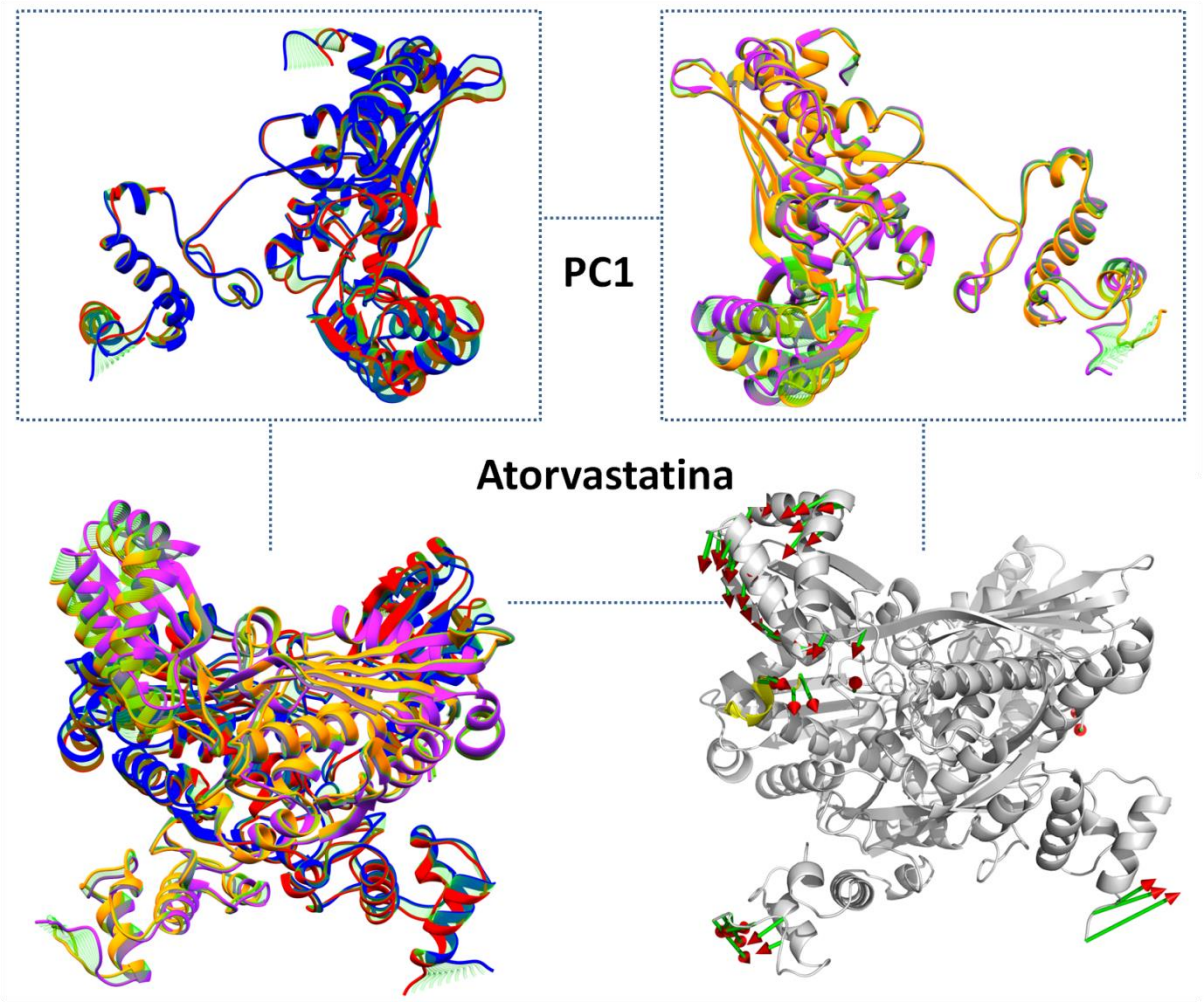
Figura 27 – Gráfico de PC *vs* PC para a **Atorvastatina**; a) gráfico do PC1 *vs* PC2; b) gráfico PC1 *vs* PC3; c) PC2 *vs* PC3, a coloração nos gráficos de PC *vs* PC é referente a trajetória, azul 0 ns; verde 50 ns; vermelho 100 ns. d) gráfico de RMSF dos resíduos da proteína para o PC1, PC2 e PC3



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

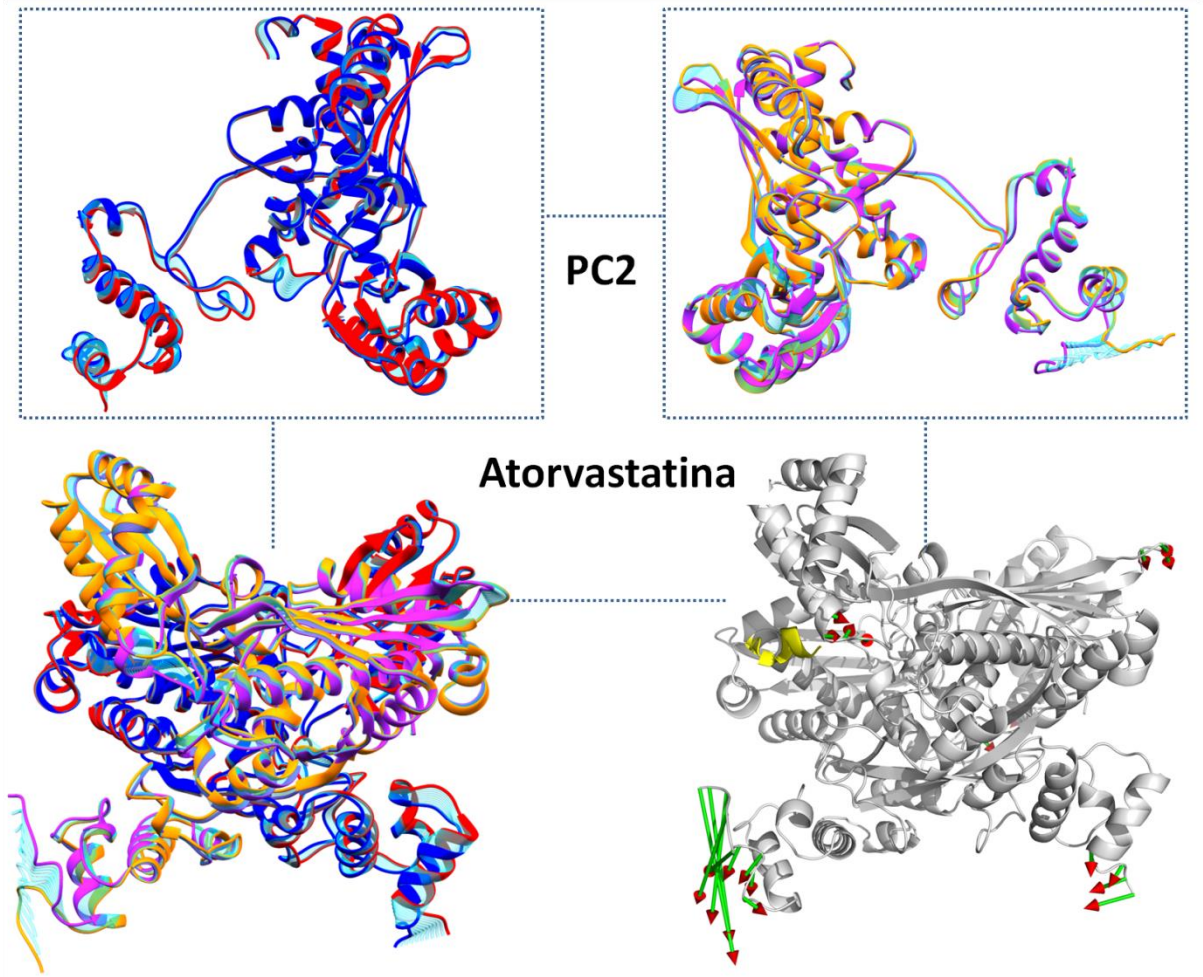
A estruturas referentes ao movimento em PC1 são mostradas na Figura 28, observando principalmente o domínio *Flap* podemos observar que sofre um rearranjo conformacional para se acomodar melhor no sítio ativo. Em PC2 temos a estabilidade do *loop* nessa mesma conformação, revelando que no segundo movimento principal o *Flap* não sofre conformações se mantendo somente no estado já identificado em PC1, estado fechado (Figura 30). Em PC1 temos o S domínio se movimento para baixo, porém esse movimento não apresenta muita intensidade como é observado na estrutura com os vetores (Figura 28), já PC2 esse domínio não apresenta a mesma movimentação, as maiores movimentações desse segundo componente são observadas no N-terminal (Figura 29).

Figura 28 – Movimentação da proteína em PC1 para o sistema da Atorvastatina, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em verde



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

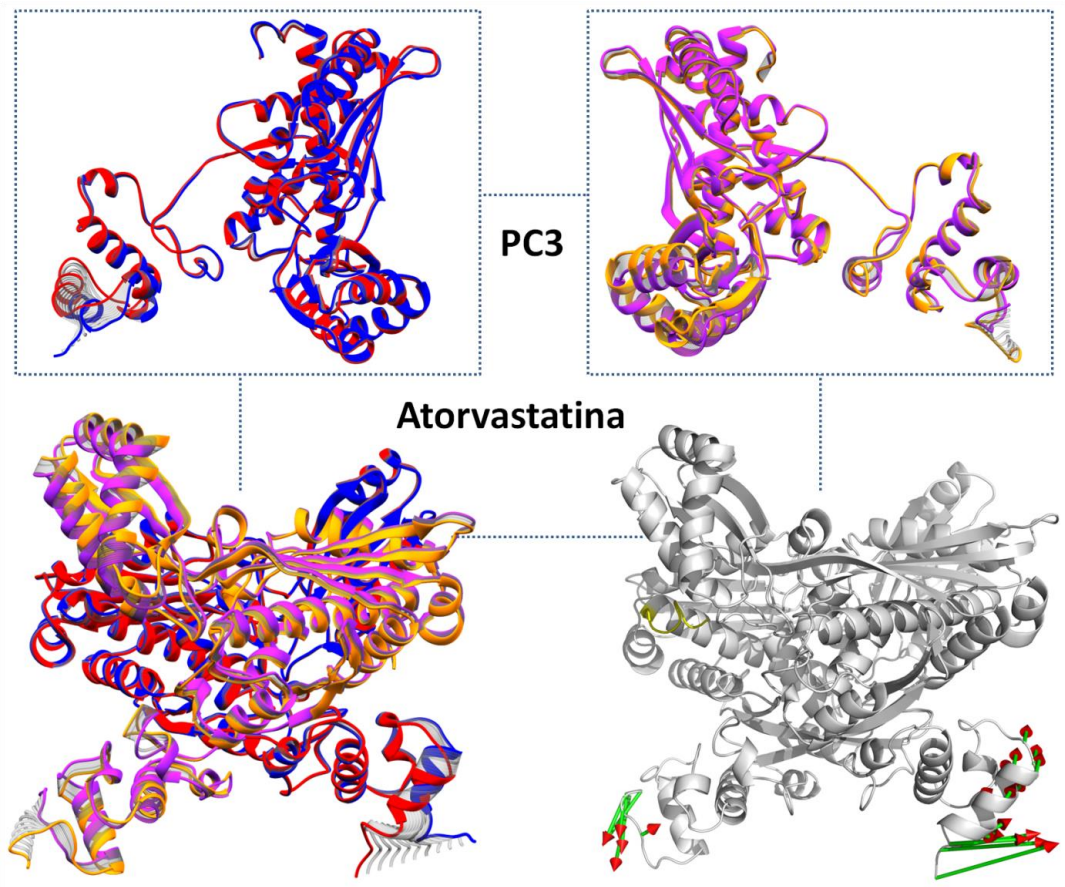
Figura 29 – Movimentação da proteína em PC2 para o sistema da Atorvastatina, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em ciano



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

O PC3 confirma a ausência de um segundo estado para a movimentação da proteína ligada a Atorvastatina (Figura 30), se mantendo somente no estado fechado cobrindo o sítio catalítico e contribuindo para a permanência e interação da estatina. Os outros domínios se mantém conservados sem sofre qualquer alteração, somente o N terminal se movimenta, como já observados também em outros sistemas aqui estudados. Os resultados de PCA para a Atorvastatina indicam as características de inibidores capazes de induzir o fechamento do *Flap*, e a contribuição dessa característica e suas consequências serão mostradas no próximo tópico, que apresentara a influência da modificação estrutural do domínio *Flap* para a energia do sistema e para as interações importantes no sítio ativo de ligação.

Figura 30 – Movimentação da proteína em PC3 para o sistema da Atorvastatina, a cadeia C temos a estrutura inicial em vermelho, estrutura final em azul. Para a cadeia D, estrutura inicial é em rosa e a final em laranja, as estruturas intermediarias estão em cinza



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

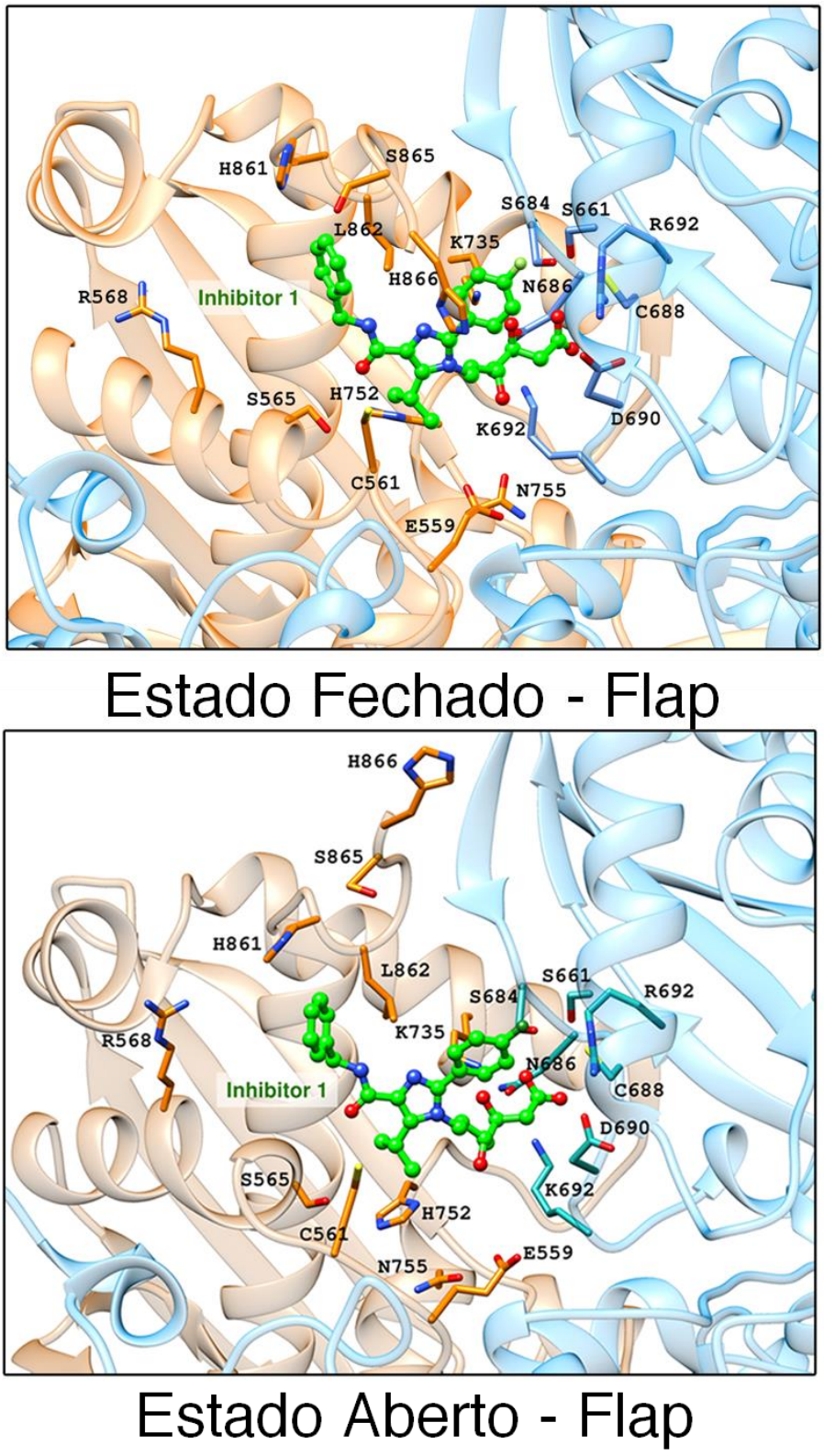
5.3 Energia Livre de Ligação - MMGBSA, SIE e Decomposição

Utilizou-se de técnicas de clusterização para encontrar as estruturas de maior similaridade que representassem o maior número de população e frequência das conformações do complexo proteína-ligante, sendo possível assim verificar as principais interações que ocorrem durante a simulação de DM, e então investigou-se o perfil dessas interações e seu comportamento energético, considerando apenas a energia eletrostática para a energia de interação (E_{int}) por resíduo, por demonstrar maiores descrições para os sistemas estudados.

O PCA revelou dois estados conformacionais do domínio *Flap*, onde podemos observar os resíduos do *loop* (861-866) no estado aberto e no estado do *Flap* fechado (Figura 31) mostrando a disposição dos resíduos em relação ao inibidor 1 nos dois estados e podemos observar que a conformação que o ligante assume no sítio não tem tantas mudanças entre os dois estados, indicando que a mudança no *Flap* não

ocorre por meio de modificações estruturais do ligante provocando efeitos estereoquímicos.

FIGURA 31 – Inibidor 1 no sítio ativo da proteína HMGR; Conformação estrutural do *Flap* no estado fechado (a cima) e no estado aberto (a baixo) demonstrado pelo PCA



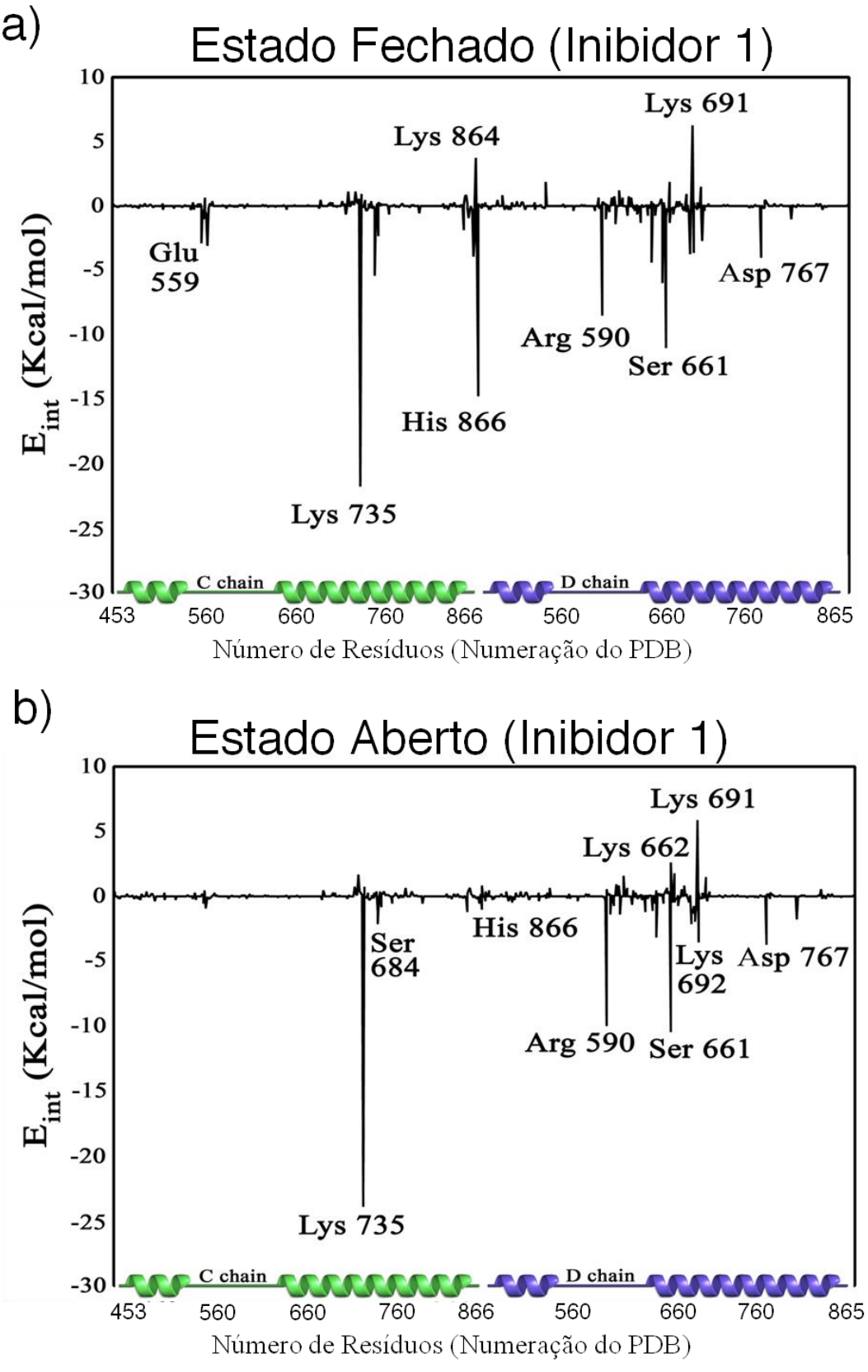
Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

Os aminoácidos do *loop* não interagem diretamente com o inibidor 1, provocando assim sua instabilidade. No entanto, no estado fechado a His866 se dispõem em frente ao anel central do inibidor 1, sendo possível a ocorrência de interações dos átomos de nitrogênio da His com o anel do ligante, levando a uma contribuição química direta do *Flap* com o inibidor, porém essa interação possui um caráter fraco que é incapaz de se manter presente no sítio ativo. De modo geral todos os resíduos do sítio ativo se dispõem na mesma forma nos dois estados, porém os resíduos do *Flap* passam do estado fechado para o estado aberto mudando o ambiente do sítio ativo favorecendo o sistema, onde o estado fechado é o que apresenta maior contribuição para a inibição da HMGR, como podemos ver na Figura 32, que mostra a energia de interação por resíduos para o estado aberto e fechado do inibidor 1, com o PCA foi possível caracterizar os dois estados.

A contribuição dos principais resíduos hidrofóbicos: Leu562, Val683, Leu853, Ala856 e Leu857 estão envolvidos no processo enzimático e também participam do processo de ligação com os inibidores, aqui podemos observar perfeitamente a contribuição da His866 no estado fechado, indicando que ela participa e contribui diretamente no processo de inibição, ou seja, o *Flap* fechado demonstra-se ser essencial para o favorecimento energético do sistema. Temos a Lys864 que faz parte do *Flap* com energia igual a 3,757 Kcal/mol, energeticamente desfavorável para o estado fechado, e no estado aberto essa energia diminui para -0,195 Kcal/mol.

A His866, o principal resíduo catalítico do *Flap*, contribui bastante para o sistema com uma energia igual a -14,802 Kcal/mol quando o *Flap* está no estado fechado e quando o *Flap* passa para o estado aberto a contribuição é menos favorável, decaindo para -1,022 Kcal/mol, mostrando que a principal configuração do *Flap* depende da contribuição desse resíduo, no estado fechado o resíduo catalítico está envolvido diretamente e contribui de modo favorável para o sistema, demonstrando que a His866 é um resíduo importante e está envolvido no processo de inibição da HMGR por estatinas, e que o mecanismo de modificação estrutural interfere diretamente na interação de ligação dos ligantes no sítio ativo.

FIGURA 32 – Energia de interação (Kcal/mol) por resíduos, para o sistema do inibidor 1 que apresentou dois estados conformacionais em relação ao *Flap*

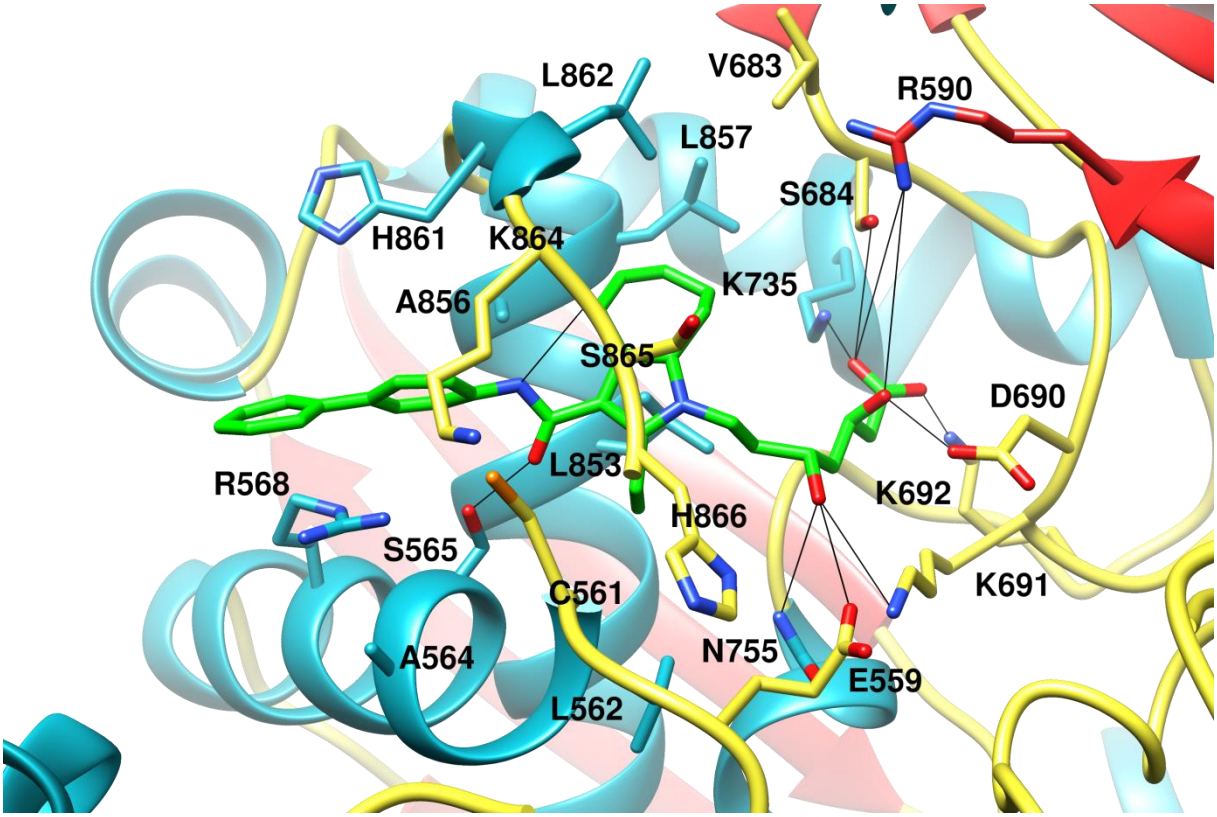


Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

Outros resíduos se mostraram favoráveis para o sistema aberto e fechado, como a Lys735 que interage com o átomo de oxigênio O2 do grupo δ-lactônica do ligante (porção HMG), contribuindo energeticamente com -21,735 Kcal/mol no estado fechado e -23,886 Kcal/mol no estado aberto, a Arg590 com -8,540 Kcal/mol no estado fechado e no estado aberto com -9,987 Kcal/mol assim como a Ser661 com -10,986 Kcal/mol no estado fechado e -10,473 Kcal/mol quando o *Flap* está aberto, e a Lys691 demonstrou-se desfavorável nos dois estados com energias acima de 5 Kcal/mol e no estado aberto a Lys662 mostrou-se desfavorável para o sistema.

Os resultados do PCA apontaram que o ligante 2 induz o fechamento do *Flap*, mantendo-o fechado durante toda simulação, e por meio da clusterização das estruturas obteve-se o complexo representativo de maior similaridade, observando-se as principais interações que ocorrem durante a DM. A figura 33 apresenta o inibidor 2 ligado ao sítio ativo com as linhas em preto indicando a ligações de Hidrogênio. A permanência do *Flap* para esse complexo se dá principalmente pela interação que ocorre entre o átomo de nitrogênio N1 do inibidor com o átomo de oxigênio O cadeia principal da Lys864 (K864), os outros resíduos do *loop* interagem de outras formas e mantém um ambiente químico favorável.

FIGURA 33 – Inibidor 2 ligado ao sítio ativo de ligação da proteína HMGR, estrutura gerada por meio da clusterização



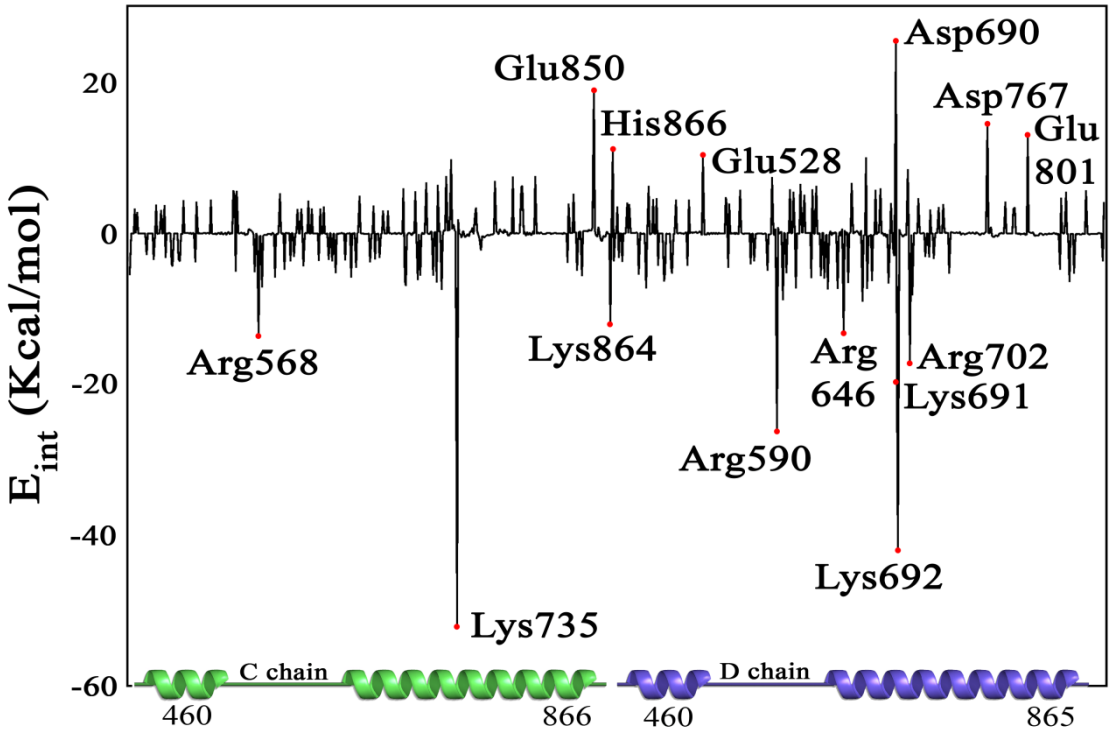
Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

Podemos perceber na Figura 33 que o átomo de oxigênio O5 faz interação com a Ser565 da cadeia D, a similaridade da porção HMG do ligante com o mevalonato e substrato HMG-CoA garante um perfeito encaixe e interação com o *cis/loop* da proteína HMGR. Os principais resíduos importantes aparecem fazendo interação com inibidor 2, como: Glu559 (E559), Lys691 (K691), Asp690 (D690), Ser684 (S684), Lys735(K735) e Asn755 (N755), todos fazendo interação de hidrogênio com o grupo HMG do inibidor 2.

A Arg590 (R590) foi inserida por se tratar de um resíduo catalítico, porém não faz interação com o grupo HMG do inibidor 2, apresentando uma distância média do átomo de oxigênio O3 para o átomo de nitrogênio NH1 igual a 5,61 Å, mas de acordo com o cálculo de interação por resíduo (Gráfico 3) possui uma alta contribuição favorável para o complexo com uma E_{int} de -26,37 Kcal/mol. A Lys864 contribui para o sistema com uma E_{int} -11,91 Kcal/mol, e esse resíduo está presente no *Flap* que cobre o sítio ativo, demonstrando que o estado fechado influencia no complexo do inibidor 2, e a His866 passa a ter uma contribuição polar para o sistema (não apresentado no gráfico) sendo favorável por apresentar E_{int} igual

-10,55 Kcal/mol, essa mudança de caráter químico pode ser o responsável por manter e induzir o *Flap* fechado durante toda a DM.

GRÁFICO 3 – Energias de interação (E_{int}, em Kcal/mol) entre os resíduos da HMGR e o Inibidor 2



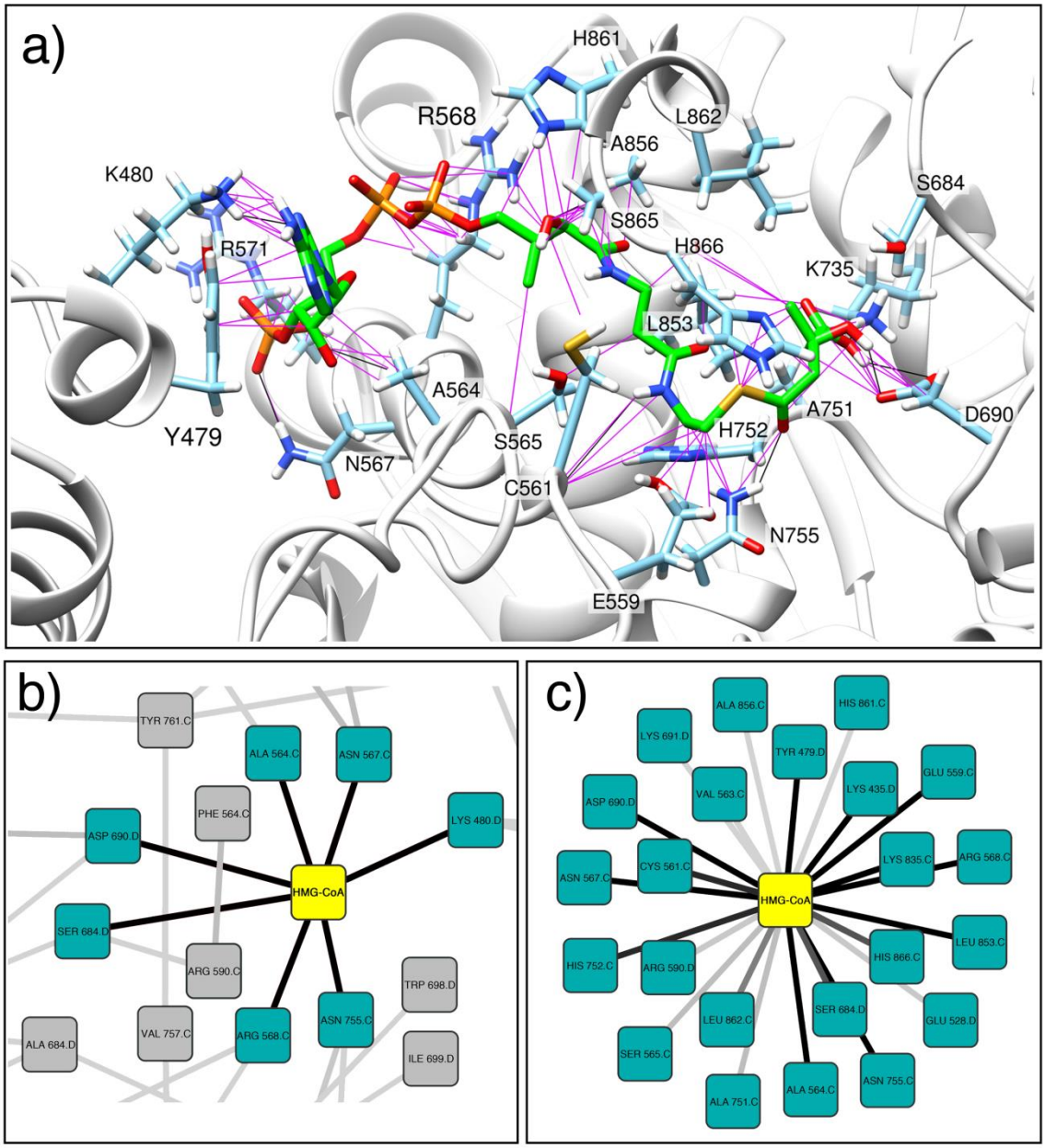
Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

As E_{int} por resíduo para o sistema do ligante 2 variam dentre todos os aminoácidos da proteína, apresentando resíduos desfavoráveis e muitos mais resíduos favoráveis, aqui a Lys735 foi o resíduo que mais contribuiu para o complexo com uma E_{int} igual a -52,32 Kcal/mol, seguido pela Lys692 com energia de -41,94 Kcal/mol, a presença dos resíduos: Arg568, Lys864, Arg646, Lys692, Lys691 e Arg702 são os que possuem melhores energias espontâneas presentes para esse sistema mantendo o complexo estável, diferente do inibidor 1, que não tem as mesmas contribuições para esses resíduos, e a presença de muitos mais resíduos com contribuição favorável também garante a estabilidade do complexo pro inibidor 2, principalmente frente ao *Flap*, que permanece fechado. O Gráfico 3 tem os valores desfavoráveis de E_{int}, com 10,34 Kcal/mol para o resíduo Glu528, 12,91 Kcal/mol para Glu801, 14,37 para Asp767 Kcal/mol e Glu850 com 19,08 Kcal/mol, e valores de energias favoráveis, como -11,91 Kcal/mol para a Lys864, -13,18 Kcal/mol (Arg646),

-13,619 Kcal/mol (Arg568) e -17,12 Kcal/mol (Arg702), esses resíduos são responsáveis por possuírem a maior contribuição para o complexo HMGR-inibidor 2.

Durante a permanência do HMG-CoA no sítio ativo o *Flap* se fechou exercendo várias interações com o sítio ativo, a His866 faz contatos fortemente com o átomo de enxofre do substrato, essencial para que ocorra quebra e formação do mevalonato, a Figura 34 demonstra a interação exercida por esse resíduo catalítico e de outros resíduos importantes para a ação da proteína incluindo os contatos hidrofóbicos do sítio ativo e do *Flap*, que fechado contribui para o sistema. As interações de hidrogênio observadas durante as simulações de DM (Figura 34a) e os contatos hidrofóbicos (Figura 34b) estão em conformidade com as identificadas na literatura e estão envolvidas na catálise enzimática. O resíduo Asn567 tem uma distância média igual 7,36 Å, entre os átomos de nitrogênio ND2 do resíduo e átomo de oxigênio O13 do HMG-CoA, mesmo estando presente na clusterização, esse aminoácido sofre flutuações ao longo da simulação que o impede de exercer interações de hidrogênio durante toda DM, porém possui alta contribuição para o sítio de ligação aumentando a superfície hidrofóbica, como pode ser observado na Figura 34c com os contatos.

FIGURA 34 – a) Principais interações feitas pelo substrato HMG-CoA no sítio ativo, ligações de hidrogênio (linhas pretas) e contatos moleculares (linhas em rosa); b) Resíduos que desempenham ligações de hidrogênio; c) Contatos hidrofóbicos exercidos pelo sítio ativo e *Flap*

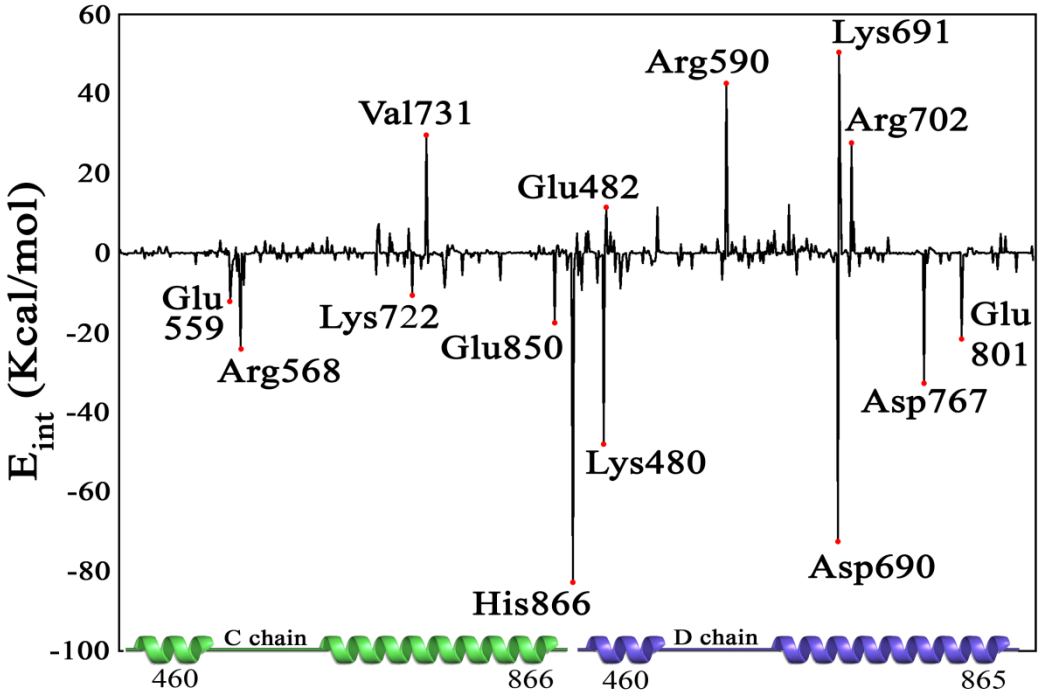


Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

No Gráfico 4 os resultados de energias obtidos por meio do método de MMGBSA para cada resíduo do complexo, demonstram que a interação com a His866 é a mais energeticamente favorável, o fechamento do *Flap* possibilita a ocorrência e permanência dessa interação. A contribuição energética mais favorável está relacionada aos resíduos que interagem diretamente com o substrato no processo de catálise do HMG-CoA, os resíduos da cadeia C: Glu559, Arg568, Lys722, Glu850 e

His866, e os resíduos da cadeia D: Lys480, Asp690, Asp767 e Glu801 também contribuem de maneira favorável para o sistema, já a Val731, Glu482, Arg590, Lys691 e Arg702 são os principais aminoácidos que possuem energias desaforáveis.

Gráfico 4 – Energias de interação (E_{int}, em Kcal/mol) entre os resíduos da HMGR e o substrato HMG-CoA



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

O substrato conta com bastante resíduos contribuindo para sua ligação no receptor, por ter um volume maior e heteroátomos eletronegativos interage mais facilmente com resíduos ao seu redor. A presença da His866 conta uma forte E_{int} no valor de -82,48 Kcal/mol, altamente favorável, essa energia está de acordo com os resultados experimentais que apontam esse resíduo como importante no processo de catálise enzimática da HMGR. A Lys735 presente com E_{int} altamente favorável para os inibidores 1 e 2, aqui para o substrato não aparece com o mesmo perfil energético. Os principais aminoácidos que exercem ligações de Hidrogênio com HMG-CoA (Figura 34b) durante a simulação reflete na energia de interação aumentando a contribuição do sítio ativo e a estabilidade do complexo, como temos os resíduos com valores favoráveis: -12,32 Kcal/mol (Glu559), -24,16 Kcal/mol (Arg568), -10,58 Kcal/mol (Lys722), -17,15 Kcal/mol (Glu850), -82,48 Kcal/mol (His866), -47,65 Kcal/mol (Lys480), -72,18 Kcal/mol (Asp690), -32,46 Kcal/mol (Asp767) e Glu801 com -20,96 Kcal/mol.

O estado fechado do *Flap* da proteína HMGR é o estado mais favorável quando temos um ligante capaz de induzir esse fechamento, criando uma tampa no sítio ativo que contribui diretamente para uma melhor estabilidade do sistema e um ambiente energeticamente favorável, como podemos observar nas energias livres de ligação pelos métodos MMGBSA (E_MMGBSA) e SIE (E_SIE), as energia de cavidade (E_cavity) e energia de Van der Waals (E_VdW) foram geradas para os estados encontrados durante a simulação por meio do PCA, a Tabela 1 apresenta as energias livres de ligação no estado aberto e fechado para o inibidor 1 e somente no estado fechado para o inibidor 2, HMG-CoA e Atorvastatina, uma vez que durante as simulações e análise desses sistemas não foi identificado outros estados do *Flap* para esses ligantes, reforçando que para uma estatina ser bem sucedida no processo de inibição é necessário que ela seja capaz de influenciar e manter o fechamento do *Flap*, já que o mesmo se demonstrou essencial para o favorecimento energético do sistema.

TABELA 1 – Energia livre de ligação, energia de cavidade e energia de Van der Waals, obtidas pelos métodos de MMGBSA e SIE

Compostos	**Estado conformacionais do *Flap***					
	E_MMGBSA (Kcal/mol)		**E_SIE (Kcal/mol)**		**E_Cavity (Kcal/mol)**	**E_VdW (Kcal/mol)**
	Fechado	**Aberto**	**Fechado**	**Aberto**	**Fechado**	
Inibidor 1	-8.012	-1.638	-7.49	-6.36	-10.70	-44.08
Inibidor 2	-21.665		-11.41		-11.09	-53.37
HMG-CoA	-8.823		-8.52		-14.67	-67.84
Atorvastatina	-15.204		-9.11		-13.35	-55.39

Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

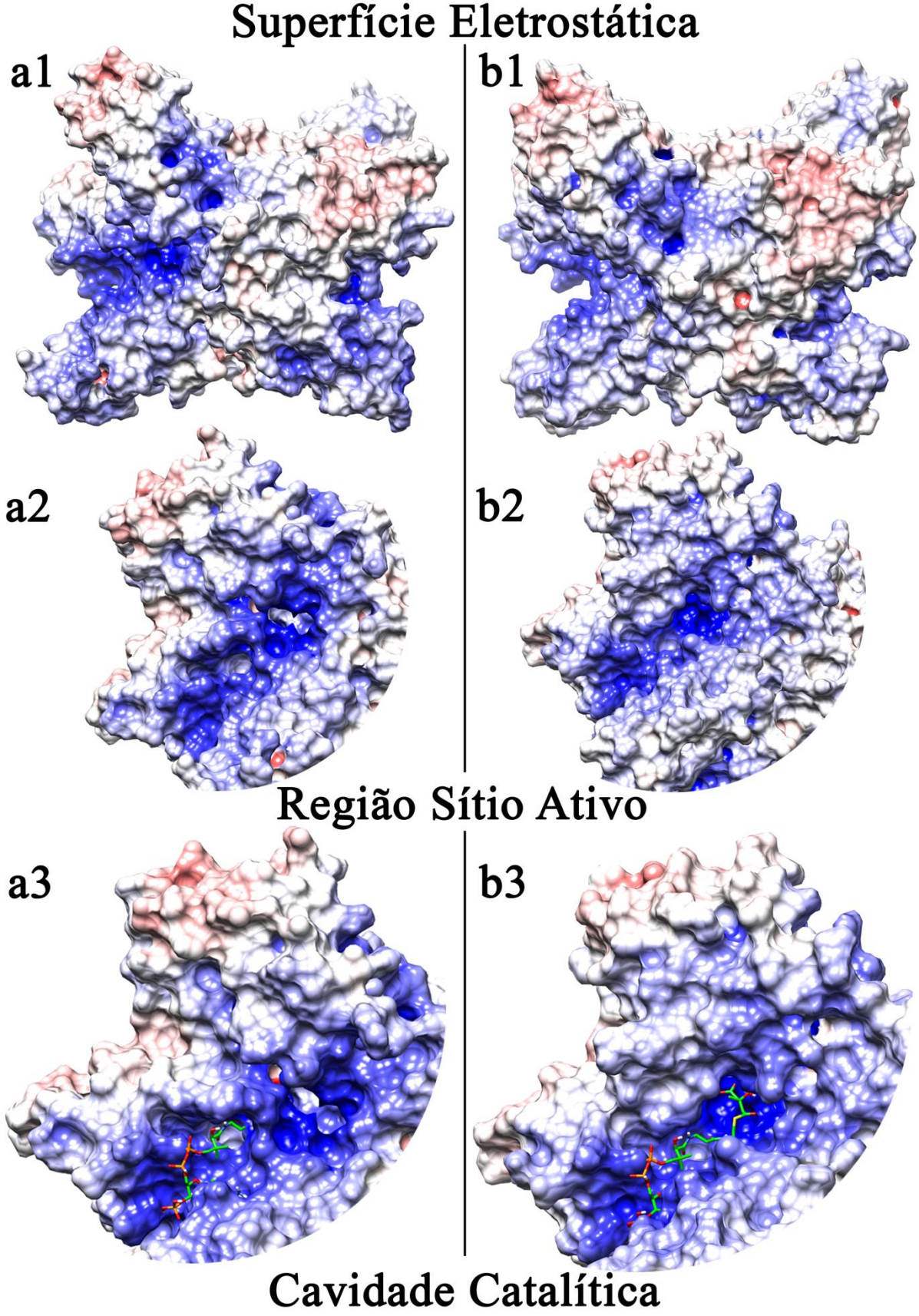
Portanto temos o estado fechado do domínio *Flap* da proteína HMGR, como o estado mais favorável para o processo de inibição e catálise do HMG-CoA, uma vez que o comportamento energético do estado aberto para o inibidor 1 desfavorece a ligação inibidor-enzima, e com a presença do *loop* (861-866) podemos confirmar que o melhor rendimento energético é com a participação do resíduo catalítico His866. Essa conformação do *Flap* assume que para um melhor rendimento da inibição é necessário estar no estado fechado para que a ligação seja mais favorável e a His866 catalítica faça a interação com o ligante e contribua para o ambiente do sítio ativo de ligação, esses resultados levaram a identificar que o estado fechado do *Flap* garante uma melhor postura para a acomodação de estatinas na inibição da enzima HMGR.

Com a extensão da simulação da DM para proteína sem ligante (Apo) foi possível identificar que o *Flap* passa de um estado semiaberto para um estado totalmente aberto e assim foi gerado uma superfície eletrostática para esses estados

(Figura 35). A Figura 35a1 e b1 apresenta a superfície do dímero (cadeia C e D) da proteína HMGR, gerada por meio do servidor PDB2PQR, em cores de superfície de energia eletrostática, em vermelho superfícies negativas, em azul, positivas e as regiões neutras em branco, a figura 35a1 é a estrutura da proteína com o *Flap* no estado semiaberto e a figura 35b1 é quando o *Flap* passa para o estado totalmente aberto, ambas as estruturas foram obtidas por técnicas de clusterização.

A Figura a2 apresenta a superfície aplicada a região do sítio ativo, demonstrando que a cavidade no momento que o *Flap* está semiaberto gera um impedimento estérico, já quando passa para o estado totalmente aberto (Figura 35b2) a cavidade aumenta, deixando um espaço suficientemente adequado para o encaixe do substrato. O substrato HMG-CoA foi encaixado na cavidade da proteína no momento do estado semiaberto e no estado totalmente aberto (figura 35a3 e 35b3) afim de observar se realmente o *Flap* precisa se abrir completamente para receber o substrato, e a figura 35a3 demonstra que essa cavidade não pode receber o substrato, por ter os seus resíduos impedindo a entrada do HMG-CoA no sítio, porém quando o *Flap* passa para o estado totalmente aberto (Figura 35b3) podemos observar que a cavidade está pronta para receber o substrato, se encaixando perfeitamente no sítio ativo, indicando que a proteína passa de um estado semiaberto para um estado totalmente aberto para receber o substrato natural HMG-CoA para que ocorra a catálise. É possível observar ainda que a superfície eletrostática modifica-se com a variação do estado conformacional, indicando que a proteína nativa sofre influência do domínio *Flap* mesmo sem a presença de um ligante ligado ao seu sítio ativo.

FIGURA 35 – Superfície eletrostática, aplicado a Apo-proteína, a) no estado semiaberto, e b) para o estado totalmente aberto do domínio *Flap*



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

A Tabela 2 apresenta a distâncias médias de interação dos resíduos da proteína HMGR para o grupo químico HMG do inibidor 1, inibidor 2, substrato e atorvastatina, as interações encontradas na cristalografias foram avaliadas no primeiro momento, e no segundo momento a tabela apresenta as interações adicionais encontradas por meio de clusterização e investigadas durante a simulação molecular para verificar a confirmação dessas interações.

Na Tabela 2 as interações catalíticas que ocorrem com o inibidor 1 têm valores elevados para uma ligação de Hidrogênio, mas isso ocorre por conta das modificações conformacionais que acontecem neste complexo, a presença de dois estados no domínio *Flap* influência na estabilidade desses resíduos, devido à instabilidade provocada por esse *loop* os aminoácidos ao redor sofrem flutuações provocadas pelo processo de atração e repulsão. Porém interações adicionais aparecem participando do processo de ligação com esses inibidores e HMG-CoA, garantindo assim sua permanência no sítio ativo da HMGR.

TABELA 2 – Distância média de ligação do grupo HMG dos inibidores e substrato para o resíduos de aminoácidos da proteína HMGR

Grupo HMG	Resíduo	Ligação de Hidrogênio em Å			
		Inibidor 1	Inibidor 2	Substrato	Atorvastatina
	Resíduos catalíticos*				
O1	NZ Lys692	7,21	3,52	6,93	6,07
O2	NZ Lys735	4,85	2,90	5,29	7,82
	OG Ser684	5,55	3,27	4,79	6,96
O3	NH1 Arg590	6,44	5,61	3,39	6,19
	OD2 Asp690	6,53	3,86	3,62	5,53
O4	ND2 Asn755	6,86	4,04	3,03	5,05
	NZ Lys691	6,70	3,83	4,90	5,05
	OE1 Glu559	6,94	6,09	5,28	11,62
	Interações Adicionais§				
O1	SG Cys688	4.49			
	N Asp690				3.42
	O Ala751				4.65
	O Asp690				3.47
O2	N Asp690	4.37			
O3	NZ Lys735	3.49			
	OG Ser865			4.27	
	O His866				4.30
O4	OD2 Asp645				3.50
O5	NZ Lys691				3.09
	OG Ser565		2.72		
O9	NE Arg568			3.83	
O10	NE Arg568			4.67	
O12	NH2 Arg568			4.92	
N1	O Lys864		3.13		

* resíduos catalíticos apontados pela literatura como os principais aminoácidos que interagem com os inibidores segundo Sarver, 2008; Istvan, 2000; 2001; 2003.

§ interações adicionais identificadas na clusterização de estruturas da DM.

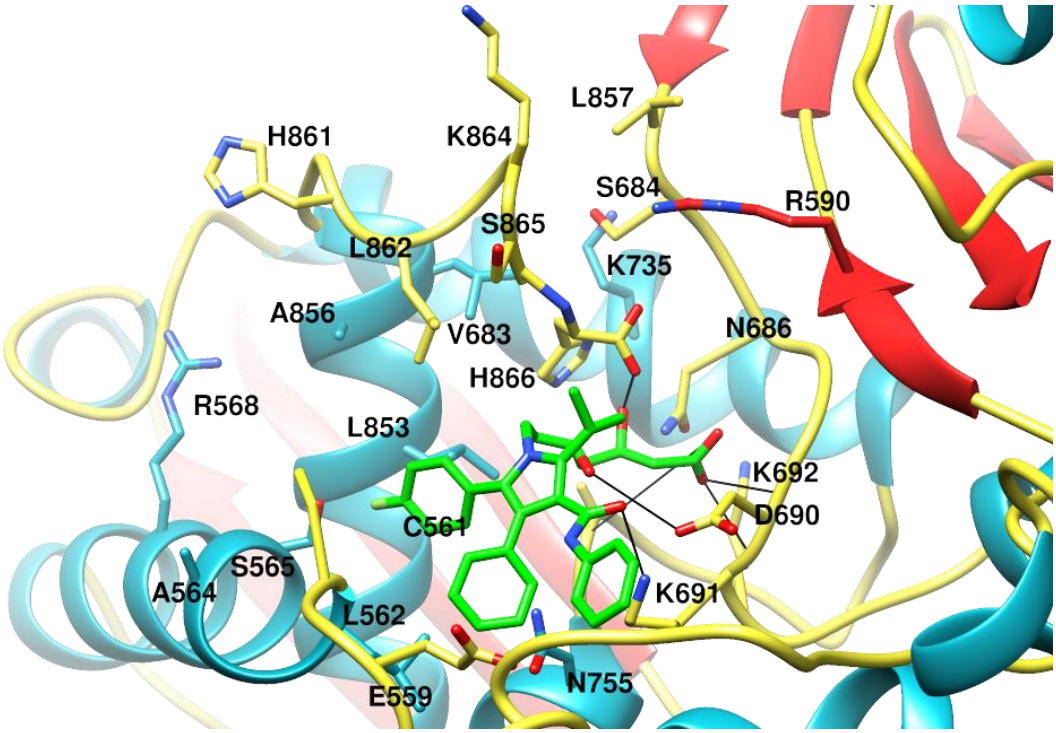
Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

Com exceção da interação com Arg590 que apresenta valores acima de 5,0 Å e Glu599 com uma distância média de 6,09 Å, o inibidor 2 possui excelentes padrões de distâncias para os resíduos catalíticos, esses valores demonstram que há uma alta estabilidade na ligações entre esses resíduos e o grupo HMG do inibidor 2, e a adição de interações como a da cadeia principal Lys864 com o átomo de nitrogênio N1 do inibidor 2 garante uma ligação forte com o domínio *Flap*, e esse é um dos efeitos encontrados para explicar a permanência do *loop* cobrindo o sítio ativo e garantindo maior estabilidade para o sistema.

O substrato HMG-CoA exerce interações bem fortes com muitos aminoácidos catalíticos, como pode ser observado na Tabela 2, assim como para o inibidor 2 as interações com Lys735 e Glu559 possuem altos valores para o grupo HMG, acrescentando ainda a interação com a Lys692 que possui um valor médio de distância igual a 6,93 Å, a disposição desses resíduos foi mostrado na Figura 34, dentre as interações adicionais, destaca-se a interação com átomo oxigênio OG da Ser865 como o oxigênio O5 do HMG-CoA, presente no domínio *Flap*, essa interação garante uma estabilidade no *loop* que permanece fechado durante toda simulação, cobrindo o substrato e o sítio ativo de ligação. Garantindo assim que a His866 interaja diretamente com o substrato contribuindo o processo de catálise.

A Atorvastatina tem valores médios de interação com os resíduos catalíticos elevados, o que poderia demonstrar uma instabilidade para esse complexo, mas como foi observado anteriormente o *Flap* encontra-se fechado para esse sistema, e a Figura 36 traz o modo das interações adicionais que a Atorvastatina exerce com os resíduos da HMGR, essas interações são responsáveis por tornar o complexo estável durante toda a simulação, a interação com a His866 faz com que o *Flap* permaneça fechado durante toda a simulação.

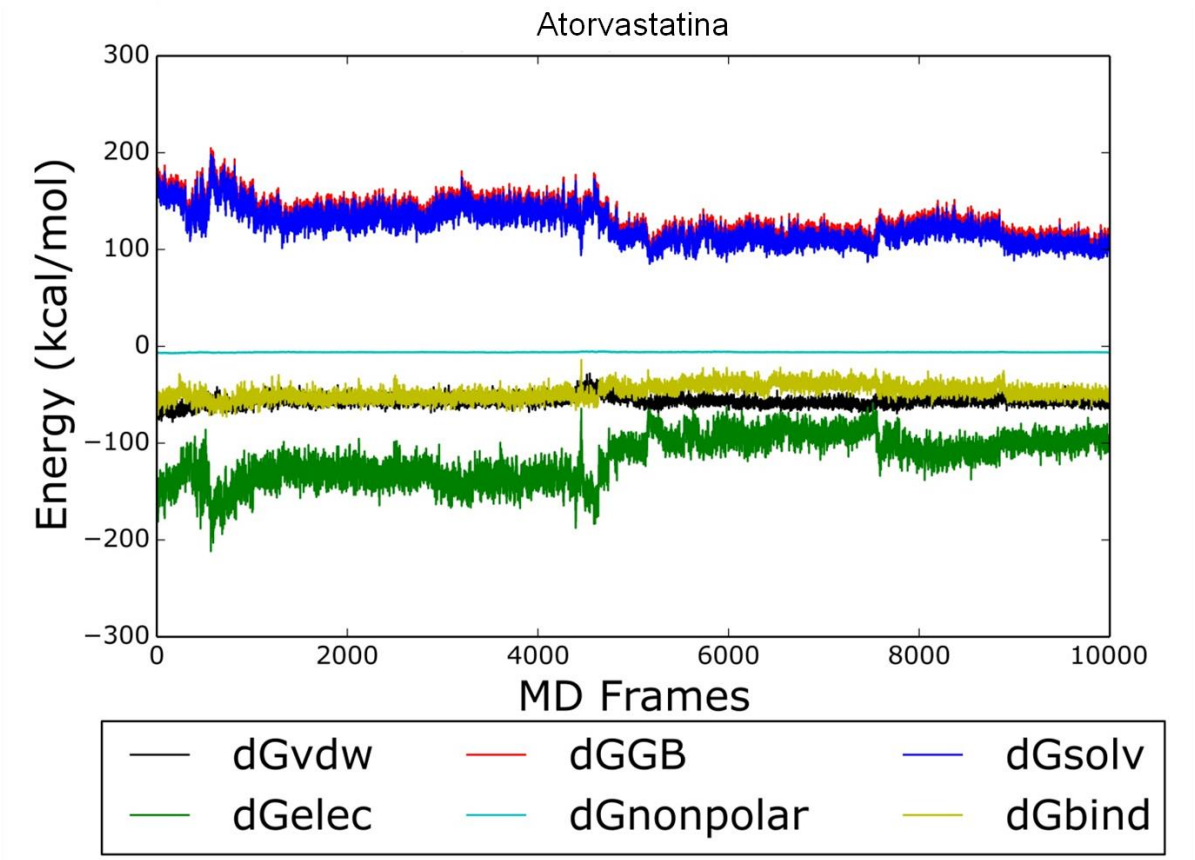
FIGURA 36 – Atorvastatina ligado ao sítio ativo de ligação da proteína HMGR, exercendo as interações adicionais



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

A estabilidade do *Flap* para o complexo de Atorvastatina-HMGR ocorre por meio da cadeia principal da a His866 com o átomo de oxigênio O3 do grupo HMG, sendo o único inibidor que interagiu com o *Flap* dessa forma. A estabilidade desse sistema se refle na energia livre de ligação (dGbind) que é mostrado no gráfico 5 que apresenta as variações das energias ao longo dos 100 ns (10000 frames) de simulação de DM, a dGbind varia em torno de -50 Kcal/mol, não sofrendo mudanças drásticas ao longo do tempo. A energia Eletrostática (dGelec) é a que sofre maior variação durante a simulação, mas ainda se mantendo favorável.

GRÁFICO 5 – Energia Livre de Ligação (em Kcal/mol) ao longo do Tempo de DM (em frames) para a Atorvastatina

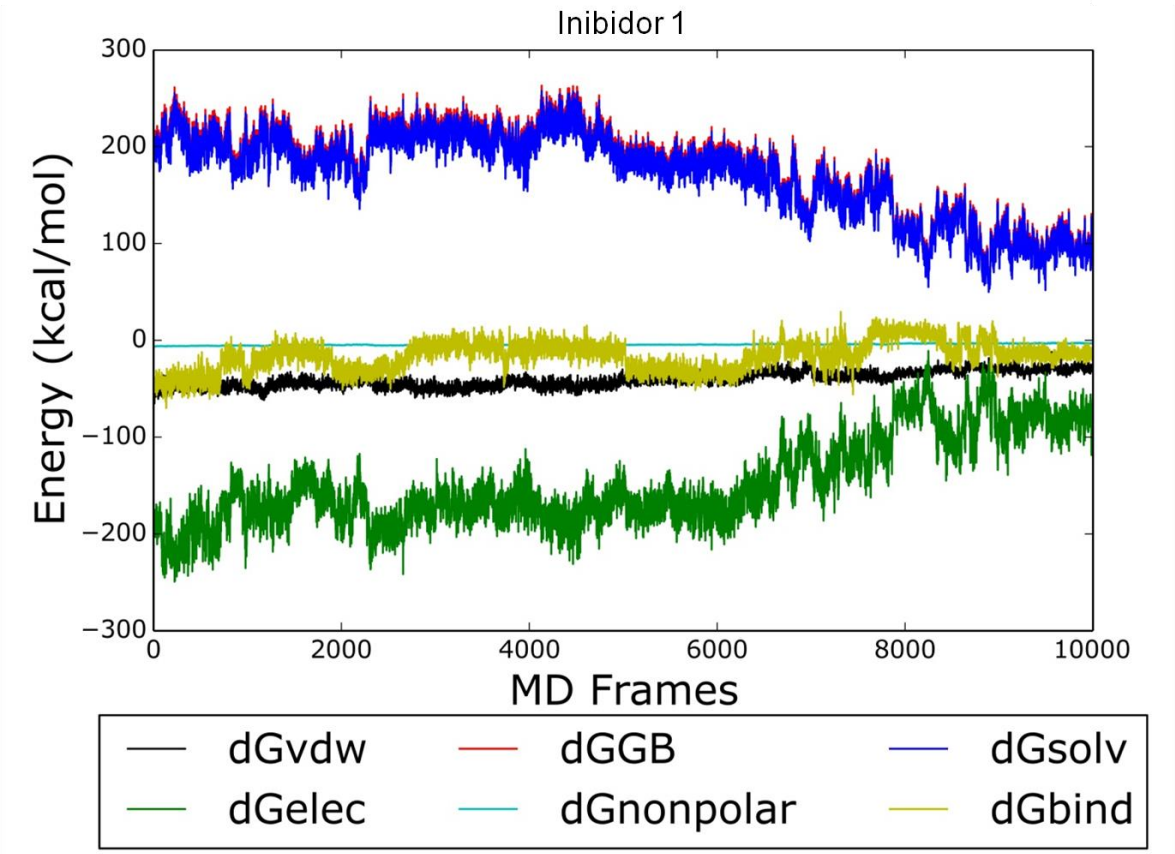


Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

O Gráfico 6 traz as energias ao longo do tempo de produção de 100ns de DM para o sistema do inibidor 1. A dGbind (linha amarela) demonstra instabilidade, apresentando grandes variações durante a simulação, indicando um sistema instável, levando a valores positivos de energias em alguns pontos da DM, com essas energias é possível observar a variação das energias durante a simulação, sendo possível perceber os pontos energéticos mais críticos durante a simulação, a dGelect começa

a subir a partir dos 65ns de produção, influenciando nas energias de solvatação (dGsolv) e energia polar (dGGB). A instabilidade desse inibidor provocado principalmente pela grande movimentação do *Flap*, faz com que esse sistema se torne desfavorável em muitos pontos conformacionais de simulação.

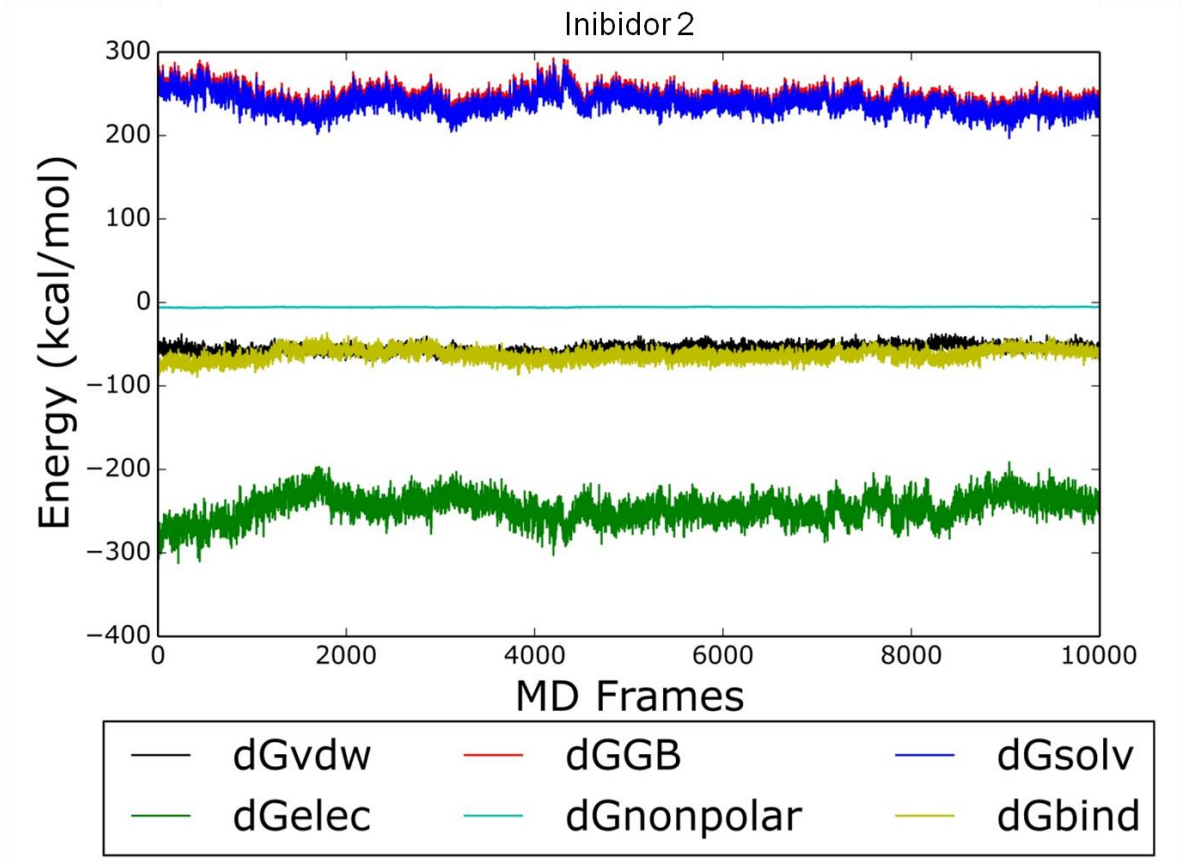
GRÁFICO 6 – Energia Livre de Ligação (em Kcal/mol) ao longo do Tempo de DM (em frames) para o ligante 1



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

Já quando observamos as energias para o complexo do inibidor 2 e HMGR percebemos que a estabilidade e permanência do domínio *Flap* faz com que tenhamos um sistema altamente descrito energeticamente, como pode ser observado no Gráfico 7, onde temos alta estabilidade de todas as energias do sistema, com dGbind próximos de -100 Kcal/mol, e a dGelec com valores abaixo de -200 Kcal/mol, esse perfil energético demonstra que esse é o melhor inibidor dentre os demais inibidores apresentados neste trabalho. Esses energias confirmam que o inibidor capaz de induzir e manter o domínio *Flap* fechado garante um sistema energeticamente favorável, favorecendo a inibição da proteína HMGR.

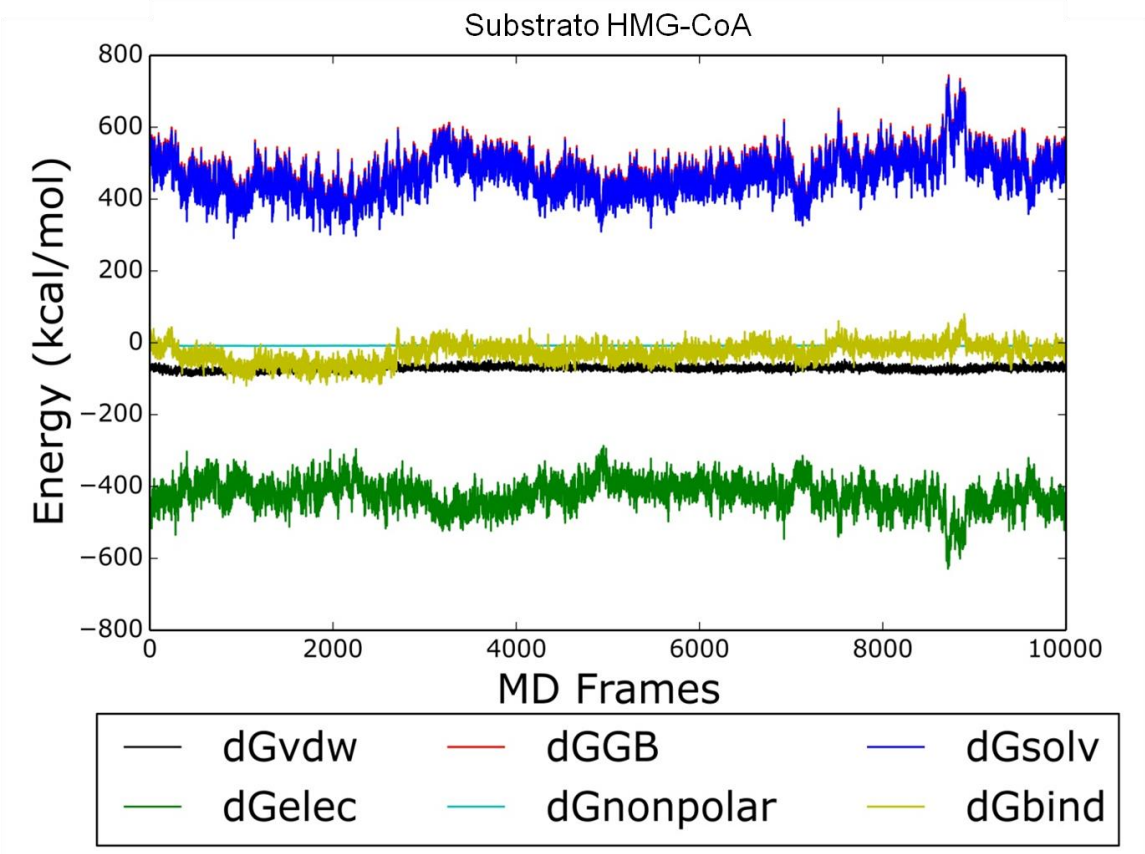
GRÁFICO 7 – Energia Livre de Ligação (em Kcal/mol) ao longo do Tempo de DM (em frames) para o ligante 2



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

Por fim as energias para o complexo substrato-HMGR (Gráfico 8), o modo de ligação do substrato envolve muito mais resíduos que os inibidores, porém esse aspecto físico-químico não garante energias baixas e espontâneas. Podemos observar que a dGbind possui variações altas chegando a ultrapassar zero Kcal/mol e tornando a energia positiva em alguns pontos, e essa variação percorre toda a simulação, o que nos mostra que mesmo com esses valores de energias altos a ligação substrato-HMGR ainda demonstra-se favorável, porém com rendimentos abaixo comparados aos inibidores, o que já é esperado, uma vez a afinidade dessas estatinas por HMGR são 10.000 vezes superiores em relação à HMG-CoA (ENDO, 1985; 2004), indicando que esses medicamentos são potentes inibidores da produção de colesterol pelo fígado.

GRÁFICO 8 – Energia Livre de Ligação (em Kcal/mol) ao longo do Tempo de DM (em frames) para o substrato HMG-CoA



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

CONCLUSÃO

Simulações de DM foram utilizadas para elucidar o mecanismo conformacional que envolve o domínio *Flap* (resíduos 861-866) da proteína HMGR. Embora as conformações do *Flap* não tenham sido observadas diretamente pelo experimental, esse comportamento dinâmico é relatado somente para o substrato (TABERNERO, et al., 1999; JAWAID, et al., 2010), nossos resultados apresentam que o movimento do *Flap* depende da indução do ligante que se liga à proteína, provocando fechamento ou abertura desse *loop*, e esses estados correspondem à modificação energética do sítio ativo de ligação, apontando que essa mudança interferre no processo de ligação do ligante e contribui para o processo enzimático de catálise e inibição.

Os estudos de dinâmica associados com PCA possibilitaram a visualização de cada movimento principal da proteína e suas mudanças conformacionais ao longo do tempo de DM, de início foram calculados 500 ns de produção parar todos os sistemas estudados, e foi feita uma extensão da simulação da Apo-proteína e do substrato em 100 ns cada, totalizando 700 ns de DM somando as simulações de todos os sistemas. Com a extensão da DM foi possível observar que a proteína sem ligante passa de um estado semiaberto para um estado totalmente aberto garantindo o aumento da cavidade para receber o substrato, que uma vez ligado permanece induzindo o fechamento do *Flap* até o final da extensão de 200 ns, demonstrando que o substrato se liga à cavidade do sítio ativo da HMGR e o *Flap* permanece no estado fechado, pois a cavidade formada pelo estado totalmente aberto garantiu um total acoplamento do HMG-CoA. As modificações estruturais da Apo proteína ao criar uma maior cavidade para receber o substrato têm um papel cinético, porque o Flap precisa se fechar quando o substrato se liga e abrir para liberar o produto.

Nossos resultados sugerem que a His866 fornece contribuição para a energia livre de ligação do complexo HMGR-inibidor 1 no estado fechado, e quando passa para o estado aberto essa contribuição decai para -1,022 Kcal/mol, esse resíduo é apontado como importante para a conversão do HMG-CoA em Mevalonato, sendo apresentado como o principal resíduo do *Flap* que modifica a contribuição energética do sítio ativo também no processo de inibição.

Para o complexo do substrato HMG-CoA com HMGR a His866 se mostrou altamente favorável para o sistema, confirmando que esse resíduo participa do processo de catálise, demonstrando um papel estrutural, fornecendo novas interações

para o substrato e estabilizando o complexo HMGR-subtrato. Para os complexos dos inibidores, novas interações foram identificadas garantindo a estabilidade e permanência dos derivados estatínicos no sítio ativo. As energias livres de ligação demonstraram que quando há uma instabilidade no domínio *Flap* a energia ao longo da simulação de DM sofre grandes alterações, e quando temos um estado totalmente fechado a energia do sistema se encontra favorável. A energia livre de ligação dos inibidores com a HMGR demonstra maior afinidade, em comparação à energia do substrato HMG-CoA.

Os resultados sugerem uma ótima inibição de HMGR para o inibidor que induz o fechamento do *Flap*, envolvido com maiores interações com os resíduos catalíticos e, consequentemente, a capacidade de inibir a produção do Mevalonato, o precursor do colesterol, além de contribuir para um novo projeto de desenvolvimento de estatinas inibidoras da HMGR. Finalmente, a comparação dos movimentos da proteína HMGR revelou que o domínio *Flap* está presente no processo de ligação dos inibidores e na catálise do substrato, revelando que o estado fechado é o mais favorável, com energias livres de ligação que demonstram espontaneidade do sistema com a presença do *loop* fechado, contribuindo diretamente com o ligante e interagindo mais fortemente com o sítio ativo, induzindo o melhor ajuste para a inibição com a mudança conformacional tampando o sítio ativo e criando um ambiente energeticamente favorável para a inibição, nos levando a uma melhor compreensão das mudanças conformacionais da HMGR após a ligação dos ligantes estatínicos e substrato.

REFERÊNCIAS

ADCOCK, S. A.; McCAMMON, J. A. Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of pro-teins. ChemicalReviews, v. 106, p. 1589-615. 2006.

BAYLY, Christopher I., Piotr Cieplak, Wendy D. Cornell, and Peter A. Kollman. A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints for Deriving Atomic Charges: The RESP Model. J. Phys. Chem. 1993, 97, 10269-10280.

CAMPO, Vanessa Leiria e CARVALHO, Ivone. Estatinas Hipolipêmicas e Novas Tendências Terapêuticas. Quim. Nova, Vol. 30, No. 2, 425-430, 2007;

CASE, D.A.; CHEATHAM, T.E.; DARDEN, T.A.; GOHLKE, H.; LUO, R.; MERZ, K.M.; ONUFRIEV, A.; SIMMERLING, C.L.; WANG, B.; WOODS, R. J.; J. Comput. Chem. 2005, 26, 1668.

CASE, D.A.; DARDEN, T.A.; CHEATHAM, T.E., III; SIMMERLING, C.L.; WANG, J.; DUKE, R.E.; LUO, R.; WALKER, R.C.; ZHANG, W.; MERZ, K.M.; et al., AMBER 12; University of California: San Francisco, CA, USA, 2012.

CASE, D.A.; R.M. Betz, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, T.A. Darden, R.E. Duke, T.J. Giese, H. Gohlke, A.W. Goetz, N. Homeyer, S. Izadi, P. Janowski, J. Kaus, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, D. Mermelstein, K.M. Merz, G. Monard, H. Nguyen, H.T. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, C.L. Simmerling, W.M. Botello-Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, R.M. Wolf, X. Wu, L. Xiao and P.A. Kollman (2016), AMBER 2016, University of California, San Francisco.

CHEVROT, G.; SCHURHAMMER, R.; WIPFF. Molecular dynamics study of dicarbollide anions in nitrobenzene solution and at its aqueous interface. Synergistic effect in the Eu(III) assisted extraction. Physical Chemistry Che-mical Physics, v.9, p.5928-5938, 2007;

COSTA, C. H. S.; OLIVEIRA, A. R. S.; PEREIRA, M. J. S.; FIGUEIREDO, A. F.; FERREIRA, J. E. V.; MIRANDA, R. M., Quantum Chemistry, Quantitative Structure-Activity Relationship and Molecular Docking Study on Fenarimol Derivatives with Biological Activity Against Chagas Disease. Journal of Computational and Theoretical Nanoscience, 2015.

DURRANT, J.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biology*, v. 9, n. 1, p. 71, 2001.

ENDO, A. et al. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ml-236a and ml-236b fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. FEBS LETTERS, v. 72, number 2, p. 323-326, 1976;

ENDO, A.; Kuroda, M.; Tanzawa, K. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. FEBS Lett. 1976, 72, 323–326.

GALINDO-MURILLO, R., DR Roe, and TE Cheatham, III. On the absence of intrahelical DNA dynamics on the μs to ms timescale. Nature Commun. 5:5152 (2014) doi: 10.1038/ncomms6152.

GALINDO-MURILLO R., DR Roe, and TE Cheatham, III. Convergence and reproducibility in molecular dynamics simulations of the DNA duplex d(GCACGAACGAACGAACGC). Biochimica Biophys. Acta 1850, 1041-1058 (2015). doi: 10.1016/j.bbagen.2014.09.007

GAUSSIAN Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; SCALMANI, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; and Pople, J. A.; Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.

GROSSO, Marcos; Adrian Kalstein, Gustavo Parisi, Adrian E. Roitberg, and Sebastian Fernandez-Alberti. On the analysis and comparison of conformer-specific essential dynamics upon ligand binding to a protein. The Journal Of Chemical Physics 142, 245101 (2015).

GUNASEKARAN, K. Nussinov, R. How Different are Structurally Flexible and Rigid Binding Sites: Sequence and Structural Features Discriminating Proteins that Do and Do not Undergo Conformational Change upon Ligand Binding. J Mol Biol. 2007;365(1):257-273. doi:10.1016/j.jmb.2006.09.062.

HAINES, Brandon E., Olaf Wiest, and Cynthia V. Stauffacher. "The increasingly complex mechanism of HMG-CoA reductase." Accounts of chemical research 46.11 (2013): 2416-2426.

HORIUCHI, Tokio; Gō, Nobuhiro. Projection of monte carlo and molecular dynamics trajectories onto the normal mode axes: Human lysozyme. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. V10, p 106-116. 1991.

HORNAK V, Abel R, Okur A, et al., Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters, Proteins, 65 2006; 65: 712-725.

HOU T, Wang J, Li Y, Wang W. Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 1. The accuracy of binding free energy calculations based on molecular dynamics simulations. J Chem Inf Model. 2011, 51(1): 69-82.

HUFF, M. W, D. E. Telford, Lord of the rings — the mechanism for oxidosqualene: lanosterol cyclase becomes crystal clear, Trends Pharmacol. Sci. 26 (2005) 335–340.

ICHIYE, Toshiko; Karplus, Martin. Collective motions in proteins: a covariance analysis of atomic fluctuations in molecular dynamics and normal mode simulations. Proteins 11, 205–217. 1991.

ISTVAN, E. S e Johann Deisenhofer. Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. Science 292, 1160 (2001).DOI:10.1126/science.1059344

ISTVAN, E. S. Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Am. Heart J. 2002, 144, S27–S32;

ISTVAN, E. S., Maya Palnitkar, Susan K.Buchanan and Johann Deisenhofer. Crystal structure of the catalytic por-tion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis. The EMBO Journal Vol.19 No.5 pp.819–830, 2000;

JAWAID, Safdar. Monica Gertz. Carlin Corsio, Jamie Cheung, Heather Seidle and Robin D Couch. Human Hydroxymethylglutaryl-coenzyeA reductase (HMGCR) and statin sensitivity. Indian Journal of Biochemistry & Bi-ophysics. Vol. 47, December 2010, pp 331-339.

JORGENSEN, W.; Chandrasekhar, J.; Madura, J.; Impey, R.; Klein, M. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. J. Chem. Phys. 1983, 79, 926–935.

KOLLMAN, P.A.; MASSOVA, I.; REYES, C.; KUHN, B.; HUO, S; CHONG, L.; LEE, M.; LEE, T.; DUAN, Y.; WANG, W.; DONINI, O.; CIEPLAK, P.; SRINIVASAN, J.; CASE, D.A.; CHEATHAM, T. E., Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. Acc Chem Res. 2000, 33(12): 889-897.

LARSSON, Olle. "HMG-CoA reductase inhibitors: role in normal and malignant cells." Critical reviews in onco-logy/hematology 22.3 (1996): 197-212;

Lima, Anderson H, Santos, Alberto M, Alves, Cláudio Nahum, Lameira, Jerônimo. Computed insight into a peptide inhibitor preventing the induced fit mechanism of MurA enzyme from Pseudomonas aeruginosa. Chem Biol Drug Des. 2016; 1–10.

LUDKE, M. C. M. M., LÓPEZ, J. Colesterol e Composição dos Ácidos Graxos nas Dietas para Humanos e na Carcaça Suína. Ciência Rural, Santa Maria, v. 29, n. 1, 181-187, 1999.

MORAN, Laurence A; HORTON, H. Robert; SCRIMGEOUR, K. Gray; PERRY, Marc. D. Principles of Biochemistry. Fifth Edition. 1935-QP514.2.P745, 2012.

NAIM, M., S. Bhat, K. N. Rankin, S. Dennis, S. F. Chowdhury, I. Siddiqi, P. Drabik, T. Sulea, C. I. Bayly, A. Jakalian, E. O. Purisima, J. Chem. Inf. Model. 2007, 47, 122.

NAMBA, A. M; SILVA, V. B; SILVA, C. H. T P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fár-macos. Ecl. Quím. São Paulo, 33(4): 13-24, 2008;

OROZCO, M. http://mmb.pcb.ub.es/software/pcasuite/pcasuite.html;

PARK, William KC, et al. "Hepatoselectivity of statins: design and synthesis of 4-sulfamoyl pyrroles as HMG-CoA reductase inhibitors." Bioorganic & medicinal chemistry letters 18.3 (2008): 1151-1156

PIN-CHIH SU, Cheng-Chieh Tsai, Shahila Mehboob, Kirk E. Hevener, and Michael E. Johnson. Comparison of Radii Sets, Entropy, QM Methods, and Sampling on MM-PBSA, MM-GBSA, and QM/MM-GBSA Ligand Binding Energies of F. tularensis Enoyl-ACP Reductase (FabI). Journal of Computational Chemistry, 2015, 36,1859-1873.

RAMIN, Ekhteiari Salmas, Mine Yurtsever & Serdar Durdagi. Investigation of Inhibition Mechanism of Chemokine Receptor CCR5 by Micro-second Molecular Dynamics Simulations. Scientific RepoRts | 5:13180 | DOi: 10.1038/srep13180. 2015.

RYCKAERT, JP. Ciccotti G, Berendsen HJC (1977) Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. J Comput Phys 23:327–341. doi: 10.1016/0021-9991(77)90098-5.

SARVER, Ronald W, Elizabeth Bills, Gary Bolton, Larry D. Bratton, Nicole L. Caspers, James B. Dunbar, Melissa S. Harris, Richard H. Hutchings, O Robert M. Kennedy, Scott D. Larsen, Alexander Pavlovsky, Jeffrey A. Pfeffer-korn, and Graeme Bainbridge. Thermodynamic and Structure Guided Design of Statin Based Inhibitors of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase. J. Med. Chem. 2008, 51, 3804–38133804;

SIEFFERT, N.; WIPFF, G. The [BMI][Tf2N] ionic liquid/water binary system: A molecular dynamics study of phase separation and of the liquid-liquid interface. Journal of Physical Chemistry B, v.110, n.26, p.13076-13085,2006.

SIPERSTEIN, M. D, GUEST, M. J. Studies on the site of the feedback control of cholesterol synthesis. J Clin In-vest 1960; 39:642–5;

TABERNERO, L. BOCHAR, D. A, RODWELL, V. W & STAUFFACHER, C. V. Proc Natl AcadSci (U S A). 1999. 96, 7167-7171.

TUCKERMAN, M.; BERNE, B. J. AND MARTYNA, G. J., Reversible multiple time scale molecular dynamics. The Journal of Chemical Physics. 1992 vol: 97 (3) pp: 1990-2001.

VAN AALTEN, D.M. Conn, D.A. de Groot, B.L. Berendsen, H.J. Findlay, J.B. Amadei, A. Protein dynamics derived from clusters of crystal structures. Biophysical Journal. V73, p 2891-2896. 1997.

VERLI, Hugo. Bioinformática da Biologia à flexibilidade molecular. Porto Alegre, 2014. 282 p. :il;

VOET, D., VOET, J.G., PRATT, C.W. Fundamentos de bioquímica. Porto Alegre: Artmed, 2000;

Wang JM, Wolf RM, Caldwell JW, et al., Development and Testing of a General Amber Force Field, J. Comput.Chem., 25 2004; 25: 1157-1174.

WHO. WHO, World Health Organization | The top 10 causes of death. *WHO*. 2017. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/.

Article
For publication

RSCPublishing

ARTICLE

Study of the conformational mechanism of the statin protein of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A Reductase (HMGR) when bound and unbound using Molecular Dynamics, PCA and Free Energy.

Cite this: DOI: 10.1039/x0xx00000x

Received 00th January 2018,
Accepted 00th January 2018

DOI: 10.1039/x0xx00000x

www.rsc.org/

Clauber. H. S. da Costa,[a] Amanda. R. S. Oliveira,[a,b,c] Alberto M. dos Santos, [a] Jerônimo Lameira[a]

Cholesterol is a substance of paramount importance for all animals. However, its high level in the human body is linked to the two most deadly diseases in the world: ischemic heart disease and stroke. One of the synthetic medications already used in the treatment of hypercholesterolemia is statins, inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase (HMGR), which act primarily on the liver by inhibiting the conversion of the HMG-CoA substrate into mevalonic acid which is the metabolite Precursor of cholesterol, but the structural mechanism of the rutin bound to the substrate is unknown. Molecular Dynamics (MD) studies combined with Principal Component Analysis (PCA) were performed to verify the mechanism of conformational changes of the C-terminal Flap domain (residues His861, Leu862, Val863, Lys864, Ser865 and His866) in the free protein And after binding of the native substrate of HMGR. A total of 300 ns of MD simulation were performed in this study. It was used calculations of Energy Free Bonding and Interaction Energy, which estimated that the structural mechanism of Flap is directly related to the action of HMGR protein, since this domain controls the access to the active site of the enzyme. The results also show that the structural modification of the flap increases the energy contribution of the system by involving larger interactions with the catalytic residues and, consequently, the capacity for synthesis and production of cholesterol, leading to a better understanding of the conformational changes of HMGR after Binding of the HMG-CoA substrate.

Introduction

Cholesterol is of extreme importance for all animals and its biosynthetic pathway is one of the most studied due to its relevance to health, being present as essen-tial substances of the biological membranes and used by the cells in the synthe-sis of bile acids, digestion, absorption of lipids and fat-soluble vitamins in the small intestine, synthesis of steroid hormones and vitamin D[1,2].

Liver cholesterol biosynthesis is a complex route, requiring 20 enzymes to combine 30 carbons from acetyl-CoA reductase into a 27-carbon structure that Include four rings. Of the 20 pathway enzymes, 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase (HMGR and/or HMG-CoA reductase) is uniquely suited to serve as the main point of the regulatory pathway because it catalyzes an irreversible reaction at the beginning of the route, Containing 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A (HMG-CoA) as the enzyme's natural substrate3. However, data from the WHO (published in 2015 and updated in May 2017) report that high cholesterol levels are associated with two most deadly diseases in the world: ischemic heart disease and stroke (and other celebratory vascular diseases), responsible for 15 million of the 56.4 million deaths worldwide by 2015[4]. High levels of LDL cholesterol are associated with the

[a] Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará, CEP 66075-110 Belém, PA, Brazil.
[b] Laboratório Computacional de Sistemas Biológicos, Universidade Federal do Pará, CEP 66075-110 Belém, PA, Brazil.
[c] Laboratório Amazônico de Computação Científica , Universidade Federal do Pará, CEP 66075-110 Belém, PA, Brazil.

progression of arteriosclerosis, a cause of high levels of mortality worldwide[5]. These diseases have remained the leading causes of global death in the last 15 years. Studies indicate that the main factors for the increased risk of cardiovascular diseases are high age, hypertension, hypercholesterolemia, smoking and diabetes[6].

Thus, a decrease in the enzymatic activity of HMGR can regulate the formation of mevalonic acid, the precursor of cholesterol, and this catalytic process is the main target of a class of drugs called statins, competitive inhibitors of HMG-CoA reductase[7]. The affinity of these statins for HMGR is greater than 10,000 fold over HMG-CoA, indicating that these drugs are potent inhibitors of cholesterol production by the liver. Statins are able to maintain tolerable levels of LDL in the blood. Compoundine, simvastatin, fluvastatin, cerivastatin, atorvastatin and rosuvastatin are the main statins capable of maintaining tolerable levels of LDL in the blood. They produce adverse effects such as: gastrointestinal discomfort, migraine, cracking of the skin, muscle pain, sexual dysfunction, drowsiness, nausea, constipation and peripheral neuropathy[8,9]. In addition, the most common effect associated with statins is myalgia, which is manifested by muscle stiffness, muscle weakness, fatigue and cramps. The cause of this side effect is thought to be the inhibition of the HMGR enzyme in extrahepatic tissues[10].

Due to the similarity of mevalonate with the δ-lactone structure of statins, these substances bind to the active site of the HMGR enzyme, competing with HMG-CoA, suppressing cholesterol production[5,8,9]. Statin binding demonstrates that they are inhibitors competitive with the HMG-CoA substrate, but not competitive with NADPH[8,11]. Inhibition occurs in the enzymatic pathway of HMGR, in the production of mevalonate that after several reactions will generate cholesterol, the HMG-CoA substrate has a super important role in this pathway, where it is produced from Acetyl-CoA, and in the protein HMGR or HMG-CoA undergoes NADPH catalysis and produces mevalonate (Figure 1)[12-14].

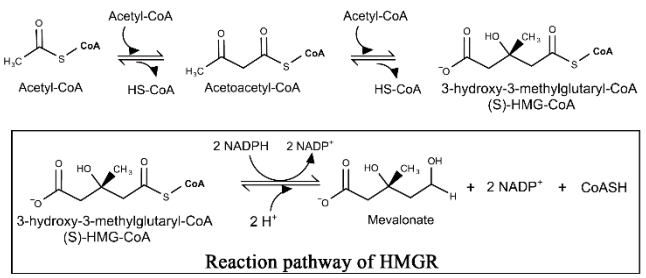


Figure 1: General reaction pathway of HMGR in the production of mevalonate

The native HMGR protein has the Flap domain containing 25-30 amino acids and is located at the catalytic end of the C-terminal, contributes to the substrate-enzyme site and the creation of a cap that covers the active site when the substrate binds Protein, contributing to the entropy involved in the substrate-enzyme binding process. It is estimated that the structural mechanism of flap closure is directly related to the action of the HMGR protein, since this domain controls access to the active site of the enzyme. This behavior is observed only for the substrate and is not involved in the binding process of inhibitors of this protein[13,14]. Recently, we analyze the induction behavior of a loop present in the active site of the MurA enzyme that closes with the substrate binding increasing the energetic efficiency of the catalytic system[15]. Thus, we performed in this article, through molecular modeling techniques, studies of Molecular Dynamics (MD) combined with Principal Component Analysis (PCA), Free Binding Energy and Residue Interaction Energy using the AMBER 1220 program package to investigate the mechanism of conformational changes of the C-terminal Flap domain (Residues His861, Leu862, Val863, Lys864, Ser865 and His866) present in the PDB 1DQ9, with the free protein and after binding of the HMG-CoA substrate in the HMGR enzyme.

Methodology

Molecular Dynamics Simulation

In order to simulate the molecular dynamics in the AMBER12[16]. The ionization state of ionizable residues was evaluated from PROPKA3[17]. First the substrate was subjected to the calculation of RESP charges[18,19] using the Gaussian03[20] program with the Hartree-Fock method and the set of bases 6-31G*[21], later extracted using the antechamber module, implemented in the AMBER12 package[16]. The general force field of AMBER (GAFF)[22] and force field ff99SB[23] were used to describe the collection of atoms of the system by Newtonian forces by the LEaP tool[22] in AMBER12[16]. The complex was solvated with octahedral TIP3P[24] molecules of water, and the system was neutralized with Cl^- ions. To minimize the contacts and the energy content of the system, we minimize the hydrogens, water molecules and against ions, and finally we apply minimization to the whole system. The system was heated through 50 picoseconds (ps) of molecular dynamics in order to increase its temperature to 300 K with position restrictions at constant volume, applying the Shake algorithm[25]. Then, 10 nanoseconds (ns) of Dynamics were performed with canonical ensemble, that is, with P (1atm), T (300K) and N constants, in order to establish the balance of the system. Finally, we performed the molecular dynamics simulations for each system, a total of 300 ns of simulation time generated and analyzed in this study.

Principal Component Analysis

Principal Component Analysis (PCA) was generated using the Cpptraj implemented in AmberTools16[26]. The PCA method is described to identify collective motions in proteins from Molecular Dynamics or Normal Mode Simulations, to use as covariance of fluctuations atomic

positions and through comparisons of covariance matrices and cross correlation shows that relative motions have many subjective characteristics in the different simulations of MD[27,28,29].

PCA is a technique that can be used to transform a series of potentially coordinated observations into a set of orthogonal vectors called principal components (PCs). That are able to describe the behavior of Cartesian coordinates contained in the dynamics of each fragment of the protein[30,31]. PCA finds "new variables" called principal components (PC) which comprise PC1 (first principal component), PC2 (second principal component), and PCn (n principal component). Able to generate a plot that displays the scores and gives general relationships about the samples (similarities and differences) based on the descriptors under consideration[32]. For a system of N atoms, the input data set for PCA, which was obtained by means of a standard trajectory with the coordinates x and z of each atom, can be a statistical data matrix and each column of the matrix indicates Cartesian coordinate for a atom in each simulation frame and can be separated in PC1, PC2 and PC3[33].

In order to generate each PC from the DM, only Cα atoms were considered, excluding the side chains to not consider the displacement and the rotations of the structure, but rather the fluctuation of the atoms to be stored in a Covariance matrix (C) of coordinates calculated from time series of 3D positional coordinates, so that the PCs represent the modes of movement of the system, whose terms are defined as (Equation 1)[33,34].

$$C_{ij} = \langle q_i q_j \rangle = \frac{1}{K} \sum_{K=1}^{K} q_i^K \, q_j^K \qquad \text{Eq. 1}$$

where the sum goes over the K configurations stored during an equilibrated MD simulation (Equation 2)

$$q_i^K = \sqrt{m_i} \left(x_i^k - \langle x_i \rangle \right) \qquad \text{Eq. 2}$$

is the mass-weighted internal displacement of Cartesian coordinate x_i^k of the i th atom (i= 1,...,N; N = number of atoms in the molecule) with mass mi, and the angular brackets represent the average obtained from the k configurations of the corresponding equilibrated MD simulation. The diagonalization of the 3N × 3N covariance matrix **C** that can be calculated by (Equation 3)

$$\Lambda = L^T C L \qquad \text{Eq. 3}$$

where Λ describes a diagonal matrix representing the reactive contribution of each PCA and containing the eigenvalues and L describes a matrix including the 3N orthonormal eigenvectors. and diagonalization to generate a reduced matrix with PC1, PC2 and PC3 for each DM simulation frame.

With the DM simulations the trajectories were used for the PCA calculations, the first step was to use the simulations of each system to collect the information of the X, Y and Z fluctuations of each atom along the trajectory for the construction of the matrix of Covariance (**C**) using Cpptraj implemented in AmberTools 16[26]. In the second step diagonalization of the matrix C is generated by generating eigenvectors, that is, first, second and third principal components (PC1, PC2 and PC3) and eigenvalues (ie "weight" of each PC) a column with the frame number of the DM trajectory and the three main components PC1, PC2 and PC3. The third step is to plot the graph by correlating PC1 vs. PC2 by creating a staining surface that control the numbers of blue (0 ns) trajectories tending towards green (50 ns) leading to the end of the DM in red (100 ns). The fourth step is the creation of trajectory with the movements of each component through the program PCAsuite - Molecular Modelling & Bioinformatics Group[35]. It is possible to observe the direction and amplitude of the movement and thus generate images that demonstrate the initial, intermediate and final structure that form the conformational movement of the protein. This study aims to investigate the conformational mechanism of the Flap domain due to the binding of the substrate and statins to the HMGR protein, since this Loop is close to the active site.

The molecular dynamics was used to elucidate the conformational mechanism what is involved on the Flap domain (residues 861-866) of the HMGR protein. Although this flap conformation was not observed on the experimental, this dynamic behavior is only related to the substrate[13,14]. Combine molecular dynamics studies with PCA allows the visualization of each main movement of the protein and its conformational changes along the time during the MD simulation[28-30,33,34,36]. It's not only the three-dimensional structure and the catalytic site of the protein that is responsible for the action, the movement and conformational changes are important to the comprehension of the biochemical function. Since they are dynamic structure, proteins often suffer changes in their conformation after the bound of the ligand. Is widely accepted that the flexible loop regions has an important participation on the protein function[37].

It is estimated that the structural mechanism of Flap closing is directly related to the action of the HMGR protein, once this domain controls the access to the active site. This behavior is observed only to the substrate and is not involved in the process of inhibition of this protein[13,14]. In this work, we combine technics of Molecular Modeling, Molecular Dynamics (MD), Principal Component Analysis (PCA), Binding Free Energy and residues interaction energy using the AMBER 12 program16. To investigate the mechanism of conformational changes of the Flap domain

on the C-terminal (His861, Leu862, Val863, Lys864, Ser865, His866) present on PDB 1DQ9, with the free protein and after the substrate binding HMG-CoA on the HMGR enzyme.

Results And Discussion

The figure 2 demonstrate the correlation between the PCs, each point on the graph represent one structure of the complex protein-substrate and the way which runs during the 100ns of MD simulation. In PC1 vs PC2 (Figure 2a) and PC1 vs PC3 (Figure 2b) we have groups of micro states of similarity between the structures of the complex. The Figure 2c (PC2 vs PC3) show a more dispersed correlation of the structures. The RMSF for each PC is demonstrated on the Figure 2d, where is possible observe the mean fluctuation of each residue in each PC.

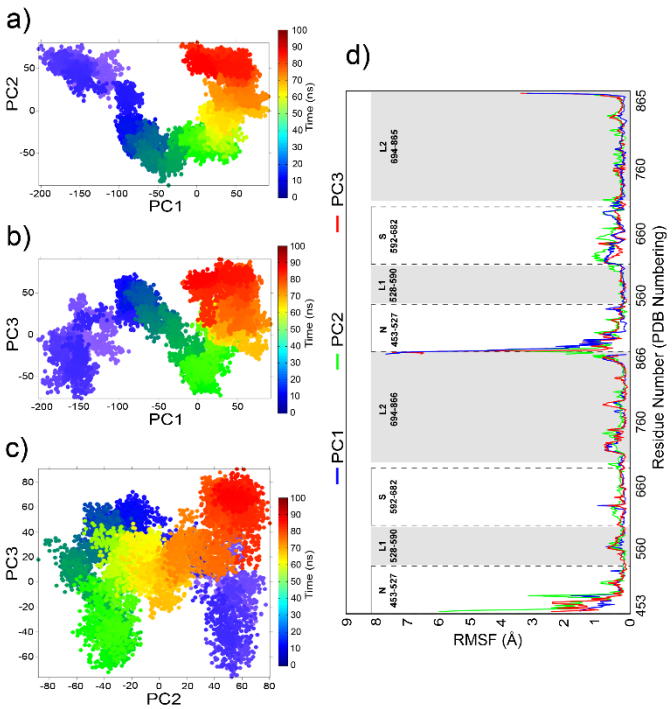


Figure 2: Graphic of PC vs PC to the substrate HMG-CoA; a) graphic of PC1 vc PC2; b) PC1 vc PC3; c) PC2 vc PC3, the color of the graphics are related to the reference, blue is 0ns; green to 50ns and red to 100ns. d) Graphic of RMSF of the residues of the protein to PC1, PC2 and PC3.

The PCA results demonstrate that the substrate induces the close state of the flap creating a favorable environment to the binding. The vectors confirm only one conformational state of the flap and the main movements of the complex (Figure 3).

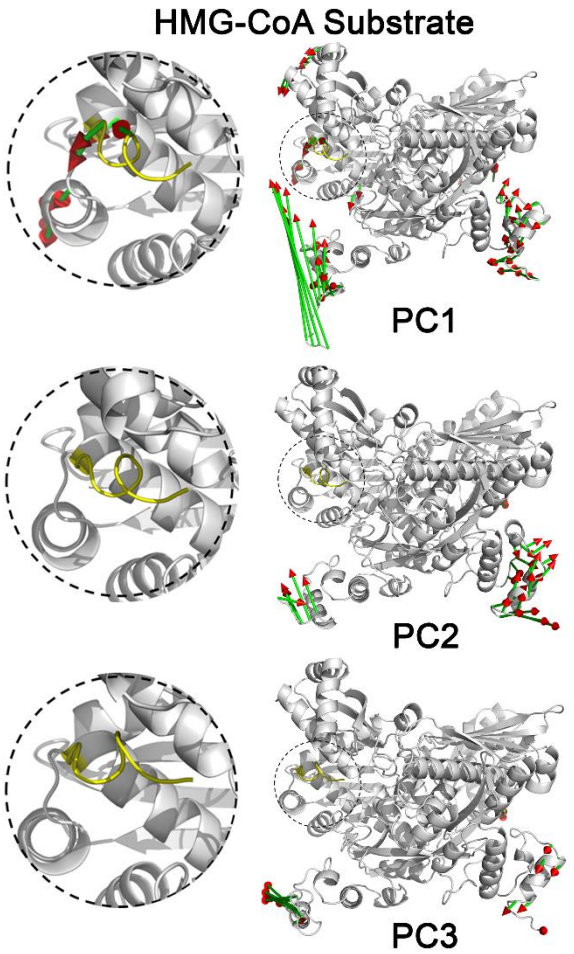


Figure 3: the protein movement on PC1, PC2 and PC3 to the system with the substrate HMG-CoA with the vectors (green stick and red arrows) indicating the amplitude and direction of the movement, in evidence (yellow) the FLAP portion (861-866).

The Figure 4 shows the decomposition energy by residues for the complex protein-substrate. When the HMG-Co is on the active site, the flap was closed, creating many interactions with the site. The most favorable energy contribution is related with the residues that interact directly with the substrate HMG-CoA during the catalysis. His866 has a high favorable energy to the system which confirms that this residue participates of the catalysis process. Besides the catalytic residues, others amino acids demonstrate favorable energies.

His866 is pointed as an important residue to the conversion of HMG-CoA to Mevalonate, being pointed as the main residue of the flap that also modifies the energy contribution of the active site in the inhibition process.

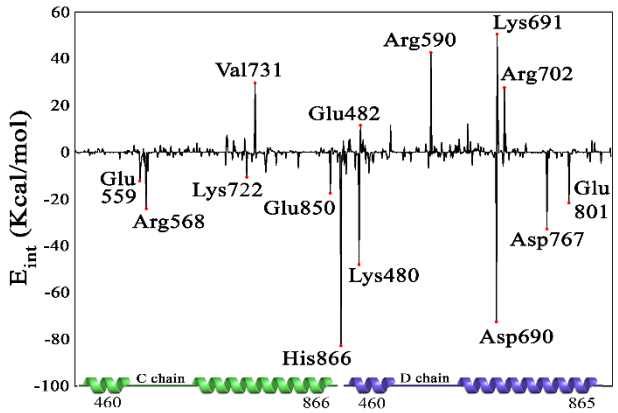


Figure 4: Interaction energy (Eint, in Kcal/mol) between the protein and the substrate

The PCA results demonstrate that the Atorvastatin has the same behavior of the substrate, induces the Flap closure, as is shown on the Figure 5, which show the PC1 movement, where the Flap pass from the open state to close state (chain C, initial structure in blue and final in red), PC2 and PC3 confirm the absence of a second conformational state of the flap (Figure 6 and 7). The flap influence on the Atorvastatin system proves that the close state of the loop is related to the inhibition efficiency of the HMGR, once this state is related with the stability of the ligand-receptor complex.

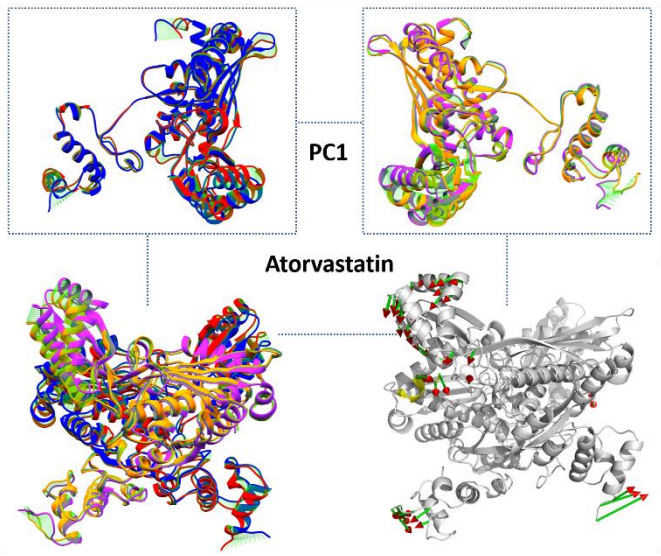


Figure 5: Protein movement in PC1 from the Atorvastatin system, for the C Chain we have the initial structure in red and final structure in blue. To the D chain, the initial structure is in pink and the final in orange. In green, the intermediate structure.

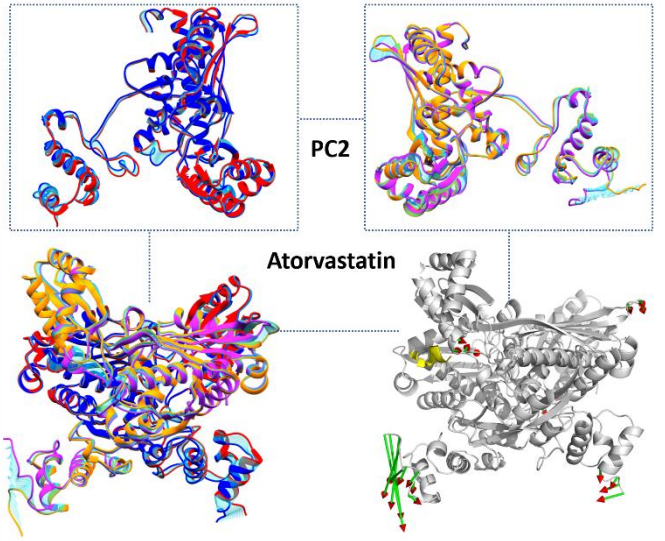


Figure 6: Protein movement in PC2 from the Atorvastatin system, for the C Chain we have the initial structure in red and final structure in blue. To the D chain, the initial structure is in pink and the final in orange. In cyan, the intermediate structure

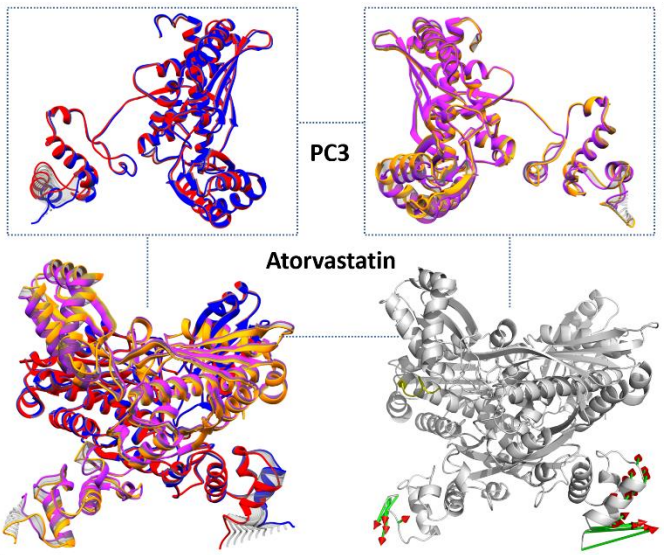


Figure 7: Protein movement in PC3 from the Atorvastatin system, for the C Chain we have the initial structure in red and final structure in blue. To the D chain, the initial structure is in pink and the final in orange. In gray, the intermediate structure

This results suggest that the Atorvastatin is a High efficiency inhibitor by imitate the substrate behavior, revealing that the flap dominium is present on the inhibition process and in the substrate catalysis. The calculated free energy to the substrate HMG-CoA e Atorvastatin is shown on the table 1, compared with the experimental ΔG, witch demonstrate that the presence of the close flap contributes directly with the affinity between the ligand and HMGR, creating an environment with favorable energy both for the catalysis and inhibition. HMGR has 10,000 times higher affinity for statins than for HMG-CoA. In this work, we demonstrate that the Atorvastatin has a more favorable

energy with higher affinity, ensuring your higher inhibitory potential.

Table 1: Free energy to the substrate HMG-CoA and Atovastatin comparad with the experimental ΔG.

Compostos	$\Delta G_{teórico}$	$\Delta G_{experimental}$
HMG-CoA	-23,54118	-6,7
Atorvastatina	-46,83234	-10,0

The PCA from the apo-protein (using 100 ns of molecular dynamics) shown many movements and high flexibility in all domains and it is possible to observe movements on the Flap in PC1 and PC2 (figure 8 and 9), indicating that the flap has an intermediate state, because its instability causes an oscillation between the open and close states. This Flap is closed in some moments and opens in others, but not in point to make a free cavity, with higher volume, to the ligand binding.

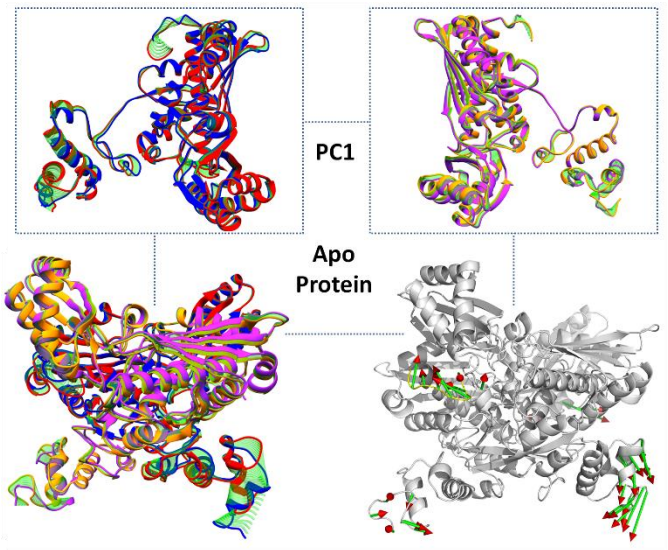


Figure 8: Protein movement in PC1 from the Apo-protein system, for the C Chain we have the initial structure in red and final structure in blue. To the D chain, the initial structure is in pink and the final in orange. In gray, the intermediate structure. The sticks for the vectors of PC1 are show in green and the arrows in red

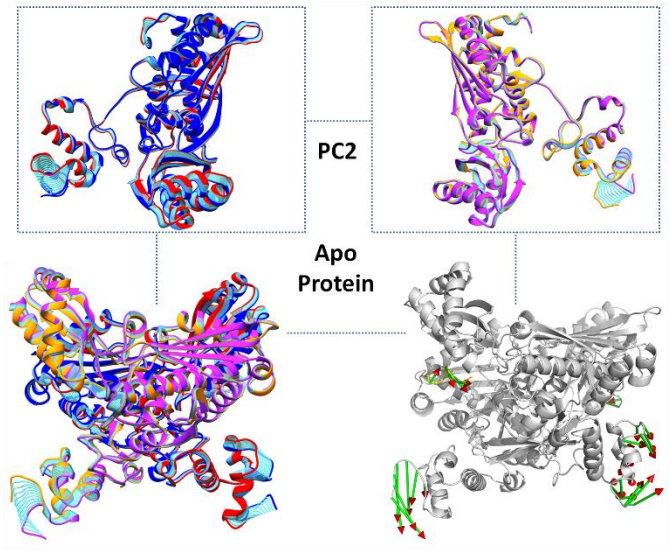


Figure 9: Protein movement in PC2 from the Apo-protein system, for the C Chain we have the initial structure in red and final structure in blue. To the D chain, the initial structure is in pink and the final in orange. In gray, the intermediate structure. The sticks for the vectors of PC2 are show in green and the arrows in red

The figure 10 show the RMSD to the 200ns of MD to both systems, apo-protein and with the substrate, to observe the behavior of the flap. The protein without ligand passes from an intermediate state to a full open state (blue) ensuring cavity enlargement to receive the substrate, once is binding, they induce the Flap to the close state until the end of the simulation (green), this shows that the substrate binding to the active site of HNGR leading the flat to the close state, because the cavity formed by the open state guaranteed a full coupling of HMG-CoA.

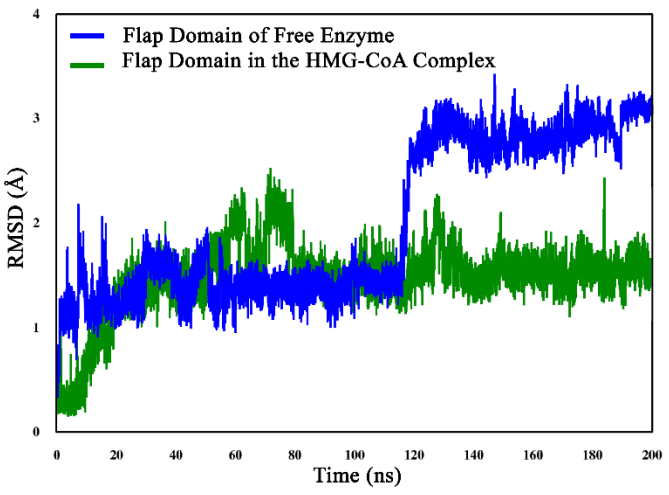


Figure 10: RMSD graphic (in Å) to the Flap (860-866) to the substrate HMG-CoA (green) and to the Apo-protein (blue) during 200 ns of MD simulation.

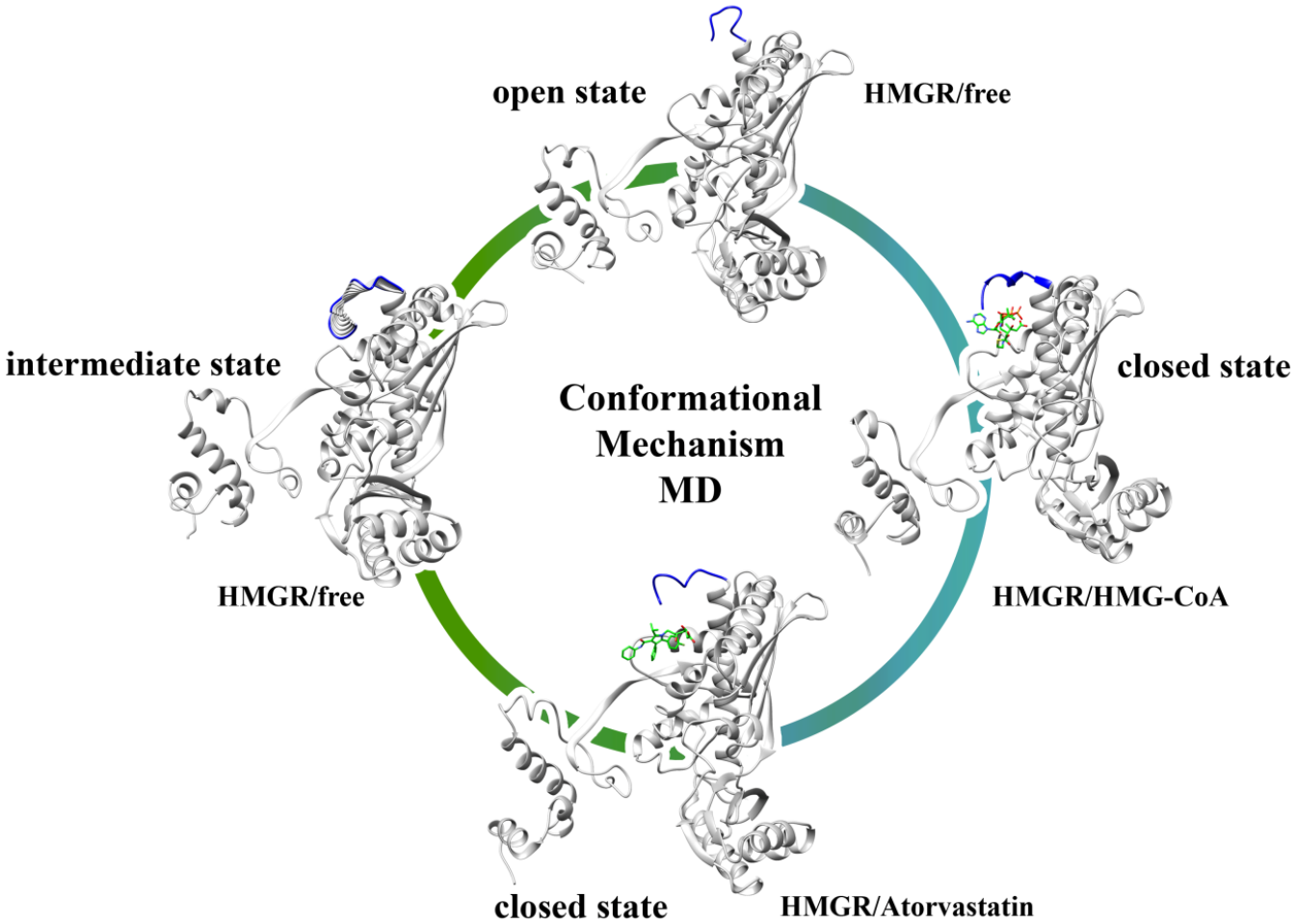


Figure 11: Conformational mechanism of the HMG protein for the Flap domain states.

The figure 11 show the conformational mechanism cycle of the free protein HMGR and binding to the Inhibitor and substrate. The apo-protein pass form an intermediate state to a full open state and this structural changes in the free HMGR has a kinetic role to create a larger cavity to receiver the substrate, because the flap needed close when the substrate binding and opening to release the product. The HMGR bounded with the ligand closes in the presence of the substrate HMG-CoA and Atorvastatin imitates the binding of the substrate guarantee a better affinity and the permanence on the active site.

Conclusions

Acknowledgements

We thank to Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular (PPGQMMM), the Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos (LPDF), and the Universidade Federal do Pará (UFPA). The Author is immensely grateful to Jerônimo Lameira for the guidance.

References

1 LUDKE, M. C. M. M., LÓPEZ J. Colesterol E Composição Dos Ácidos Graxos Nas Dietas Para Humanos E Na Carcaça Suína.

2 HUFF M, TELFORD D. Lord of the rings – the mechanism for oxidosqualene:lanosterol cyclase becomes crystal clear. Trends Pharmacol Sci. 2005; 26 (7):335-340. doi:10.1016/j.tips.2005.05.004.

3 MORAN, Laurence A; HORTON, H. Robert; SCRIMGEOUR, K. Gray; PERRY MD. Principles of Biochemistry. 5th (fifth.; 2012.

4 WHO. WHO, World Health Organization | The top 10 causes of death. WHO. 2017. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/.

5 ISTVAN ES, Palnitkar M, Buchanan SK, Deisenhofer J. Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis. EMBO J. 2000;19(5):819-830. doi:10.1093/emboj/19.5.819.

6 Sarver RW, Bills E, Bolton G, et al. Thermodynamic and Structure Guided Design of Statin Based Inhibitors of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase. J Med Chem. 2008;51(13):3804-3813. doi:10.1021/jm7015057.

7 SIPERSTEIN MD, GUEST MJ. Studies on the site of the feedback control of cholesterol synthesis. J Clin Invest. 1960;39(4):642-652. doi:10.1172/JCI104079.

8 Endo A, Kuroda M, Tanzawa K. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. FEBS Lett. 1976;72(2):323-326. doi:10.1016/0014-5793(76)80996-9.

9 Endo A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. J Lipid Res. 1992;33. http://www.jlr.org/content/33/11/1569.full.pdf. Accessed June 25, 2017.

10 Park WKC, Kennedy RM, Larsen SD, et al. Hepatoselectivity of Statins: Design and Synthesis of 4-Sulfamoyl Pyrroles as HMG-CoA Reductase Inhibitors. Vol 18.; 2008. doi:10.1016/j.bmcl.2007.11.124.

11 Istvan ES, Deisenhofer J, Tanzawa K, al. et. Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Am Heart J. 2002;144(6 Suppl):S27-32. doi:10.1067/mhj.2002.130300.

12 Haines BE, Wiest O, Stauffacher C V. The Increasingly Complex Mechanism of HMG-CoA Reductase. Acc Chem Res. 2013;46(11):2416-2426. doi:10.1021/ar3003267.

13 Tabernero L, Bochar DA, Rodwell VW, Stauffacher C V. Substrate-induced closure of the flap domain in the ternary complex structures provides insights into the mechanism of catalysis by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(13):7167-7171. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10377386. Accessed June 25, 2017.

14 Jawaid S, Gertz M, Corsino C, Cheung J, Seidle H, Couch RD. Human hydroxymethylglutaryl-coenzyme a reductase (HMGCR) and statin sensitivity. Indian J Biochem Biophys. 2010;47(6):331-339.

15 Lima AH, dos Santos AM, Alves CN, Lameira J. Computed insight into a peptide inhibitor preventing the induced fit mechanism of MurA enzyme from Pseudomonas aeruginosa. Chem Biol Drug Des. 2017;89(4):599-607. doi:10.1111/cbdd.12882.

16 Case DA, Cheatham TE, Darden T, et al. The Amber biomolecular simulation programs. J Comput Chem. 2005;26(16):1668-1688. doi:10.1002/jcc.20290.

17 Olsson MHM, S?ndergaard CR, Rostkowski M, Jensen JH. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical p K a Predictions. J Chem Theory Comput. 2011;7(2):525-537. doi:10.1021/ct100578z.

18 and NS, Wipff* G. The [BMI][Tf2N] Ionic Liquid/Water Binary System: A Molecular Dynamics Study of Phase Separation and of the Liquid−Liquid Interface. 2006. doi:10.1021/JP061849Q.

19 Chevrot G, Schurhammer R, Wipff G, et al. Molecular dynamics study of dicarbollide anions in nitrobenzene solution and at its aqueous interface. Synergistic effect in the Eu(iii) assisted extraction. Phys Chem Chem Phys. 2007;9(44):5928. doi:10.1039/b711284j.

20 GAUSSIAN Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.;. Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; and Pople, J. A.; Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.

21 Bayly CI, Cieplak P, Cornell W, Kollman PA. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. J Phys Chem. 1993;97(40):10269-10280. doi:10.1021/j100142a004.

22 Wang J, Wolf RM, Caldwell JW, Kollman PA, Case DA. Development and testing of a general amber force field. J Comput Chem. 2004;25(9):1157-1174. doi:10.1002/jcc.20035.

23 Hornak V, Abel R, Okur A, Strockbine B, Roitberg A, Simmerling C. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. Proteins Struct Funct Bioinforma. 2006;65(3):712-725. doi:10.1002/prot.21123.

24 Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. J Chem Phys. 1983;79(2):926-935. doi:10.1063/1.445869.

25 Ryckaert J-P, Ciccotti+ G, Berendsen HJC. Numerical integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes. J Comput Phys. 1977;23:321-341. http://physics.ujep.cz/~mlisal/md/shake.pdf. Accessed June 25, 2017.

26 CASE, D.A.; R.M. Betz, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, T.A. Darden, R.E. Duke, T.J. Giese, H. Gohlke, A.W. Goetz, N. Homeyer, S. Izadi, P. Janowski, J. Kaus, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, D. Mermelstein, K.M. Merz, G. Monard, H. Nguyen, H.T. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, C.L. Simmerling, W.M. Botello-Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, R.M. Wolf, X. Wu, L. Xiao and P.A. Kollman (2016), AMBER 2016, University of California, San Francisco.

27 HORIUCHI, Tokio; Gō, Nobuhiro. Projection of monte carlo and molecular dynamics trajectories onto the normal mode axes: Human lysozyme. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. V10, p 106-116. 1991.

28 ICHIYE, Toshiko; Karplus, Martin. Collective motions in proteins: A covariance analysis of atomic fluctuations in molecular dynamics and normal mode simulations. Proteins 11, 205–217. 1991.

29 VAN AALTEN, D.M. Conn, D.A. de Groot, B.L. Berendsen, H.J. Findlay, J.B. Amadei, A. Protein dynamics derived from clusters of crystal structures. Biophysical Journal. V73, p 2891-2896. 1997.

30 GALINDO-MURILLO, R., DR Roe, and TE Cheatham, III. On the absence of intrahelical DNA dynamics on the μs to ms timescale." Nature Commun. 5:5152 (2014) doi: 10.1038/ncomms6152.

31 GALINDO-MURILLO R., DR Roe, and TE Cheatham, III. Convergence and reproducibility in molecular dynamics simulations of the DNA duplex d(GCACGAACGAACGAACGC). Biochimica Biophys. Acta 1850, 1041-1058 (2015). doi: 10.1016/j.bbagen.2014.09.007.

32 COSTA, C. H. S.; OLIVEIRA, A. R. S.; PEREIRA, M. J. S.; FIGUEIREDO, A. F.; FERREIRA, J. E. V.; MIRANDA, R. M., Quantum Chemistry, Quantitative Structure-Activity Relationship and Molecular Docking Study on Fenarimol Derivatives with Biological Activity Against Chagas Disease. Journal of Computational and Theoretical Nanoscience, 2015.

33 RAMIN, Ekhteiari Salmas, Mine Yurtsever & Serdar Durdagi. Investigation of Inhibition Mechanism of Chemokine Receptor CCR5 by Micro-second Molecular Dynamics Simulations. Scientific RepoRts | 5:13180 | DOi: 10.1038/srep13180. 2015.

34 GROSSO, Marcos; Adrian Kalstein, Gustavo Parisi, Adrian E. Roitberg, and Sebastian Fernandez-Alberti. On the analysis and comparison of conformer-specific essential dynamics upon ligand binding to a protein. The Journal Of Chemical Physics 142, 245101 (2015).

35 OROZCO, M. http://mmb.pcb.ub.es/software/pcasuite/pcasuite.html;

36 Jolliffe IT. Principal Component Analysis, Second Edition. Encycl Stat Behav Sci. 2002;30(3):487. doi:10.2307/1270093.

37 Gunasekaran K, Nussinov R. How Different are Structurally Flexible and Rigid Binding Sites? Sequence and Structural Features Discriminating Proteins that Do and Do not Undergo Conformational Change upon Ligand Binding. J Mol Biol. 2007;365(1):257-273. doi:10.1016/j.jmb.2006.09.062.