

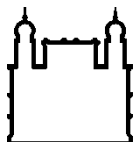
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas

ESTUDOS *IN SILICO* DO COMPORTAMENTO DINÂMICO DO RECEPTOR P2X7
HUMANO

RAFAEL FERREIRA SOARES

Rio de Janeiro
Março de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas

RAFAEL FERREIRA SOARES

Estudos In Silico do Comportamento Dinâmico Do Receptor P2x7 Humano

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Computacional e Sistemas

Orientador (es): Prof. Dr. Ernesto Raúl Caffarena
Prof. Dr. Pedro Celso Nogueira Teixeira

RIO DE JANEIRO

Março de 2015

–Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

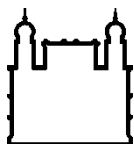
S676 Soares, Rafael Ferreira

Estudos *in silico* do comportamento dinâmico do receptor P2x7 humano / Rafael Ferreira Soares. – Rio de Janeiro, 2015.
xx, 119 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas, 2015.
Bibliografia: f. 95-103

1. Receptores purinérgicos. 2. Receptor P2x7. 3. Modelagem tridimensional de proteínas. 4. Dinâmica molecular. I. Título.

CDD 572.696



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas

AUTOR: RAFAEL FERREIRA SOARES

Estudos *in Silico* do Comportamento Dinâmico Do Receptor P2x7 Humano

ORIENTADORES: Prof. Dr. ERNESTO RAÚL CAFFARENA

Prof. Dr. PEDRO CELSO NOGUEIRA TEIXEIRA

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Carlos Roberto Alves - IOC Fiocruz (Presidente)

Prof. Dr. Robson Coutinho Silva - UFRJ

Prof. Dr. Laurent Emmanuel Dardenne - LNCC

Prof. Dr. Gabriel Limaverde - IOC Fiocruz

Prof. Dr. Floriano Paes Silva Jr - IOC Fiocruz

Rio de Janeiro, de de 2015

Existem pessoas que passam por nossas vidas e nos marcam de diversas maneiras.

Essas marcas nos alentam em um mar de sensações nostálgicas nos momentos de saudade.

Entretanto, existem pessoas, que durante sua passagem por nossas vidas, deixam lentamente uma parte de si.

E basta pensar nelas para sentir que estão do seu lado. Onipresentes e independente do tempo, estas pessoas acreditam em você e apostam no seu sucesso.

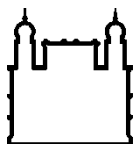
Dedico a meus novos amigos este trabalho, com esta definição mais próxima do que consigo sentir por todos vocês.

AGRADECIMENTOS

- À pessoa que teve sua vida dedicada à minha, e nunca deixou de lutar pelas minhas conquistas. Obrigado Mãe, pelos momentos de compreensão nas horas mais difíceis.
- Um agradecimento especial a Ernesto Raúl Caffarena. O homem que me orientou de maneira fraternal, me mostrou um caminho mais maduro a ser trilhado e olhou para meus maiores defeitos como desafios a serem superados.
- A Pedro Celso Nogueira Teixeira, eterna gratidão por me ensinar a ser paciente e me orientar não somente em um trabalho científico, mas também para uma vida onde a meta e os resultados sejam sempre o benefício do próximo.
- Para Amanda Sutter, Deborah Antunes, Janaina Cruz e Vanessa Silva. Agradeço a vocês por serem verdadeiras companheiras que com um pulso firme, me disciplinaram e tornaram possível a realização deste trabalho. Vocês foram o grande estímulo de minha dedicação.
- Aos amigos Paulo Ricardo, Mauricio Costa por estarem sempre dispostos a me socorrer nos momentos onde as dúvidas não eram sanadas apenas com artigos, necessitavam da expertise de um tutor.
- Um agradecimento a Lucianna Helena, a excentricidade em pessoa. Uma amiga que me aconselhou e direcionou em momentos onde somente ela poderia entender.
- Lucas Machado e Felipe Duval, com suas ideias sempre complexas e de rico fundo teórico que só poderiam ser expressas por pessoas tão geniais como vocês, obrigado.
- Ao amigo, Dinarte Ferreira, que compartilhou seu conhecimento em diversos momentos e contribuiu de maneira significativa para construção deste trabalho.
- Um sincero obrigado, a minha companheira Priscila Furtado, que esteve disposta a comprometer seu tempo em função das minhas necessidades. Você já é parte de todas as conquistas que eu possa vir a ter.
- Ao CNPQ pelo fomento mensal durante estes dois anos de trabalho.

“É impossível controlar as emoções, apenas nossas ações estão passíveis de algum controle, e assim omitimos diversos de nossos sentimentos frente a uma sociedade nada sociável. Mesmo assim, não desisto da humanidade e em dizer que não existe o mal, apenas a inexperiência de usar toda bondade em nossos corações. E mesmo que intitulado de tolo, não posso desistir de retribuir as ofensas e agressões do mundo com um sorriso e um gesto de carinho.”

(Rafael Ferreira)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

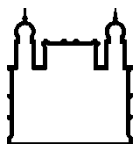
ESTUDOS *IN SILICO* DO COMPORTAMENTO DINÂMICO DO RECEPTOR P2X7 HUMANO

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA COMPUTACIONAL E SISTEMAS

Rafael Ferreira Soares

O receptor P2X7, contido na família de receptores P2, é um receptor inotrópico purinérgico, cátion seletivo, ativado por nucleotídeos (ATP). Esses receptores são expressos em células do sistema nervoso central, periférico e células da linhagem hematopoiética além de estarem envolvidos em diversos processos biológicos como a transdução de sinais da dor, participação na inflamação granulomatosa, dentre outros. Dos seus sete subtipos (P2X1 – P2X7) o P2X7 possui a característica de formar um poro cuja condutância é aumentada em aproximadamente 26 vezes em relação à condutância padrão de todos os receptores da família P2X (~15 pS). Este aumento na condutância se reflete em possibilitar a passagem de moléculas de até 900 Da. Este estudo propõe através da aplicação das técnicas de modelagem comparativa e dinâmica molecular analisar o comportamento dinâmico de um modelo do receptor P2X7 humano, desde seus movimentos de fechamento e abertura do canal de baixa condutância, até a passagem de íons catiônicos (Potássio) e aniônicos (cloreto) para avaliar a seletividade do canal. Isto é necessário pois ainda não se dispõe de um modelo experimental (Ressonância Magnética Nuclear ou Cristalografia de raio-X) e ainda existem dúvidas sobre o mecanismo de ativação que elucide o processo de transição entre o estado de menor condutância (um canal aberto) para o estado de maior condutância (formação de um poro). Foram construídos dois modelos do receptor P2X7 por meio de modelagem comparativa utilizando como molde o receptor P2X4 do organismo *Danio rerio* (único molde viável até o momento) em seus estados aberto e fechado. As simulações de dinâmica molecular revelaram o tempo de fechamento de canal (região transmembranar) e o rearranjo do sítio de ligação ao ATP em ~400ps e ~650ps, respectivamente. As dinâmicas de passagem dos íons confirmaram as características cátion seletivas do canal, visto que foi possível observar a passagem de todos os íons de potássio dispostos na região de estreitamento do canal e também foi observada a expulsão de uma das três dispostas na mesma região que os íons catiônicos avaliados. Estes resultados ressaltam que os sistemas simulados para avaliar o comportamento do receptor P2X7 descrevem comportamentos semelhantes aos descritos experimentalmente ressaltando a possibilidade de uso dos modelos construídos neste trabalho para aplicação em estudos piloto futuros (*virtual screening*, *docking* molecular) para avaliação de compostos promissores que atuem como agonistas ou antagonistas mais seletivos que os compostos existentes atualmente.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

DYNAMIC BEHAVIOR STUDY OF THE HUMAN P2X7 RECEPTOR THROUGH COMPARATIVE MODELING AND MOLECULAR DYNAMICS

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION/PHD THESIS IN COMPUTACIONAL SYSTEMS BIOLOGY

Rafael Ferreira Soares

The P2X7 is an inotropic, purinergic, cation-selective and activated by nucleotides (ATP) receptor that belongs to the P2 receptor family. These receptors are found in central and peripheral nervous system cells and in hematopoietic lineage cells. In addition, P2X7 receptors are involved in a vast number of biological processes such as pain signal transduction, participation in granulomatous inflammation, among others. From all seven subtypes (P2X1 – P2X7), P2X7 receptor presents the characteristic of forming a pore whose conductance increases approximately 26 times more than the standard conductance from all others P2X receptors (~15 pS). This rise in the conductance allows the entrance of molecules up to 900 Da. The aim of this study is to employ comparative modeling and molecular dynamics methods to analyze the dynamic behavior of the human P2X7 receptor to assess the channel selectivity, regarding the opening and closing movements and the passage of cations (potassium) and anions (chloride) across the low conductance channel). The combination of these methods is necessary since there is no model determined by experimental methods such as Nuclear Magnetic Resonance or X-ray Crystallography, and doubts remain about the activation mechanism that drives the receptor from a state of low conductance (open channel) to a state of high conductance (pore formation). Two P2X7 receptor models were built by means of comparative modeling using as template the 3D structure of P2X4 receptor from *Danio rerio* organism in its open and close states. Molecular dynamics simulations revealed the channel closing time (transmembrane region) and the rearrangement of the ATP binding site took place, in ~400 ps and ~650 ps, respectively. The ion entry simulations confirmed the cation selectivity characteristics of the channel, since it was possible to observe the entrance of all potassium molecules present in the narrowed region of the channel. Furthermore, it was noted the expelling of the chloride molecules at the same regions. These results highlight that the P2X7 model reproduce its experimental behavior. It is possible to describe similar mechanisms described experimentally; emphasizing the prospect of using these models in future studies (virtual screening, molecular docking) to evaluate lead compounds, capable of acting as more selective agonists or antagonist than the current available ones.

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações gerais dos canais iônicos	1
1.2 Biologia dos receptores purinérgicos em geral	3
1.3 Família P2X	4
1.4 Descrição da estrutura do Receptor P2X4	5
1.5 Características do Receptor P2X7	8
1.6 Modelagem Molecular	14
1.6.1 Modelagem comparativa (MC).....	14
1.6.2 Dinâmica Molecular	21
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Modelagem Comparativa	25
3.1.2 Análise dos modelos.....	26
3.2 Dinâmica molecular.....	27
3.2.1 Criação do sistema de bicamada lipídica.....	29
3.2.2 Inserção de proteínas em sistemas de bicamada lipídica.....	32
3.2.3 Simulações de Dinâmica Molecular	34
3.2.4 Análises das simulações de dinâmica molecular	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Modelagem Comparativa	41
4.1.1 Busca por estruturas homólogas	41
4.1.2 Comparação sequencial entre receptores P2X7 (humano) e P2X4 (<i>Danio rerio</i>).....	42
4.1.3 Construção do Modelo.....	42
4.1.4 Análise da Qualidade Estereoquímica	45
4.1.5 Otimização de Regiões de <i>Loop</i>	47

4.2	Dinâmica molecular	55
4.2.1	Validação do sistema de bicamada lipídica	55
4.2.2	Inserção da região TM do modelo do receptor P2X7 ao sistema de bicamada lipídica	58
4.3	Inserção da proteína em bicamada lipídica	58
4.3.1	Simulação das regiões transmembranares.....	62
4.4	Comportamento dinâmico do receptor P2X7 em seu estado aberto .	67
4.4.1	Avaliação da passagem de moléculas de água	67
4.5	Fechamento do Canal	68
4.6	Passagem dos íons através da membrana	79
5	CONCLUSÕES	93
6	PERSPECTIVAS	95
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Representação das diferentes estruturas das proteínas formadoras de canais por número de subunidades. (A) Receptor de canal iônico fechado por ligante (LGIC) (código do PDB 3KDG). (B) Estrutura cristalográfica do receptor P2X4 (código do PDB 4DW1) ligado ao ATP (C) Cristalografia de um subtipo de receptor inotrópico de glutamato (código do PDB 3KG2). Adaptado de (Alves et al., 2014).2**
- Figura 2: Estrutura do receptor P2X4 do organismo *Danio rerio*. (a) e (b) visão lateral da proteína. (c) e (d) visão superior. As esferas representam as moléculas de ATP ligadas. Cada subunidade é distinta nas cores amarelo, azul e vermelho. (a) e (c) o P2X4 em seu estado fechado, (b) e (d) em seu estado aberto. Adaptado de (Hattori e Gouaux, 2012).6**
- Figura 3: Comparação entre uma subunidade do P2X4 e a anatomia de um golfinho. Em verde a nadadeira comparada aos seguimentos transmembranares 1 e 2 (TM1 e TM2). Em ciano o corpo do golfinho comparado a extensa região de folhas beta. Em laranja, amarelo e vermelho a comparação entre as nadadeiras dorsal, esquerda e direita respectivamente. Em azul escuro e roxo o corpo superior e a cabeça do golfinho, adaptado de Hattori e Gouaux (Hattori e Gouaux, 2012).7**
- Figura 4: Comparação entre o tamanho da região C-terminal do receptor P2X7 em relação aos outros receptores da família. Neste esboço é representado uma as subunidades dos receptores P2X com suas alças N e C - terminais voltadas para o meio intracelular. As esferas verdes representam as cabeças polares a membrana celular. As linhas laranjas a região hidrofóbica da membrana celular. Os cilindros magenta (TMD1 e TMD2) são os domínios transmembranares da subunidade proteica, sendo a linha abaixo do cilindro TMD2 a região c-terminal a ser comparada entre as proteínas da família P2X. Adaptado de Hattori et al 2012.9**
- Figura 5: Ativação dos receptores receptor P2X. (A) Todo receptor P2X é um trimero cujas subunidades foram a luz do canal permeável a cátions. (B) A ativação rápida (10 s) por ATP desencadeia uma serie de respostas celulares como despolarização, degranulação e formação de corpos apoteóticos oriundos da membrana. (C) Ativação prolongada com ATP acima de 100 μ M abre um poro**

cuja sua formação tem mecanismo desconhecido, permitindo a passagem de moléculas de até 900 Da {Bisaggio, 2001 #2}.	10
Figura 6: Etapas da modelagem comparativa. Inicialmente é preciso obter a sequência a qual se deseja modelar, compara-la com um banco de dados de estruturas definidas experimentalmente para então se obter um molde e em seguida alinha as duas sequencias comparadas. A partir deste alinhamento é construído um modelo baseado na estrutura do molde que posteriormente será avaliado, pela sua estereoquímica energia. Adaptado de (Martí-Renom et al., 2000).	15
Figura 7: Gráfico de correlação identidade sequencial e tamanho da sequência em relação aos valores mínimos de identidades (Da Silva, 2007).	18
Figura 8 Região TM do P2X4 fechado a ser inserida no sistema de bicamada lipídica de DPPC. As linhas tracejadas mostram a região seccionada do receptor.	28
Figura 9: Modelo de bicamada lipídica constituído de DPPC (Kukol, 2009). As esferas vermelhas representam os oxigênios, as azuis os nitrogênios e as douradas os fósforos. As extensas cadeias de carbono do lipídio são representadas pelas esferas ciano. Os eixos X, Y e Z descrevem a largura, espessura e a altura de caixa do sistema.	30
Figura 10: Processo de ampliação do sistema de bicamada proposto por Kukol (Kukol, 2009). (A) Representação da incompatibilidade entre o tamanho do modelo a ser simulado em bicamada. (B) União de quatro sistemas idênticos para sua ampliação. (C) Comparação entre as dimensões do modelo construído em relação ao sistema já ampliado, revelando a necessidade do procedimento.	31
Figura 11. Imersão de proteínas em sistemas lipídicos de bicamada com g_membed. As esferas de Van der Waals amarelas e azuis representação a proteína e os lipídeos, respectivamente. Adaptação de (Wolf et al., 2010).	33
Figura 12: Posicionamento dos íons na luz do canal iônico. Modelo do receptor P2X7 construído. (A) Visão lateral do receptor. (B) Visão inferior do receptor (região intracelular). Em azul, a posição dos íons de Potássio e de cloro na luz do canal, em vermelho amarelo e verde as conformações alfa, beta e coils, respectivamente.	37

Figura 13: Alinhamento de sequencias utilizando o servidor clustalW2. Os gaps extensos revelam a ausência dos terminais N e C do receptor P2X4. Para construção do modelo foi utilizado o alinhamento sem considerar as porções terminais.	43
Figura 14: Estruturas molde e modelo representadas em cartoon. (A) Estruturas cristalográficas do receptor P2X4 nos estados fechado e (B) no estado aberto. (C) modelo do receptor P2X7 no estados fechado (C) e (D) no estado aberto. As estruturas apresentaram valores de RMSD de 0,35 Å e 0,42 Å para o estado fechado e aberto, respectivamente.	44
Figura 15: Gráfico de Ramachandran molde e modelo dos receptores P2X. (A) e (B) P2X4 em seu estado fechado e aberto respectivamente. (C) e (D) P2X7 em seu estado fechado e aberto respectivamente. Os gráficos (C) e (D) são referentes as estruturas pós refinamento de loops.	46
Figura 16: Avaliação da qualidade do molde e do modelo (servidor ERRAT). As regiões das estruturas que podem ser rejeitadas com uma confiança de 99% encontram-se na cor preto, as regiões rejeitadas com uma confiança de 95%, em cinza. Valores mais baixos representam maior confiança na estruturação das regiões.	48
Figura 17: Gráfico DOPE dos perfis energéticos do molde P2X4 (verde) e do modelo P2X7 (vermelho) antes do refinamento. Em destaque (A, B, C), as regiões apontadas com necessidade de refinamento. Região (A) resíduos 46 a 58 (-KEEIVENGVKKLV-). (B) resíduos 376 a 389 (-KEEIVENGVKKLVH-). (C) resíduos 706 a 719 (-KEEIVENGVKKLVH-).	49
Figura 18: Análise da estrutura do modelo P2X7 na configuração aberta segundo o servidor ERRAT. (A) estrutura não refinada, (B) estrutura refinada.	51
Figura 19: Gráfico DOPE comparando a diferença entre os perfis energéticos do molde e do modelo refinado, construídos a partir do Modeller. Em verde, o perfil energético do molde (P2X4) e em vermelho, o perfil energético do modelo (P2X7).	52
Figura 20: Alinhamento estrutural dos modelos do P2X7. (A) estruturas no estado aberto. (B) estruturas no estado fechado. Nos círculos encontram-se as regiões onde as estruturas configuradas em beta aumentaram após o refinamento de loops. Em vermelho as estruturas refinadas, em verde as não refinadas.	54

Figura 21: Análise da densidade parcial do sistema simulado. Os lipídeos DPPC (linha preta) e água (linha vermelha) foram analisados após 80 ns de simulação.	56
Figura 22: Resultado da ampliação do sistema de bicamada lipídica. (A) Modelo de bicamada lipídica de DPPC proposto por (Kukol, 2009). (B) Sistema utilizado neste trabalho, amplificado 4 vezes em relação ao sistema em (A). Os átomos de carbono das moléculas de DPPC estão representados em ciano e os átomos de oxigênio e fósforo das cabeças polares, em vermelho.	57
Figura 23: Inserção de proteínas em bicamada lipídica. A figura mostra a o processo de inserção da região TM do modelo construído. (A) compressão da proteína. (B) Restauração de sua conformação original e a acomodação dos lipídeos ao redor da proteína, baseada nos movimentos de restauração de coordenadas da proteína. Todos os sistemas deste trabalho utilizaram o mesmo método e arquivos de parametrização.	60
Figura 24: Sistema final contendo o P2X7 em seu estado aberto As dimensões em eixos X, Y e Z respectivamente foram 13nm x 13nm x 14,28nm. O sistema contém 190.325 átomos, sendo 80% dos átomos correspondentes ao solvente. Em azul os átomos de oxigênio, Fosforo e Nitrogênio das moléculas de DPPC, em cinza as cadeias carbônicas do lipídeo. Em vermelho, amarelo e verde, as configurações secundárias alfa, beta e coils do receptor P2X7, respectivamente.	61
Figura 25: Representação em new-cartoon das estruturas iniciais (A) e finais (B) da região transmembranar do P2X4. Gráfico DSSP revelando que as configurações estruturais da proteína se mantiveram ao longo da simulação. Os valores de RMSD entre as estruturas iniciais e finais é de 2,648 Å.	63
Figura 26: Região transmembranar do P2X7. (A) Quadro inicial (B) Quadro final. Gráficos DSSP, mostrando a conservação das estruturas secundárias. Os valores de RMSD entre as estruturas iniciais e finais é de 2,124Å.	64
Figura 27: RMSD das estruturas transmembranares do receptor P2X4 (preto) e P2X7 (vermelho).	65
Figura 28: RMSF dos resíduos das estruturas dos receptores P2X4 (barras pretas) e P2X7 (barras vermelhas).....	66
Figura 29: Passagem de água pelas janelas laterais. (A) Sistema simulado omitindo os lipídios para melhor visualização das janelas laterais. (B)	

Destaque de uma das janelas laterais. A proteína se encontra com visualização em modo superfície de acessibilidade ao solvente. Em roxo e azul os resíduos configurados em alfa, em amarelo os resíduos configurados em beta. Em ciano e branco os resíduos configurados em coil e turn, respectivamente.....69

Figura 30: Sistema simulado excluindo a representação gráfica dos lipídios e da proteína. (A) frame inicial da simulação. (B) Quadro final da simulação, revelando a forma afunilada do canal formado pelo receptor P2X7 e a passagem das moléculas de água pelas três janelas laterais.70

Figura 31: (A) Sistema P2X7 inserido na membrana. As moléculas de água não foram inseridas para facilitar a visualização. (B) Destaque de uma das janelas laterais faceada às cabeças polares dos lipídios. Os átomos carregados negativamente são representados por esferas vermelhas.71

Figura 32: (A) Modelo construído do receptor P2X7 em seu estado aberto após 10 ns de simulação passando para o estado fechado. (B) Estrutura cristalográfica do receptor P2X4 fechado. (C) Alinhamento entre as duas estruturas considerando (Backbone) com RMSD de 3,120Å.72

Figura 33: Raio de giro em função do tempo de simulação. Em azul a região transmembranar, em laranja região de alça extracelular.....75

Figura 34: (A) Nível de compactação da região transmembranar do receptor P2X7. (B) Energia potencial do receptor P2X7.76

Figura 35: (A) Configuração inicial da dinâmica de fechamento do canal. (B) Configuração final da dinâmica após 10ns. Ao centro do canal de ambas as figuras um triângulo (tracejado vermelho) formado pelo centro geométrico dos resíduos formadores do canal (Gly316, Gly 641, Gly 966).....77

Figura 36: (A) Quadro inicial da dinâmica do receptor P2X7 (B) Quadro final da simulação do mesmo receptor. Em destaque na figura A o sítio de ligação ao ATP e antes do fechamento do canal e na figura B em destaque a mesma região 300 ps após o fechamento da região transmembranar (~700 ps de simulação). Em vermelho as regiões com densidade de carga negativa, em azul com densidade de carga positivas e em branco as regiões neutras.....78

Figura 37: Difusão dos íons de potássio no receptor P2X7, utilizado parâmetro de restrição de movimento da proteína mantendo o receptor constantemente aberto. Em amarelo, as coordenadas em eixo Z do resíduo G316 (último resíduo

do estreitamento do canal). Apenas o íon K1 (em azul) ultrapassou a linha amarela, indicando a passagem do íon pelo canal.	80
Figura 38: Número de coordenação dos íons Potássio em relação aos átomos de oxigênio da água. Em azul, o cátion mais próximo do estreitamento de canal revelando o aumento da interação com moléculas de água após a passagem pelo canal (~ 600 ps)	81
Figura 39: (Esferas vermelhas) Resíduos carregados negativamente Aspartato nas posições Asp19, Asp300, Asp323 da cadeia A, Asp344, Asp625, Asp648 da cadeia B e Asp665, Asp950, Asp973 da cadeia C. (Esferas azuis) Íons de Potássio.	82
Figura 40: Difusão dos íons de potássio, utilizando os parâmetros de restrição de movimento e também o efeito de campo elétrico de -0,046 V/nm.	84
Figura 41: Número de coordenação dos íons de potássio para o sistema utilizando as restrições de movimento da proteína e implementação do efeito de campo elétrico de -0,046V/nm.	85
Figura 42: Difusão dos íons de potássio sem os parâmetros de restrição de movimento e utilizando um campo elétrico -0,046V/nm.	86
Figura 43: Número de coordenação entre os íons de potássio e as moléculas de água. Dentro dos círculos destaque para os íons K1, K2 e K3 e os momentos de sua passagem.....	88
Figura 44: Difusão dos íons cloreto com a utilização de um campo elétrico de 0,092V/nm para forçar a passagem dos íons aniônicos através da luz do canal.	91
Figura 45: Número de coordenação entre os íons de cloro e as moléculas de água.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela de condutividade da família de receptores P2X e suas funções.	4
Tabela 2: Estruturas encontradas como potenciais moldes para modelagem comparativa do P2X7 humano	41
Tabela 3: Valores de área por lipídeos em nm ²	55
Tabela 4: Valores de Densidade de lipídeos (10 ⁻⁸ cm ² S ⁻¹).....	55
Tabela 5: Configuração do Cluster SMP diskless, com foco nos principais periféricos.....	105
Tabela 6: Configuração dos servidores utilizados, com foco nos principais periféricos.....	105

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
DM	Dinâmica Molecular
DOPE	<i>Discrete Optimized Protein Energy</i>
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DSSP	Dicionário de Estruturas Secundárias de Proteínas
GBCMM	Grupo de Biofísica Computacional e Modelagem Molecular
GROMACS	<i>Groningen Machine For Chemical Simulations</i>
LCC	Laboratório de Comunicação Celular
LGCI	Receptor de canal iônico fechado por ligante
MC	Modelagem comparativa
MM	Modelagem Molecular
nAChRs	Receptores Nicotínicos de acetilcolina
nm	Nanômetro
ns	Nanossegundo
pS	picosiemens
ps	picossegundo
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
RMSF	<i>Root Mean Square Fluctuation</i>
TM	Transmembranar
VMD	<i>Visual Molecular Dynamics</i>

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais dos canais iônicos

O conceito de canais iônicos começou a ser desenvolvido para entender a condutância elétrica de íons existentes na membrana celular e sua rápida regulação direcionada por estímulos químicos, elétricos ou até mecânicos (Behrends, 2012). Com o passar do tempo, estudos de Hodgkin e Huxley (1969) sobre permeação de íons catiônicos (Na^+ e K^+) e suas influências na membrana celular permitiram a previsão de uma possível molécula reguladora desta permeação, que foi comprovada futuramente através dos avanços nas técnicas bioquímicas associadas aos estudos com receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) da espécie *Torpedo marmorata* (Changeux *et al.*, 1969).

Estes estudos permitiram ampliar o conhecimento físico-químico celular, possibilitando abordagem por meio da difração de raio-X de uma proteína formadora de canal iônico (Dupont *et al.*, 1974).

Os receptores formadores de canal são arranjados estruturalmente de acordo com o seu número de subunidades proteicas:

- Triméricos - 3 subunidades proteicas (Figura 1B);
- Tetraméricos - 4 subunidades proteicas (Figura 1C);
- Pentaméricos - 5 subunidades proteicas (Figura 1A);

As proteínas de membrana capazes de formar canais iônicos estão presentes em diversos mecanismos fisiológicos, sendo indispensável para os organismos que as possuem. Através delas é possível transportar ou permear moléculas importantes de natureza hidrofílica que dificilmente atuariam no interior de uma célula devido à hidrofobicidade da membrana celular. Seu mecanismo eficiente capaz de transportar íons no limite de velocidade da difusão está presente desde a contração muscular, até a sinalização de eventos importantes, como apoptose e na comunicação celular (Kawate *et al.*, 2011; Samways *et al.*, 2014).

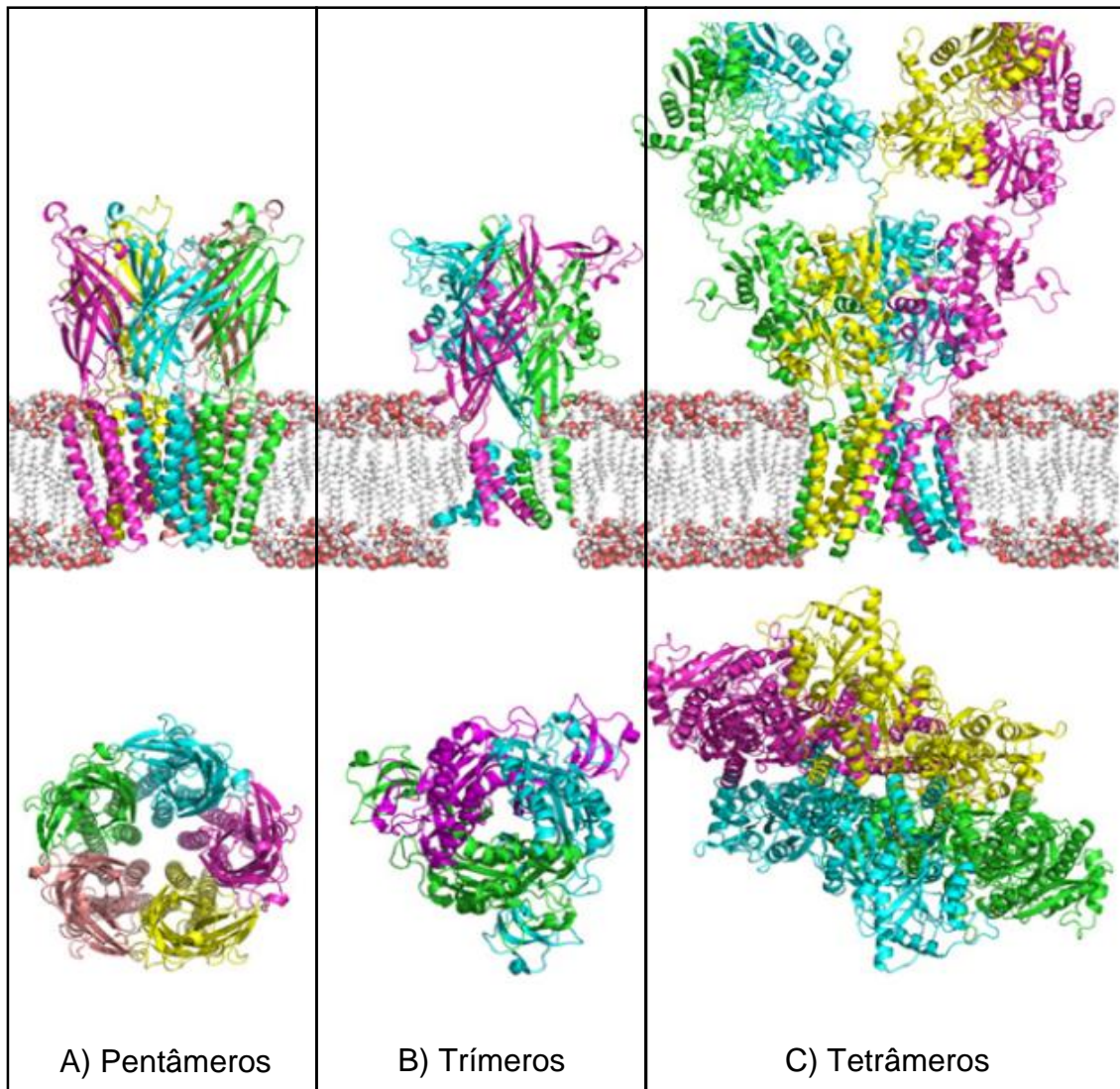


Figura 1: Representação das diferentes estruturas das proteínas formadoras de canais por número de subunidades. (A) Receptor de canal iônico fechado por ligante (LGIC) (código do PDB 3KDG). (B) Estrutura cristalográfica do receptor P2X4 (código do PDB 4DW1) ligado ao ATP (C) Cristalografia de um subtipo de receptor inotrópico de glutamato (código do PDB 3KG2). Adaptado de (Alves *et al.*, 2014).

1.2 Biologia dos receptores purinérgicos em geral

O termo “receptor purinérgico” proposto em 1976 por Burnstock (Cook e Burnstock, 1976) baseia-se primeiramente em evidências experimentais de Drury e Szent-Gyorgyi em 1929 (Drury A. N. , 1929), através da presença do ATP e da adenosina como depressor cardiovascular. Posteriormente Burnstock descreveu a presença do ATP sobre neurotransmissores onde teoricamente existiria um receptor de ATP em membranas pós-sinápticas.

Somente em 1976, Burnstock (Cook e Burnstock, 1976) definiu que havia liberação do ATP tanto nos terminais pós-sinápticos dos neurônios mais também nos pré-sinápticos, diferenciando-os dos demais neurotransmissores (Burnstock 2007). Em contrapartida, os P2X foram encontrados em células não neuronais, regulando fatores como resposta imune, transdução de sinais da dor, diferenciação celular, dentre outras funções. Desta forma, foi possível verificar a extensão e conseqüentemente a importância da sinalização purinérgica e seus mecanismos envolvidos (Burnstock 2007).

Em 1978 os receptores purinérgicos foram classificados em dois subtipos, P1 seletivos por adenosina e P2 seletivos à adenosina trifosfato (ATP). Por sua vez em 1985 os receptores P2 foram caracterizados em dois tipos, P2X e P2Y sendo os P2Y receptores acoplados à proteína G e os P2X dependente de ligantes (Figura 2) (Burnstock, 1978).

A partir destes dados, foi possível a utilização de estudos de propagação de ondas do Ca^{+2} , afim de avaliar novas características, principalmente estruturais. Estes dados não haviam sido explorados até o momento devido às limitações tecnológicas da época e dos conhecimentos sobre as estruturas destes receptores.

1.3 Família P2X

As proteínas transmembranares pertencentes à família P2X possuem sete subtipos (P2X1 ao P2X7), cuja identidade sequencial entre eles varia de 31% a 50%. São caracterizadas por formar um canal cátion seletivo (Na^+ Ca^{+2} e K^+) (Faria *et al.*, 2005; Kawate *et al.*, 2009).

Estas proteínas possuem três subunidades idênticas (homotriméricas). Seus sítios de ligação ao ATP estão localizados na região extracelular, possuindo um sítio por subunidade (Ford *et al.*, 2006; Burnstock, 2007).

Até o momento, apenas um agonista seletivo ao subtipo P2X foi descrito na literatura, e com este foi possível classificar os receptores segundo afinidade pelo ligante. Os receptores P2X1 e P2X3 dessensibilizam e sensibilizam rapidamente na presença do agonista α - β -meATP. Já os subtipos P2X2, P2X4 e P2X5 são pouco sensíveis ao mesmo agonista e possuem dessensibilização lenta quando comparados aos subtipos anteriores. Em contra partida, o P2X7 não perde sua condutividade na presença do antagonista (Tabela 1) (Buell *et al.*, 1996; Rassendren *et al.*, 1997; Hattori e Gouaux, 2012).

Tabela 1: Tabela de condutividade da família de receptores P2X e suas funções.

Receptor	Função
P2X1	Contração da musculatura lisa, ativação de plaquetas, regulação da resposta endotelial
P2X2, P2X3	Transdução de sinais da dor
P2X4	Atividade ionotrópica positiva no coração
P2X5	Diferenciação do músculo esquelético
P2X6	Aderência celular
P2X7	Contração da musculatura lisa, ativação de plaquetas, regulação da resposta endotelial

1.4 Descrição da estrutura do Receptor P2X4

O receptor P2X4 foi o primeiro e único dos receptores P2X cuja estrutura tridimensional foi resolvida através de Cristalografia de Raio-X. Desde então, suas informações estruturais têm sido cada vez mais utilizadas em estudos piloto tanto do próprio P2X4 quanto dos outros componentes da família P2X (Hattori e Gouaux, 2012).

A estrutura do P2X4 é um homotrímero, sendo cada subunidade disposta de dois domínios transmembranares (TM I e TM II), ambos em configuração α -hélice, sendo as extremidades das TMs voltadas para o meio intracelular. Esses domínios estão ligados por uma extensa região de alça extracelular composta por diversas configurações estruturais, como α -hélice, folhas- β , e *Coils*. Ao todo, o P2X4 da espécie *Danio rerio* possui 389 resíduos, enquanto o P2X4 humano possui 388 resíduos (Figura 2) (Hattori e Gouaux, 2012).

Em uma representação gráfica construída por Hattori (2012), é possível observar a disposição espacial de cada subunidade do P2X4. Nesta imagem é destacada a semelhança de uma das subunidades do receptor com a forma de um golfinho (Figura 3) (Hattori e Gouaux, 2012).

A barbatana dorsal de uma subunidade em junção com as barbatanas laterais de outra subunidade formam a região do sítio de ligação ao ATP. Na parte superior da subunidade está localizada a cabeça, configurada em sua maioria em folha- β (Figura 3) (Hattori e Gouaux, 2012).

Desta forma, os três sítios de ligação ao ATP são formados através do compartilhamento entre resíduos de diferentes subunidades, proporcionando maiores mudanças conformacionais frente ao ligante (Hattori and Gouaux, 2012).

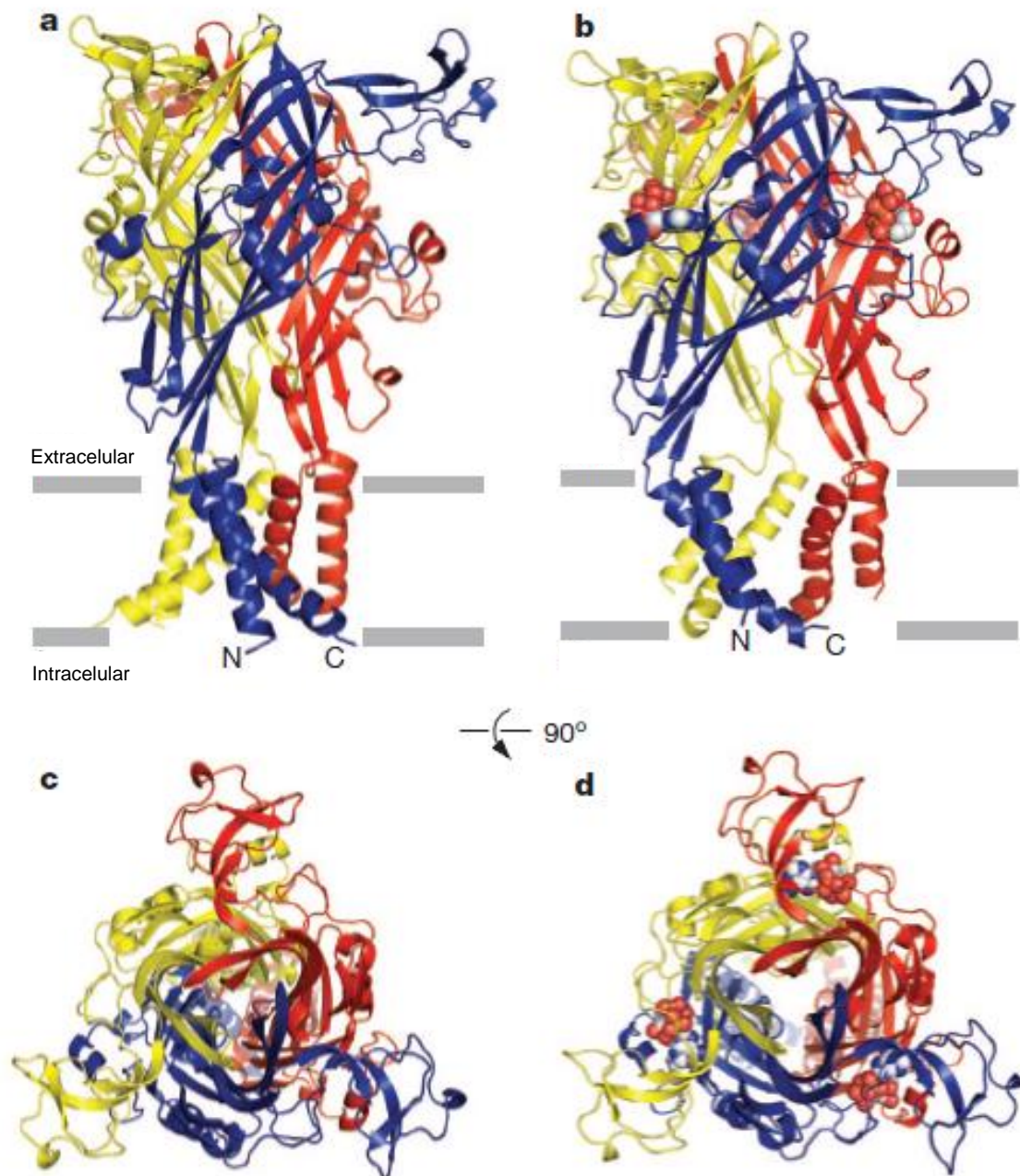


Figura 2: Estrutura do receptor P2X4 do organismo *Danio rerio*. **(a)** e **(b)** visão lateral da proteína. **(c)** e **(d)** visão superior. As esferas representam as moléculas de ATP ligadas. Cada subunidade é distinta nas cores amarelo, azul e vermelho. **(a)** e **(c)** o P2X4 em seu estado fechado, **(b)** e **(d)** em seu estado aberto. Adaptado de (Hattori e Gouaux, 2012).

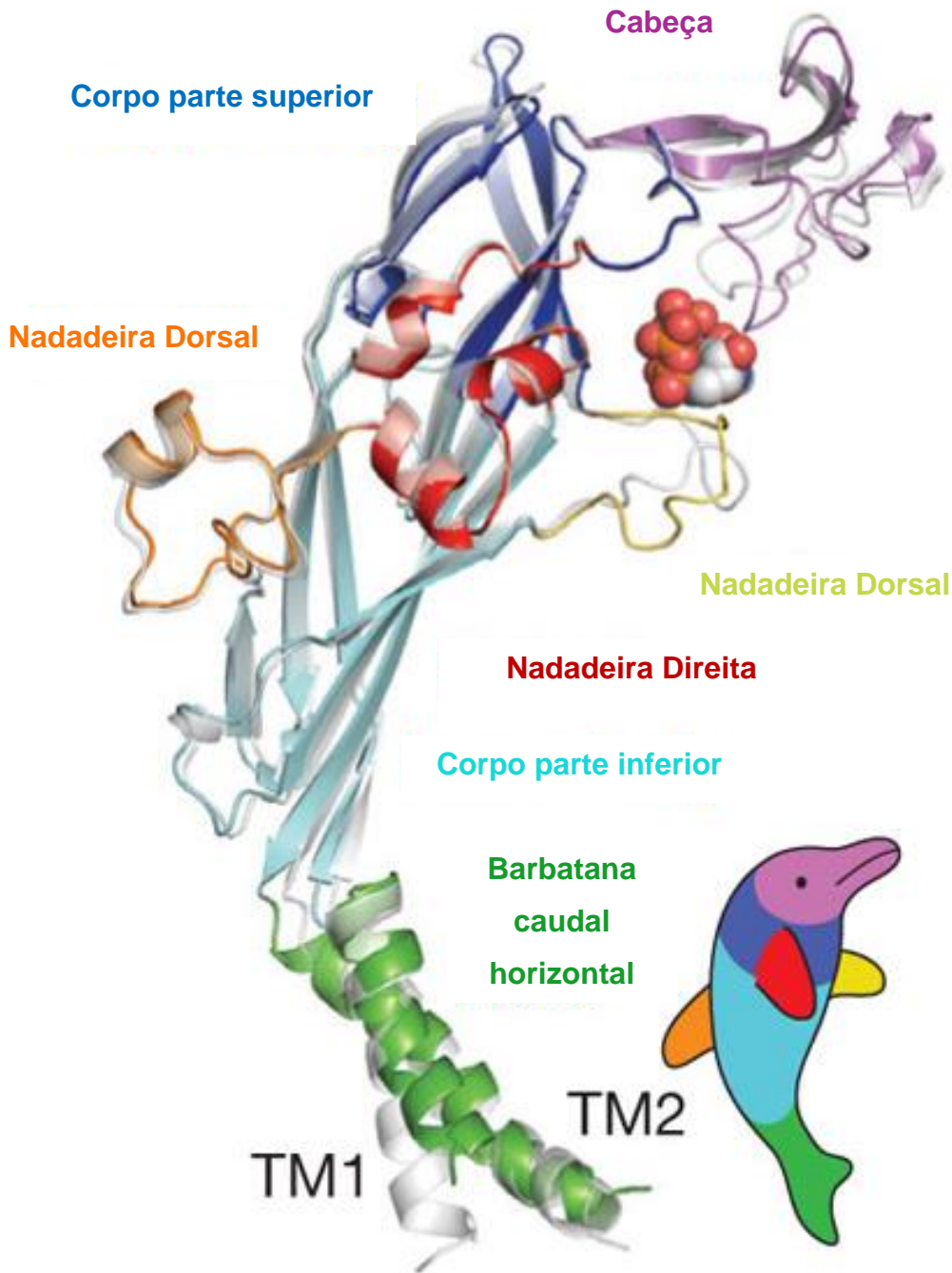


Figura 3: Comparação entre uma subunidade do P2X4 e a anatomia de um golfinho. Em verde a nadadeira comparada aos seguimentos transmembranares 1 e 2 (TM1 e TM2). Em ciano o corpo do golfinho comparado a extensa região de folhas beta. Em laranja, amarelo e vermelho a comparação entre as nadadeiras dorsal, esquerda e direita respectivamente. Em azul escuro e roxo o corpo superior e a cabeça do golfinho, adaptado de Hattori e Gouaux (Hattori e Gouaux, 2012).

1.5 Características do Receptor P2X7

O receptor P2X7 pertence à família de receptores ionotrópicos P2X ativados por ATP (Burnstock, 2006; North, 2002). São expressos em células de linhagem hematopoiéticas, incluindo mastócitos, linfócitos, eritrócitos, fibroblastos, macrófagos peritoneais e também em células do sistema nervoso central e periférico (Surprenant *et al*, 1996; Barjit *et al*, 2012).

Dentre toda a família dos P2X, o P2X7 se destaca pela formação de um canal não seletivo de alta condutância (~400 pS), que permite a passagem de moléculas com massa de até ~900 Da (Steinberg, Silverstein, 1987; Di Virgilio, 1995; Virginio *et al*, 1999). Possui um grande domínio C-terminal (239 resíduos) (Figura 4) em relação aos outros subtipos da família (27-129 resíduos), sendo esta porção terminal importante para a formação do canal de alta condutância (Le Feuvre *et al.*, 2002; Costa-Junior *et al.*, 2011).

Além disso, esse receptor não apresenta dessensibilização, mantendo sua condutividade (~15pS) na presença do agonista (<100µM); caso as concentrações de ATP ultrapassem os 100µM, ou sejam, aumentadas por alguns segundos, a condutividade aumenta para ~400pS formando um poro capaz de permear moléculas de até aproximadamente 900 Da, como N-metil-D-glucamina e YO-PRO-1 (Coutinho-Silva *et al.*, 1996; Ralevic e Burnstock, 1998; Ford *et al.*, 2006; Burnstock, 2008).

Em termos fisiológicos, o P2X7 está envolvido no fenômeno de formação de corpos apoptóticos oriundos da membrana celular (Figura 5) (Di Virgilio *et al*, 2001; MacKenzie *et al*, 2001), na sinalização para eventos celulares como morte celular via permeabilização de membrana (Di Virgilio *et al*, 1998; MacKenzie *et al*, 2005) e na função de células do sistema imune, tais como formação de células gigantes multinucleares no processo de inflamação granulomatosa (Chiozzi *et al*, 1997; Falzoni *et al*, 1995) e na morte do *Mycobacterium tuberculosis* (Correa *et al.*, 2010). Além disso, a superexpressão do P2X7 está associada à vários tipos de câncer ou distúrbios no crescimento celular (Adinolfi *et al*, 2002, Slater *et al*, 2004a).

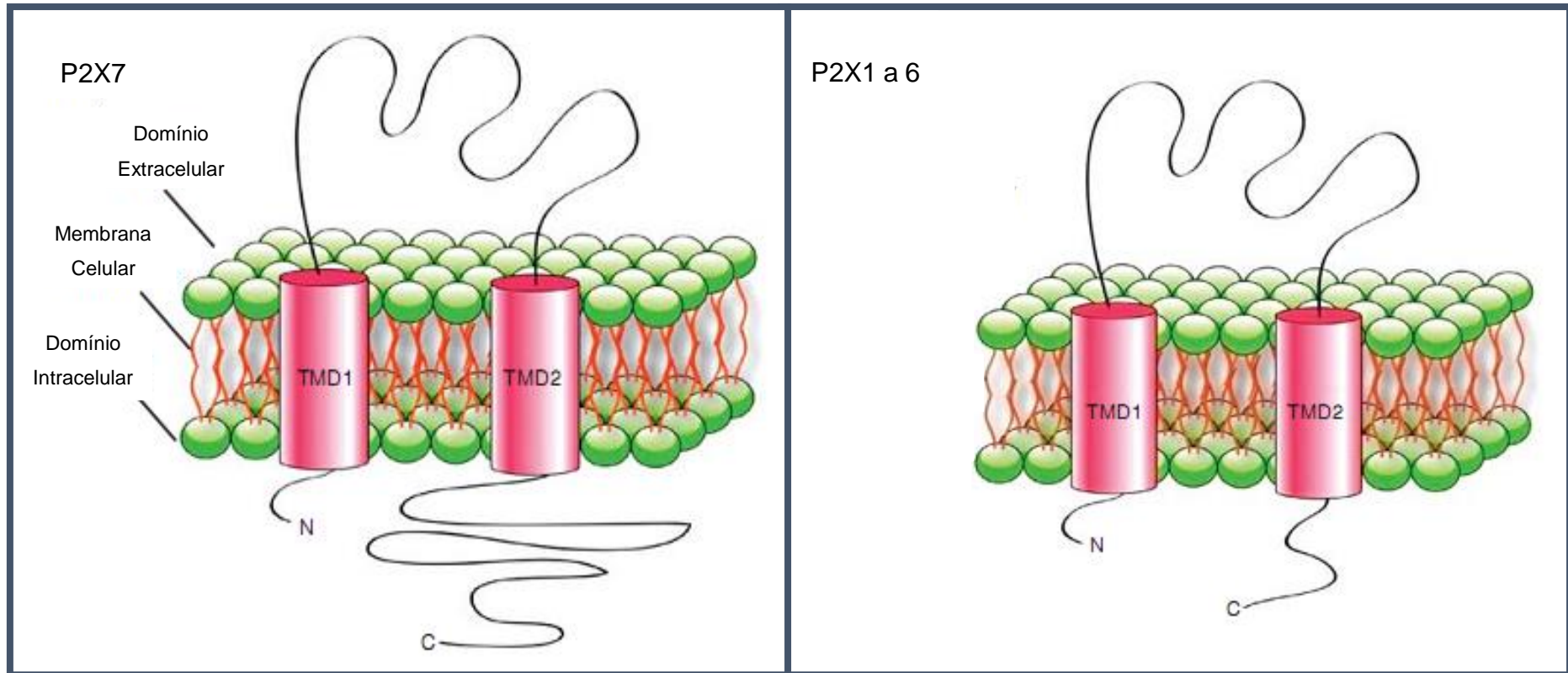


Figura 4: Comparação entre o tamanho da região C-terminal do receptor P2X7 em relação aos outros receptores da família. Neste esboço é representado uma as subunidades dos receptores P2X com suas alças N e C - terminais voltadas para o meio intracelular. As esferas verdes representam as cabeças polares a membrana celular. As linhas laranjas a região hidrofóbica da membrana celular. Os cilindros magenta (TMD1 e TMD2) são os domínios transmembranares da subunidade proteica, sendo a linha abaixo do cilindro TMD2 a região c-terminal a ser comparada entre as proteínas da família P2X. Adaptado de Hattori *et al* 2012.

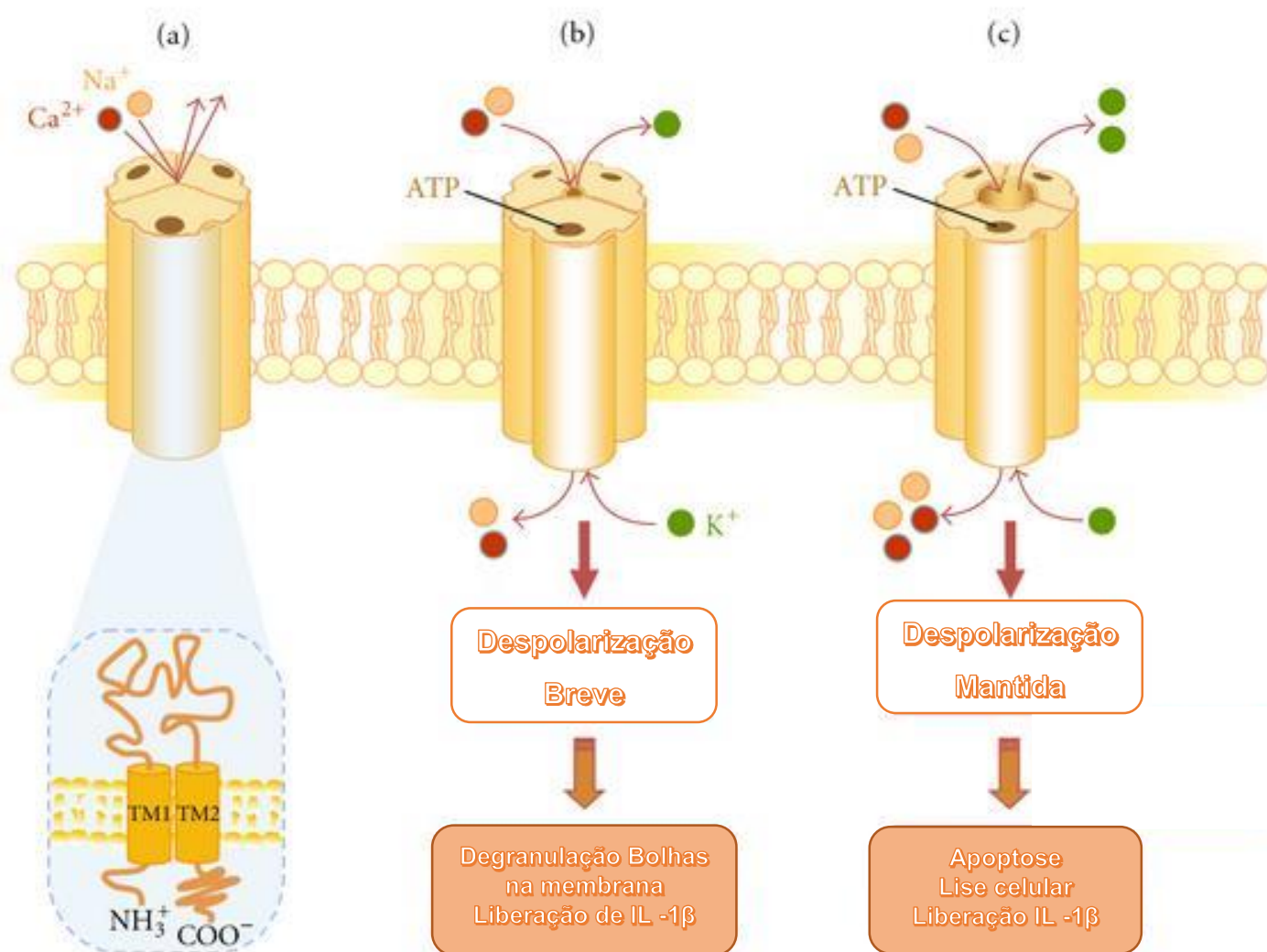


Figura 5: Ativação dos receptores receptor P2X. (A) Todo receptor P2X é um trimero cujas subunidades formam o canal permeável a cátions. (B) A ativação rápida (10 s) por ATP desencadeia uma série de respostas celulares como despolarização, degranulação e formação de corpos apoptóticos oriundos da membrana. (C) Ativação prolongada com ATP acima de 100 μM abre um poro cuja sua formação tem mecanismo desconhecido, permitindo a passagem de moléculas de até 900 Da (Bisaggio *et al.*,

No que diz respeito ao entendimento do mecanismo envolvido na transição deste receptor, desde a configuração de canal de baixa condutância, até um canal não seletivo de alta condutância, são consideradas atualmente duas hipóteses fundamentais (Burnstock, 2012):

- i) A primeira está relacionada à ativação de segundos mensageiros intracelulares (após a ativação do P2X7) que ativariam outra proteína desconhecida responsável pela formação do canal (Schilling *et al*, 1999; Verhoef *et al*, 2004).
- ii) A segunda hipótese justifica a formação do poro pela dilatação do canal seletivo de baixa condutância associado ao P2X7 (Di Virgilio *et al*, 2005; Teixeira, 2009; Yan, 2010).

Desta forma, a elucidação da conformação desse receptor é de fundamental importância para o entendimento dos mecanismos moleculares de formação de ambos os canais, o que poderia contribuir com a validação de uma dessas hipóteses.

Neste sentido, o maior avanço do ponto de vista estrutural foi a definição da estrutura de uma versão modificada do P2X4 da espécie *Danio rerio* (P2X4) no seus estados fechado e aberto (ATP ligado), por cristalografia de raios-X (Hattori e Gouaux, 2012). Esses resultados confirmam as previsões sobre o arranjo trimérico com dois domínios transmembrana (TMDs) por subunidade. Os domínios N e C-terminal voltados para o citoplasma e as alças voltadas para o meio extracelular, onde ocorre a interação com o ATP. O conhecimento das estruturas nos estados aberto e fechado, aliado a estudos de mutagênese sítio-dirigida permitiram que fosse proposto um modelo para a abertura do canal de baixa condutância do P2X4 (Hattori e Gouaux, 2012).

Entretanto, a estrutura tridimensional do P2X7 não possui resolução por métodos experimentais, tendo em vista as dificuldades comuns de purificação e cristalização de proteínas transmembranares (TM) no emprego de técnicas padrão, como a cristalográfica de raios-X e a ressonância magnética nuclear (RMN) (Bordag e Keller, 2010).

A cristalografia produz bons resultados em termos de resolução, contudo, o uso dessa técnica necessita da formação de um cristal, que além de difratar de maneira adequada, também reproduza o ambiente no qual a proteína assume

sua conformação nativa. Por outro lado, a RMN pode ser realizada em solução, tornando esta técnica mais atrativa para a definição de estruturas dessa classe de proteínas. Entretanto, esta técnica possui atualmente uma limitação de resolução, permitindo no máximo a análise de proteínas com aproximadamente duzentos resíduos (Bordag e Keller, 2010).

Essas limitações são refletidas pelo baixo número de estruturas de proteínas TM inseridas no Protein Data Bank (PDB) (Berman *et al.*, 2000; Berman *et al.*, 2002; Parasuraman, 2012) (1,4%, até o presente momento) (Berman *et al.*, 2002), levando em consideração que proteínas TM representam um terço das proteínas codificadas no nosso genoma e mais da metade são drogáveis (Bordag e Keller, 2010).

Apesar de sua participação em diversos mecanismos regulatórios em diferentes eventos biológicos, ainda não existe uma determinação estrutural experimental para o receptor P2X7 humano.

Todavia, devido ao crescente acúmulo de dados extraídos de experimentos, os estudos *in silico* deste receptor estão se tornando cada vez mais frequentes, possibilitando assim a configuração dos sistemas biológicos computacionais para utilização de diversas técnicas como dinâmica molecular, *docking* molecular, entre outras.

Em diversos estudos são aplicados mecanismos para tentar descrever de diferentes formas a ativação e o funcionamento do canal cátion seletivo formado por este receptor.

Turchenkov e Bystrov (2014) utilizam uma combinação de cálculo de química quântica, dinâmica molecular e Browniana para modelar o processo de condutância dos P2X2, P2X4 e P2X7 em um estudo de caso, utilizando modelos simplificados das estruturas dos mesmos. Nesse trabalho foi apontada a importância dos resíduos aspárticos situados na região inferior dos domínios transmembranares destes receptores com um papel chave na seletividade do canal catiônico para os íons Li⁺, Na⁺ e K⁺. Também demonstraram uma menor seletividade de canal para o P2X2 em comparação ao P2X2 e P2X7.

Em outro estudo Hattori e Gouaux (2012) analisaram o mecanismo de ativação dos receptores P2X através da ligação ao ATP, e relataram um movimento de abertura do canal e de fechamento do sítio de ligação ao ATP

após seu ancoramento. Estes movimentos são associados à flexão de resíduos estruturados em folha- β próximos à região dos domínios transmembranares. Também são inferidos movimentos para formação do poro de alta condutância através do alargamento do receptor P2X. Os movimentos descritos são considerados pelos autores como fundamentais para o desenvolvimento de novos fármacos. Sendo assim, estas informações poderão auxiliar na arquitetura de moléculas que possuam mecanismos tanto eletrofílicos quanto nucleofílicos para possibilitar uma melhor abertura ou fechamento do sítio de ligação ao ATP (Hattori e Gouaux, 2012).

Outro estudo relevante foi de Browne e colaboradores (2013), que utilizaram células renais embrionárias humanas para expressar o receptor P2X7 de rato através de técnicas de mutagênese para avaliar a passagem de moléculas grandes ($>1\text{nm}$). Por meio da medição da de voltagem foram obtidos valores entre -60 a $+60$ mV em um tempo de 1s a uma frequência de 5Hz utilizando BzATP (3'-O-(4-Benzoyl) ATP) como agonista. Essa medição tornou possível a observação do aumento na permeabilidade de íons cloreto, assim como a passagem de corantes negativos como o isotiocianato de fluoresceína cujo diâmetro são maiores de 1nm. Este estudo demonstrou a passagem de corantes com tamanho máximo de 1,4nm (isotiocianato de fluoresceína). Estes resultados foram obtidos através das mutações T348K, D352N, D352K (Browne *et al.*, 2013).

Apesar das inúmeras evidências, controvérsias ainda persistem no que diz respeito à trajetória dos íons até a chegada na região transmembranar, bem como das moléculas cujas massas se aproximam dos 900Da.

Neste sentido, considerando a falta de dados referente à estrutura do P2X7 humano, este trabalho propõe o estudo *in silico* deste receptor através de modelos estruturais obtidos por modelagem comparativa (MC), usando como molde o P2X4, o qual demonstrou formar canais iônicos com seletividade muito próxima ao do P2X7 em *patch-clamp* e em um sistema de bicamada lipídica artificial (De Souza *et al.*, 2012).

1.6 Modelagem Molecular

Mecânica Molecular (MM) é o termo utilizado para se referir a um conjunto de técnicas computacionais baseada na mecânica clássica. As abordagens existentes na MM são representações simplificadas de sistemas físicos reais, no intuito de aumentar sua compreensão sobre elementos contidos no sistema de estudo. Em outras palavras, são construídos sistemas que representem da forma mais realista possível os fenômenos físico-químicos a nível atômico (Dori e Barak, 2001).

1.6.1 Modelagem comparativa (MC)

A MC é um método empírico fundamentado no fato de que a estrutura de uma proteína é mais conservada do que sua sequência de aminoácidos ao decorrer dos processos evolutivos. Desta forma, pequenas mudanças na sequência de aminoácidos não resultam em mudanças significativas na estruturação da proteína (Sanchez e Sali, 1997).

Essa abordagem permite inferir através de sua sequência de aminoácidos a estrutura de uma proteína, cuja conformação tridimensional não foi elucidada. Esta construção se baseia no alinhamento entre a sequência da proteína alvo (modelo) e uma ou mais sequências de proteínas relacionadas estruturalmente (moldes) (Sanchez e Sali, 1997) que se encontram depositadas em bancos de dados de estruturas proteicas, como o PDB (*Protein Data Bank*) (Berman *et al.*, 2000; Berman *et al.*, 2002).

Os dados experimentais acumulados nas bases de dados, associados à técnica de modelagem comparativa, podem ser utilizados para reduzir o tempo, os custos finais em pesquisas e também ajudar na geração de estudos que direcionam futuras pesquisas baseados em observações encontradas nos experimentos *in silico* (Sanjay Chandrasekharan, 2011).

O processo de predição da estrutura tridimensional de uma proteína utilizando MC consiste em quatro etapas (Figura 6) (Sanchez e Sali, 1998):

(i) identificação dos moldes; (ii) alinhamento entre sequências; (iii) construção do modelo e; (iv) validação do modelo.

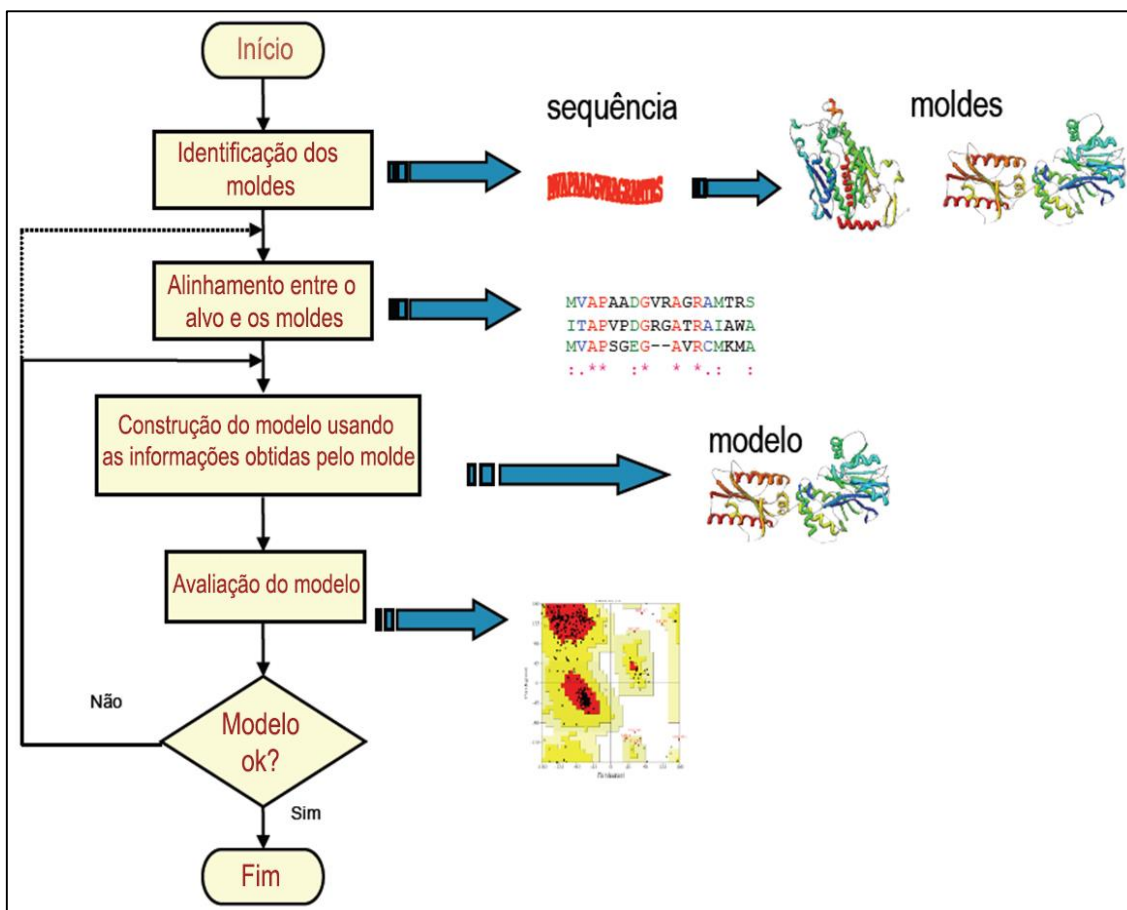


Figura 6: Etapas da modelagem comparativa. Inicialmente é preciso obter a sequência a qual se deseja modelar, compara-la com um banco de dados de estruturas definidas experimentalmente para então se obter um molde e em seguida alinha as duas sequencias comparadas. A partir deste alinhamento é construído um modelo baseado na estrutura do molde que posteriormente será avaliado, pela sua estereoquímica energia. Adaptado de (Martí-Renom *et al.*, 2000).

1.6.1.1 Identificação dos moldes

A identificação dos moldes é realizada por meio de ferramentas de bioinformática. Essas ferramentas utilizam algoritmos para realizar buscas em bancos de dados de estruturas de proteínas similares que possam ser utilizadas como molde (McWilliam *et al.*, 2013).

A operação básica para a busca de moldes pela comparação sequencial é realizada através de técnicas de alinhamento entre sequências. Seu objetivo é identificar se duas sequências possuem similaridade suficiente para inferir homologia entre elas (Webb e Sali, 2014). Além disso, é preciso que existam coordenadas espaciais atribuídas à sequência molde para que esta seja utilizada como referência. Sendo assim o primeiro passo na modelagem comparativa é a identificação de estruturas tridimensionais resolvidas que possam atuar como uma base estrutural para a modelagem da sequência-alvo (proteína alvo)(Webb e Sali, 2014).

Adicionalmente, são levados em conta aspectos como o conhecimento estrutural, similaridade de função, expressão pelo mesmo grupo de genes, similaridade sequencial ou até correlação evolutiva. Desta forma é possível organizar os dados das sequências alinhadas e correlacioná-los para as proteínas com a estrutura tridimensional resolvida para que sejam selecionadas como moldes que auxiliem na predição estrutural da sequência estudada (Sali *et al.*, 1995; Webb e Sali, 2014).

Dentre as ferramentas de busca por moldes proteicos mais utilizadas destaca-se o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (McWilliam *et al.*, 2013). Através dele é possível utilizar diversas bases de dados para realizar sua triagem na busca por moldes, sendo o servidor de estrutura proteicas PDB o mais utilizado (Altschul, S. F. *et al.*, 1990).

O BLAST utiliza tipos diferentes de alinhamento para avaliar o grau de similaridade entre sequências como os alinhamentos do tipo local e global. Este tipo e alinhamento são configurados pelo usuário, assim como o tipo e matriz de substituição a ser utilizados. Esta matriz utiliza algoritmos de busca por similaridade entre as sequências alvo e as sequências contidas no banco de dados de estruturas, reportando uma tabela em ordem decrescente do grau de identidade (Mount, 2007; McWilliam *et al.*, 2013).

1.6.1.2 Alinhamento entre sequências

Com os alinhamentos construídos é possível organizar sequências de proteínas e analisar relações evolutivas, funcionais ou estruturais através da similaridade entre as regiões das sequências (McWilliam *et al.*, 2013). Para conferir o melhor alinhamento os programas utilizam matrizes que buscam obter a melhor pontuação através do melhor alinhamento possível. As matrizes mais utilizadas são:

- PAM: utiliza um modelo evolucionário explícito através de métodos parcimoniosos, calculando a matriz com base na taxa de substituições dos aminoácidos; esta matriz possui subtipos que chamados PAM1 e suas derivações PAM100 e PAM250. Quanto maior o número descrito no nome da matriz PAM, mais adequada para analisar sequências divergentes (States *et al.*, 1991).
- Blosom: Analisa as sequências par a par e não utiliza um modelo evolucionário explícito. Em contrapartida, sua sensibilidade é maior que a matriz PAM. Esta matriz possui variações como a matriz PAM, sendo estas as Blosom 45, 52, 60, 80 e 90. Estes números se referem ao nível de identidade utilizado para construir blocos nas análises, desta forma as matrizes Blosom 90 criam blocos com proteínas que são 90% idênticas (Eddy, 2004).

Este método possibilita construir dois tipos de alinhamentos. O alinhamento local, que alinha apenas partes das sequências envolvidas, através da busca por regiões semelhantes sem considerar as sequências como um todo. O segundo tipo é o alinhamento global, que utiliza toda a extensão das sequências. Além disto é possível realizar o alinhamento múltiplo entre três ou mais sequências para serem analisadas de maneira local ou global.

Dentre os servidores de alinhamento local podemos citar, BLAST, ClustalW, MAFFT (Altschul, Stephen F *et al.*, 1990; Thompson *et al.*, 2002; Katoh e Standley, 2013). Para o alinhamento global temos como exemplo os servidores ClustalW2, T-coffee, MAFFT (Thompson *et al.*, 2002; Di Tommaso *et al.*, 2011; Katoh e Standley, 2013).

Na MC é necessário construir o melhor alinhamento possível entre a sequência a ser modelada e a sequência ou sequências escolhidas como referência para serem utilizadas como molde. A identidade sequencial mínima para realização da MC é descrita literariamente com valores 30% entre as sequências alvo e molde, sendo este valor mais aceitável dependendo do tamanho da sequência (acima de 100 resíduos). Quanto maior a sequência melhor menos influencia negativas este valor mínimo terá sobre a construção do modelo (Figura 5).

Caso apenas uma sequência seja encontrada é realizado um alinhamento ao par (*pairwise*) entre as sequências. Se existirem duas ou mais sequências encontradas, será necessário um alinhamento múltiplo entre todas as proteínas para realização de MC. Ao término do alinhamento é iniciado o processo de construção do modelo (Sali *et al.*, 1995; Sanchez e Sali, 1997).

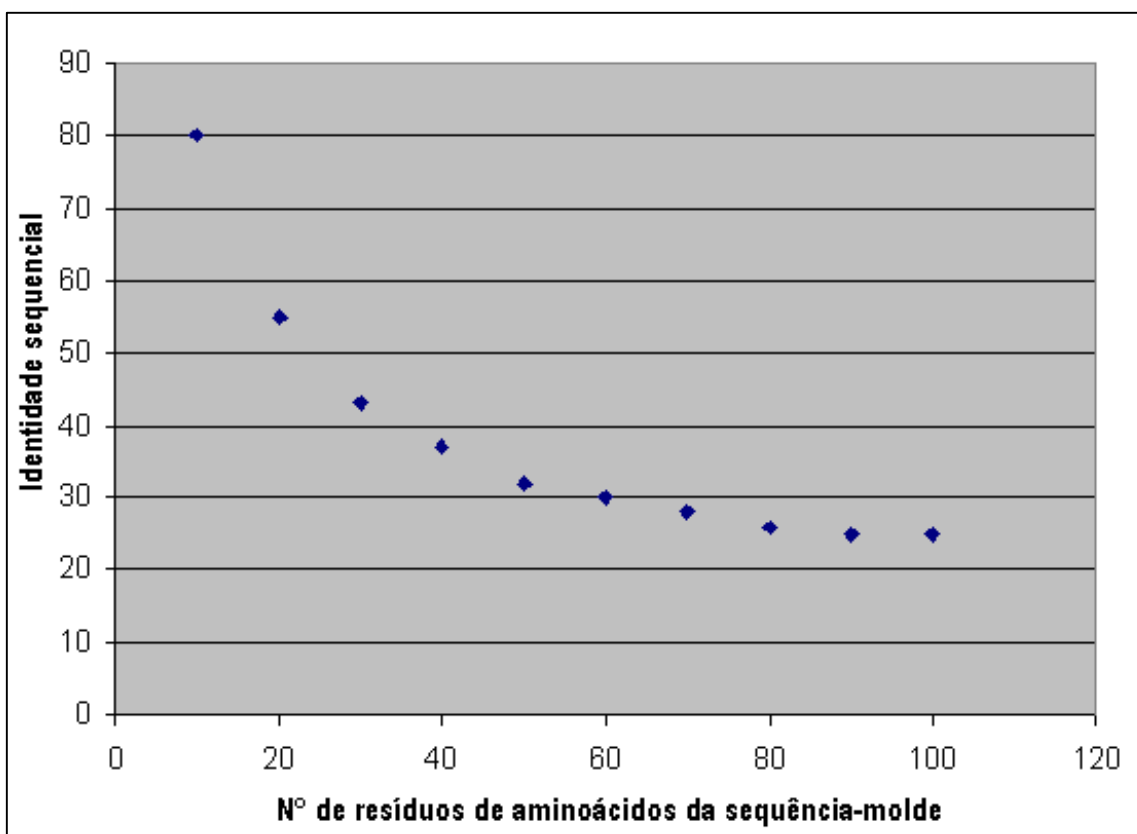


Figura 7: Gráfico de correlação identidade sequencial e tamanho da sequência em relação aos valores mínimos de identidades (Da Silva, 2007).

1.6.1.3 Construção do modelo

A construção do modelo é baseada inteiramente na informação contida no alinhamento entre as sequências. Dentre os métodos mais utilizados na MC, se destacam: (i) o método de modelagem pela satisfação de restrições espaciais (Blundell *et al.*, 1987) e (ii) o método de modelagem pela união de corpos rígidos (Srinivasan *et al.*, 1993).

- i) Restrições espaciais: este método é realizado mediante a geração de um conjunto de restrições espaciais que são aplicadas à sequência alvo. As restrições utilizadas são aplicadas às ligações angulares e nos diedros. Além disso, um campo de força controla as propriedades estereoquímicas entre os átomos, aplicando restrições químicas (Sali, 1995).
- ii) União de corpos rígidos: Nesta técnica, a construção do modelo se dá por meio das transferências atômicas dos moldes utilizados. Após o alinhamento entre as sequências os resíduos da cadeia principal são sobrepostos e trocados, porém as coordenadas espaciais são mantidas (Goldsmith-Fischman e Honig, 2003).

1.6.1.4 Validação do modelo

A última etapa é a validação, que tem como objetivo avaliar a qualidade do modelo construído que determinará a precisão da estrutura tridimensional. Esta etapa possibilita identificar possíveis erros da estrutura tridimensional que podem ser resultado da escolha dos moldes ou do alinhamento construído (Srinivasan *et al.*, 1993).

Apesar de eficaz, a modelagem comparativa não substitui os dados experimentais, sendo um excelente complemento de informações (Blundell *et al.*, 1987).

Para validação dos modelos são utilizados diversos algoritmos que avaliam parâmetros estereoquímicos, físicos e estatísticos, que são geralmente comparados com um banco de dados experimental e com estruturas *in silico* de alta confiança (Bernstein *et al.*, 1977; Sanchez e Sali, 1997). Alguns exemplos de algoritmos de validação são:

- i) PROCHECK; analisa globalmente e resíduo por resíduo a estrutura de uma proteína, para verificar sua qualidade estereoquímica. Estas análises reportam o gráfico de Ramachandran onde são observados o número de resíduos em regiões favoráveis para formação de estruturas secundárias. Ao total, um mínimo de 90% dos resíduos da proteína devem estar alocados em regiões favoráveis para ser considerado um modelo aceitável (Laskowski *et al.*, 1996).
- ii) WHAT_CHECK; é um pacote de programas que avalia a qualidade de uma estrutura (Vriend, 1990; Hooft *et al.*, 1996) através da análise das interações entre os átomos da proteína.
- iii) ERRAT; verifica os padrões das interações entre átomos não ligados de uma proteína alvo. Os átomos carbono, nitrogênio e oxigênio desta proteína são classificados em um índice e comparados com um banco de dados de estruturas cristalográficas de proteínas com refinamento altamente confiáveis (estruturas de alta resolução (<2Å)). A estrutura é analisada através de uma janela deslizante de nove resíduos. Com isso para cada janela é verificada as seis possíveis interações entre os átomos indexados (CC, CN, CO, NN, NO, OO). Destes átomos, são verificados os que possuem distância menor que o raio de corte 3,5 Å e são atribuídos valores estatísticos que estimam o valor da função de erro, resíduo por resíduo, demonstrando as regiões da estrutura que podem ser rejeitadas com maior grau de confiança. Os valores de função de erro abaixo de 95% são considerados ideais para avaliação do modelo cristalográfico. As regiões entre 95 % e 99% ainda que não ideais, são aceitáveis para os parâmetros deste programa; Já as regiões acima de 99% possuem altíssima confiança em serem rejeitadas, revelando resíduos com extrema necessidade de refinamentos (Colovos e Yeates, 1993; Macarthur *et al.*, 1994).

1.6.2 Dinâmica Molecular

As técnicas experimentais exercem função primordial na compreensão de diversos eventos biológicos, assim como elucidação de mecanismos físico-químicos através de diversas técnicas. Para elucidação da conformação estrutural e a função de moléculas de interesse biológico mesmo as técnicas de difração de raio-X ou NMR não são plenamente exploradas ou até mesmo executadas sem a implementação prévia de um modelo ou informações teóricas. Desta forma os modelos *in silico* são implementados para modelar sistemas físicos reais e auxiliar a compreensão de suas características (Saiz *et al.*, 2002; Karplus *et al.*, 2003).

Neste sentido a simulação de átomos e moléculas vêm constituindo sistemas biológicos cada vez mais complexos. Esta complexidade promoveu a otimização cada vez mais intensa dos algoritmos utilizados para realização das simulações mais rápidas. Isto, associado aos avanços de hardware, levou a um ganho de performance excepcional em comparação aos primeiros anos de simulações computacionais, tornando este método cada vez mais indispensável como técnica complementar aos métodos experimentais (Konings *et al.*; Sanjay Chandrasekharan, 2011).

A Dinâmica Molecular (DM) é um método computacional que simula os movimentos dos átomos ou moléculas baseadas na mecânica clássica. Os movimentos dos átomos são obtidos através da resolução numérica das equações de movimento de Newton dando lugar a um conjunto de coordenadas espaciais em função do tempo.

Como os sistemas estudados podem ser constituídos de átomos ou moléculas de diversas características, são aplicados os campos de força clássicos, para descrever a força atuante sobre cada átomo do sistema. Para o tratamento de centenas ou milhares de átomos como proteínas e ácidos nucleicos são introduzidas funções potenciais empíricas, calibradas por informações experimentais e ou cálculos quânticos sobre pequenas moléculas (Brooks *et al.*, 1983; Brooks *et al.*, 1988).

A função de energia potencial para um sistema molecular constituído de um número finito de átomos calcula-se entre os pares de átomos a partir

somatórios de termos harmônicos, torcionais, eletrostáticos e de van der Waals, sendo que vários campos de forças (GROMOS (Daura *et al.*, 1998), AMBER (Lindorff-Larsen *et al.*, 2010), CHARMM (Brooks *et al.*, 1983), MMFF94 (Halgren, 1996), etc.) adotam a mesma forma funcional.

Desta forma, a escolha do campo de força a ser utilizado influenciará diretamente nos resultados de uma dinâmica, visto a diversidade de ambientes que uma mesma molécula pode residir (Brooks *et al.*, 1988; Kukol, 2009; Lindorff-Larsen *et al.*, 2010; Pronk *et al.*, 2013).

Genericamente atribui-se a denominação de campo de força à descrição de um sistema de muitas partículas pela sobreposição de termos simples, que descrevem a interação entre duas, três ou quatro partículas. (Brooks *et al.*, 1983; Brooks *et al.*, 1988; Van Gunsteren e Berendsen, 1990)

Em geral, a forma funcional da função energia potencial, para um sistema constituído de N átomos, com vetores posições r_i , é expressa por:

$$\begin{aligned}
 V(r_1, r_2, \dots, r_N) = & \sum_{n=1}^{N_b} \frac{1}{2} K_{b_n} (b_n - b_{0_n})^2 + \sum_{n=1}^{N_\theta} \frac{1}{2} K_{\theta_n} (\theta_n - \theta_{0_n})^2 + \sum_{n=1}^{N_\xi} \frac{1}{2} K_{\xi_n} (\xi_n - \xi_{0_n})^2 + \\
 & \sum_{n=1}^{N_\varphi} K_{\varphi_n} [1 + \cos(n_n \varphi_n - \delta_n)] + \quad [1] \\
 & \sum_{i < j}^N \left[\frac{C_{12}(i, j)}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_6(i, j)}{r_{ij}^6} \right] + \sum_{i < j}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon r_{ij}}
 \end{aligned}$$

onde os quatro primeiros termos se referem especificamente a interações entre átomos ligados (comprimento de ligação, ângulo de ligação, ângulos diedrais impróprios e próprios respectivamente). Os dois últimos termos, de van der Waals e eletrostático respectivamente, estão relacionados com interações de longo alcance entre átomos não ligados entre si. A constante dielétrica do meio é dada pelo valor do parâmetro ϵ , a carga parcial atômica no átomo i é dada pelo parâmetro q_i e a distância entre dois átomos i e j é dada por r_{ij} .

A partir desta função potencial, pode-se determinar a força atuante sobre cada átomo do sistema e conseqüentemente simular o comportamento dinâmico das estruturas. A solução numérica das equações de movimento a partir de coordenadas e velocidades iniciais, para o movimento de cada átomo submetido

ao campo de força, é obtida através de um algoritmo computacional (Brooks *et al.*, 1983; Wood, 1986; Tildesley e Allen, 1987; Frenkel e Smit, 2001). Todos eles baseiam-se na resolução das equações de Newton a partir de uma expansão em série de potências da posição das partículas para cada partícula e em cada incremento no tempo δt .

A técnica de simulação por Dinâmica Molecular abre a possibilidade de um estudo mais detalhado dos sistemas de macromoléculas em complexo com outras moléculas menores (substratos), com análise das interações entre estes componentes na escala microscópica e em tempos da ordem de nanossegundos. Com esta metodologia simula-se o comportamento dinâmico dos sistemas sendo possível o acompanhamento da evolução temporal dos mesmos como também a determinação de propriedades dinâmicas, estruturais e termodinâmicas (Frenkel e Smit, 2001).

Por ter uma grande precisão temporal (escala de picossegundos) é possível ter uma grande riqueza de detalhes dos movimentos. Entretanto, para eventos moleculares onde existe uma maior necessidade de tempo para sua ocorrência o custo computacional (tempo necessário para calcular os sistemas) e o armazenamento em disco rígido (espaço físico para escrever as informações do sistema) se tornam um obstáculo para a execução desta técnica (Frenkel e Smit, 2001).

Atualmente o poder computacional cresceu a um nível onde a dinâmica pode alcançar tempos de simulação na faixa de microssegundos, e reduziu muito o custo computacional necessário, possibilitando estudo em proteínas ou outras moléculas de interesse com um maior tempo de observação (Frenkel e Smit, 2001).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar estrutural e funcionalmente um modelo computacional da proteína de membrana P2X7 humana.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a estrutura tridimensional do domínio transmembranar (segmentos TM1 e TM2) e extracelular do P2X7 humano em seus estados fechado e aberto.
- Analisar o comportamento dinâmico e o fechamento do canal do P2X7 humano em modelo de bicamada lipídica (DPPC).
- Representar a passagem seletiva de cátions (K^+) e ânions (Cl^-) através do canal do modelo de proteína P2X7 humano em seu estado aberto.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Modelagem Comparativa

Neste trabalho propomos um modelo do receptor purinérgico humano P2X7, construído utilizando a técnica modelagem comparativa (MC), utilizando como molde a estrutura do receptor purinérgico P2X4 da espécie *Danio rerio* (Peixe zebra) (Hattori e Gouaux, 2012), em seus estados aberto e fechado.

A busca por estruturas homólogas foi realizada usando o servidor *online* BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul, S. F. *et al.*, 1990; Mount, 2007). A sequência de aminoácidos do receptor purinérgico P2X7 humano com 595 resíduos, sob código de acesso Q99572.4 contido no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (Rassendren *et al.*, 1997) foi utilizada como entrada do programa BLAST.

A sequência alvo foi comparada com o banco de estruturas PDB utilizando do algoritmo *BLASTP* com a matriz de alinhamento *BLOSUM62* (*item 1.6.1.2*) (Henikoff e Henikoff, 1992).

As estruturas molde foram obtidas do PDB, cujos códigos são 4DW1 para o estado aberto e 4DW0 para o estado fechado da proteína P2X4 (Hattori e Gouaux, 2012). A construção do modelo foi realizada com o programa *Modeller 9.13* (Sali *et al.*, 1995; Sanchez e Sali, 1997; Sánchez e Šali, 1999), que calcula automaticamente um modelo aplicando a metodologia de restrições espaciais (Sali *et al.*, 1995), utilizando sequências de aminoácidos de proteínas com estrutura tridimensional conhecida alinhadas à sequência de aminoácidos da proteína a ser solucionada (Sali *et al.*, 1995; Sanchez e Sali, 1997; Sánchez e Šali, 1999).

As sequências de aminoácidos dos receptores P2X7 humano e P2X4 do *Danio rerio* foram alinhadas utilizando o servidor *online* Alinhamento Múltiplo de Sequências de Ácidos Nucleicos e Proteínas (ClustalW2) (Thompson *et al.*, 2002; McWilliam *et al.*, 2013). Este é um programa de uso geral, para alinhamento de DNA ou proteínas, capaz de calcular dentro das especificações pré-selecionadas (matriz de alinhamento) a melhor correspondência entre as

sequencias inseridas no programa, mostrando os valores de identidade, similaridade bem como suas diferenças (McWilliam *et al.*, 2013).

. Foram gerados 300 modelos do receptor P2X7 humano, sendo 150 em seu estado fechado e posteriormente 150 modelos em seu estado aberto, dentre estes, foi escolhido um modelo final para o estado aberto do receptor e um modelo final para o estado fechado. Como critério de seleção foi utilizado o valor mínimo da função objetiva. Este valor é reportado pelo programa *Modeller* e representa uma relação entre as restrições espaciais do molde e o quanto o modelo gerado foi capaz de respeitar estas restrições. Os valores mais baixos de função objetiva representam modelos mais próximos do molde, reportando em uma melhor modelagem comparativa (Sali *et al.*, 1995).

É importante destacar que a função objetiva somente pode ser utilizada para comparação entre modelos gerados sem variação no número de aminoácidos da sequência alvo, não sendo um padrão de eficiência ao serem comparados com modelos construídos em condições fora das estabelecidas (Sanchez e Sali, 1997).

3.1.2 Analise dos modelos

Os modelos escolhidos foram submetidos ao servidor *online* SAVES (<http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>). Neste servidor foram executados três programas de validação da estrutura proteica: (i) PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1996); (ii) WHAT_CHECK (Vriend, 1990; Hooft *et al.*, 1996); (iii) ERRAT (Colovos e Yeates, 1993; Macarthur *et al.*, 1994). As configurações padrão foram aplicadas a todos os programas citados.

Posteriormente, utilizamos a função parâmetro de energia de proteínas otimizada discreta (*DOPE – Discrete Optimized Protein Energy*), por meio de arquivos *script* em linguagem Python disponibilizados no site do programa *Modeller* (<https://salilab.org/modeller/tutorial/advanced.html>). No DOPE é calculado o potencial estatístico para avaliar os modelos construídos por comparação. Frequentemente o DOPE é utilizado para avaliar a qualidade de um modelo como um todo. Entre tanto, como alternativa para analisar resíduos, o programa pode gerar um perfil de energia resíduo a resíduo para o modelo construído, tornando possível a identificação de regiões problemáticas na

estrutura. Geralmente as regiões onde os padrões energéticos são discordantes, estão relacionadas com as conformações de maior liberdade da proteína, como *loops* e *coils* (Sali *et al.*, 1995; Sanchez e Sali, 1997; Sánchez e Šali, 1999).

3.2 Dinâmica molecular

Para os estudos de dinâmica molecular utilizamos o programa GROMACS (Groningen Machine for Chemical Simulations) (Pronk *et al.*, 2013) (versão 4.6.3) executado através de placas gráficas (GPU - *Graphics Processing Unit*) por intermédio da tecnologia CUDA (*Compute Unified Device Architecture*). Esta última é uma plataforma de computação paralela, capaz de utilizar os núcleos de processamento da GPU e conseqüentemente aumentar de forma significativa o desempenho devido ao seu número elevado de *threads* em paralelo, juntamente com seu dedicado sistema de memória de acesso randomizado (Stefanello¹ *et al.*). O principal fator de escolha para utilização do programa GROMACS foi seu foco na execução de dinâmicas cada vez mais rápidas, característica que tem sido otimizada a cada atualização (Wu *et al.*, 2007).

Ao todo, foram construídos sete sistemas para execução das dinâmicas moleculares. Como o receptor P2X7 é uma proteína transmembranar, o primeiro sistema criado foi uma bicamada lipídica, a qual foi utilizada para acomodar o modelo de proteína a ser estudado e seu respectivo molde, em sistemas separados.

Em seguida, a proteína molde e o modelo construído, em seu estado fechado, foram seccionados, para inserção da região hidrofóbica intramembranar no sistema de bicamada construído (Figura 7), no intuito de avaliar o comportamento dinâmico separadamente de suas alças extracelulares. Por último o modelo do receptor P2X7 em seu estado aberto não seccionado foi inserido ao sistema de bicamada lipídica gerando quatro novos sistemas para análise da passagem de íons catiônicos e aniônicos.

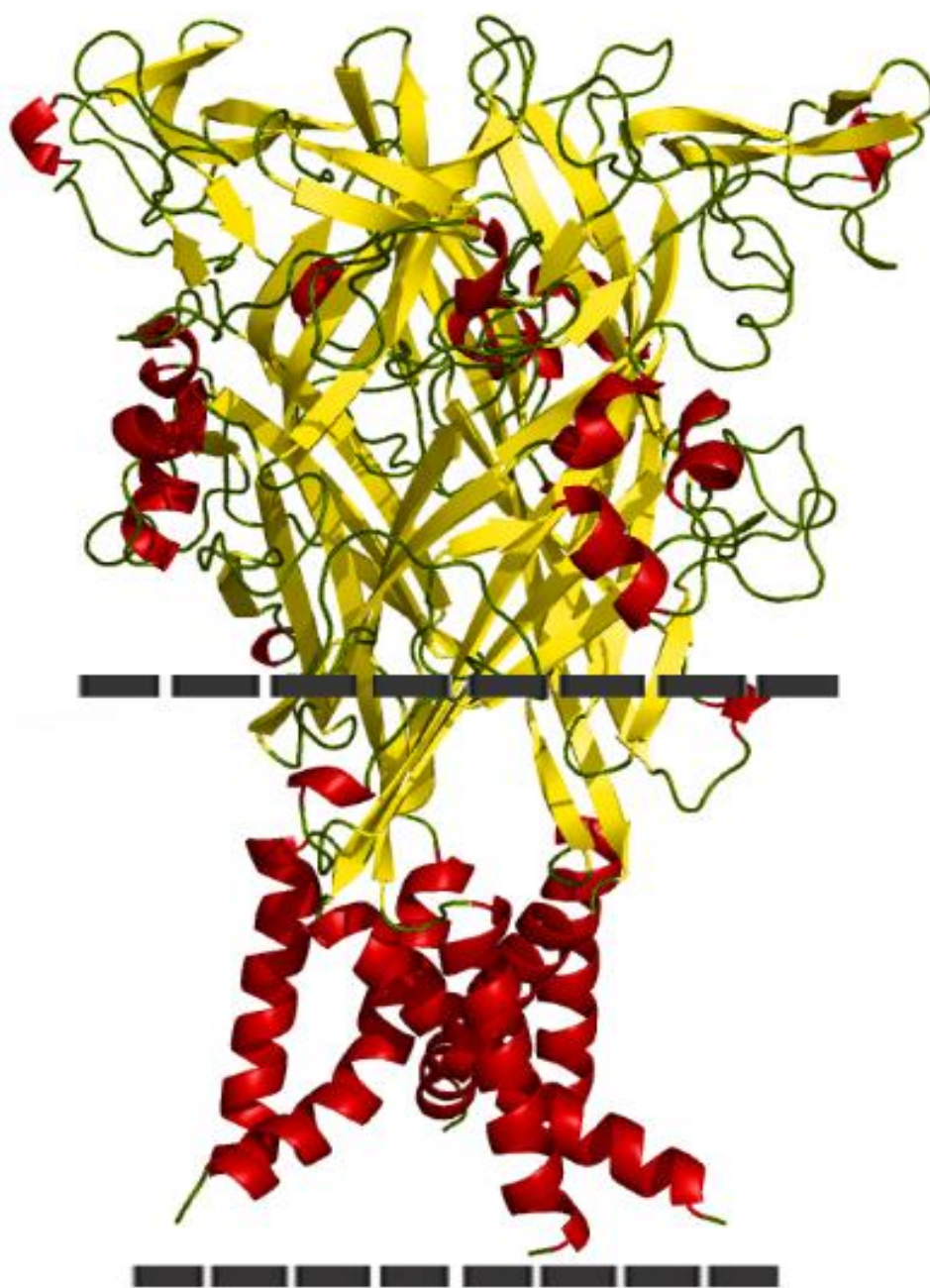


Figura 8 Região TM do P2X4 fechado a ser inserida no sistema de bicamada lipídica de DPPC. As linhas tracejadas mostram a região seccionada do receptor.

3.2.1 Criação do sistema de bicamada lipídica

Atualmente os modelos de bicamada lipídica compõem os sistemas de membranas biológicas mais simulados (Sonne *et al.*, 2007). Neste sentido a dinâmica molecular auxilia na predição e correlação de eventos macromoleculares, possibilitando em casos específicos a otimização do tempo de trabalho em experimentos de bancada e principalmente a economia de recursos financeiros e de matéria prima (Saiz *et al.*, 2002).

Para simular o modelo proteico gerado construímos uma bicamada lipídica com 512 moléculas de dipalmitoilfosfatidilcolina (*DPPC - 1,2-dipalmitoil-sn-glicero3-fosfocolina*) utilizando a parametrização molecular e os arquivos de coordenadas construídos por Kukol (2009), que possuem 128 moléculas de DPPC (Kukol, 2009) e 3.655 moléculas de água (modelo SPC – *Simple Point Charge*) (Berendsen *et al.*, 1981; Kukol, 2009). As dimensões de caixa neste sistema foram 63 Å, 64 Å e 66 Å para os eixos X, Y, Z, respectivamente (Figura8).

Alguns dos fatores que contribuíram para a escolha deste modelo de fosfolípido foram: i) o número de campos de força que já possuem parametrização definida para simular este composto, como CHARMM (Mackerell *et al.*, 2004) , AMBER (Lindorff-Larsen *et al.*, 2010) e GROMOS (Oostenbrink *et al.*, 2004), considerando um modelo parametrizado de acordo com campo de força *all-atoms* frequentemente utilizado; ii) sua precisão, ao apresentar resultados *in silico*, muitos próximos dos dados experimentais (Kukol, 2009).

Apesar do sistema de bicamada estar equilibrado dinamicamente e de acordo com as características necessárias para mimetizar o ambiente em que a proteína modelo deve ser simulada, as dimensões do sistema de bicamada pré-otimizado são insuficientes para acomodar a proteína a ser estudada. Visto que o modelo se aproxima de 8nm nos eixos X e Y, e 10nm em seu eixo Z, aproximadamente duas vezes maior do que as dimensões da caixa citada por Kukol (2009) para sistema de bicamada lipídica. Para solucionar este problema, aumentamos o sistema de bicamada nos eixos X e Y, de forma a duplicar suas dimensões (Figura 9), no qual é possível comparar através de um esboço o tamanho da proteína em relação ao tamanho do sistema a ser simulado. Neste processo a quantidade de moléculas de água também é aumentada, mantendo constante a relação de moléculas de água por lipídeo.

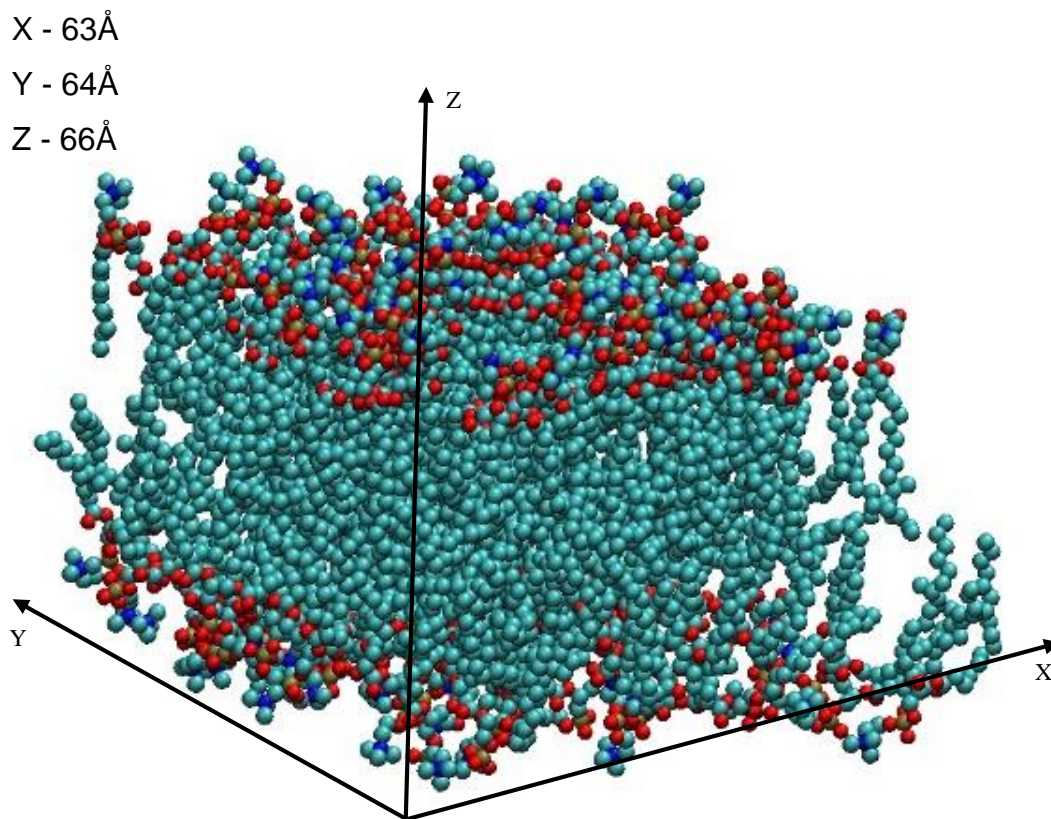


Figura 9: Modelo de bicamada lipídica constituído de DPPC (Kukol, 2009). As esferas vermelhas representam os oxigênios, as azuis os nitrogênios e as douradas os fósforos. As extensas cadeias de carbono do lipídio são representadas pelas esferas ciano. Os eixos X, Y e Z descrevem a largura, espessura e a altura de caixa do sistema.

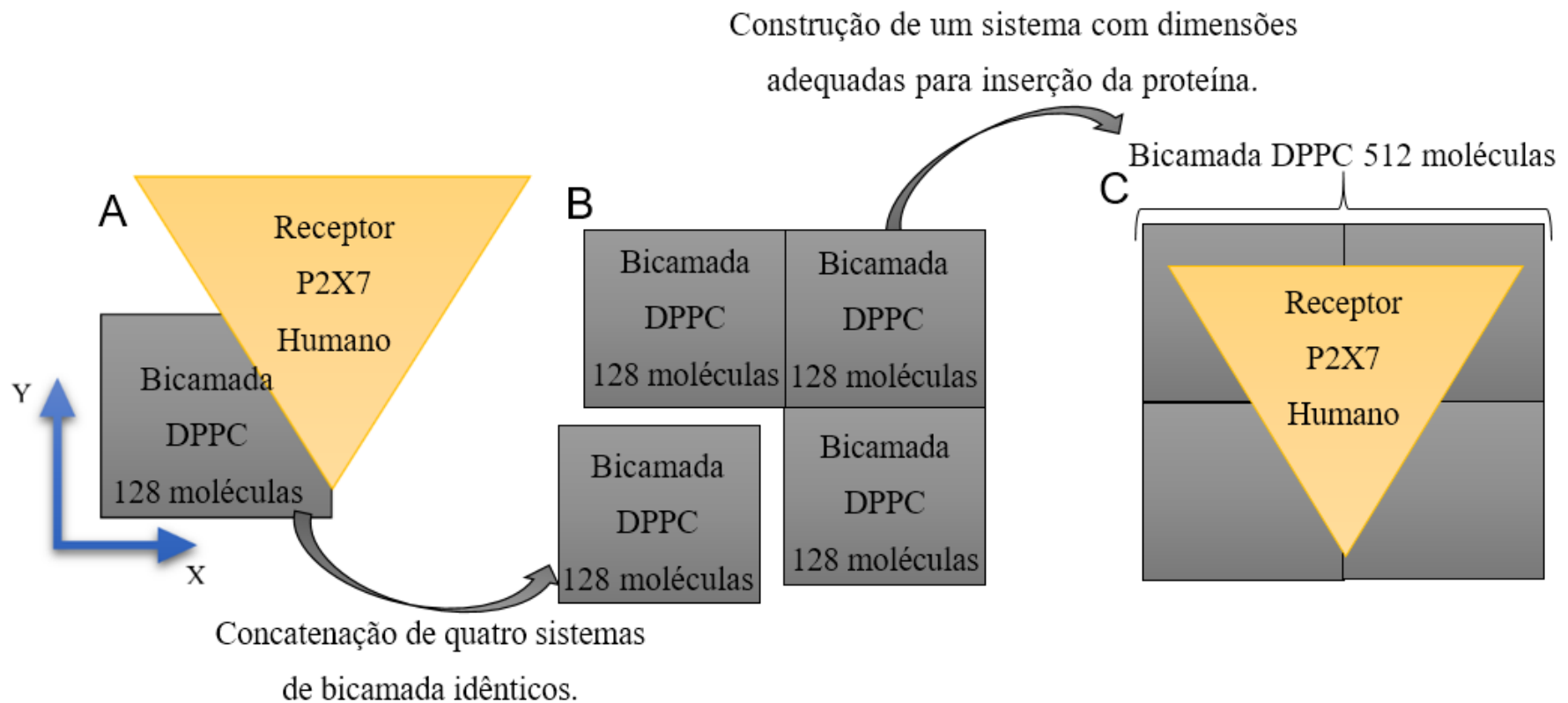


Figura 10: Processo de ampliação do sistema de bicamada proposto por Kukol (Kukol, 2009). (A) Representação da incompatibilidade entre o tamanho do modelo a ser simulado em bicamada. (B) União de quatro sistemas idênticos para sua ampliação. (C) Comparação entre as dimensões do modelo construído em relação ao sistema já ampliado, revelando a necessidade do procedimento.

3.2.2 Inserção de proteínas em sistemas de bicamada lipídica

O crescente interesse nas simulações em proteínas transmembranares promoveu um aumento na eficiência das técnicas de inserção de proteínas em modelos de bicamada lipídica (Kandt *et al.*, 2007).

Para inclusão dos modelos proteicos na membrana foi utilizada a ferramenta *g_membed* (*Gromacs Membrane Embed*) contida no pacote de ferramentas do GROMACS (Wolf *et al.*, 2010). Essa ferramenta é capaz de inserir moléculas reconhecíveis pelo programa, tais como proteínas, em um ambiente molecular formado por qualquer outro tipo de molécula. Neste caso, foi a inserção de uma proteína em um modelo de bicamada lipídica.

Como passo inicial, a proteína a ser inserida deve ser alocada no modelo de bicamada na exata posição em que o usuário deseja encontrá-la ao término do processo. Este posicionamento causa uma sobreposição dos átomos da proteína aos átomos dos lipídeos e também de moléculas d'água.

Para o programa *g_membed* executar a inserção da proteína, ela é comprimida nas direções X e Y, através de um procedimento onde não são consideradas as interações não ligadas da proteína, ou seja, seus átomos não são capazes de interagir entre si. Em seguida, todas as moléculas sobrepostas detectadas são removidas (Wolf *et al.*, 2010).

Finalmente, o programa remove os lipídeos e moléculas de água sobrepostos e gradualmente insufla a proteína à sua conformação original, causando a acomodação dos lipídeos ao redor da proteína (Figura10) (Wolf *et al.*, 2010).

Ao término do processo, a montagem do sistema está completa e pronta para a execução de dinâmicas moleculares (Figura 10, passo 1000).

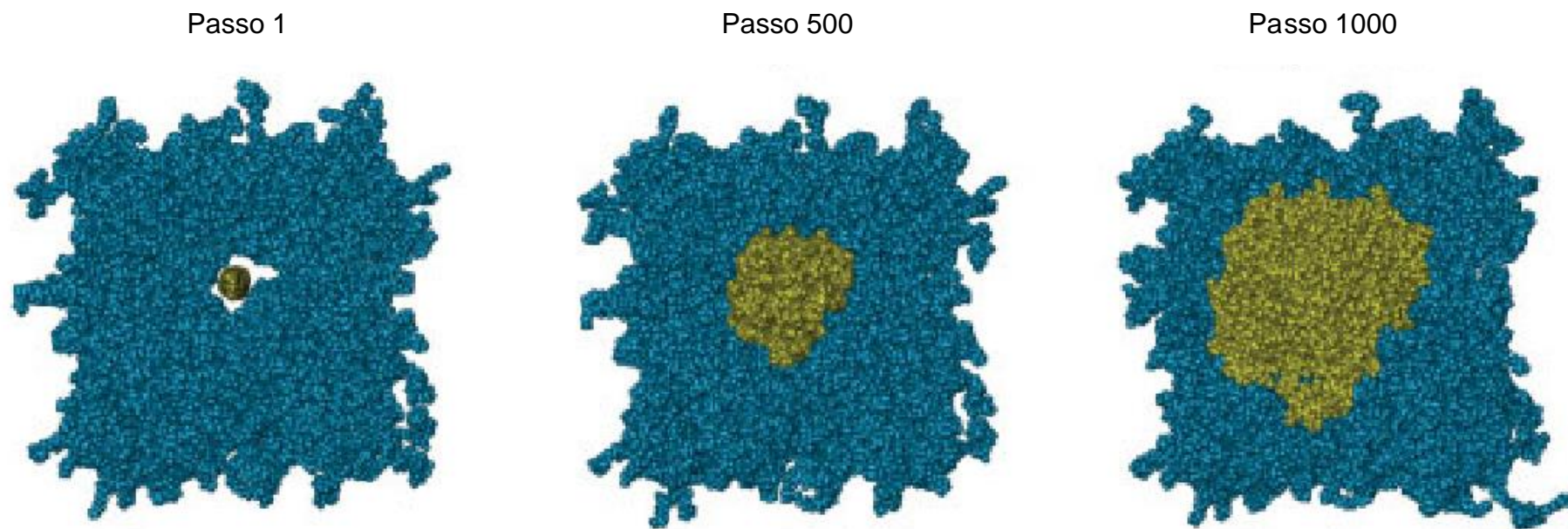


Figura 11. Imersão de proteínas em sistemas lipídicos de bicamada com *g_membed*. As esferas de Van der Waals amarelas e azuis representam a proteína e os lipídeos, respectivamente. Adaptação de (Wolf *et al.*, 2010).

3.2.3 Simulações de Dinâmica Molecular

Para verificar se o aumento do sistema de 128 moléculas proposto por Kukol, para 512 moléculas, reproduziria as medidas experimentais, o modelo de bicamada lipídica construído foi submetido a uma simulação teste.

As estruturas tridimensionais, obtidas por modelagem comparativa e seu molde, foram inseridas e centralizadas numa caixa de dimensões 126 Å x 128 Å x 66 Å para os sistemas em que apenas as regiões hidrofóbicas foram inseridas e de dimensões 126 Å x 128 Å x 190 Å para inserção das estruturas completas do modelo e molde.

Foi utilizado o campo de força GROMOSffG53a6 do pacote GROMACS (Lindahl *et al.*, 2001), uma versão modificada do campo de força do Gromos96 (Daura *et al.*, 1998), solvatação explícita para água (modelo SPC) (Berendsen *et al.*, 1981).

Aos sistemas foi aplicado o método de *Particle Mesh Ewald* e potencial 6-12 de Lennard-Jones para considerar as interações não ligadas, com raios de 1 nm e 1,4 nm respectivamente. Todas as configurações foram neutralizadas mediante adição de 15 íons de Cl^{-1} . O algoritmo LINCS foi aplicado sobre as ligações covalentes (Hess *et al.*, 1997).

Com passo de integração de 0,002 ps, utilizamos o algoritmo *leap-frog* para integrar as equações de movimento de Newton (Hockney *et al.*, 1974; Svanberg, 1997).

A energia inicial foi minimizada para todos os sistemas, através do método *Steepest descent method*, com número de passos igual a 20.000 e tolerância de 1.000 kJ mol⁻¹ nm⁻¹.

As simulações preliminares (fase de equilibração) foram realizadas durante 10ns, com restrição de movimentos da cadeia principal (*backbone*) da proteína quanto à sua posição, ângulos e distância entre os átomos, orientação e diedros (*restraints*), mediante aplicação de potencial de Hooke com constante de força 1000 kJ/mol/nm².

Essa etapa foi necessária para que os sistemas atinjam um estado de equilíbrio termodinâmico, ou seja, de forma que existam apenas pequenas flutuações nos valores de energia potencial ao logo da simulação. Após a fase de equilibração, os

átomos da proteína foram liberados de sua restrição e submetidos a uma dinâmica por mais 100 ns em duas condições distintas, a primeira sem adição de cátions contendo 15 íons de cloreto e a segunda com adição dos cátions Sódio, Potássio e Cálcio. No total, os sistemas continham 105 cátions e 125 ânions, obtendo carga total do sistema igual a zero.

Todas as simulações utilizaram condições periódicas de contorno em ensemble de Gibbs (NPT), à temperatura fisiológica humana ($T=310\text{K}$) com termostato *v-rescale* (Bussi *et al.*, 2007) e pressão atmosférica (1 bar) com o barostato de Berendsen (Berendsen *et al.*, 1984).

As simulações foram realizadas no Laboratório de Comunicação Celular (LCC) e no laboratório do Grupo de Biofísica Computacional e Modelagem Molecular (GBCMM) do Programa de Computação Científica na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) usando a infraestrutura descrita na seção anexo (tabelas 2 e 3).

A estratégia abordada para realização das etapas de dinâmica molecular foram:

- Simular apenas a região transmembranar do molde e dos modelos, afim de observar possíveis desenovelamentos: esta estratégia foi abordada antes da aquisição dos servidores com GPU, devido ao alto custo computacional necessário para simular o sistema que continha 272 mil átomos. Após a aquisição dos novos servidores (Tabela 3) e das placas gráficas para o cluster (Tabela 2), o poder computacional foi aumentado tanto em número de máquinas quanto em poder de *Hardware*, o que possibilitou simular o sistema utilizando a proteína não seccionada.

- Simular o modelo do receptor P2X7 completo em seu estado aberto. Estas dinâmicas foram realizadas utilizando as seguintes etapas:

- Sistema com restrição de movimentos da proteína, mantendo o canal constantemente aberto, para verificar a passagem de moléculas de água, desde a solução aquosa até a luz do canal, através das janelas laterais.
- Sistema sem restrição de movimentos da proteína, para avaliar o possível fechamento do canal e suas características.
- Dois sistemas com restrição de movimentos da proteína e adição de íons. No primeiro sistema os íons de potássio foram colocados

a 2Å de distância dos resíduos G316, G646 e G976, localizados na região mais estreita do canal. No segundo sistema íons de cloro foram adicionados nas mesmas coordenadas utilizadas para o sistema descrito anteriormente.

- Os sistemas com adição de íons (Cloro e Potássio) foram simulados sem restrições espaciais para analisar a influência dos movimentos da proteína na velocidade de difusão e seletividade do canal.
- Sistemas com adição de íons, sem restrição de movimentos da proteína em presença de um campo elétrico (simulando um potencial de membrana) de intensidade constante de 0,046 V/nm, valor calculado a partir dos dados experimentais (Filippov *et al.*, 2003; Kucerka *et al.*, 2005; Kučerka *et al.*, 2006).

Para melhor compreensão, o posicionamento dos íons catiônicos e aniônicos é representado na Figura 11. Após a adição de íons os sistemas foram minimizados utilizando os parâmetros descritos previamente.

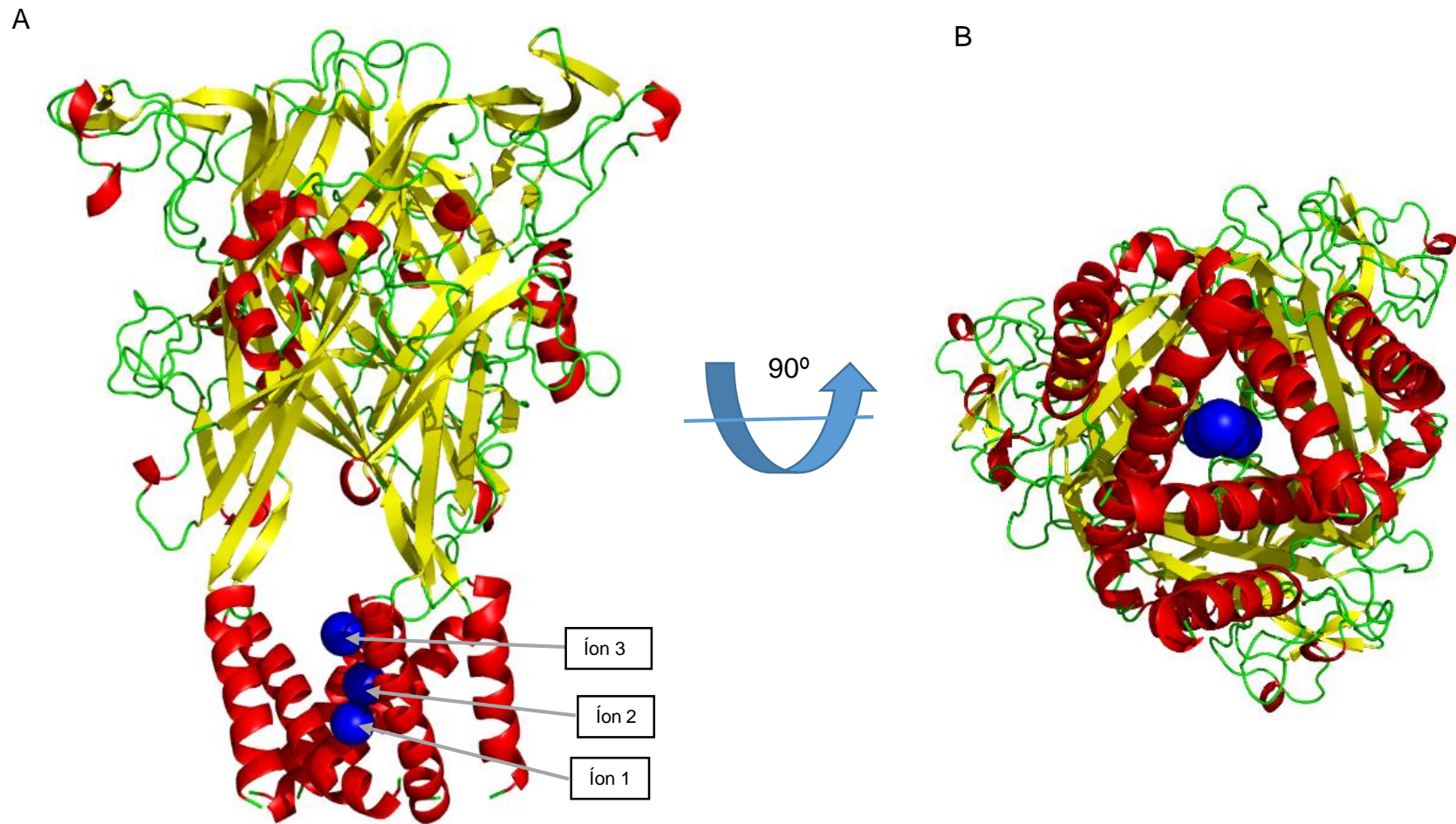


Figura 12: Posicionamento dos íons na luz do canal iônico. Modelo do receptor P2X7 construído. (A) Visão lateral do receptor. (B) Visão inferior do receptor (região intracelular). Em azul, a posição dos íons de Potássio e de cloro na luz do canal, em vermelho amarelo e verde as conformações alfa, beta e *coils*, respectivamente.

3.2.4 Análises das simulações de dinâmica molecular

Através dos inúmeros programas de análise contidos no pacote GROMACS é possível analisar os dados obtidos das dinâmicas moleculares. Dentre as ferramentas encontradas no pacote *GROMACS foram utilizados*:

- **g_energy**: Através deste programa é possível extrair as informações das energias do sistema ao longo do tempo de simulação. Para as interações não ligadas, computamos os valores de energia de Lennard-Jones de curto (LJ-SR) e longo (LJ-LR) alcances, e a contribuição de Lennard-Jones em pares (LJ-14). Analogamente, foram analisadas as interações de Coulomb de curto e longo alcance.
- **g_gyrate**: Ferramenta para calcular o raio de giro segundo a expressão [1]. Este valor representa o nível de compactação da proteína ao longo de tempo de dinâmica.

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

onde “ r_i ” representa a posição do átomo “ i ” em relação ao centro de massa da proteína e “ m_i ” a massa do átomo “ i ”.

- **g_rms**: Ferramenta para calcular a raiz do desvio médio quadrático (*RMSD – Root Mean Square Deviation*) entre duas estruturas moleculares. O programa é capaz de calcular quanto uma estrutura se desvia de sua conformação de referência durante todo o período de simulação (Pronk *et al.*, 2013). Quanto mais altos os valores de RMSD, maior será o desvio de sua estrutura em relação à conformação inicial ou de referência. O valor de RMSD é obtido através da expressão:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n (x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2 + (z_i - z_j)^2} \quad [3]$$

Sendo n o número de átomos do sistema, x, y, z as coordenadas espaciais do sistema e i, j átomos respectivos.

- ***g_rmsf***: Este programa calcula a flutuação da raiz do desvio médio Quadrático (*RMSF – Root Mean Square Fluctuation*), auxiliando na busca de regiões flexíveis e complementando as informações obtidas pelo cálculo de *RMSD*. Está correlacionado com o fator de temperatura através das expressões:

$$B_i = 8\pi^2 U_i^2 \quad [4]$$

$$RMSF = \sqrt{\frac{(3 \times B_{factor})}{10 (8\pi)^2}} \quad [5]$$

- ***do_dssp***: o *Dicionário de Estruturas Secundárias de Proteínas (DSSP)* é uma ferramenta contida no pacote *GROMACS* capaz representar graficamente a evolução ao longo do tempo das estruturas secundárias de uma proteína (Pronk *et al.*, 2013). As estruturas secundárias são representadas por diferentes cores ao longo do eixo y (resíduos da proteína) do gráfico. Este método realiza uma leitura da posição dos átomos do *backbone* da proteína utilizando os dados contidos nos arquivos de coordenadas dos átomos (Joosten *et al.*, 2011). Através do cálculo de energia das ligações de hidrogênio e seguindo os padrões de número de ligações por resíduos são determinadas as estruturas secundárias mais prováveis para cada resíduo. As α -hélice, 5 -hélice e 3_{10} hélice podem apresentar sequências de ligações de hidrogênio entre 3 a 5 resíduos, as estruturas do tipo *bend* são identificadas por sua alta liberdade conformacional. Já a estrutura folhas- β forma ligações de hidrogênio em conjunto entre os aminoácidos enquanto a β -bridge é reconhecida por realizar apenas uma ligação entre os resíduos. As estruturas não

identificadas são determinadas como *coils* (Kabsch e Sander, 1983; Klose *et al.*, 2010).

- ***g_cluster***: Esta ferramenta do pacote *GROMACS* agrupa posições similares de uma simulação em uma estrutura clusterizada (Pronk *et al.*, 2013). Quanto menor o número de estruturas clusterizadas, menor será a variação conformacional da estrutura. Por se tratar de um método de exclusão, a estrutura isolada fará parte apenas de um cluster de estruturas (Daura *et al.*, 1998).

Para avaliar a perda de solvatação, utilizamos o cálculo do número de coordenação entre dois grupos. Neste caso, este cálculo avalia as distâncias entre o centro de massa do íon e o centro de massa dos átomos de oxigênio da água segundo a equação abaixo:

$$C(\text{grupo1}) = \sum_{j>i} \frac{1-(|x_i - x_j|/d_0)^n}{1-(|x_i - x_j|/d_0)^m} \quad [6]$$

onde os termos d_0 é o raio de corte de 4 Å, n e m são expoentes que controlam as interações de longo alcance, que neste trabalho configurados para 6Å e 12Å, respectivamente (Iannuzzi *et al.*, 2003).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Modelagem Comparativa

4.1.1 Busca por estruturas homólogas

Foi realizada uma busca por homólogos utilizando o BLAST-p, baseado no PDB e nove estruturas foram reportadas. Cinco possuíam cobertura menor que 30% (1E3D_B, 1E6V_B, 3LIJ_A, 3ND2_A, 2BPT_A) e não foram consideradas para a construção do modelo da proteína P2X7. As outras quatro estruturas com cobertura de 56%, (3I5D_A, 4DW1_A, 3H9V_A, 4DW0_A), são referentes a um mesmo receptor purinérgico da espécie *Danio rerio* (Tabela 4).

Destas quatro estruturas, escolhemos as de melhor resolução, 2,9Å para o receptor P2X4 em seu estado fechado (4DW0) e 2,8Å para o mesmo receptor em seu estado aberto (4DW1) (Tabela 4).

Tabela 2: Estruturas encontradas como potenciais moldes para modelagem comparativa do P2X7 humano

PDB	Max score	Total score	Query Cover	E-value	Ident
4DW0_A	315	315	56%	3e-101	47%
3H9V_A	314	314	56%	6e-101	47%
4DW1_A	313	313	56%	7e-101	47%
3I5D_A	314	314	56%	7e-101	47%
1E3D_B	32,0	32,	14%	1,7	30%
1E6V_B	30,4	30,4	19%	4,2	25%
3LIJ_A	30,4	30,4	14%	4,5	24%
3ND2_A	30,4	30,4	21%	7,2	23%
2BPT_A	30,4	30,4	21%	7,3	23%

As duas estruturas apresentaram valores de 47% de identidade, 64% de similaridade entre as sequências e 4% de regiões de *gaps*. Apenas os valores de *E-value* obtiveram resultados diferentes, $3e-101$ para o estado fechado e $7e-101$ para o estado aberto.

4.1.2 Comparação sequencial entre receptores P2X7 (humano) e P2X4 (*Danio rerio*)

Para construir o modelo do receptor P2X7 foram alinhadas as sequências molde e alvo, utilizando o servidor CLUSTALW2 e como resultado foi obtido o seguinte alinhamento (Figura 12) (Thompson *et al.*, 2002; McWilliam *et al.*, 2013).

As regiões N-terminal e C-terminal do receptor P2X7 humano foram seccionadas, 20 resíduos para o N-terminal e 253 resíduos para o C-terminal. Isto foi feito dada a existência de extensas regiões de *gap*, encontradas nas extremidades do alinhamento. Assim, obtivemos melhor pontuação e igualamos o número de resíduos para construção do modelo.

4.1.3 Construção do Modelo

Utilizando o *software Modeller*, foram criados trezentos modelos do receptor P2X7 humano. Destes trezentos, foram escolhidos dois modelos, sendo um para seu estado fechado e o outro para o estado aberto.

Tanto as estruturas do molde como as dos modelos criados (Figura 13) foram submetidas aos servidores *online* de validação estrutural, para fins de comparação dos resultados. Após submissão, foi possível realizar análises de estereoquímica e físico-química.

P2X7	M P A C C S C S D V F Q Y E T N K V T R I Q S M N Y G T I K W F F H V I I	37
P2X4 G S S K K V G T L N R F T Q A L V	17
P2X7	F S Y V C . F A L V S D K L Y Q R K E P V I S S V H T K V K G I A E V K E	73
P2X4	I A Y V I G Y V F V Y N K G Y Q D T D T V L S S V T T K V K G I A L T K T	54
P2X7	E I V E N G V K K L V H S V F D T A D Y T F P L Q G N . S F F V M T N F L	109
P2X4	S E L G E R I W D V A D Y I I P P Q E D G S F F V L T N M I	84
P2X7	K T E G Q E Q R L C P E E Y P T R R T L C S S D R G C K K G W M D P Q S K G	146
P2X4	I T T N Q T Q S K C A E N P T P A S T C T S H R D C K R G F N D A R G D G	121
P2X7	I Q T G R C V V Y E G N Q K T C E V S A W C P I E A V E E A P R P A L L N	183
P2X4	V R T G R C V S Y S A S V K T C E V L S W C P L E K I V D P P N P P L L A	158
P2X7	S A E N F T V L I K N N I D F P G H N Y T T R N I L P G L N . . . I T C	216
P2X4	D A E R F T V L I K N N I R Y P K F N F N K R N I L P N I N S S Y L T H C	195
P2X7	T F H K T Q N P Q C P I F R L G D I F R E T G D N F S D V A I Q G G I M G	253
P2X4	V F S R K T D P D C P I F R L G D I V G E A E E D F Q I M A V R G G V M G	232
P2X7	I E I Y W D C N L D R W F H H C R P K Y S F R R L D D K T T N V S L Y P G	290
P2X4	V Q I R W D C D L D M P Q S W C V P R Y T F R R L D N K D P D N N V A P G	269
P2X7	Y N F R Y A K Y Y K E N N . V E K R T L I K V F G I R F D I L V F G T G G	326
P2X4	Y N F R F A K Y Y K N S D G T E T R T L I K G Y G I R F D V M V F G Q A G	306
P2X7	K F D I I Q L V V Y I G S T L S Y F G L A A V F I D F L I D T Y S S N C C	363
P2X4	K F N I I P T L L N I G A G L A L L G L V N V I C D W I V L T F M K . . .	340
P2X7	R S H I Y P W C K C C Q P C V V N E Y Y Y R K K C E S I V E P K P T L K Y	400
P2X4	340
P2X7	V S F V D E S H I R M V N Q Q L L G R S L Q D V K G Q E V P R P A M D F T	437
P2X4	340
P2X7	D L S R L P L A L H D T P P I P G Q P E E I Q L L R K E A T P R S R D S P	474
P2X4	340
P2X7	V W C Q C G S C L P S Q L P E S H R C L E E L C C R K K P G A C I T T S E	511
P2X4	340
P2X7	L F R K L V L S R H V L Q F L L L Y Q E P L L A L D V D S T N S R L R H C	548
P2X4	340
P2X7	A Y R C Y A T W R F G S Q D M A D F A I L P S C C R W R I R K E F P K S E	585
P2X4	340
P2X7	G Q Y S G F K S P Y	595
P2X4	340

Figura 13: Alinhamento de sequencias utilizando o servidor clustalW2. Os gaps extensos revelam a ausência dos terminais N e C do receptor P2X4. Para construção do modelo foi utilizado o alinhamento sem considerar as porções terminais.

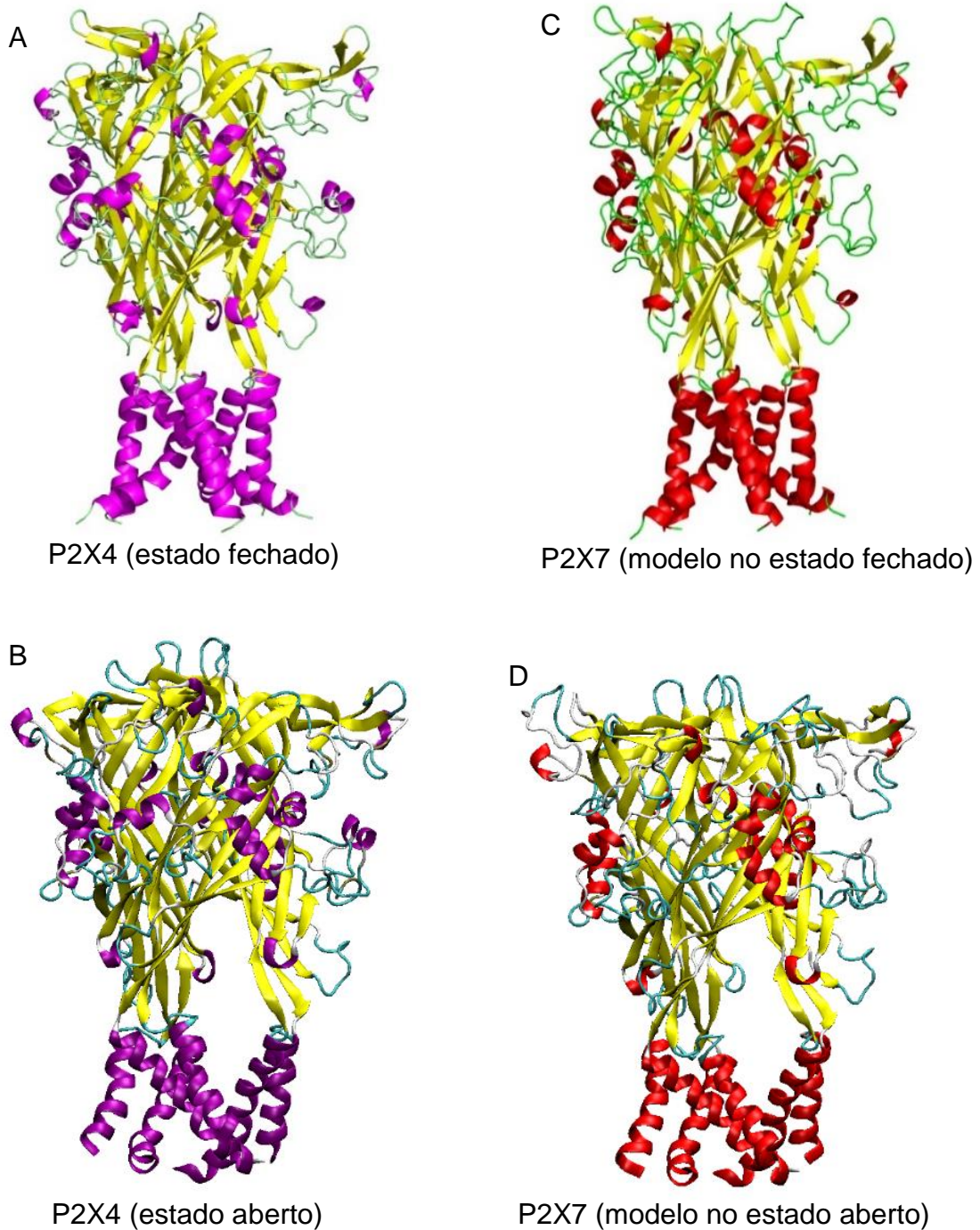


Figura 14: Estruturas molde e modelo representadas em cartoon. (A) Estruturas cristalográficas do receptor P2X4 nos estados fechado e (B) no estado aberto. (C) modelo do receptor P2X7 no estados fechado (C) e (D) no estado aberto. As estruturas apresentaram valores de RMSD de 0,35 Å e 0,42 Å para o estado fechado e aberto, respectivamente.

4.1.4 Análise da Qualidade Estereoquímica

Para analisar a qualidade estereoquímica dos modelos utilizamos o programa PROCHECK. Os resultados observados no gráfico de Ramachandran revelaram 92% dos resíduos em regiões mais favoráveis e 7% dos resíduos em regiões adicionais permitidas para o receptor P2X4 em seu estado fechado (Figura 14A).

Resultados semelhantes foram observados para o receptor P2X7 no estado fechado, sendo que 92% dos resíduos localizam-se em regiões mais favoráveis, 6% em regiões adicionais permitidas, 0,5% em regiões generosamente permitidas. Diferenciando-se apenas na adição de 0,1% dos resíduos em regiões não permitidas.

Na etapa de validação identificamos a necessidade de refinamento de algumas regiões de loops do modelo, regiões de maior flexibilidade que pode influenciar expressivamente o processo de refinamento.

Após o refinamento destas regiões, percebemos melhorias no modelo detectadas pelo servidor PROCHECK, no qual podemos observar que 95,2% dos resíduos encontravam-se em regiões mais favoráveis e 4% em regiões adicionais permitidas. Por outro lado, foi encontrado um aumento do número de resíduos em regiões generosamente permitidas e não permitidas, 0,7% e 0,1%, respectivamente (Figura 14B).

As estruturas no estado aberto apresentaram valores menos favoráveis, visto que o estado aberto da estrutura é uma fase transitória e possui maior liberdade conformacional em comparação à estrutura no estado fechado.

O receptor P2X4 aberto apresentou valores de 91,1% dos resíduos em regiões mais favoráveis e 8,9% dos resíduos em regiões adicionais permitidas (Figura 15A). Para o receptor P2X7 aberto, 90,3% dos resíduos estão localizados em regiões mais favoráveis, 6% adicionais permitidas, 1% em regiões generosamente permitidas e mais 1% para as regiões não permitidas.

Novamente, o refinamento da estrutura do receptor P2X7 aumentou a porcentagem de resíduos em regiões mais favoráveis para 92,5%. As regiões generosamente permitidas e as regiões não permitidas alteraram seus valores para 1,2% e 1%, respectivamente. Já a região adicionalmente permitida diminuiu para 5,5% (Figura 14D).

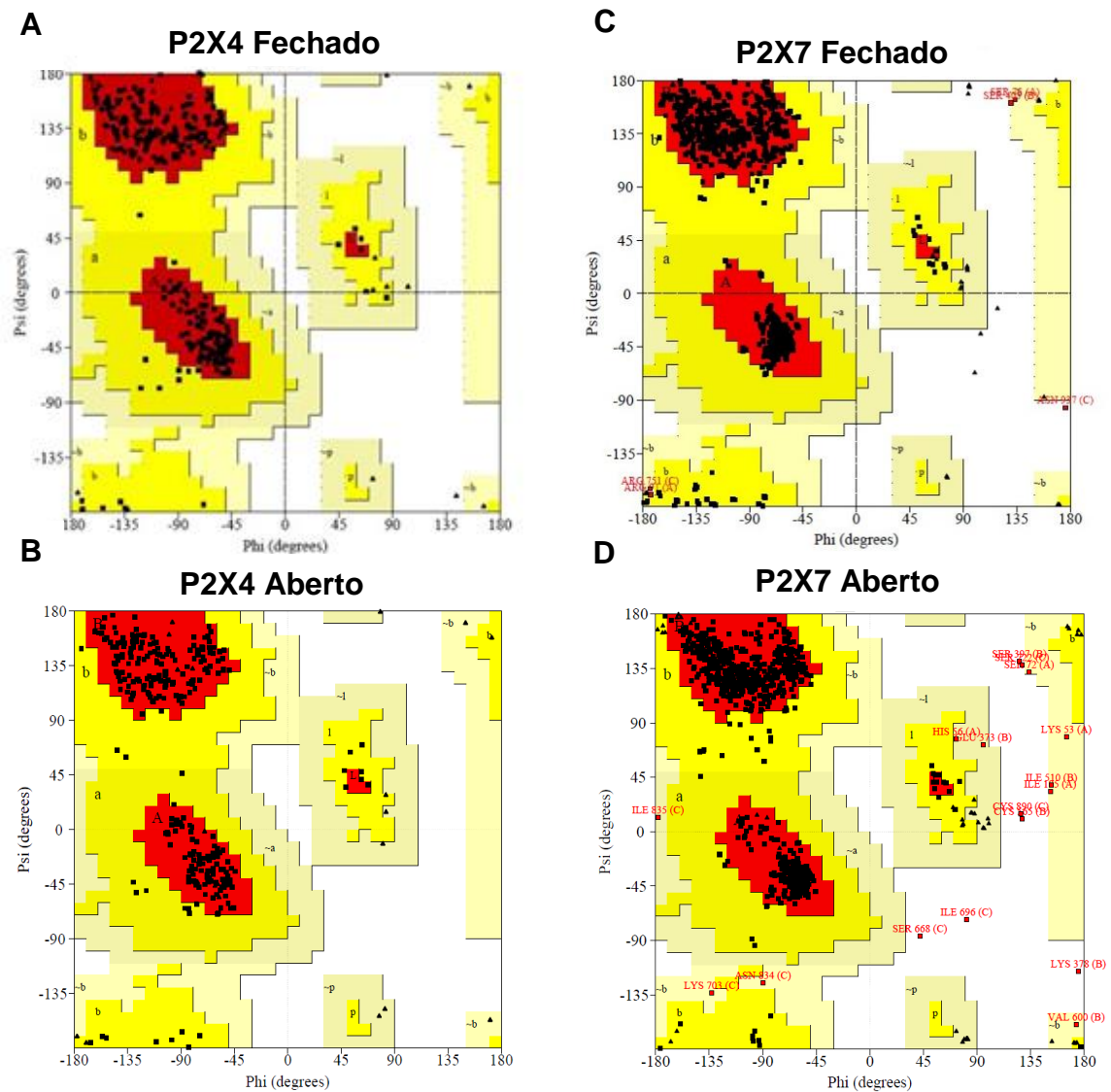


Figura 15: Gráfico de Ramachandran molde e modelo dos receptores P2X. (A) e (B) P2X4 em seu estado fechado e aberto respectivamente. (C) e (D) P2X7 em seu estado fechado e aberto respectivamente. Os gráficos (C) e (D) são referentes as estruturas pós refinamento de loops.

4.1.5 Otimização De Regiões De Loop

Para otimizar os modelos nas regiões mais flexíveis utilizamos conjuntamente os resultados do servidor ERRAT, e *DOPE* gerado pelo programa *Modeller*. O servidor ERRAT reportou resultados não satisfatórios sobre a qualidade de algumas regiões de *loops*, revelando a necessidade de refinamento dos modelos construídos.

Foram observados na estrutura quaternária, formada pelo arranjo das três subunidades P2X7, regiões de loop estruturalmente desfavoráveis (99% de confiança de rejeição) contendo ao todo 246 resíduos, sendo 82 por cada subunidade da proteína (Figura 16).

O gráfico *DOPE*, gerado com o modelo fornecido pelo programa revelou regiões com padrões energéticos discrepantes entre o molde e o modelo para ambos os estados (aberto e fechado). Paralelamente, estas regiões também foram indicadas para refinamento pelo servidor ERRAT (Figura 17).

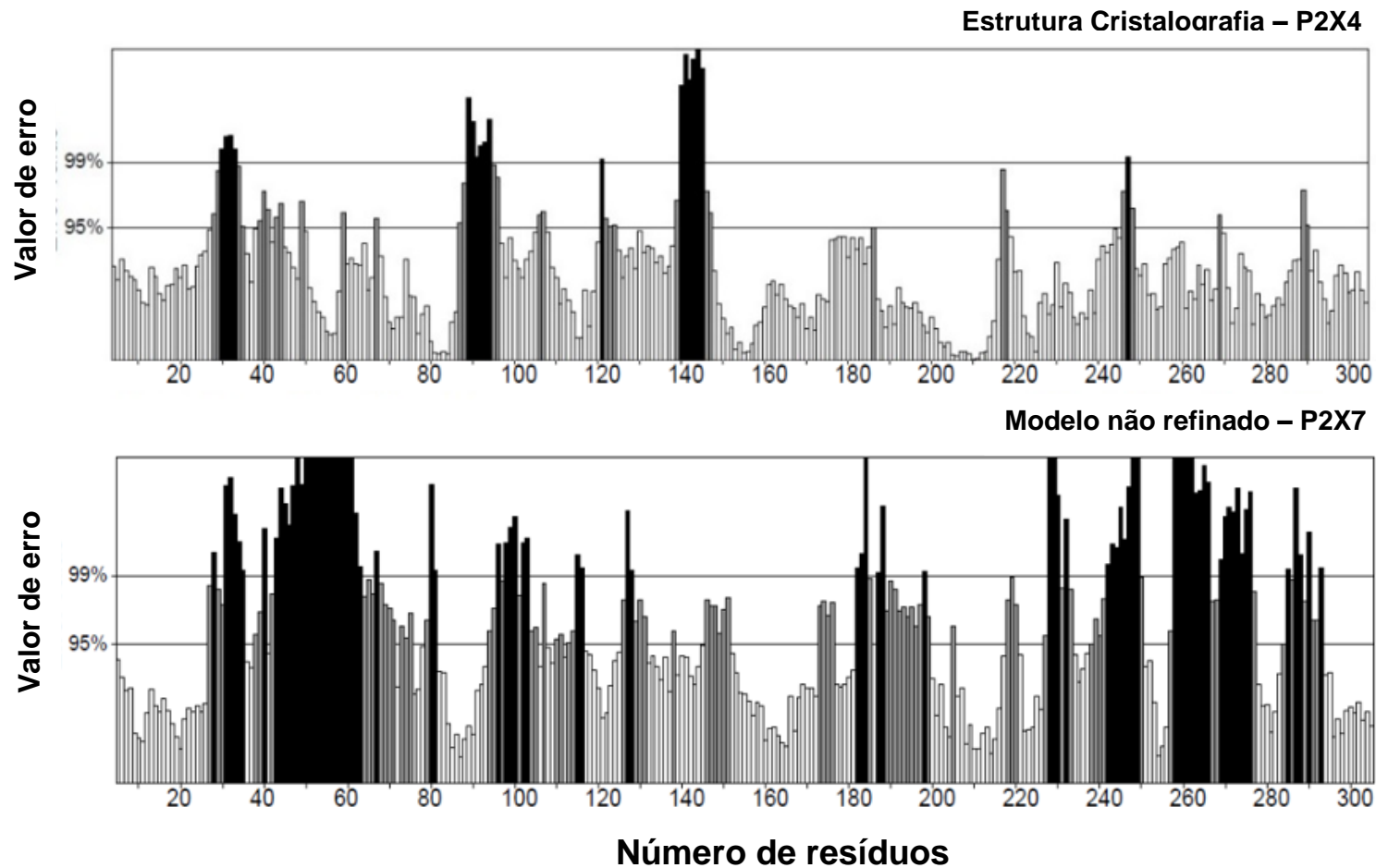


Figura 16: Avaliação da qualidade do molde e do modelo (servidor ERRAT). As regiões das estruturas que podem ser rejeitadas com uma confiança de 99% encontram-se na cor preto, as regiões rejeitadas com uma confiança de 95%, em cinza. Valores mais baixos representam maior confiança na estruturação das regiões.

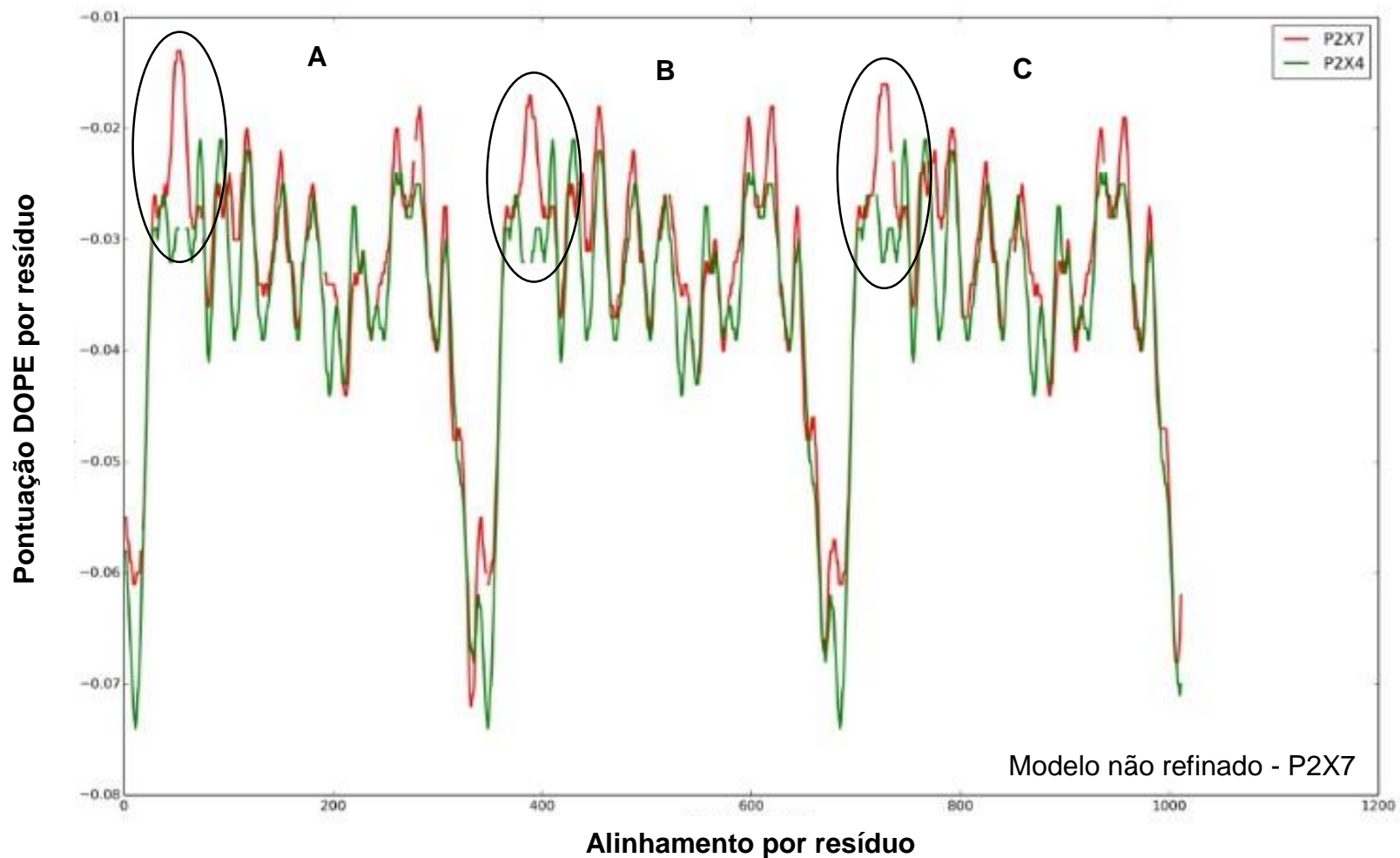


Figura 17: Gráfico DOPE dos perfis energéticos do molde P2X4 (verde) e do modelo P2X7 (vermelho) antes do refinamento. Em destaque (A, B, C), as regiões apontadas com necessidade de refinamento. Região (A) resíduos 46 a 58 (*-KEEIVENGVKKLV-*). (B) resíduos 376 a 389 (*-KEEIVENGVKKLVH-*). (C) resíduos 706 a 719 (*-KEEIVENGVKKLVH-*).

Os resíduos correspondentes às regiões discrepantes (Figura 18) se detalham na Tabela 5. Estas três regiões se localizam na alça extracelular da proteína e interferem diretamente em regiões muito próximas da bicamada (~5Å).

Após o refinamento das três regiões destacadas acima, os modelos do receptor P2X7 em ambos os estados foram novamente submetidos aos servidores de análise.

Os novos resultados obtidos pelo servidor ERRAT mostraram que o processo de refinamento das regiões diferenciadas promoveu a otimização da estruturação do modelo como um todo (Figura18). A otimização também se evidenciou através dos gráficos DOPE (Figura 19). Entretanto, as regiões diferenciadas existentes entre as estruturas P2X4 e P2X7 não se otimizaram tanto quanto o restante da proteína, mesmo sendo a região diretamente refinada.

Possivelmente este comportamento deve-se ao fato do P2X7 ser semelhante ao P2X4, porém possui características que os diferenciam (citadas no item 1.5). Estas características podem estar ligadas ao perfil estrutural e energético da proteína, revelando as diferenças encontradas entre os perfis DOPE do molde e do modelo.

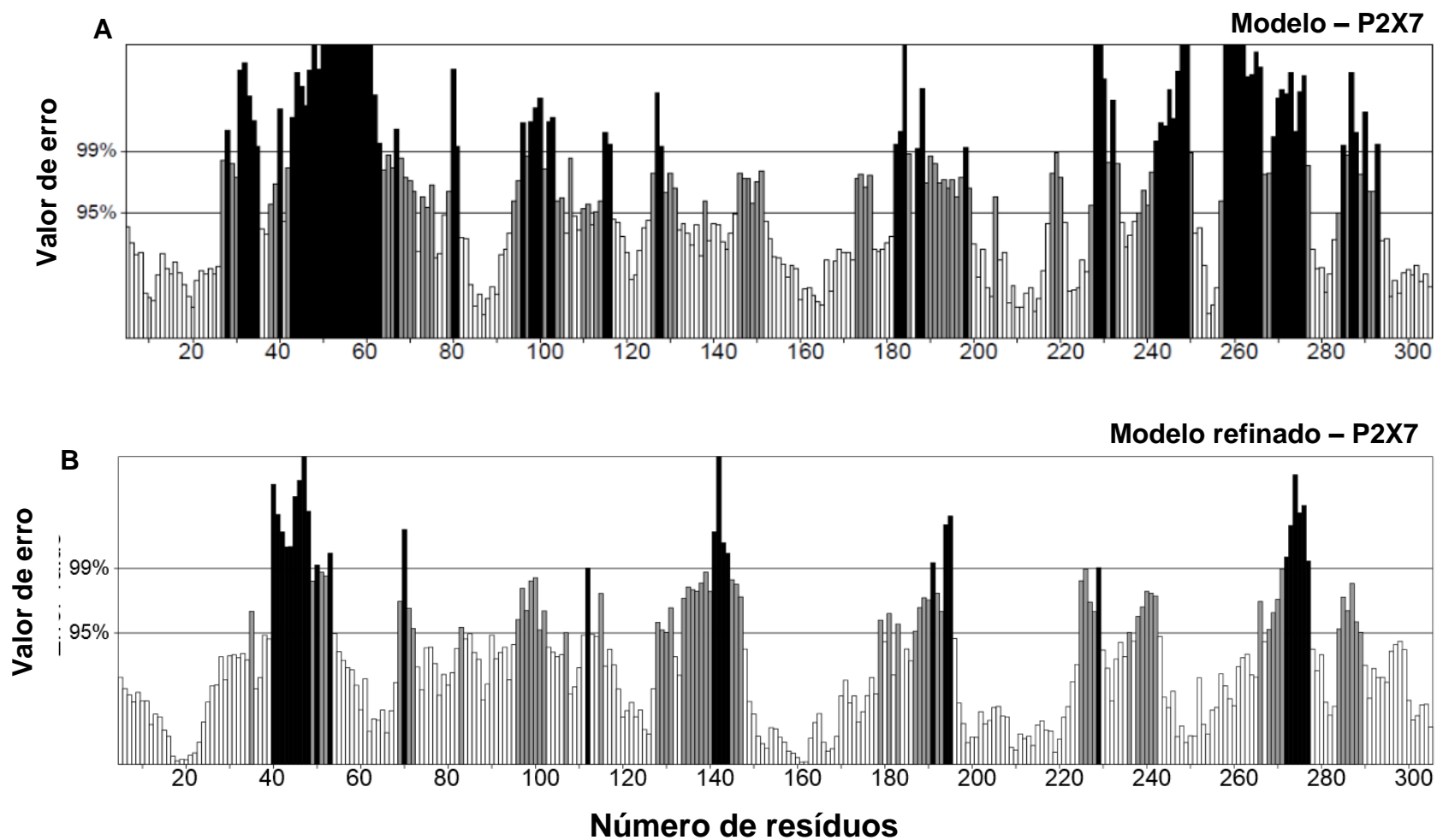


Figura 18: Análise da estrutura do modelo P2X7 na configuração aberta segundo o servidor ERRAT. (A) estrutura não refinada, (B) estrutura refinada. A redução das barras pretas revela o refinamento de resíduos em diversas regiões onde não foram alterados os loops no refinamento.

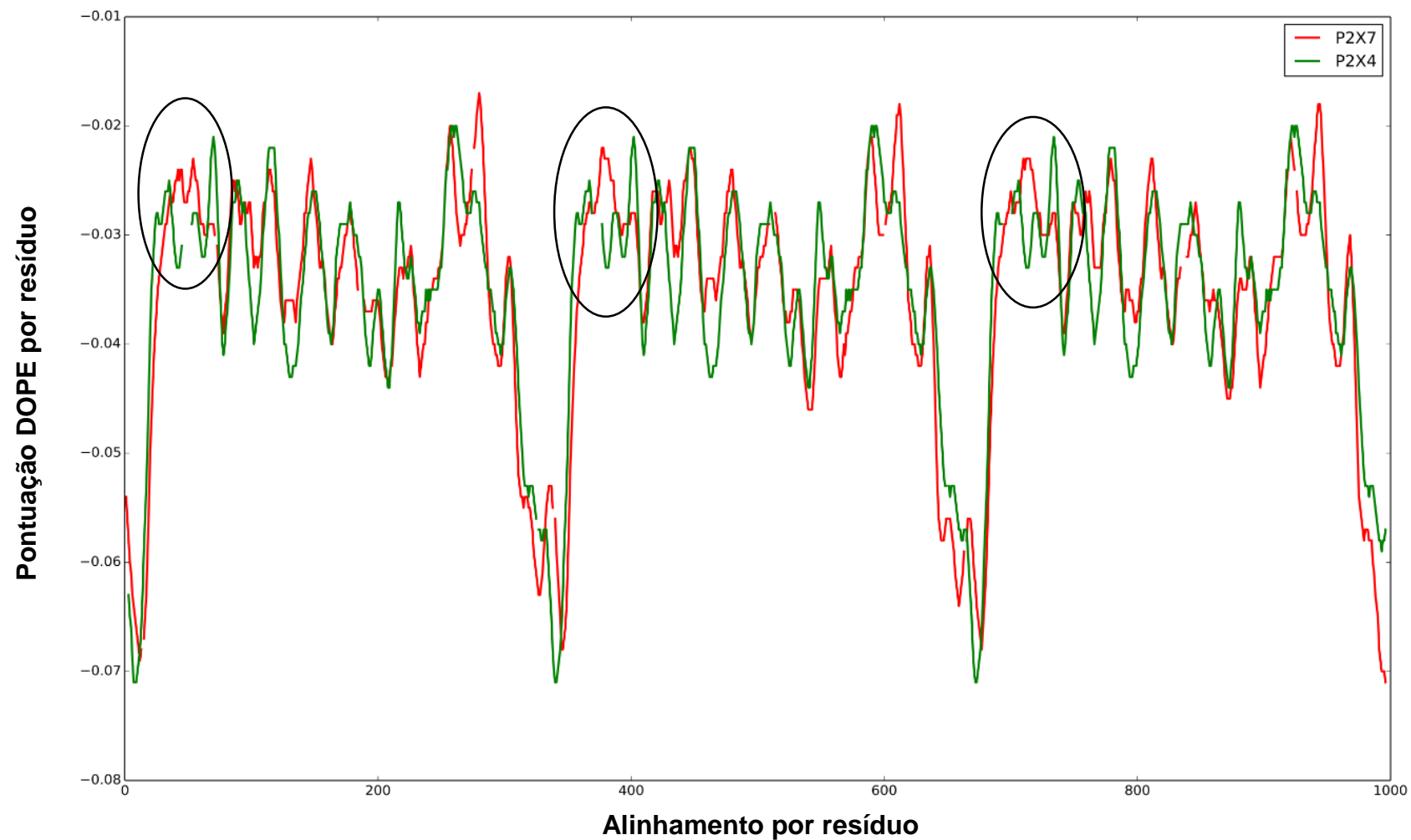


Figura 19: Gráfico DOPE comparando a diferença entre os perfis energéticos do molde e do modelo refinado, construídos a partir do *Modeller*. Em verde, o perfil energético do molde (P2X4) e em vermelho, o perfil energético do modelo (P2X7).

Posteriormente ao processo de otimização, foi possível observar um aumento da estruturação de folha beta nas três regiões refinadas para o receptor P2X7 no seu estado aberto. Os valores de RMSD entre as estruturas inicial e otimizada foram de 0,643Å para o estado aberto e de 0,321Å para o estado fechado (Figura 20).

Esta tendência das regiões otimizadas se estruturarem em folha- β é um reflexo das diferenças de liberdade conformacional entre os estados aberto e fechado da proteína. Esta característica corrobora com dados experimentais, onde é descrito que o estado aberto da proteína atua como um período transitório e o estado fechado como um período de maior duração (repouso) (Kawate *et al.*, 2011; Browne *et al.*, 2013; Samways *et al.*, 2014).

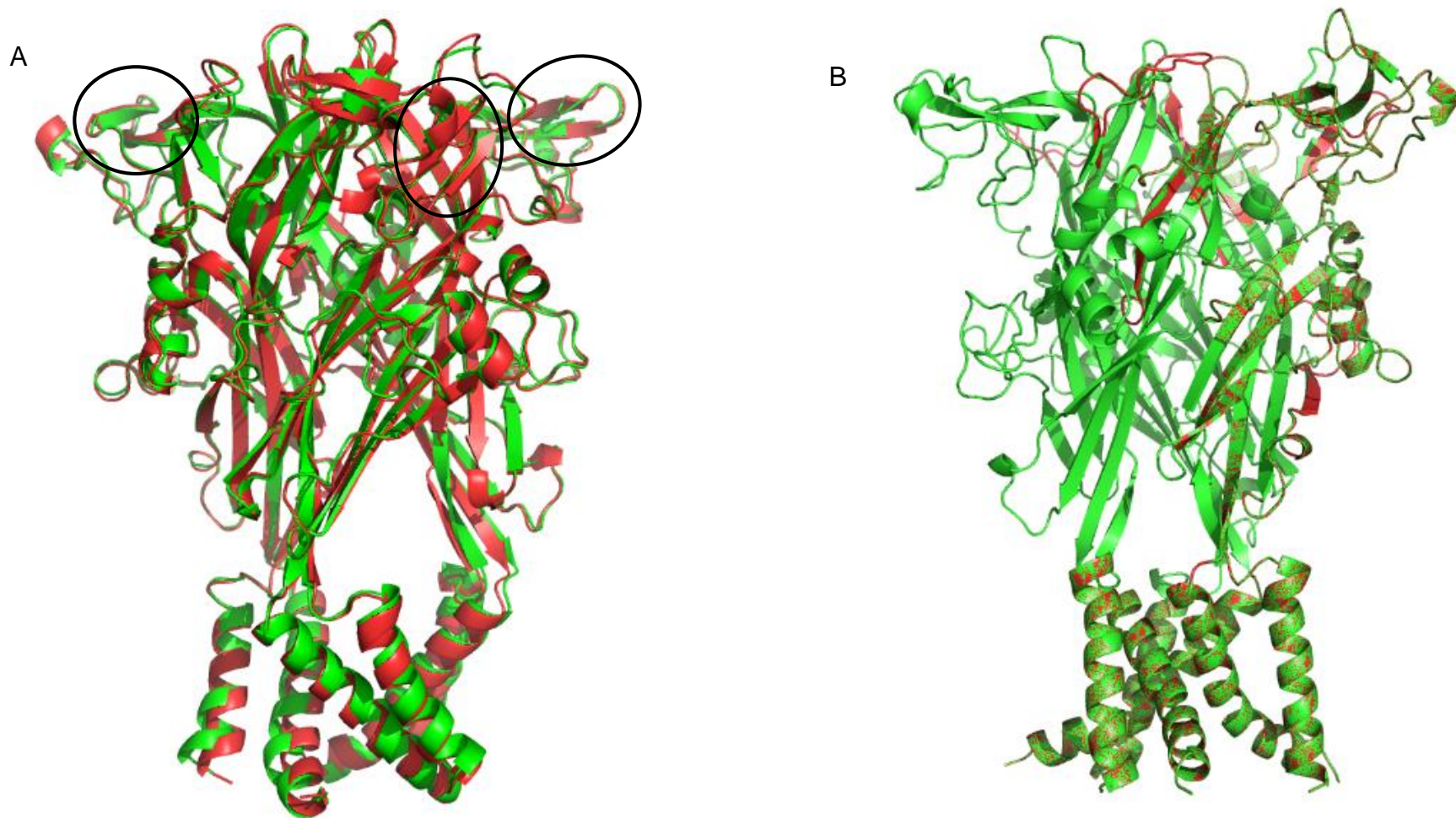


Figura 20: Alinhamento estrutural dos modelos do P2X7. (A) estruturas no estado aberto. (B) estruturas no estado fechado. Nos círculos encontram-se as regiões onde as estruturas configuradas em beta aumentaram após o refinamento de loops. Em vermelho as estruturas refinadas, em verde as não refinadas.

4.2 Dinâmica molecular

4.2.1 Validação do sistema de bicamada lipídica

Após uma dinâmica molecular de 80ns do sistema de bicamada lipídica (DPPC), analisamos os parâmetros característicos de membrana. Os dados experimentais (Filippov *et al.*, 2003; Kucerka *et al.*, 2005; Kučerka *et al.*, 2006) foram comparados com os parâmetros de espessura média, difusão lateral e área por lipídeo e também provenientes de simulações prévias (Kukol, 2009). As simulações realizadas por Kukol e colaboradores também utilizaram o campo de forças GROMOSff.53⁶.

Como os resultados obtidos foram similares aos dados experimentais e ao estudo de modelagem prévio, (Tabela 3 e 4), iniciamos o processo de inserção das proteínas no sistema de bicamada lipídica.

Tabela 3: Valores de área por lipídeos em nm²

Autor	Kukol <i>et al</i>	Simulado	Tristam <i>et al</i>
Dados	0,436 – 0,623 ± 0,011	0,530–0,667 ± 0,023	0,64

Tabela 4: Valores de Densidade de lipídeos (10⁻⁸ cm² S⁻¹)

Autor	Kukol <i>et al</i>	Simulado	Kucerka <i>et al</i>
Dados	6,8 – 8,2 ± 0,6	5,3 – 7,9 ± 0,8	9,7

Com valores médios de espessura da bicamada de $3,24 \pm 0,32$ nm e área por lipídeos de $0,632$ nm², alcançamos valores muito próximos aos obtidos em simulações realizadas por Kukol 2009 (Kukol, 2009).

O gráfico de densidade de lipídeos revelou que os perfis hidrofóbicos e hidrofílicos do sistema foram bem reproduzidos pela simulação (Figura 21). Neste sentido, as moléculas de água não invadiram o meio hidrofóbico formado pelas moléculas de DPPC bem como as interações entre os lipídeos não foram desfeitas. Não foram detectadas alterações significativas para descaracterizar a estrutura de um sistema de bicamada lipídica padrão. Ao final de 80 ns de simulação, observamos que o sistema amplificado manteve as características de membrana lipídica (Figura 22).

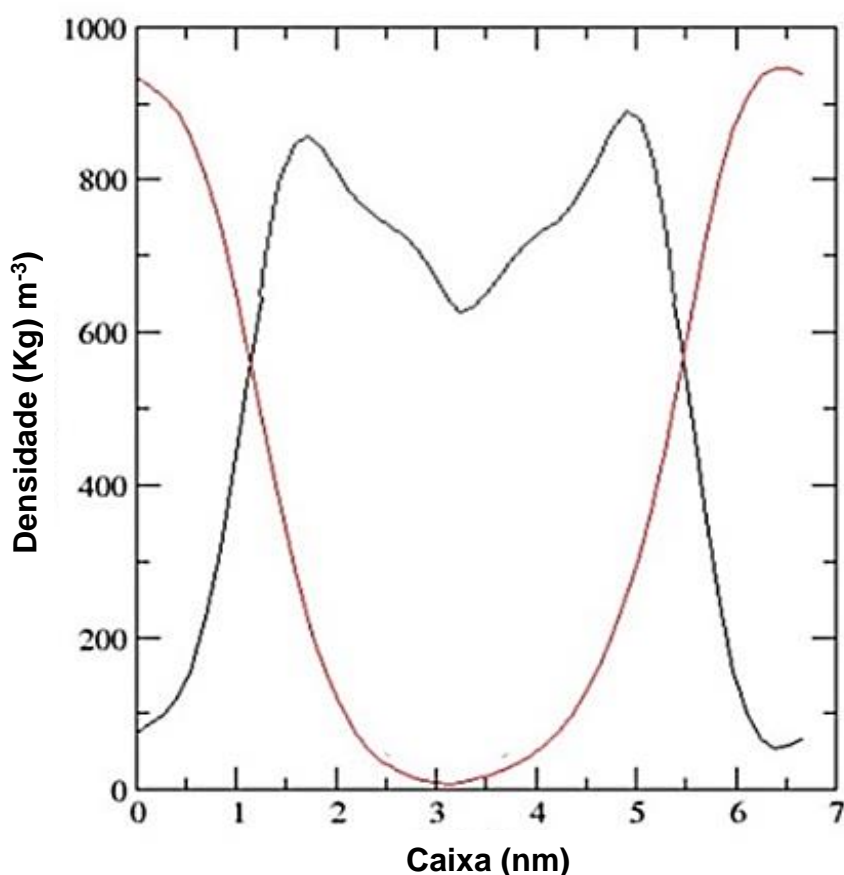
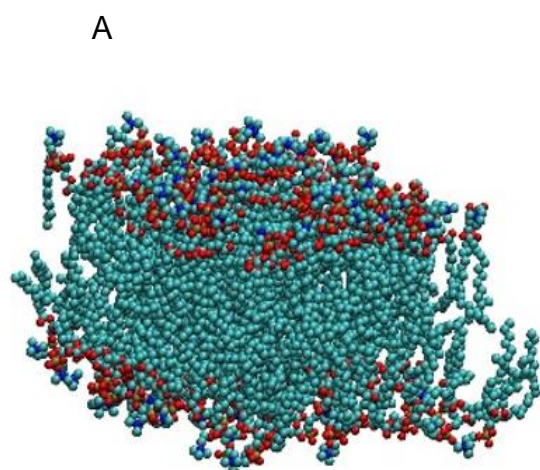
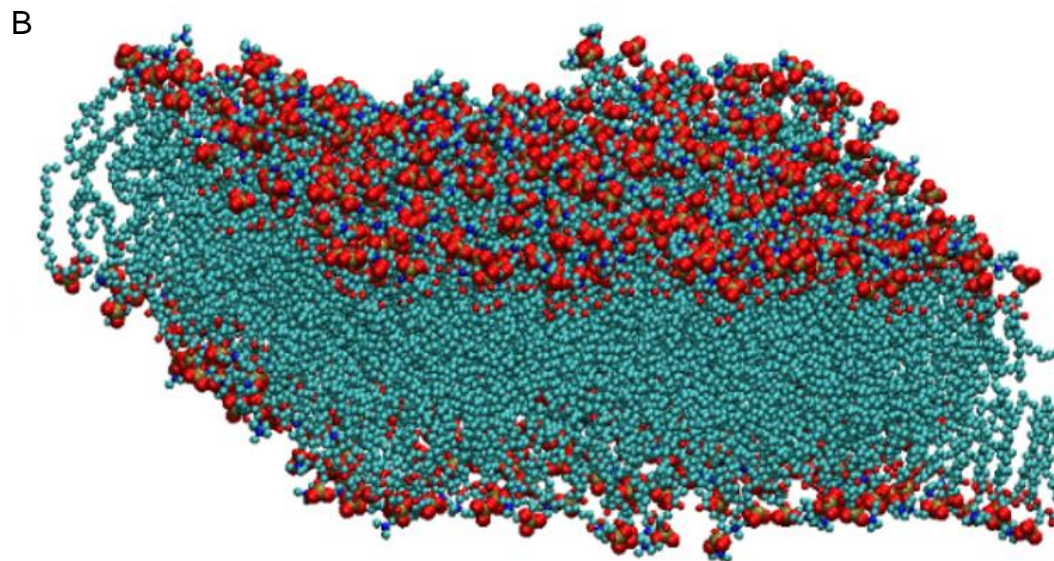


Figura 21: Análise da densidade parcial do sistema simulado. Os lipídeos DPPC (linha preta) e água (linha vermelha) foram analisados após 80 ns de simulação.



128 Moléculas de DPPC



512 Moléculas de DPPC

Figura 22: Resultado da ampliação do sistema de bicamada lipídica. (A) Modelo de bicamada lipídica de DPPC proposto por (Kukol, 2009). (B) Sistema utilizado neste trabalho, amplificado 4 vezes em relação ao sistema em (A). Os átomos de carbono das moléculas de DPPC estão representados em ciano e os átomos de oxigênio e fósforo das cabeças polares, em vermelho.

4.2.2 Inserção da região TM do modelo do receptor P2X7 ao sistema de bicamada lipídica

Para a inserção da porção hidrofóbica do receptor P2X7 na membrana, o segmento de proteína foi comprimido a 90% de seu tamanho original, e posteriormente insuflado. O processo de compressão e restauração foi completado em 4 ps (Figura 23). Foram removidas 6 moléculas de DPPC do sistema inicial.

4.3 Inserção da proteína em bicamada lipídica

A inserção da proteína no sistema de bicamada lipídica foi realizada de maneira satisfatória (Figura 23). Foi possível observar a reestruturação da parte transmembranar do receptor visto que o RMSD entre os quadros iniciais e finais foi de 0,073Å.

Segundo análise da energia de interação, foi verificado que os lipídeos e a proteína se posicionaram de maneira eficiente, dado que houve um decréscimo dos valores, variando de -5.887 kJ/mol para -8.275 kJ/mol. Por outro lado, é sabido que a otimização desses átomos resulta em uma diminuição do tempo de equilibração do sistema (Wolf *et al.*, 2010).

Para a inserção do modelo completo (não seccionado) do receptor P2X7, houve diferenças no número de moléculas de DPPC removidas entre os estados aberto e fechado do modelo. Foram removidas seis moléculas de DPPC para o estado fechado e oito para o estado aberto. Este aumento no número de moléculas de DPPC removidas no estado aberto se deve ao fato de seu maior raio de giro em região transmembranar, quando comparada ao estado fechado.

Com a inserção da proteína na bicamada lipídica, as configurações iniciais para as simulações da proteína completa em seu estado aberto e com adição do solvente explícito se mostra na Figura 24. O número de átomos do solvente no sistema foi de 190.325, representando em uma concentração de solvente de 80% do sistema, se assemelhando à concentração fisiológica do organismo humano.

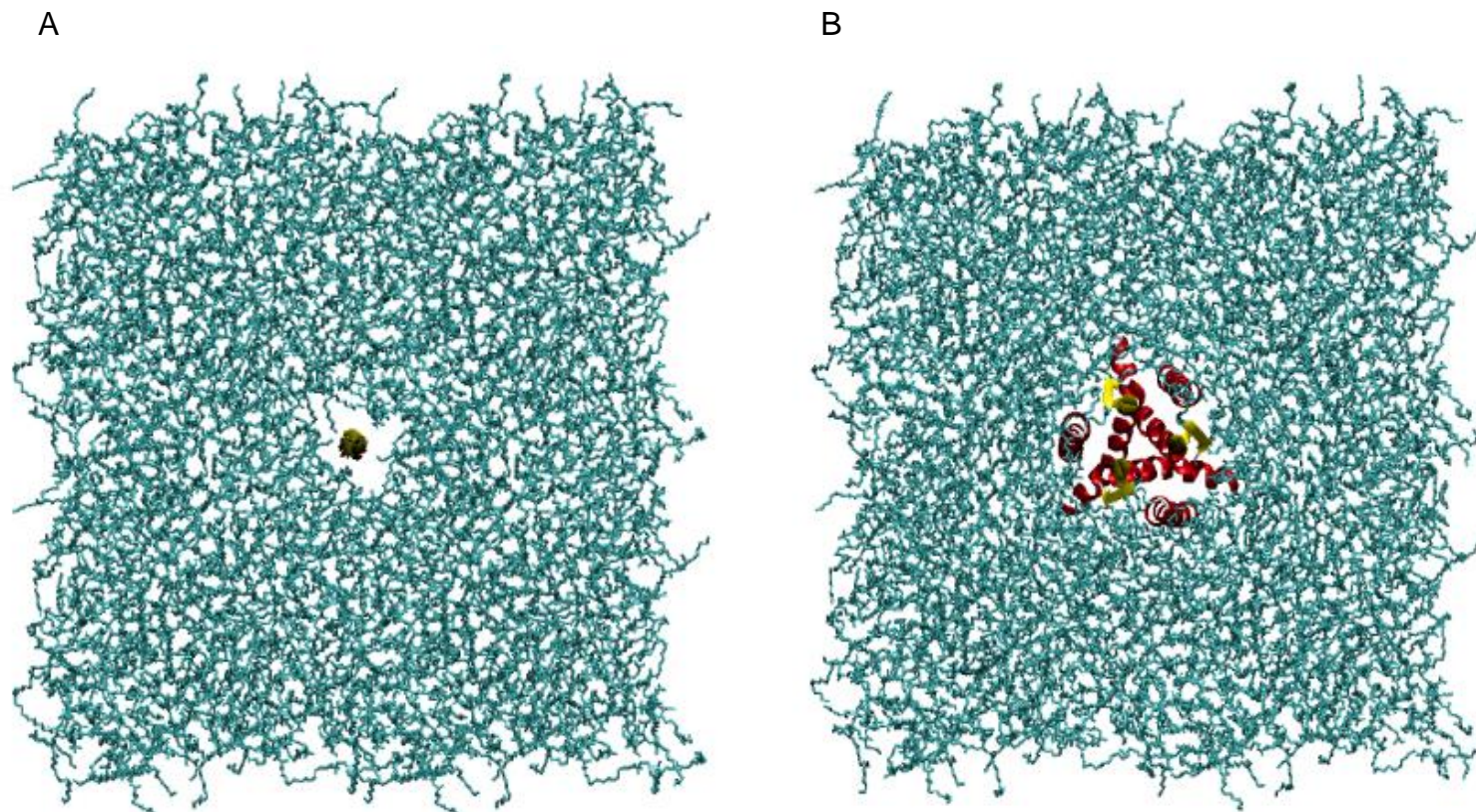


Figura 23: Inserção de proteínas em bicamada lipídica. A figura mostra a o processo de inserção da região TM do modelo construído. (A) compressão da proteína. (B) Restauração de sua conformação original e a acomodação dos lipídeos ao redor da proteína, baseada nos movimentos de restauração de coordenadas da proteína. Todos os sistemas deste trabalho utilizaram o mesmo método e arquivos de parametrização.

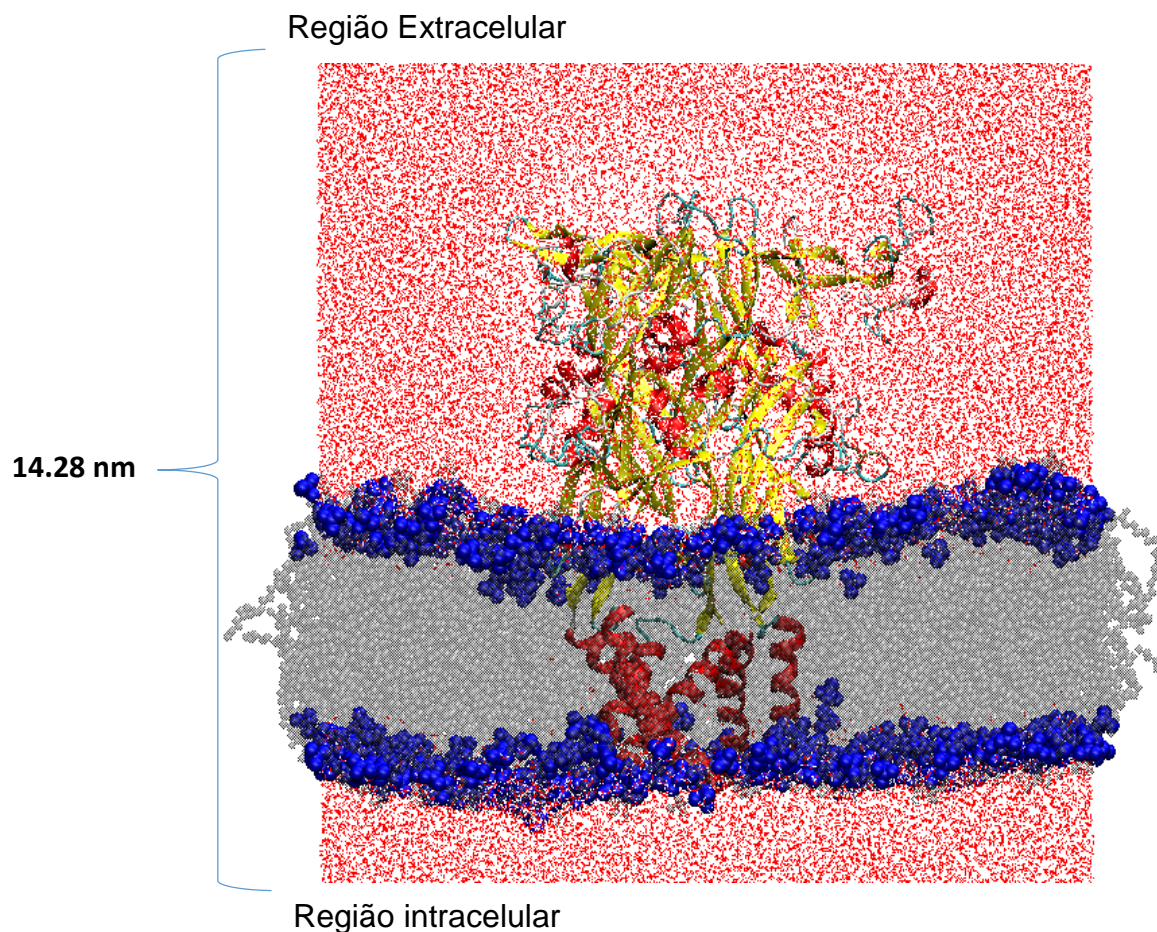


Figura 24: Sistema final contendo o P2X7 em seu estado aberto. As dimensões em eixos X, Y e Z respectivamente foram 13nm x 13nm x 14,28nm. O sistema contém 190.325 átomos, sendo 80% dos átomos correspondentes ao solvente. Em azul os átomos de oxigênio, Fosforo e Nitrogênio das moléculas de DPPC, em cinza as cadeias carbônicas do lipídeo. Em vermelho, amarelo e verde, as configurações secundárias alfa, beta e *coils* do receptor P2X7, respectivamente.

4.3.1 Simulação das regiões transmembranares

Após 80 ns de simulações de dinâmica molecular da região intramembranar para o estado fechado do molde e do modelo, detectamos que as proteínas não apresentaram desenovelamentos de estruturas secundárias. Como é possível observar no gráfico gerado pelo algoritmo Dicionário de Estrutura Secundária de Proteínas (DSSP) dos receptores P2X4 e P2X7 (Figura 25 e 26).

Através da análise dos valores das flutuações do desvio médio quadrático por aminoácido (RMSF), observamos a conservação das estruturas ao longo do tempo da simulação, sendo as regiões de maior flutuação formadas por resíduos de extremidade em conformação de *coil* (resíduos 330, 331, 660, 661, 990). Através do RMSD ao longo do tempo da simulação DM é observado seu equilíbrio dinâmico e o comportamento semelhante de ambas as estruturas (Figura 27 e Figura 28).

Estes resultados conduziram à segunda abordagem, que consistiu na execução das dinâmicas do modelo do receptor P2X7 aberto, para verificação da sua permeabilidade aos íons catiônicos e análise de fechamento do canal formado pela proteína.

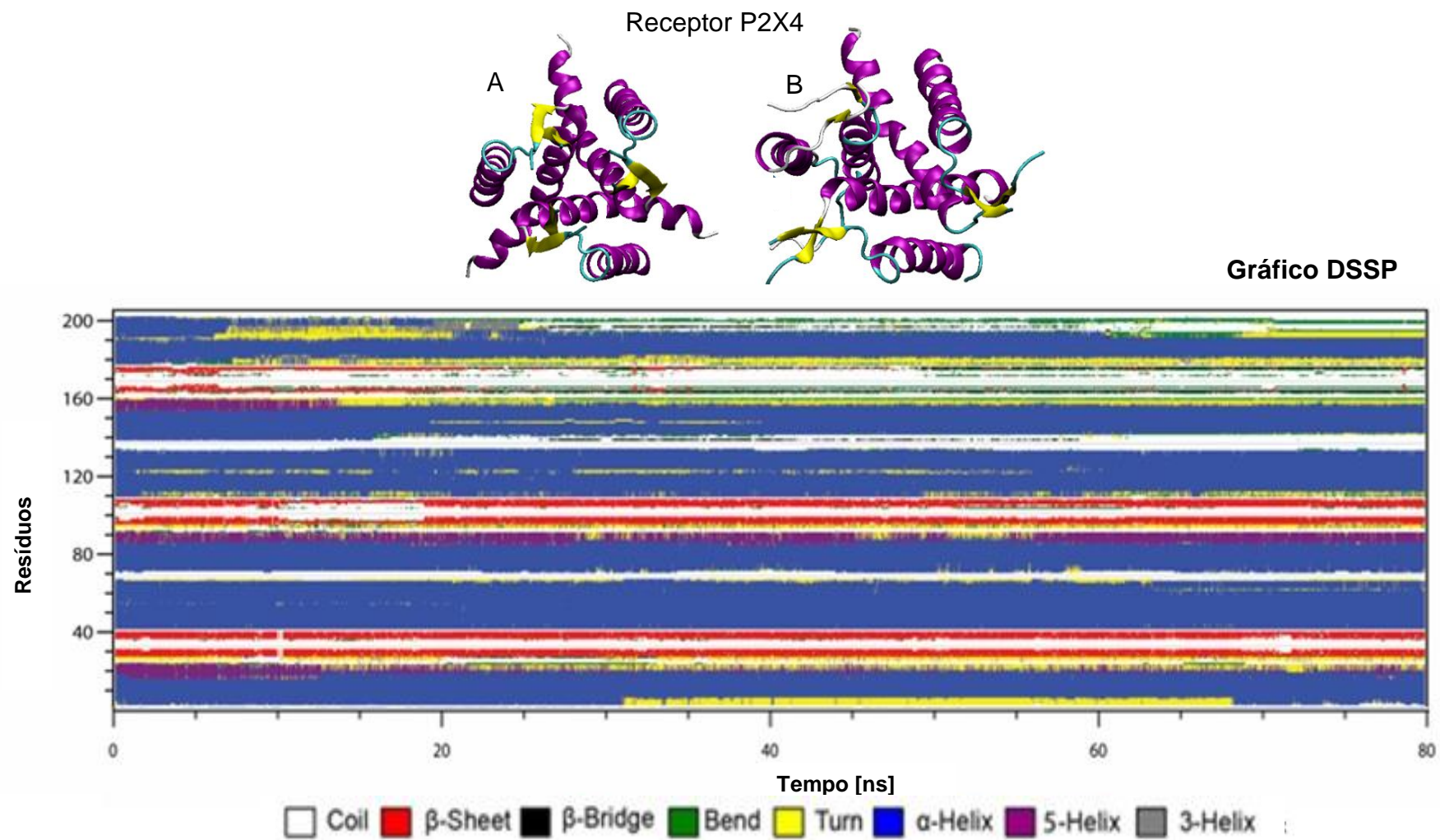


Figura 25: Representação em *new-cartoon* das estruturas iniciais (A) e finais (B) da região transmembranar do P2X4. Gráfico DSSP revelando que as configurações estruturais da proteína se mantiveram ao longo da simulação. Os valores de RMSD entre as estruturas iniciais e finais é de 2,648 Å.

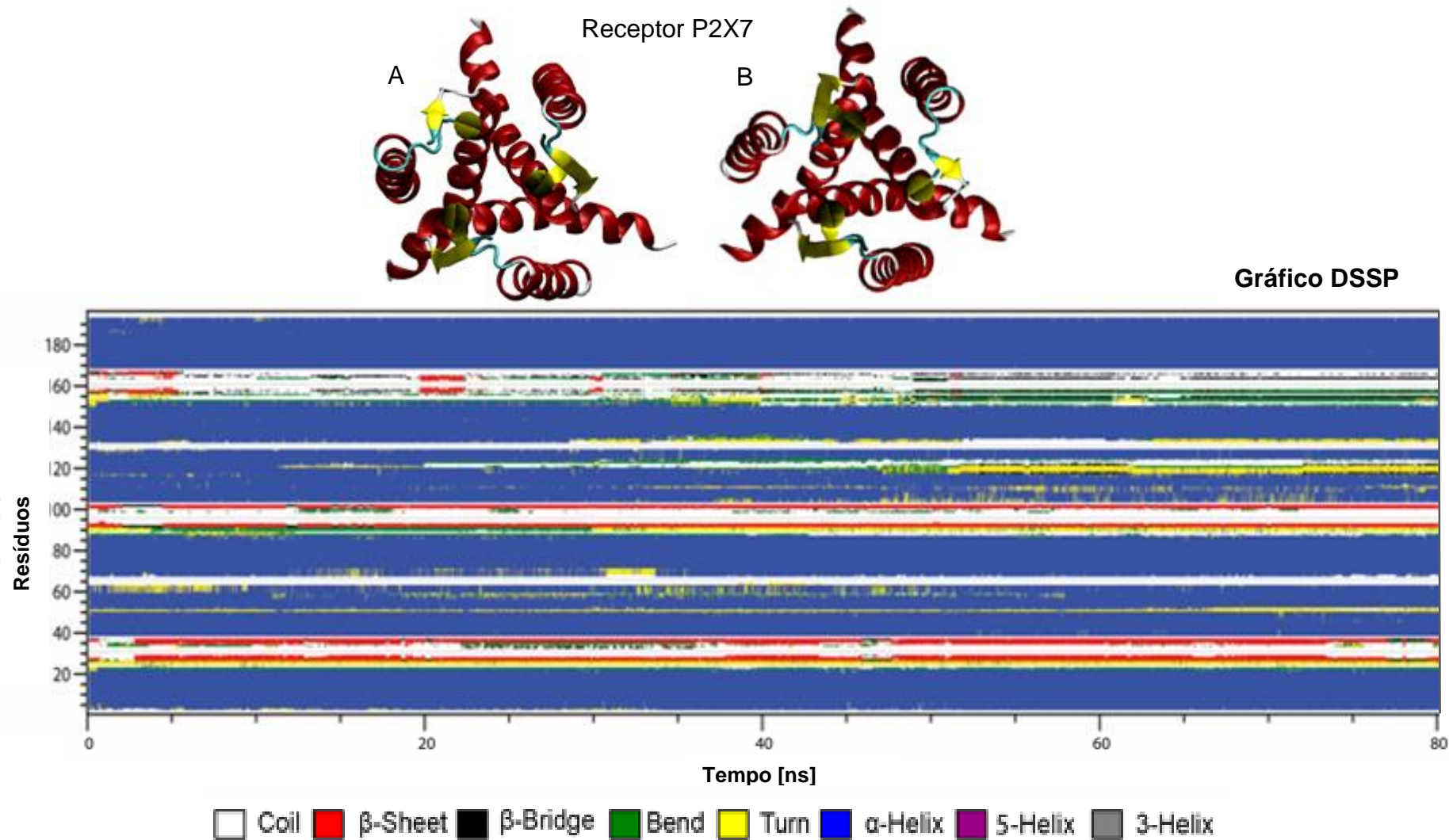


Figura 26: Região transmembranar do P2X7. (A) Quadro inicial (B) Quadro final. Gráficos DSSP, mostrando a conservação das estruturas secundárias. Os valores de RMSD entre as estruturas iniciais e finais é de 2,124Å.



Figura 27: RMSD das estruturas transmembranares do receptor P2X4 (preto) e P2X7 (vermelho).

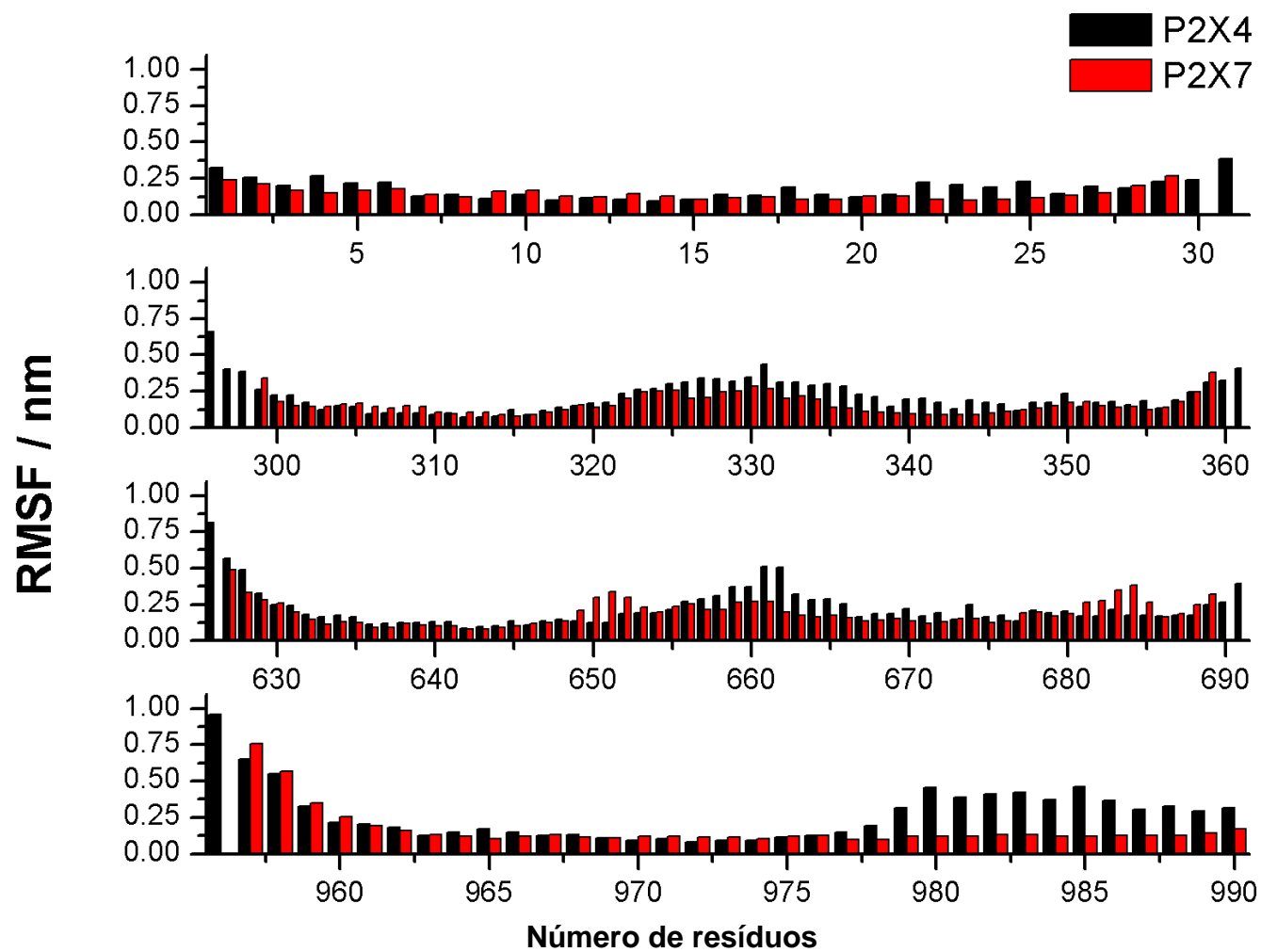


Figura 28: RMSF dos resíduos das estruturas dos receptores P2X4 (barras pretas) e P2X7 (barras vermelhas).

4.4 Comportamento dinâmico do receptor P2X7 em seu estado aberto

A proteína P2X7 se caracteriza por ser um canal seletivo para a passagem de cátions do meio extracelular ao citoplasma. Para verificar a qualidade do modelo em relação à sua funcionalidade, realizamos seis dinâmicas moleculares de 10 ns, utilizando a estrutura do receptor P2X7 aberto.

4.4.1 Avaliação da passagem de moléculas de água

Em um primeiro momento, simulamos o sistema com restrição de movimentos da proteína para avaliar os possíveis caminhos por onde as moléculas de água poderiam se deslocar ao atravessar a membrana. Esta análise foi motivada com base na possibilidade de passagem destas moléculas através de uma possível fenda na região superior da proteína ou através de três regiões laterais faceadas com a superfície da bicamada lipídica, também denominadas como janelas laterais (Figura 28) (Kawate *et al.*, 2011; Samways *et al.*, 2014).

Durante a simulação observamos a passagem das moléculas de água através de um funil localizado na região transmembranar. Verificamos que houve uma constante troca de moléculas de água entre os diferentes compartimentos separados pela membrana em ambas as direções. (Figura 29).

Através da marcação das moléculas de água confirmamos a passagem destas através das janelas laterais. Em contra partida, para a fenda localizada na parte superior da proteína não observamos nenhum fluxo de moléculas do solvente, visto que o espaço disponível existente nesta região é menor que o raio de solvatação da molécula de água (~ 1,4Å), o que impede sua passagem.

Estes resultados fortalecem a hipótese de participação destas janelas laterais para passagem dos íons, levantando novas possibilidades para a interpretação do funcionamento deste canal (Kawate *et al.*, 2011). Por exemplo, a localização das janelas laterais faceadas à bicamada lipídica pode ser um fator crucial na condução dos íons até a luz do canal devido à proximidade das cabeças polares dos fosfolipídeos, o que poderia resultar em uma maior atração

dos cátions. Estes íons também seriam atraídos pelas regiões carregadas negativamente localizadas no interior do canal (Figura 30).

4.5 Fechamento do Canal

Após liberar os movimentos do receptor P2X7 aberto, comparamos as estruturas do primeiro e do último quadro, constatando a ocorrência do fechamento do canal, mediante a análise da variação de superfície de acessibilidade ao solvente.

De fato, este comportamento é descrito para proteínas formadoras de canal, onde a estrutura de maior permanência no tempo é seu estado fechado (Rassendren *et al.*, 1997; Kawate *et al.*, 2011; Hattori e Gouaux, 2012; Browne *et al.*, 2013; Samways *et al.*, 2014; Turchenkov e Bystrov, 2014) .

Ao alinharmos a pose final desta simulação com a estrutura cristalográfica do receptor P2X4 em seu estado fechado, foi calculado o RMSD de 3,120 Å (Figura 32).

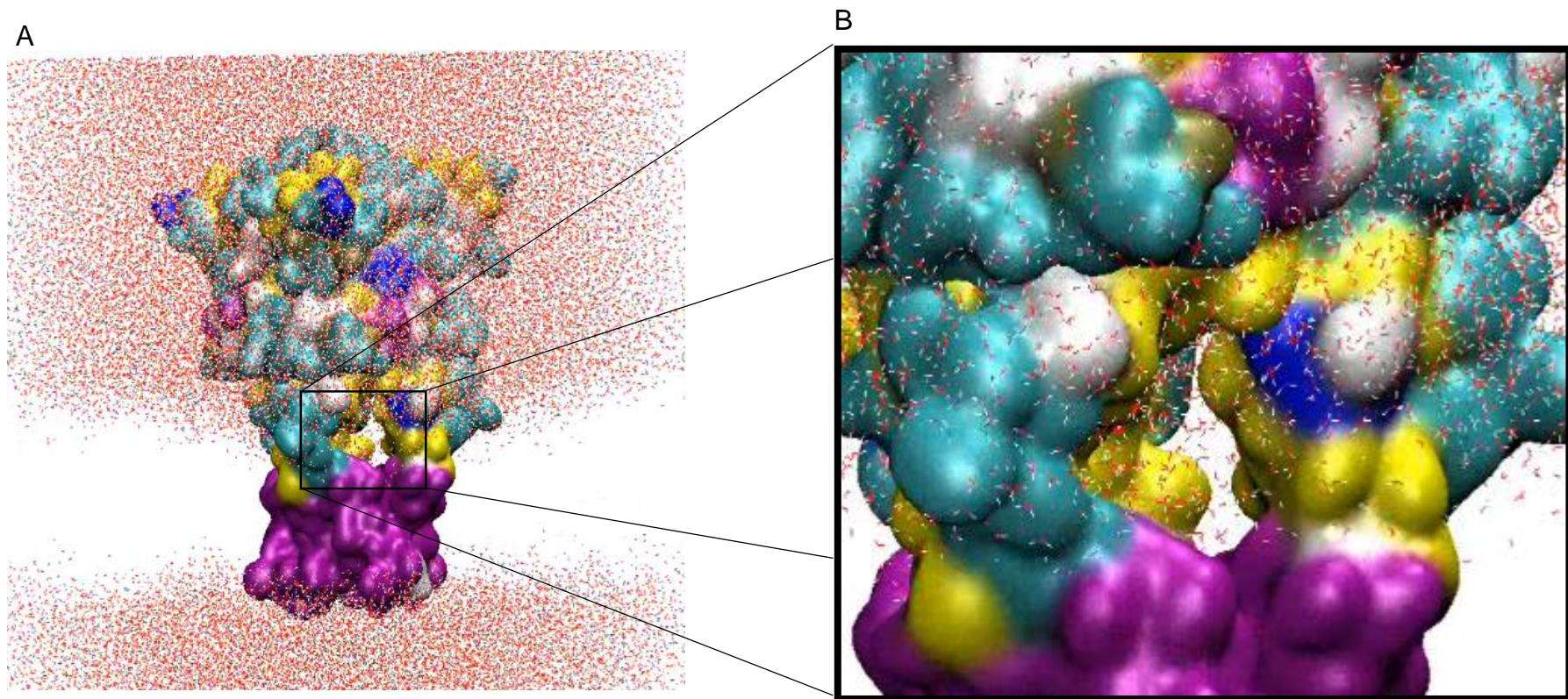


Figura 29: Passagem de água pelas janelas laterais. (A) Sistema simulado omitindo os lipídios para melhor visualização das janelas laterais. (B) Destaque de uma das janelas laterais. A proteína se encontra com visualização em modo superfície de acessibilidade ao solvente. Em roxo e azul os resíduos configurados em alfa, em amarelo os resíduos configurados em beta. Em ciano e branco os resíduos configurados em *coil* e *turn*, respectivamente.

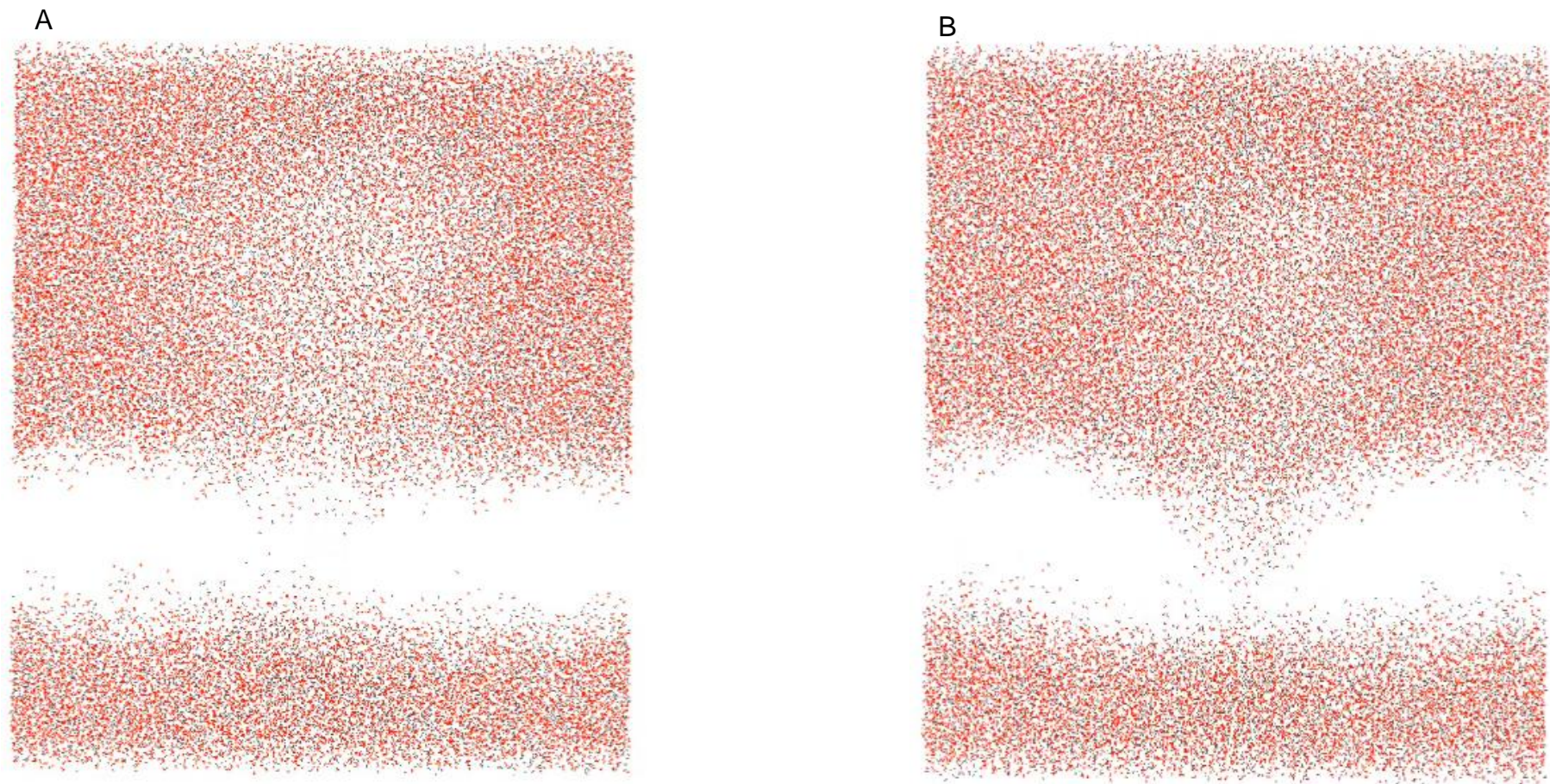


Figura 30: Sistema simulado excluindo a representação gráfica dos lipídios e da proteína. (A) frame inicial da simulação. (B) Quadro final da simulação, revelando a forma afunilada do canal formado pelo receptor P2X7 e a passagem das moléculas de água pelas três janelas laterais.

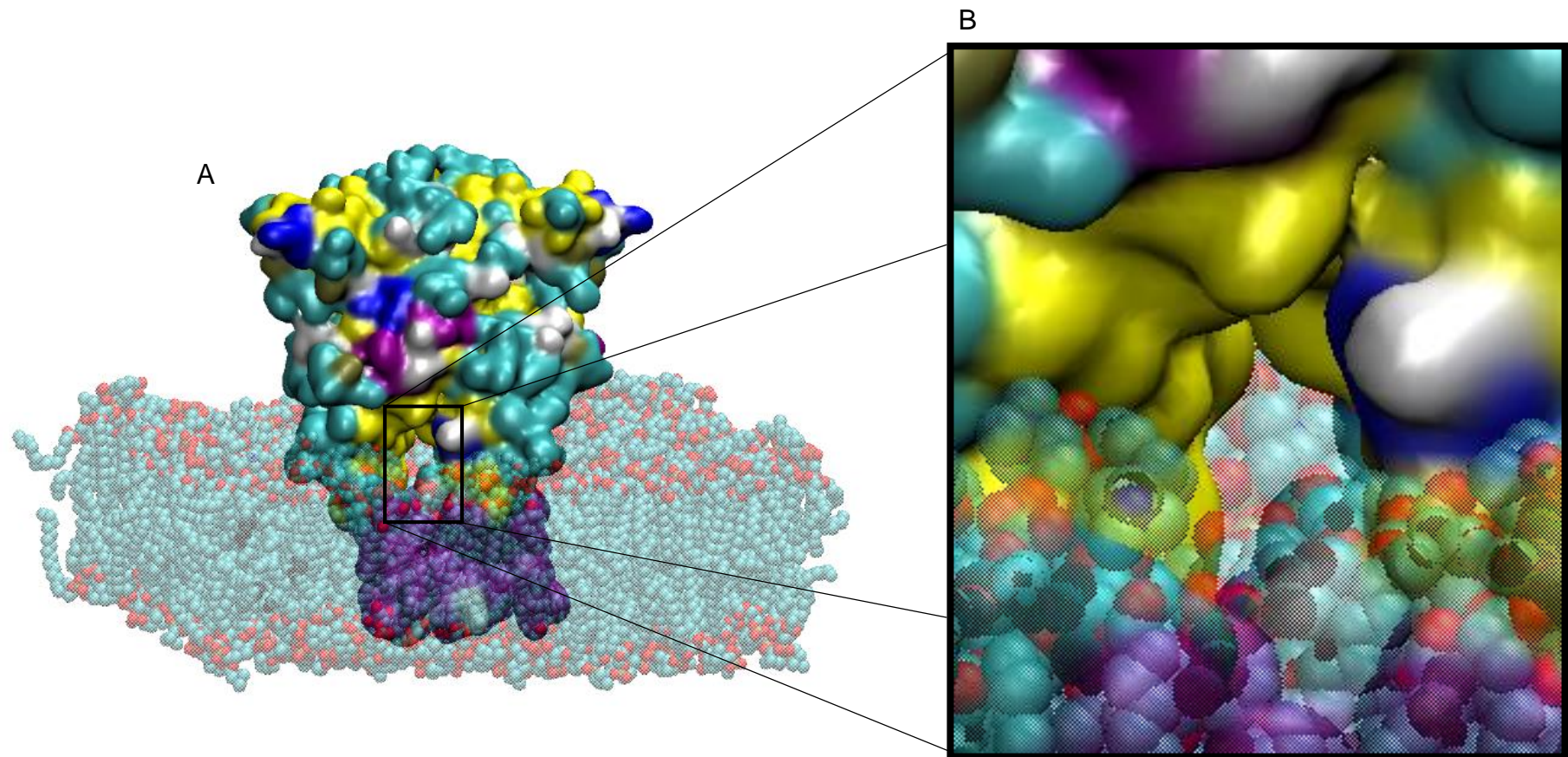


Figura 31: (A) Sistema P2X7 inserido na membrana. As moléculas de água não foram inseridas para facilitar a visualização. (B) Destaque de uma das janelas laterais faceada às cabeças polares dos lipídeos. Os átomos carregados negativamente são representados por esferas vermelhas.

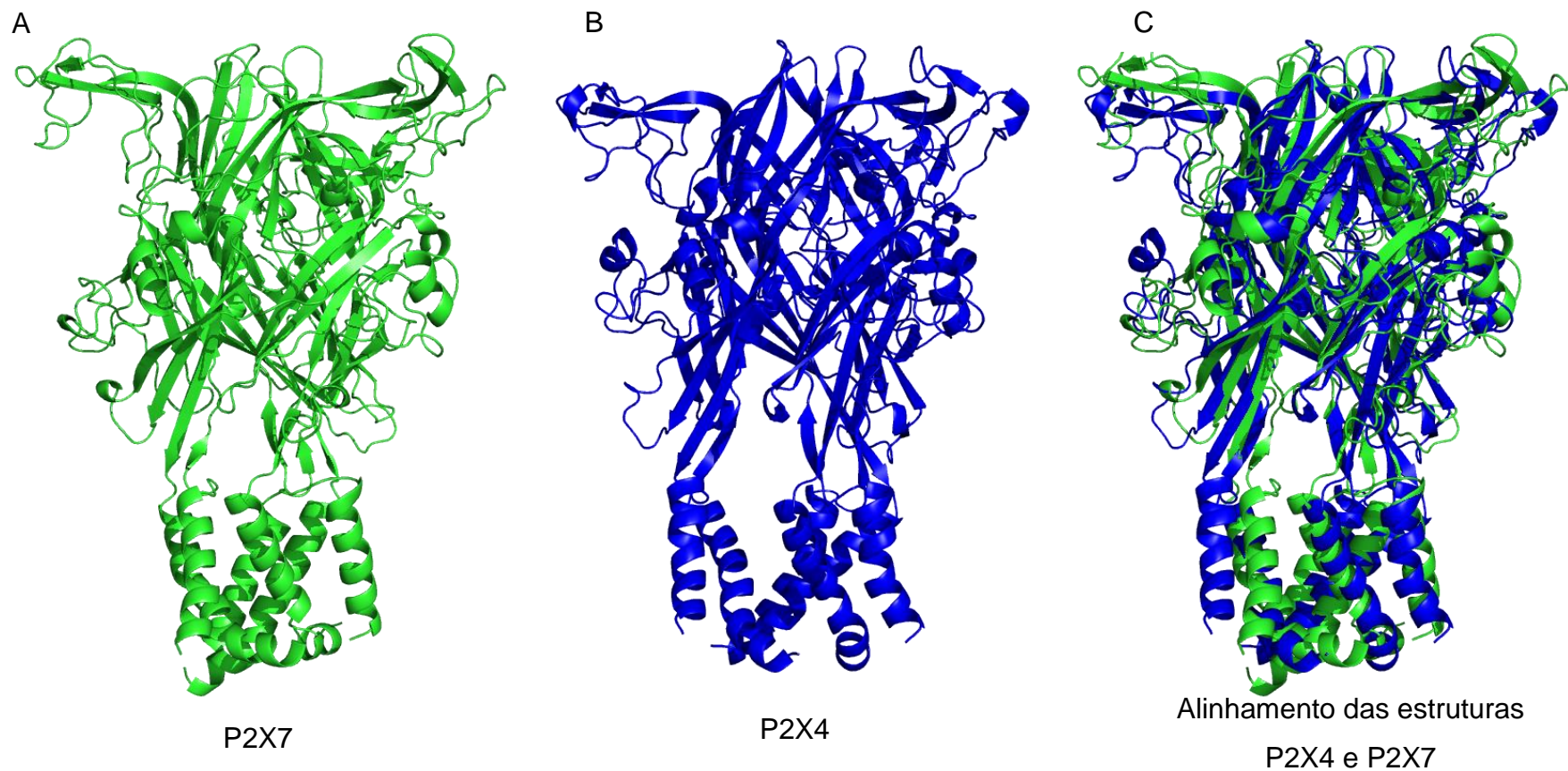


Figura 32: (A) Modelo construído do receptor P2X7 em seu estado aberto após 10 ns de simulação passando para o estado fechado. (B) Estrutura cristalográfica do receptor P2X4 fechado. (C) Alinhamento entre as duas estruturas considerando (Backbone) com RMSD de 3,120Å.

Já o alinhamento da estrutura final desta simulação com o modelo fechado do receptor P2X7 resultou em um valor de RMSD de 2,870Å.

Outro ponto a ser destacado são os valores de raio de giro da proteína. Ao longo da dinâmica percebemos que ao tempo que a região transmembranar reduziu seus valores de raio de giro (de ~1,5 nm para ~1,3 nm), a região de alça extracelular manteve seu raio de giro (~ 3,3 nm), revelando uma movimentação importante para o processo de fechamento e abertura do canal (Figuras 33 e 34).

Nos primeiros 400 ps a estrutura do receptor P2X7 se direcionou para o estado fechado (Figura 34B). Durante o restante da simulação foram observados apenas acomodações da estrutura em relação ao sistema de bicamada diminuindo gradativamente a compactação da proteína.

À medida em que o canal se fechava, houve um decréscimo da energia potencial da proteína se estabilizando após 400 ps, com valor médio de $-28.504.941 \pm 1.633$ kJ/mol (Figura 34B).

Dado que os resíduos (Gly 316, Gly 641, Gly 966) se encontram no plano paralelo à superfície da membrana, formando a região mais estreita do canal, utilizamos as coordenadas do centro geométrico destes resíduos como referência para determinar um triângulo que os contivesse. A partir desse triângulo foi calculado o circuncentro para calcular o raio da circunferência capaz de conter os vértices do triângulo.

Para o quadro inicial da simulação (receptor no estado aberto) o raio da circunferência foi calculado resultando em um valor de 8,96 Å, formando um círculo de área 252,08 Å². Ao término da simulação o raio desta circunferência se reduziu para 6,76 Å, resultando em círculo de área 143,49 Å², indicando uma redução de 43% da área do círculo com relação à estrutura inicial (Figura 34).

Segundo a dinâmica a região de estreitamento do canal se fechou em aproximadamente 400ps. A região de sitio de ligação ao ATP se abre em um tempo aproximado de ~ 1,2 ns.

Concomitantemente, o potencial eletroestático da região de sitio de ligação ao ATP também é configurado para um perfil de ataque eletrolítico (Figura 35). Esta mudança de natureza demonstra uma importante característica, necessária para a ligação da cadeia trifosfatídica ao sítio de ligação. Ela se deve principalmente à expulsão de íons cloreto utilizados para

neutralizar a carga total do sistema, que estavam aprisionados no sítio de ligação ao ATP.

Ao mesmo tempo em que a região transmembranar se fechava, as regiões de sítio de ligação ao ATP se abriram ao longo do tempo de simulação. Isto constitui uma condição necessária para ocorrência da saída da molécula de ATP disponibilizando o sítio para ancoramento de uma nova molécula de ATP.

Podemos perceber que o comportamento dinâmico do sistema simulado, reproduz a tendência descrita experimentalmente para este tipo de receptor.

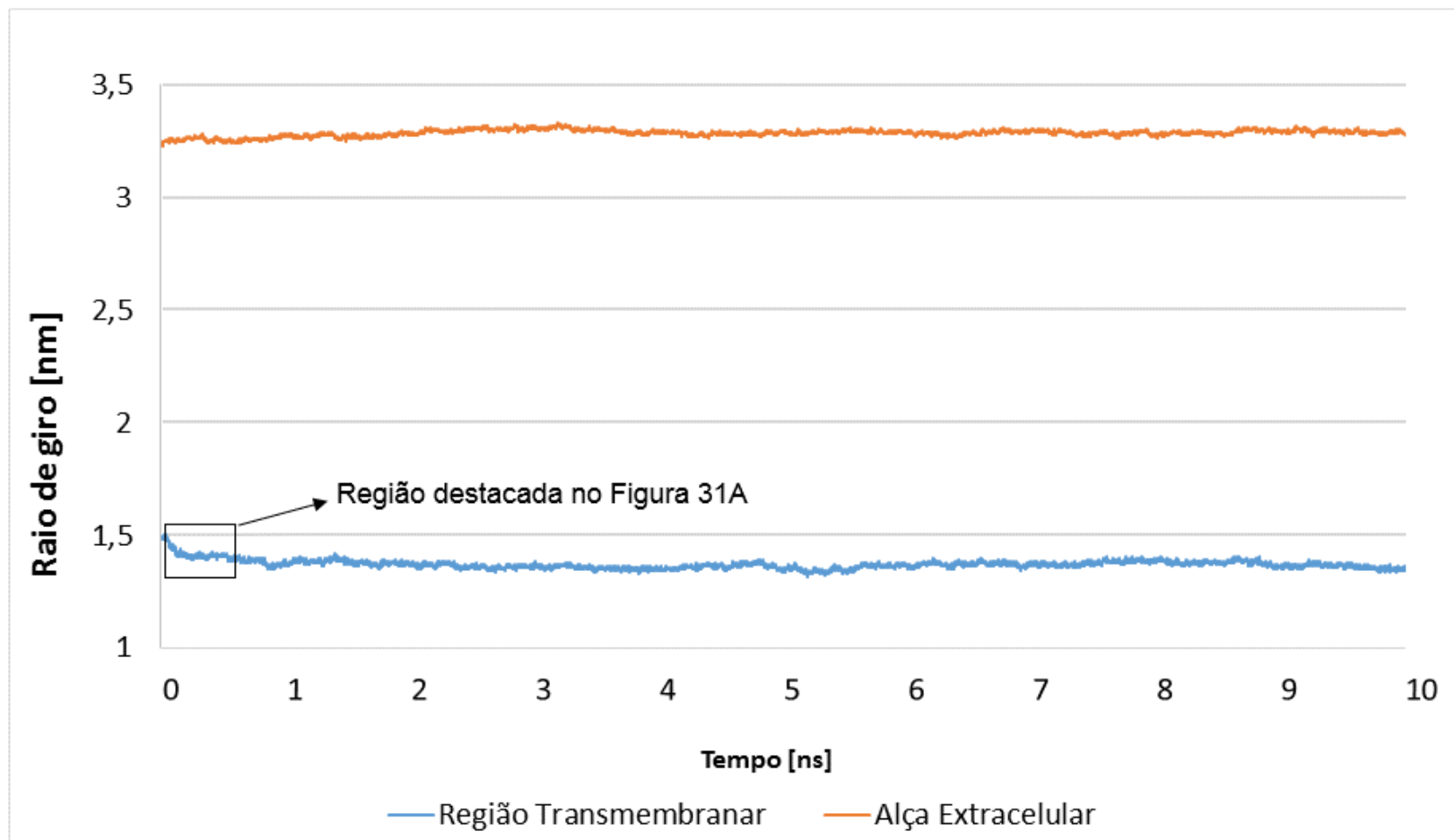


Figura 33: Raio de giro em função do tempo de simulação. Em azul a região transmembrantar, em laranja região de alça extracelular.

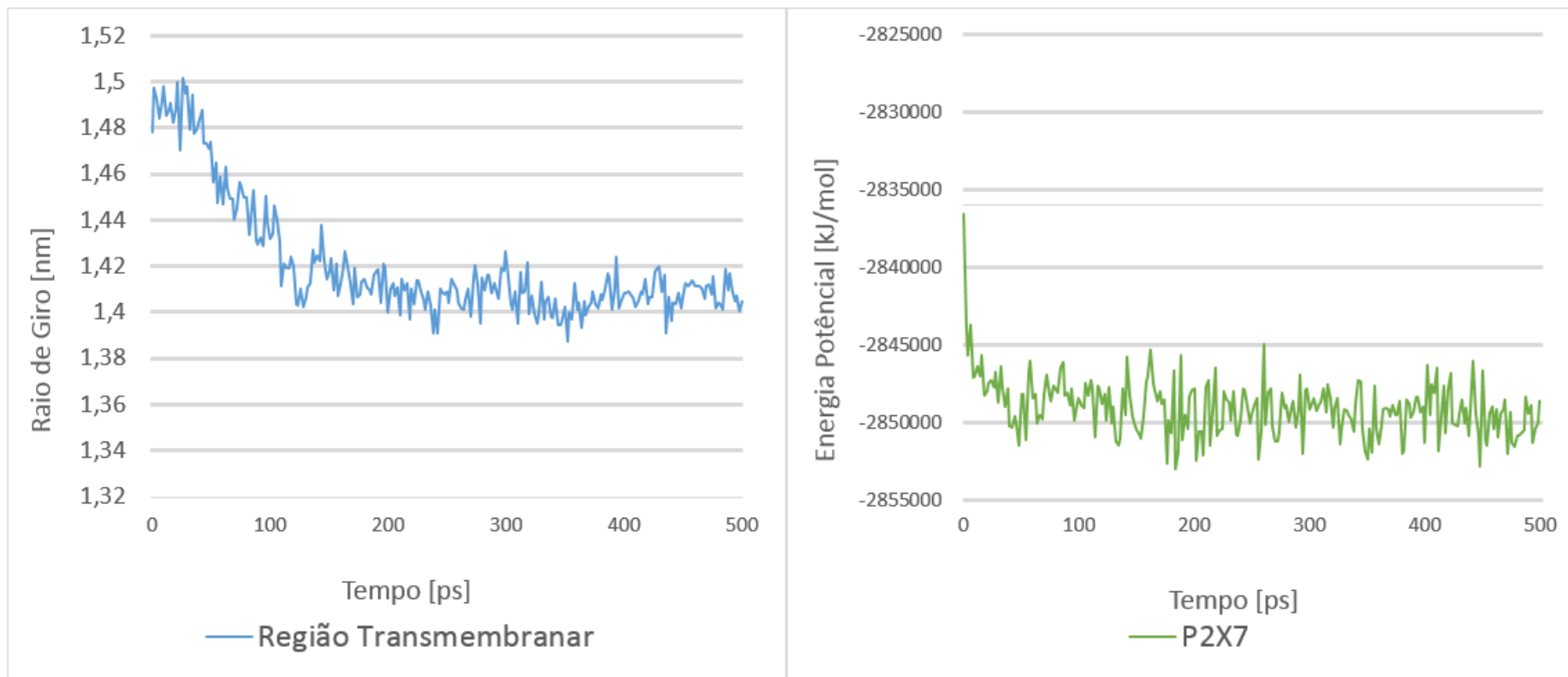


Figura 34: (A) Nível de compactação da região transmembranar do receptor P2X7. (B) Energia potencial do receptor P2X7.

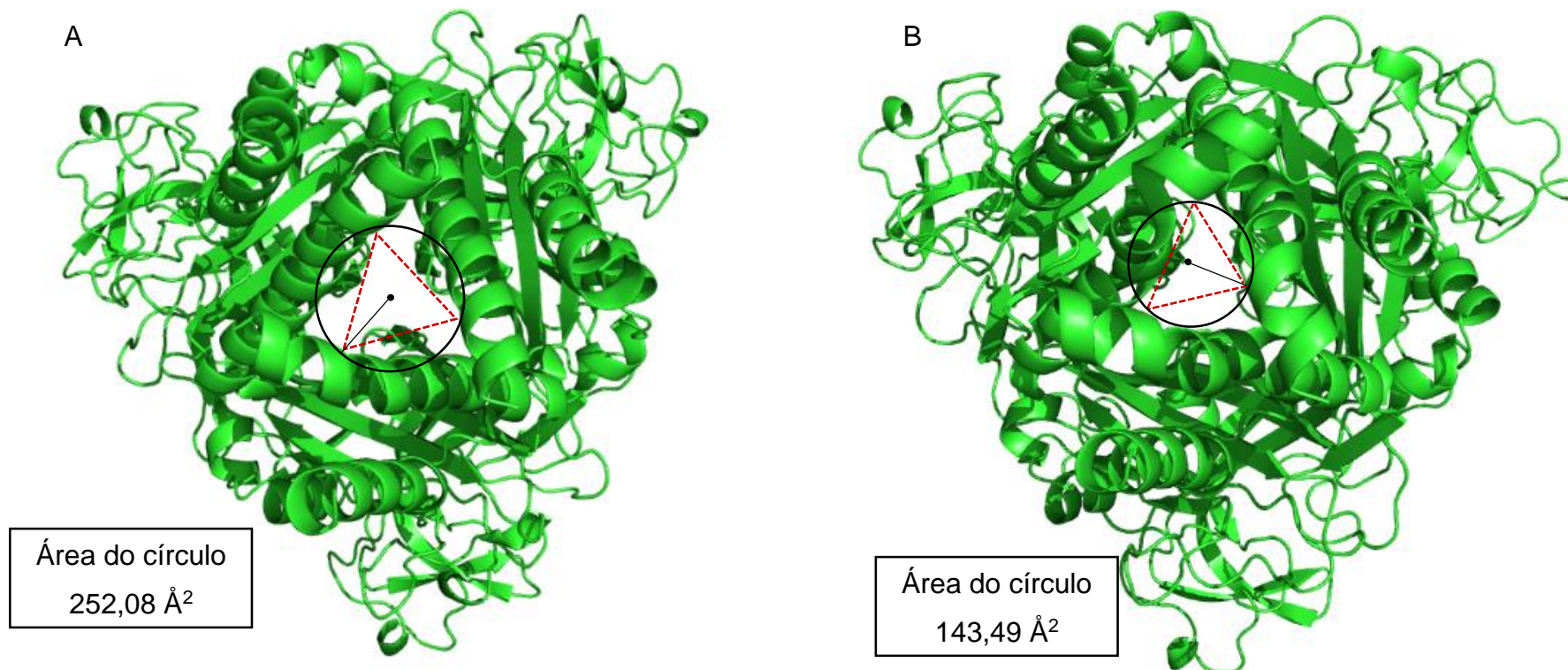


Figura 35: (A) Configuração inicial da dinâmica de fechamento do canal. (B) Configuração final da dinâmica após 10ns. Ao centro do canal de ambas as figuras um triângulo (tracejado vermelho) formado pelo centro geométrico dos resíduos formadores do canal (Gly316, Gly 641, Gly 966).

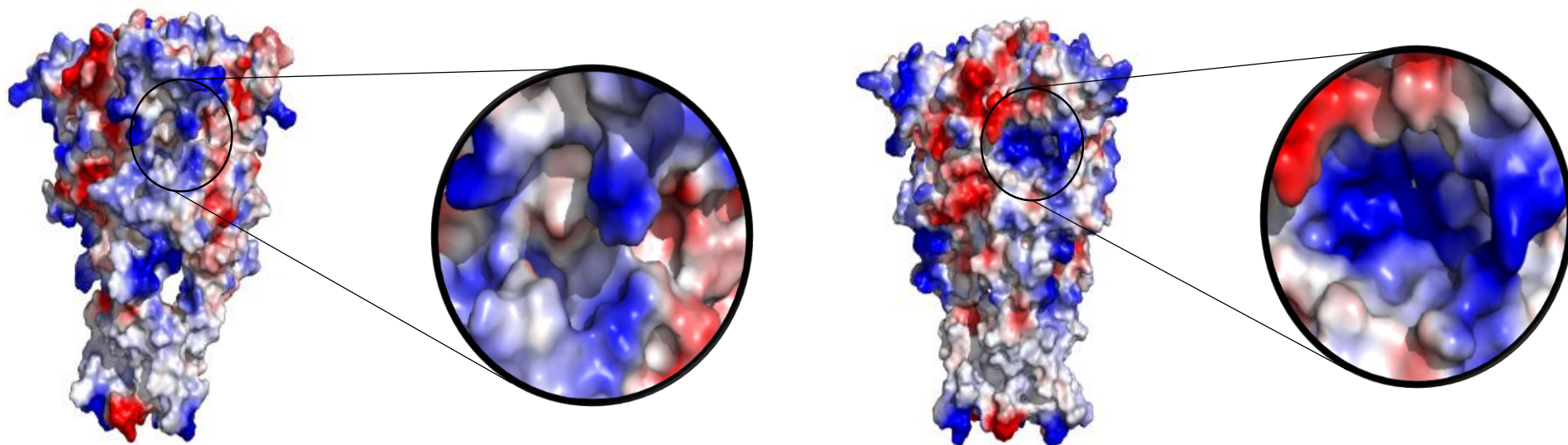


Figura 36: (A) Quadro inicial da dinâmica do receptor P2X7 (B) Quadro final da simulação do mesmo receptor. Em destaque na figura A o sitio de ligação ao ATP e antes do fechamento do canal e na figura B em destaque a mesma região 300 ps após o fechamento da região transmembranar (~700 ps de simulação). Em vermelho as regiões com densidade de carga negativa, em azul com densidade de carga positivas e em branco as regiões neutras.

4.6 Passagem dos íons através da membrana

Foram executadas 5 simulações para avaliar a seletividade do canal, conforme descrito em metodologia.

Em todas as três dinâmicas utilizando o potássio, observamos a passagem de maneira espontânea desses íons pelo canal, porém em quantidades diferentes.

Para o sistema com restrição de movimento da proteína em seu estado aberto, foi observada a passagem de apenas um deles (K1) ao longo dos 10 ns de simulação. O período de passagem foi aproximadamente de $\Delta T = 400$ ps (começando aos ~200 ps) (Figuras 37 e 38).

Concomitantemente observamos a perda do padrão de solvatação do íon durante o tempo em que se encontrava dentro do canal (Figura 38).

O padrão de solvatação dos íons K2 e K3, se manteve variando entre 15 e 25, que representa o intervalo de variação dos íons na solução. Para o íon K1, observa-se no início da simulação números de coordenação por baixo desse intervalo. Nos primeiros 400 ps o íon K1 encontrava-se dentro do canal.

Após a saída imediata do íon K1, ele permaneceu retido em uma região de potencial eletrostático negativo (Figura 39), determinado por 9 resíduos de aspartato Asp19, Asp300, Asp323 da cadeia A, Asp344, Asp625, Asp648 da cadeia B e Asp665, Asp950, Asp973 da cadeia C, estando 6 deles na região de janelas laterais e 3 voltados para o citoplasma. O processo de captura durou em torno de 4,5 ns até a sua completa liberação no bulk após 5 ns, alcançando valores de coordenação comparáveis aos outros íons.

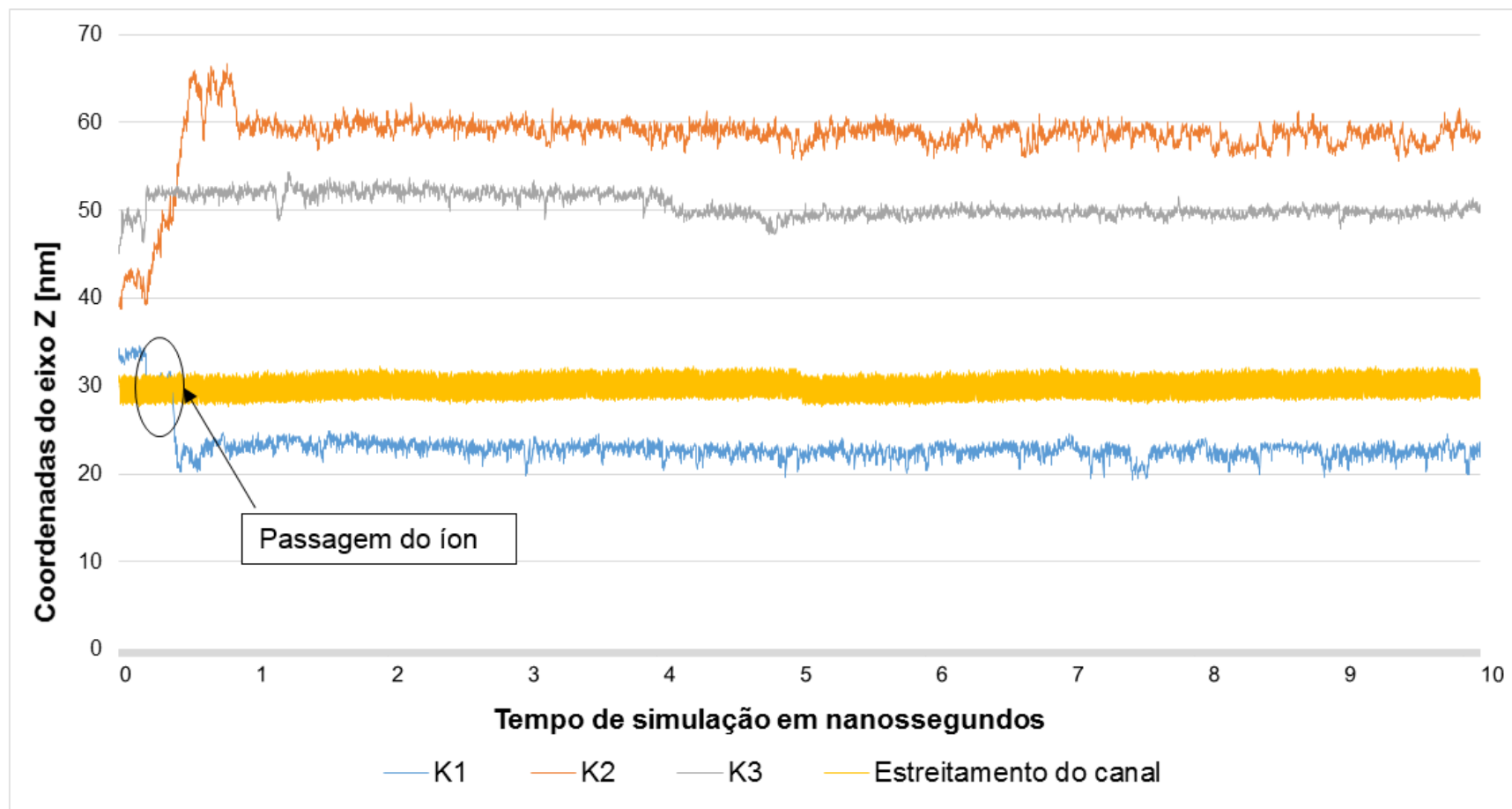


Figura 37: Difusão dos íons de potássio no receptor P2X7, utilizado parâmetro de restrição de movimento da proteína mantendo o receptor constantemente aberto. Em amarelo, as coordenadas em eixo Z do resíduo G316 (último resíduo do estreitamento do canal). Apenas o íon K1 (em azul) ultrapassou a linha amarela, indicando a passagem do íon pelo canal.

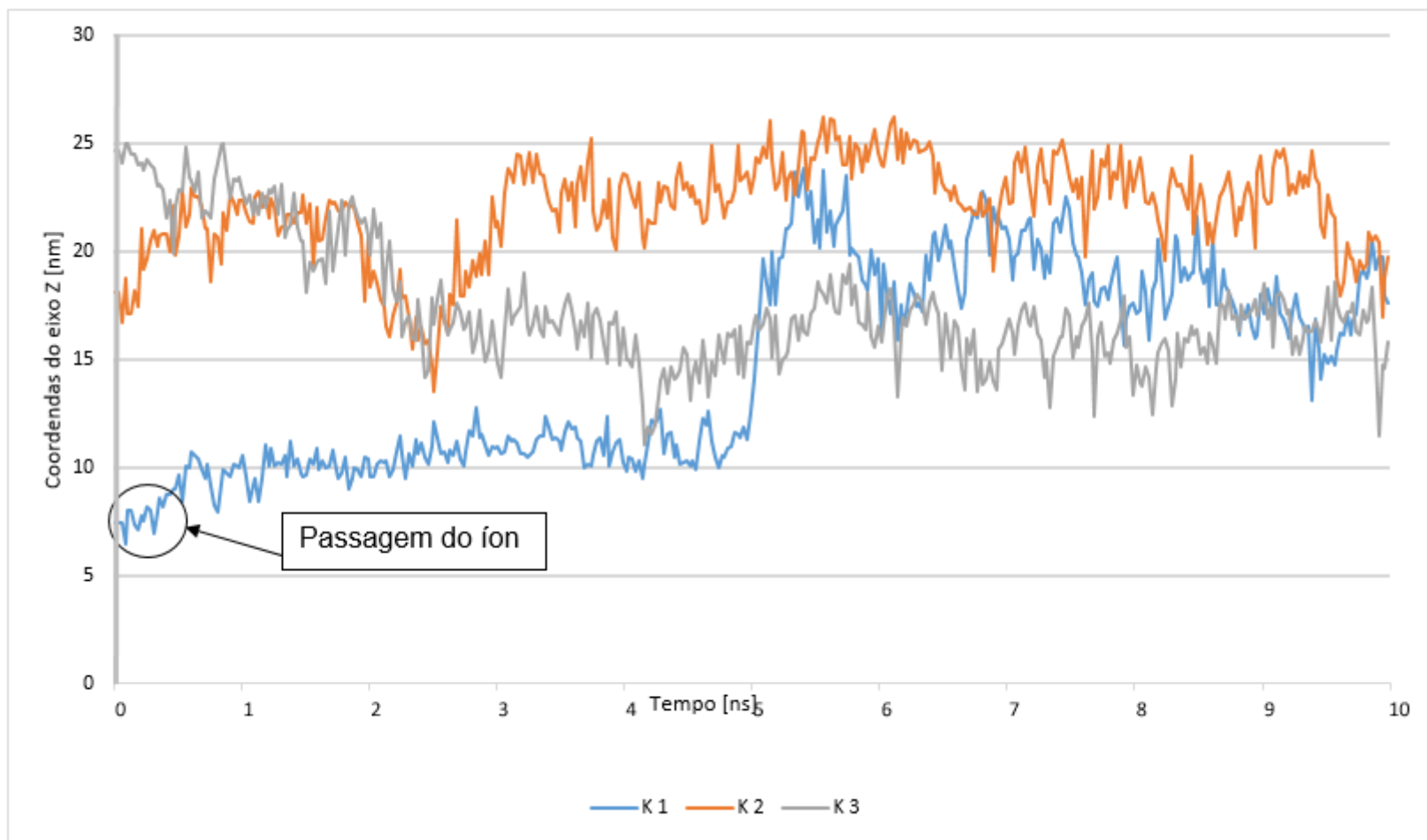


Figura 38: Número de coordenação dos íons Potássio em relação aos átomos de oxigênio da água. Em azul, o cátion mais próximo do estreitamento de canal revelando o aumento da interação com moléculas de água após a passagem pelo canal (~ 600 ps)

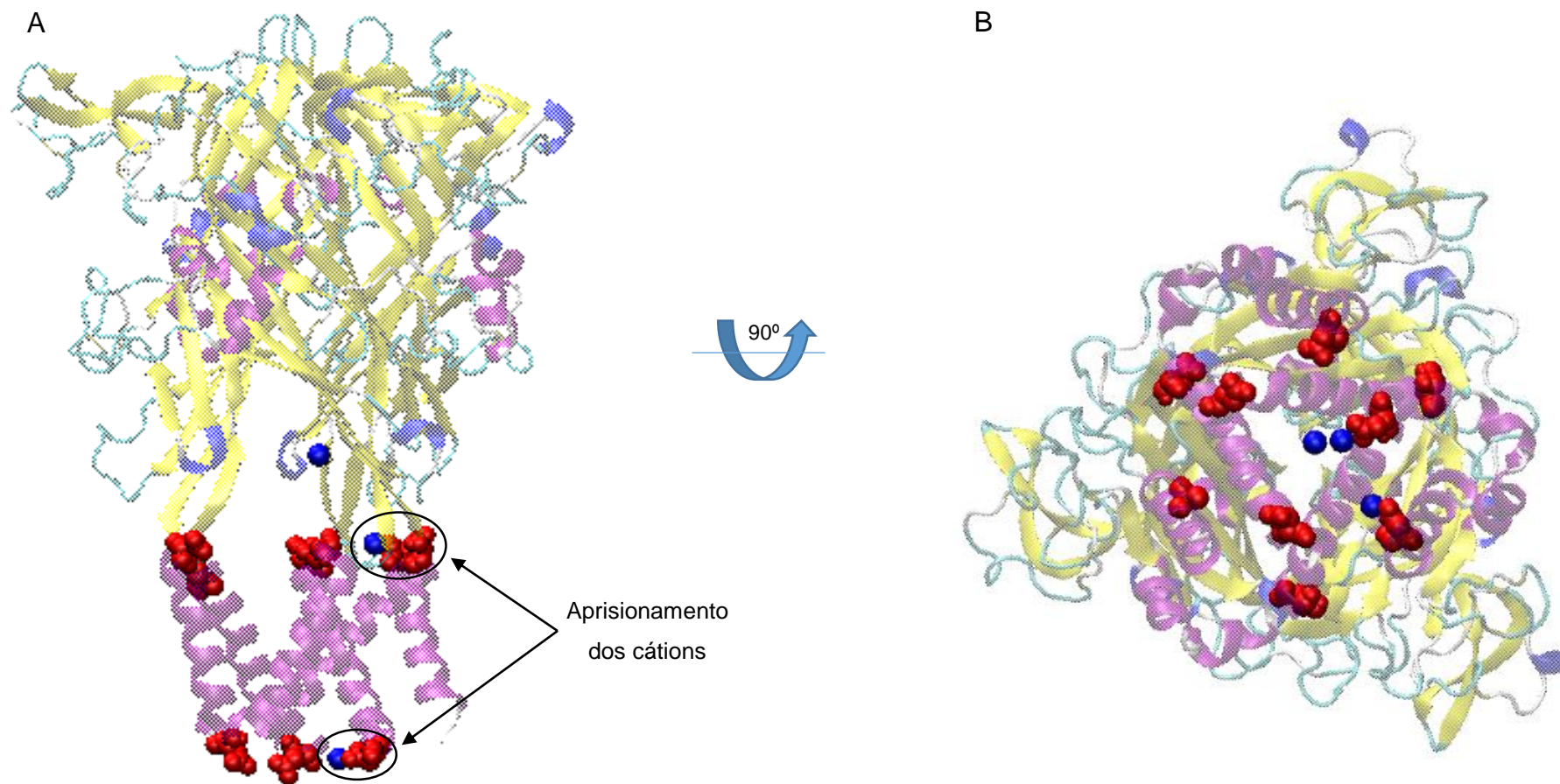


Figura 39: (Esferas vermelhas) Resíduos carregados negativamente Aspartato nas posições Asp19, Asp300, Asp323 da cadeia A, Asp344, Asp625, Asp648 da cadeia B e Asp665, Asp950, Asp973 da cadeia C. (Esferas azuis) Íons de Potássio.

A fim de aumentar o mimetismo do sistema com relação à passagem dos íons, aplicamos um campo elétrico de intensidade constante (0,046V/nm afim de reproduzir o potencial de membrana) na direção de movimento, desde o meio extracelular ao interior citosólico, de forma a induzir os íons a passar pelo afunilamento do canal, porém mantendo as restrições de posição. O valor experimental do potencial de membrana foi obtido através dos dados experimentais de condutância do receptor P2X7 (Faria *et al.*, 2005; Kawate *et al.*, 2011; Turchenkov e Bystrov, 2014).

Neste caso observamos a passagem dos íons, K1 e K2. Quando comparado com o tempo de passagem da simulação anterior, nesta etapa o íon K1 permeou rapidamente (400 ps) para o meio intracelular enquanto que o íon K2 deu início a sua passagem em ~ 5,2 ns, e após ~400 ps havia ultrapassado por completo a luz do canal, (Figura 40).

No instante em que os íons passam pela região de estreitamento do canal podemos observar novamente o padrão de redução da solvatação para os íons K1 e K2, fortalecendo que está é uma característica distinta deste receptor para o processo de transporte de íons (Figura 41).

Esta mudança nas condições de simulação do sistema resultou na passagem mais eficiente dos íons reduzindo o tempo de aprisionamento dos íons nas carregadas negativamente, existente próxima às janelas laterais.

Visto que a configuração de campo elétrico facilitou a passagem dos íons pelo canal, executamos a dinâmica sem a restrição de movimento e com o efeito de campo elétrico para verificar os efeitos da maior liberdade conformacional frente a passagem dos íons catiônicos.

Ao termino da simulação foram observados a passagem dos três íons posicionados, em um tempo total ainda mais rápido (~350 ps) quando comparados às simulações anteriores (Figura 42).

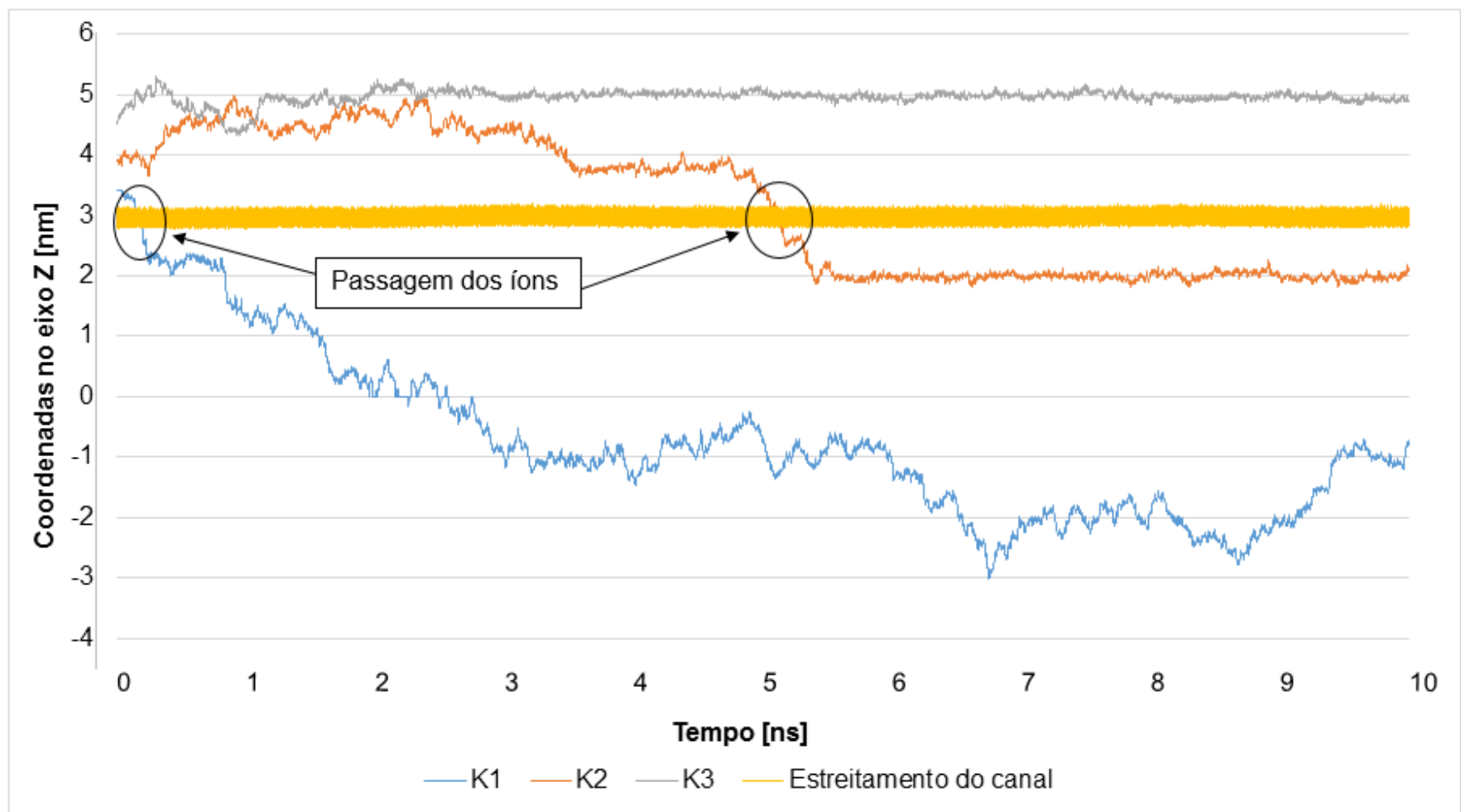


Figura 40: Difusão dos íons de potássio, utilizando os parâmetros de restrição de movimento e também o efeito de campo elétrico de $-0,046 \text{ V/nm}$.

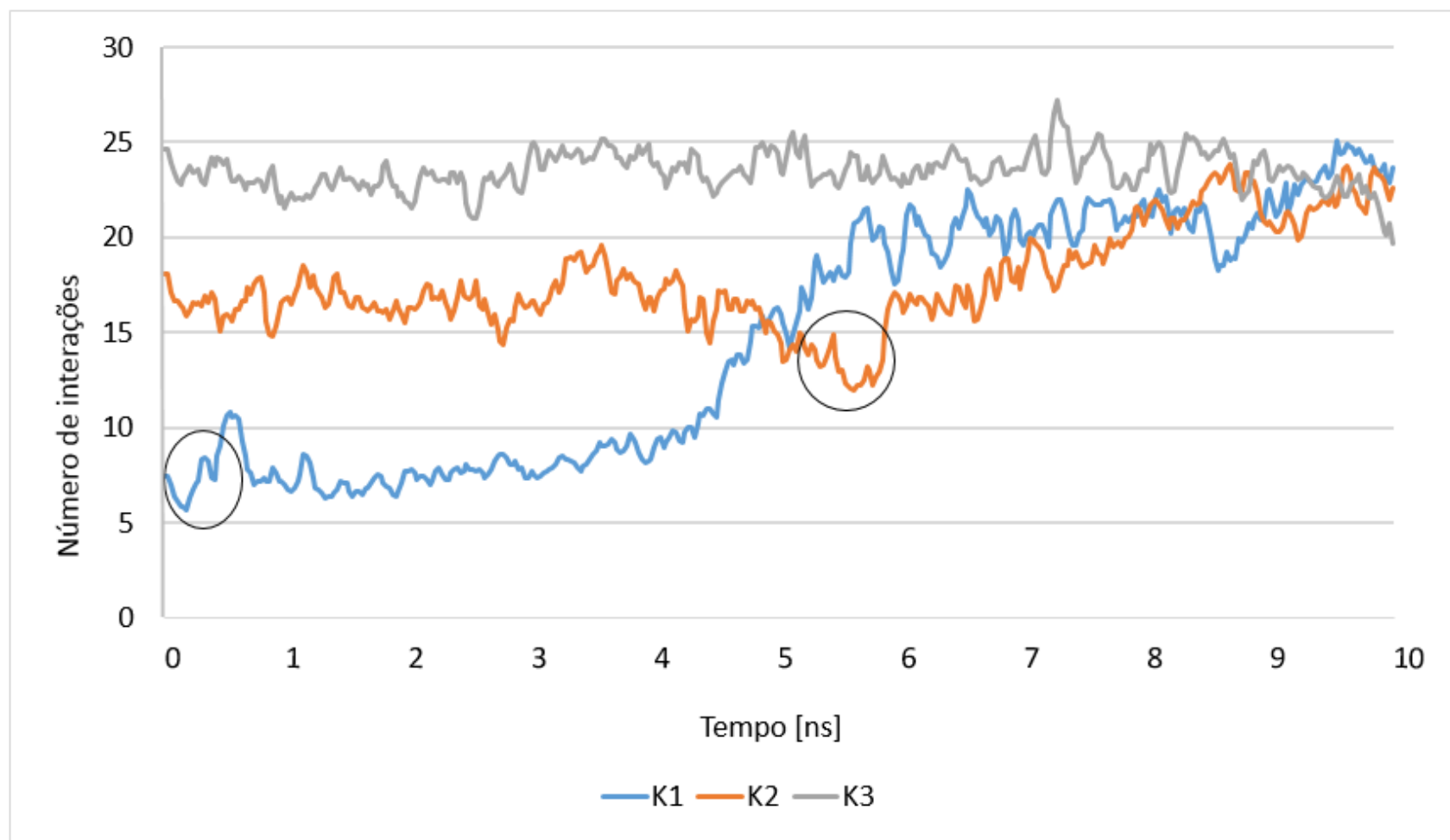


Figura 41: Número de coordenação dos íons de potássio para o sistema utilizando as restrições de movimento da proteína e implementação do efeito de campo elétrico de $-0,046\text{V/nm}$.

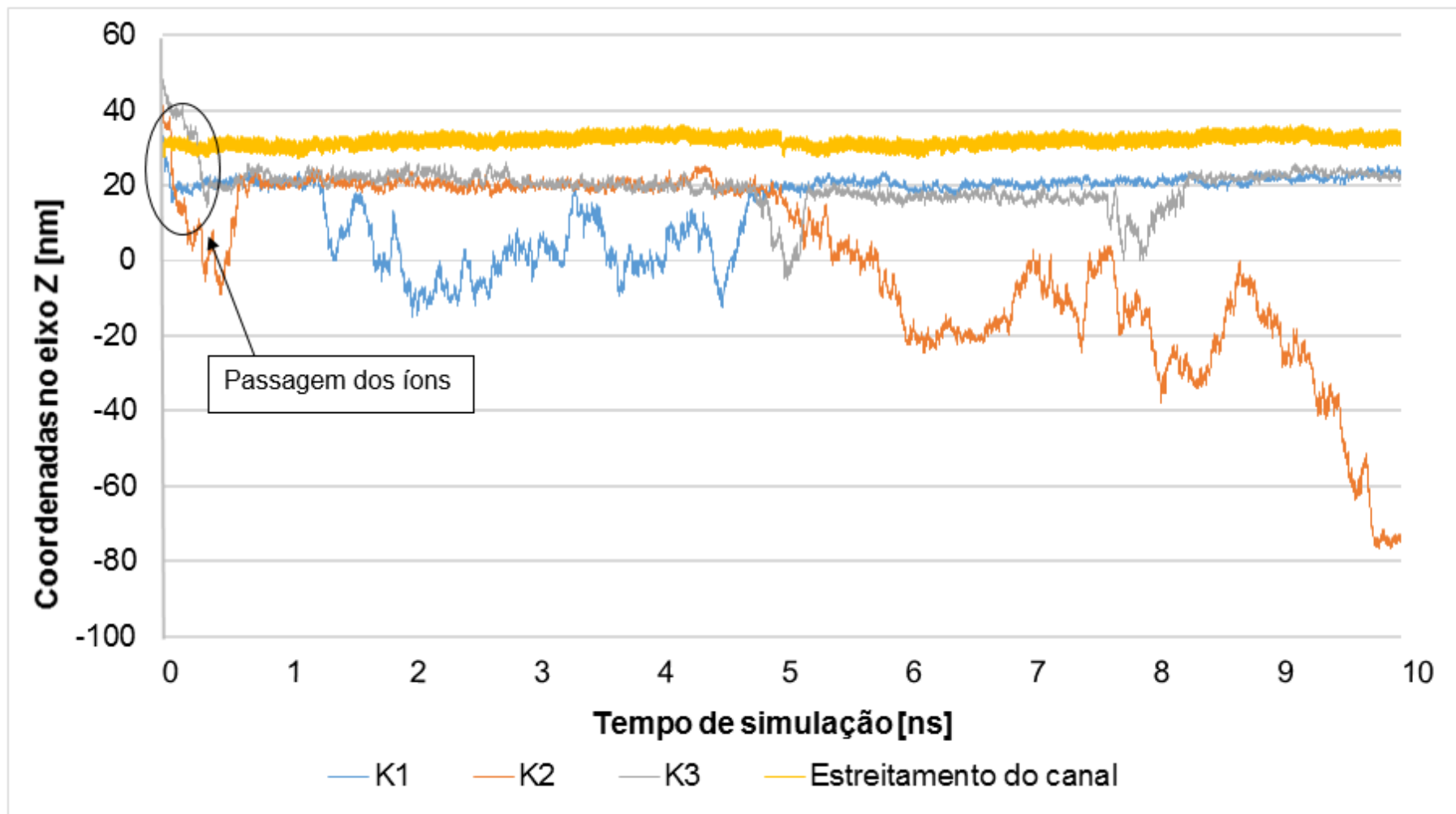


Figura 42: Difusão dos íons de potássio sem os parâmetros de restrição de movimento e utilizando um campo elétrico - 0,046V/nm.

Como observado no Figura 43, os tempos de passagem dos íons pelo canal são diferenciados. K1 completa sua permeação em torno de 25ps, K2 em ~ 50ps e K3 ~ 350ps.

Este tempo diferenciado na passagem dos íons pode ser consequência da liberdade conformacional da proteína, visto que após a passagem do íon K1 o receptor se fecha, para então durante a passagem de K2 novamente se abrir, sendo o mesmo comportamento para passagem do íon K3. Este período de abertura e fechamento, aumenta o tempo de passagem dos íons K2 e K3. Esta flexibilidade pode ser correlacionada com o tempo de abertura o sitio de ligação ao ATP. Durante o processo de fechamento do canal, é observado um movimento de abertura do sítio de ligação ao ATP.

Se considerarmos que o movimento de fechamento do canal estará completo apenas quando toda a proteína se estabiliza, ou seja, tanto a região transmembranar quanto a alça extracelular em região de sítio de ligação ao ATP, podemos inferir que os processos de fechamento e abertura do canal foram possíveis pois a proteína ainda não havia conformado totalmente em um estado fechado, proporcionando uma flexibilidade na região de estreitamento do canal.

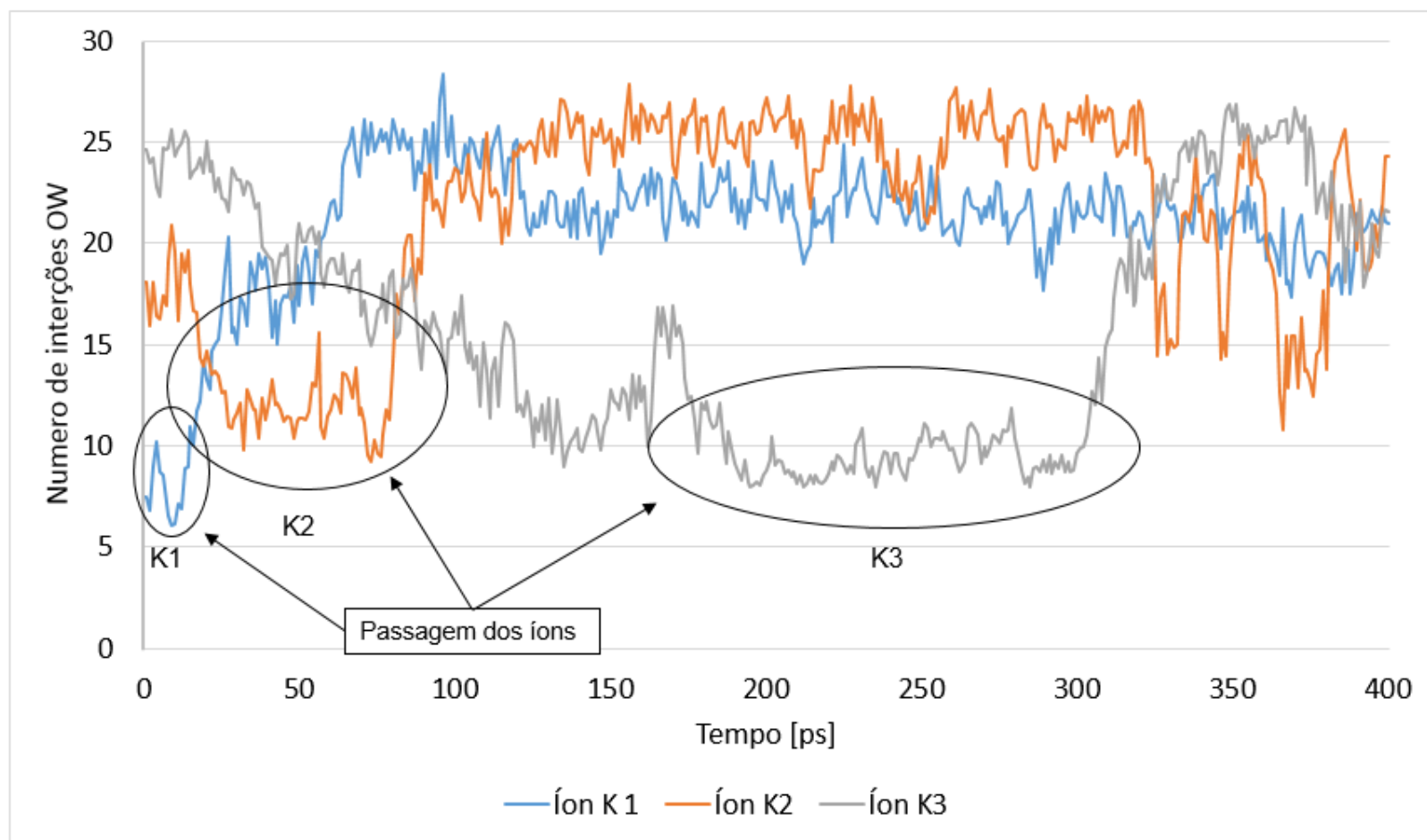


Figura 43: Número de coordenação entre os íons de potássio e as moléculas de água. Dentro dos círculos destaque para os íons K1, K2 e K3 e os momentos de sua passagem.

Para avaliar a seletividade do canal aos íons catiônicos foram executadas dinâmicas para avaliar se os íons aniônicos (cloreto) seriam capazes de passar pelo canal. Neste caso os valores de efeito de campo elétrico foram dobrados ($+ 0,092\text{V/nm}$) e sua polaridade invertida, no intuito de forçar a passagem de íons cloreto pela luz do canal.

Os íons cloreto foram posicionados utilizando as mesmas coordenadas dos íons de potássio. Estes sistemas foram simulados com e sem a utilização de restrição de movimentos da proteína.

Após 10 ps apenas o íon posicionado mais próximo a luz do canal foi capaz de permear para o meio intracelular. Já os demais ânions além de não ultrapassarem o canal foram expelidos para região extracelular entre 5 ns e 7 ns de simulação.

Em um primeiro momento é possível observar a passagem do íon cloreto localizado mais próximo a luz do canal. Entre tanto mesmo com o efeito e campo induzindo a passagem dos ânions, eles foram expelidos da luz do canal a direção oposta a tendência do campo elétrico, mostrando uma tendência do receptor quanto a sua seletividade catiônica reportada nos dados experimentais. Este mesmo resultado foi observado para o sistema com restrição de movimentos da proteína.

Com retirada das restrições de movimento é possível notar que para a passagem ânion ocorra o estreitamento do canal se abre alguns Angstroms a mais para que a passagem do potássio ($\sim 2 \text{ \AA}$).

No momento de sua passagem o cloreto não perde sua solvatação, necessitando passar com um número maior de moléculas de água do que o potássio.

Em contra partida, durante a passagem dos íons catiônicos é perceptível uma redução gradual na solvatação dos íons diretamente proporcional ao estreitamento do canal iônico, como podemos observar através do número de coordenação das moléculas de água em relação aos íons catiônicos do sistema.

Na primeira dinâmica com restrição de movimentos da proteína e sem o efeito de campo elétrico podemos observar que apenas o íon K1 mais próximo do canal permeou pela membrana em um tempo de aproximadamente 1ns. Nesta mesma escala de tempo podemos observar que o íon K1 (mais próximo do estreitamento do canal) recuperou sua solvatação ao após 600ps. Quando observado na Figura 37, 600 ps é o momento aproximado do término da passagem do íon, revelando a recuperação da solvatação após a passagem total do íon pela proteína.

Durante a passagem dos íons é perceptível uma redução gradual na solvatação dos íons de Potássio diretamente proporcional ao estreitamento do canal iônico, como podemos observar através do número de coordenação das moléculas de água em relação aos íons catiônicos do sistema.

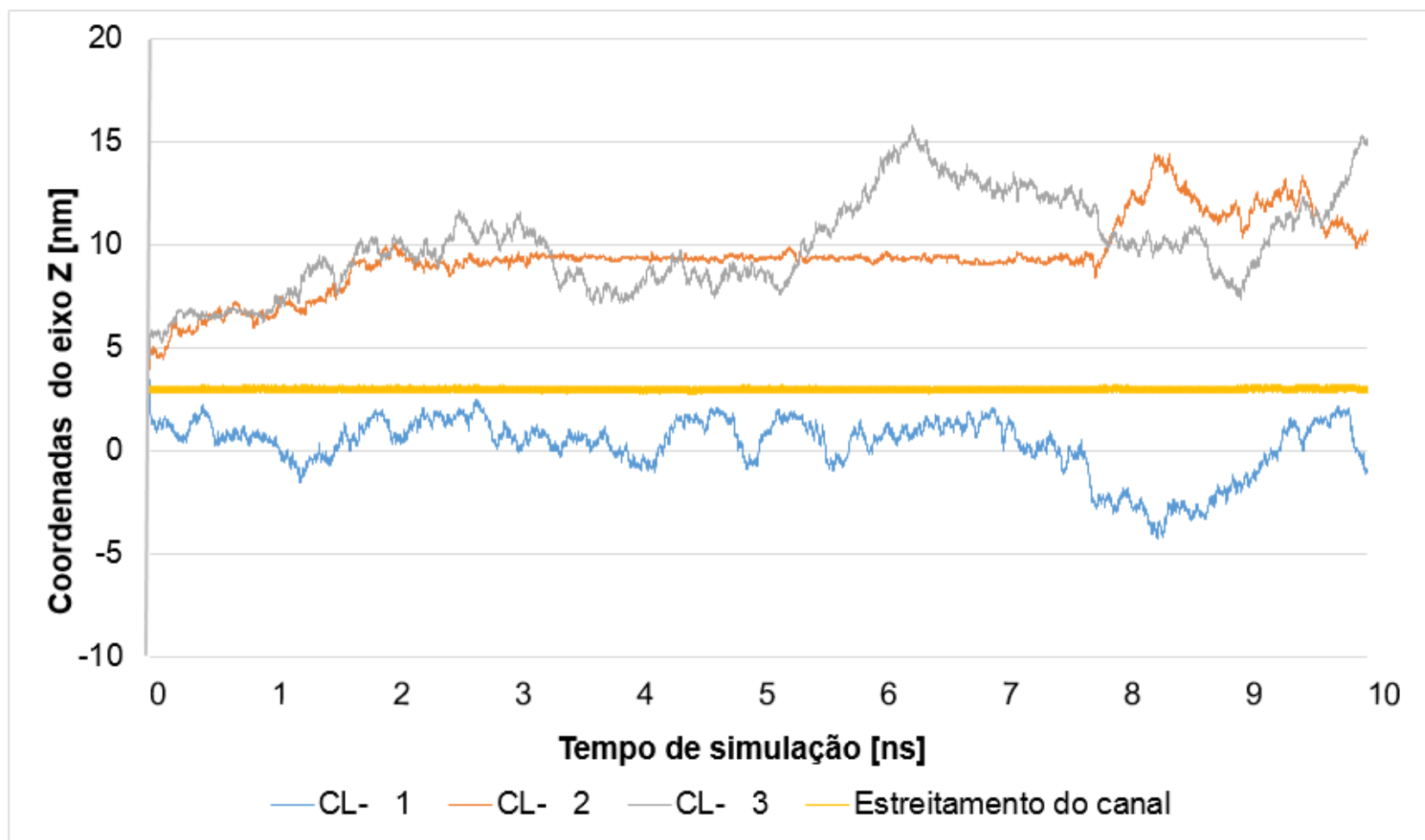


Figura 44: Difusão dos íons cloreto com a utilização de um campo elétrico de 0,092V/nm para forçar a passagem dos íons aniônicos através da luz do canal.

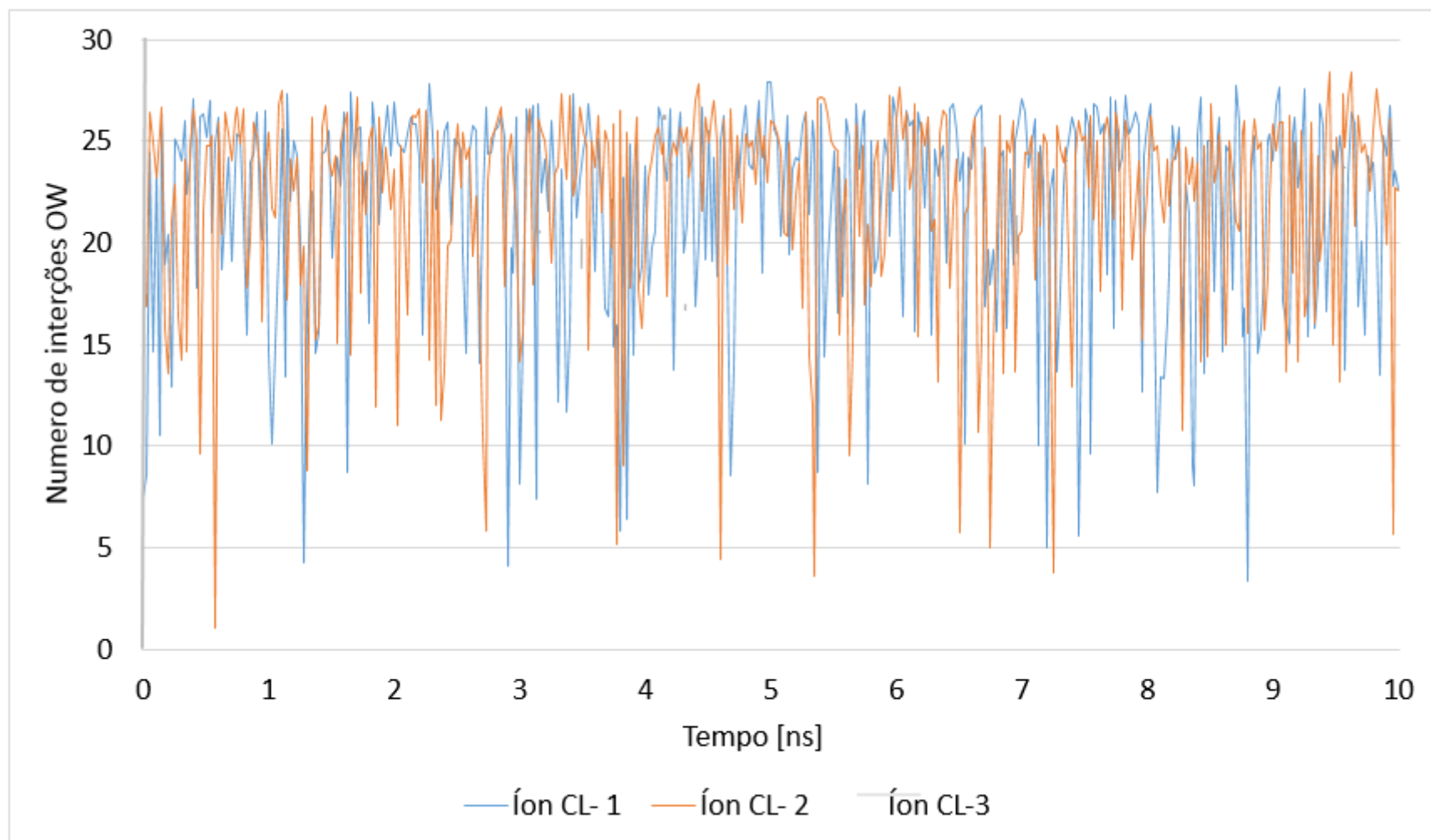


Figura 45: Número de coordenação entre os íons de cloro e as moléculas de água.

5 CONCLUSÕES

- A otimização dos modelos do receptor P2X7 reportaram resultados satisfatórios frente aos servidores de validação, aumentando a confiança dos modelos para execução de dinâmicas moleculares;
- O sistema de bicamada lipídica constituído de DPPC corroborou como os dados experimentais e simulados previamente por Kukol 2009;
- A inserção do modelo do P2X7 humano ao sistema de bicamada lipídica não alterou significativamente as propriedades biológicas descritas como densidade de lipídios, desvio lateral, largura média da bicamada;
- A região de alça extracelular tendeu a se estruturar mais em conformação em de folha beta após a realização das simulações de DM;
- O tempo total de fechamento do canal iônico do P2X7 se dá após a total abertura do sítio de ligação ao ATP, já que, durante a passagem dos íons ocorreu um movimento de abertura e fechamento da região transmembranar;
- Durante este processo a região de sítio de ligação ao ATP não se abriu totalmente e transitou entre o estado aberto e fechado até a passagem de todos os íons;
- Devido aos efeitos da abertura e do fechamento do canal, os tempos de passagem de cada íon de potássio se mostraram diferentes. Mas na ordem de picossegundos;
- A passagem dos íons catiônicos se mostrou mais eficiente após a implementação do efeito de campo elétrico, juntamente com a remoção das restrições de movimento foi possível observar a passagem de todos os íons de potássio. Isto propõem que a liberdade conformacional da proteína favorece a passagem dos íons ou mesmo esteja ligada diretamente a seletividade do canal;
- Os ânions tiveram maior dificuldade na passagem pelo canal. Mesmo com um efeito de campo elétrico duas vezes maior para favorecer a passagem dos íons, apenas um ânion foi capaz de passar pela membrana. Além disso, os íons que não permearam a membrana foram expulsos da luz do canal, fortalecendo as características de seletividade do canal;

- As regiões com densidade de carga negativa podem estar intimamente ligadas a atração dos íons para as regiões de janelas laterais e posteriormente guiar os íons catiônicos para a luz do canal, em outras palavras, estes resíduos negativos podem estar ligados aos processos de seletividade do canal já que estes mesmos resíduos diminuem consideravelmente a passagem dos íons aniônicos;
- O sistema simulado apresentou características de seu comportamento dinâmico semelhantes aquelas já descritas para o receptor P2X7, tais como: seletividade a cátions e um rápido retorno (em tempo de simulação) ao seu estado inicial (fechado), quando simulado a partir de seu estado aberto (sem ATP). Apresentando-se como um modelo em potencial para estudos futuros.
- O sistema possui limitações que devem ser levadas em consideração como: i) o fato de ter sido usado apenas um tipo de lipídio na constituição da bicamada; ii) a passagem dos íons ocorre de maneira muito rápida em relação aos dados experimentais; iii) não foi possível até o momento estudar a formação de um poro através das técnicas empregadas sem as regiões N e C terminais.

6 PERSPECTIVAS

Estes dados serão utilizados na realização de *screening virtual* para identificação de possíveis molecular agonistas e antagonistas a este receptor. Também almejamos a construção da região C-terminal inexistente no PDB do molde e do modelo para realização de experimento *in silico* referentes à formação do poro.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990. ISSN 0022-2836.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v. 215, n. 3, p. 403-10, Oct 5 1990. ISSN 0022-2836 (Print)
0022-2836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2231712> >.

ALVES, L. A. et al. Structural and molecular modeling features of P2X receptors. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 3, p. 4531-4549, 2014.

BEHRENDTS, J. C. Evolution of the ion channel concept: the historical perspective. **Chem Rev**, v. 112, n. 12, p. 6218-26, Dec 12 2012. ISSN 1520-6890 (Electronic)
0009-2665 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23194182> >.

BERENDSEN, H. J. et al. Interaction models for water in relation to protein hydration. In: (Ed.). **Intermolecular forces**: Springer, 1981. p.331-342. ISBN 9048183685.

BERENDSEN, H. J. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of chemical physics**, v. 81, n. 8, p. 3684-3690, 1984. ISSN 0021-9606.

BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 58, n. Pt 6 No 1, p. 899-907, Jun 2002. ISSN 0907-4449 (Print)
0907-4449 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12037327> >.

BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Res**, v. 28, n. 1, p. 235-42, Jan 1 2000. ISSN 0305-1048 (Print)
0305-1048 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10592235> >.

BERNSTEIN, F. C. et al. The Protein Data Bank. A computer-based archival file for macromolecular structures. **Eur J Biochem**, v. 80, n. 2, p. 319-24, Nov 1 1977.
Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=923582 >.

BISAGGIO, R. et al. Characterization of P2 receptors in thymic epithelial cells. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 47, n. 1, p. 19-31, 2001. ISSN 0145-5680.

BLUNDELL, T. L. et al. Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules. **Nature**, v. 326, n. 6111, p. 347-52, Mar 26-Apr 1 1987. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3550471 >.

BORDAG, N.; KELLER, S. α -Helical transmembrane peptides: a “divide and conquer” approach to membrane proteins. **Chemistry and physics of lipids**, v. 163, n. 1, p. 1-26, 2010. ISSN 0009-3084.

BROOKS, B. R. et al. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. **Journal of computational chemistry**, v. 4, n. 2, p. 187-217, 1983. ISSN 1096-987X.

BROOKS, C. L.; KARPLUS, M.; PETTITT, B. M. **Proteins : a theoretical perspective of dynamics, structure, and thermodynamics**. New York: J. Wiley, 1988. xiii, 259 p. ISBN 0471628018. Disponível em: < Publisher description <http://www.loc.gov/catdir/description/wiley037/87015993.html> Table of Contents <http://www.loc.gov/catdir/toc/onix04/87015993.html> >.

BROWNE, L. E. et al. P2X7 receptor channels allow direct permeation of nanometer-sized dyes. **J Neurosci**, v. 33, n. 8, p. 3557-66, Feb 20 2013. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23426683> >.

BUELL, G.; COLLO, G.; RASSENDREN, F. P2X receptors: an emerging channel family. **European Journal of Neuroscience**, v. 8, n. 10, p. 2221-2228, 1996. ISSN 1460-9568.

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 12, p. 1471-1483, 2007. ISSN 1420-682X.

BURNSTOCK, G. Unresolved issues and controversies in purinergic signalling. **The Journal of physiology**, v. 586, n. 14, p. 3307-3312, 2008. ISSN 1469-7793.

BURNSTOCK, G. C., T; CROWE, R; KASAKOV, L. Purinergic innervation of the guinea-pig urinary bladder. **J. Pharmac**, v. 63, p. 125-138, 1978.

BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **The Journal of chemical physics**, v. 126, n. 1, p. 014101, 2007. ISSN 0021-9606.

CHANGEUX, J. et al. [Separation of excitable membranes from the electric organ of *Electrophorus electricus*]. **Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles**, v. 269, n. 18, p. 1788-1791, 1969.

COLOVOS, C.; YEATES, T. O. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. **Protein Sci**, v. 2, n. 9, p. 1511-9, Sep 1993. ISSN 0961-8368 (Print) 0961-8368 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8401235>>.

COOK, R. D.; BURNSTOCK, G. The ultrastructure of Auerbach's plexus in the guinea-pig. II. Non-neuronal elements. **Journal of neurocytology**, v. 5, n. 2, p. 195-206, 1976. ISSN 0300-4864.

CORREA, G. et al. Activation of the P2X(7) receptor triggers the elimination of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from infected macrophages. **Microbes Infect**, v. 12, n. 6, p. 497-504, Jun 2010. ISSN 1769-714X (Electronic) 1286-4579 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20298798>>.

COSTA-JUNIOR, H. M.; SARMENTO VIEIRA, F.; COUTINHO-SILVA, R. C terminus of the P2X7 receptor: treasure hunting. **Purinergic Signal**, v. 7, n. 1, p. 7-19, Mar 2011. ISSN 1573-9546 (Electronic). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21484094>>.

COUTINHO-SILVA, R. et al. A cation non-selective channel induced by extracellular ATP in macrophages and phagocytic cells of the thymic reticulum. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1278, n. 1, p. 125-130, 1996. ISSN 0005-2736.

DA SILVA, V. B. Modelagem molecular de proteínas-alvo por homologia estrutural. **Revista eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 1, 2007. ISSN 1808-0804.

DAURA, X.; MARK, A. E.; VAN GUNSTEREN, W. F. Parametrization of aliphatic CHn united atoms of GROMOS96 force field. **Journal of computational chemistry**, v. 19, n. 5, p. 535-547, 1998. ISSN 1096-987X.

DE SOUZA, C. A. et al. A consensus segment in the M2 domain of the hP2X(7) receptor shows ion channel activity in planar lipid bilayers and in biological membranes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1818, n. 1, p. 64-71, Jan 2012. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21958668>>.

DI TOMMASO, P. et al. T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. **Nucleic acids research**, p. gkr245, 2011. ISSN 0305-1048.

DORI, Y. J.; BARAK, M. Virtual and physical molecular modeling: Fostering model perception and spatial understanding. **Educational Technology & Society**, v. 4, n. 1, p. 61-74, 2001.

DRURY A. N. , S.-G. A. **J. Physiol**, v. 68, p. 213-237, 1929.

DUPONT, Y.; COHEN, J. B.; CHANGEUX, J. P. X-ray diffraction study of membrane fragments rich in acetylcholine receptor protein prepared from the electric organ of *Torpedo marmorata*. **FEBS Lett**, v. 40, n. 1, p. 130-3, Mar 15 1974. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4855432> >.

EDDY, S. R. Where did the BLOSUM62 alignment score matrix come from? **Nature biotechnology**, v. 22, n. 8, p. 1035-1036, 2004. ISSN 1087-0156.

FARIA, R. X.; DEFARIAS, F. P.; ALVES, L. A. Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor? **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 288, n. 2, p. C260-C271, 2005. ISSN 0363-6143.

FILIPPOV, A.; ORÄDD, G.; LINDBLOM, G. Influence of cholesterol and water content on phospholipid lateral diffusion in bilayers. **Langmuir**, v. 19, n. 16, p. 6397-6400, 2003. ISSN 0743-7463.

FORD, A. P. et al. Purinoceptors as therapeutic targets for lower urinary tract dysfunction. **British journal of pharmacology**, v. 147, n. S2, p. S132-S143, 2006. ISSN 1476-5381.

FRENKEL, D.; SMIT, B. **Understanding molecular simulation: from algorithms to applications**. Academic press, 2001. ISBN 0080519989.

GOLDSMITH-FISCHMAN, S.; HONIG, B. Structural genomics: computational methods for structure analysis. **Protein Sci**, v. 12, n. 9, p. 1813-21, Sep 2003. ISSN 0961-8368 (Print)

0961-8368 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12930981> >.

HALGREN, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **Journal of computational chemistry**, v. 17, n. 5-6, p. 490-519, 1996. ISSN 1096-987X.

HATTORI, M.; GOUAUX, E. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. **Nature**, v. 485, n. 7397, p. 207-212, 05/10/print 2012. ISSN 0028-0836. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1038/nature11010> >.

HENIKOFF, S.; HENIKOFF, J. G. Amino acid substitution matrices from protein blocks. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 22, p. 10915-9, Nov 15 1992. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1438297> >.

HESS, B. et al. A linear constraint solver for molecular simulations. **J. Comput. Chem**, v. 18, p. 1463-1472, 1997.

HOCKNEY, R.; GOEL, S.; EASTWOOD, J. Quiet high-resolution computer models of a plasma. **Journal of Computational Physics**, v. 14, n. 2, p. 148-158, 1974. ISSN 0021-9991.

HOOFT, R. W. et al. Errors in protein structures. **Nature**, v. 381, n. 6580, p. 272, May 23 1996. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8692262> >.

IANNUZZI, M.; LAIO, A.; PARRINELLO, M. Efficient exploration of reactive potential energy surfaces using Car-Parrinello molecular dynamics. **Physical review letters**, v. 90, n. 23, p. 238302, 2003.

JOOSTEN, R. P. et al. A series of PDB related databases for everyday needs. **Nucleic Acids Res**, v. 39, n. Database issue, p. D411-9, Jan 2011. ISSN 1362-4962 (Electronic)
0305-1048 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21071423> >.

KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. **Biopolymers**, v. 22, n. 12, p. 2577-637, Dec 1983. ISSN 0006-3525 (Print)
0006-3525 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6667333> >.

KANDT, C.; ASH, W. L.; TIELEMAN, D. P. Setting up and running molecular dynamics simulations of membrane proteins. **Methods**, v. 41, n. 4, p. 475-88, Apr 2007. ISSN 1046-2023 (Print)
1046-2023 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17367719> >.

KARPLUS, K. et al. Combining local-structure, fold-recognition, and new fold methods for protein structure prediction. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 53, n. S6, p. 491-496, 2003. ISSN 1097-0134.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013. ISSN 0737-4038.

KAWATE, T. et al. Crystal structure of the ATP-gated P2X4 ion channel in the closed state. **Nature**, v. 460, n. 7255, p. 592-598, 2009. ISSN 0028-0836.

KAWATE, T. et al. Ion access pathway to the transmembrane pore in P2X receptor channels. **The Journal of general physiology**, v. 137, n. 6, p. 579-590, 2011. ISSN 0022-1295.

KLOSE, D.; WALLACE, B. A.; JANES, R. W. 2Struc: the secondary structure server. **Bioinformatics**, v. 26, n. 20, p. 2624-2625, 2010. ISSN 1367-4803.

KONINGS, R. J. et al. Comprehensive nuclear materials.

KUCERKA, N.; TRISTRAM-NAGLE, S.; NAGLE, J. F. Structure of fully hydrated fluid phase lipid bilayers with monounsaturated chains. **J Membr Biol**, v. 208, n. 3, p. 193-202, Dec 2005. ISSN 0022-2631 (Print) 0022-2631 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16604469> >.

KUČERKA, N.; TRISTRAM-NAGLE, S.; NAGLE, J. F. Closer look at structure of fully hydrated fluid phase DPPC bilayers. **Biophysical journal**, v. 90, n. 11, p. L83-L85, 2006. ISSN 0006-3495.

KUKOL, A. Lipid models for united-atom molecular dynamics simulations of proteins. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 5, n. 3, p. 615-626, 2009. ISSN 1549-9618.

LASKOWSKI, R. A. et al. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. **J Biomol NMR**, v. 8, n. 4, p. 477-86, Dec 1996. ISSN 0925-2738 (Print) 0925-2738 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9008363> >.

LE FEUVRE, R.; BROUGH, D.; ROTHWELL, N. Extracellular ATP and P2X7 receptors in neurodegeneration. **European journal of pharmacology**, v. 447, n. 2, p. 261-269, 2002. ISSN 0014-2999.

LINDAHL, E.; HESS, B.; VAN DER SPOEL, D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. **Molecular modeling annual**, v. 7, n. 8, p. 306-317, 2001. ISSN 0949-183X.

LINDORFF-LARSEN, K. et al. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 78, n. 8, p. 1950-1958, 2010. ISSN 1097-0134.

MACARTHUR, M. W.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. Knowledge-based validation of protein structure coordinates derived by X-ray crystallography and NMR spectroscopy. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 4, n. 5, p. 731-737, 1994. ISSN 0959-440X.

MACKERELL, A. D.; FEIG, M.; BROOKS, C. L. Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: Limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 11, p. 1400-1415, 2004. ISSN 1096-987X.

MARTÍ-RENOM, M. A. et al. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 29, n. 1, p. 291-325, 2000. ISSN 1056-8700.

MCWILLIAM, H. et al. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. **Nucleic Acids Res**, v. 41, n. Web Server issue, p. W597-600, Jul 2013. ISSN 1362-4962 (Electronic)
0305-1048 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23671338> >.

MOUNT, D. W. Using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). **CSH Protoc**, v. 2007, p. pdb top17, 2007. ISSN 1559-6095 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21357135> >.

OOSTENBRINK, C. et al. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1656-1676, 2004. ISSN 1096-987X.

PARASURAMAN, S. Protein data bank. **J Pharmacol Pharmacother**, v. 3, n. 4, p. 351-2, Oct 2012. ISSN 0976-500X (Print)
0976-500X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23326114> >.

PRONK, S. et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. **Bioinformatics**, v. 29, n. 7, p. 845-54, Apr 1 2013. ISSN 1367-4811 (Electronic)
1367-4803 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23407358> >.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacological reviews**, v. 50, n. 3, p. 413-492, 1998. ISSN 1521-0081.

RASSENDREN, F. et al. The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. **J Biol Chem**, v. 272, n. 9, p. 5482-6, Feb 28 1997. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9038151> >.

SAIZ, L.; BANDYOPADHYAY, S.; KLEIN, M. Towards an understanding of complex biological membranes from atomistic molecular dynamics simulations. **Bioscience reports**, v. 22, p. 151-173, 2002.

SALI, A. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. **Mol Med Today**, v. 1, n. 6, p. 270-7, Sep 1995. ISSN 1357-4310 (Print)
1357-4310 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9415161> >.

SALI, A. et al. Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER. **Proteins**, v. 23, n. 3, p. 318-26, Nov 1995. ISSN 0887-3585 (Print)
0887-3585 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8710825> >.

SAMWAYS, D. S.; LI, Z.; EGAN, T. M. Principles and properties of ion flow in P2X receptors. **Front Cell Neurosci**, v. 8, p. 6, 2014. ISSN 1662-5102 (Electronic) 1662-5102 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24550775>>.

SANCHEZ, R.; SALI, A. Evaluation of comparative protein structure modeling by MODELLER-3. **Proteins**, v. Suppl 1, p. 50-8, 1997. ISSN 0887-3585 (Print) 0887-3585 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9485495>>.

_____. Comparative protein structure modeling in genomics. **J. Computational Physics**, v. 151, p. 338, 1998.

SÁNCHEZ, R.; ŠALI, A. Comparative protein structure modeling in genomics. **Journal of Computational Physics**, v. 151, n. 1, p. 388-401, 1999. ISSN 0021-9991.

SANJAY CHANDRASEKHARAN, N. J. N., VRISHALI SUBRAMANIAN. Computational Modeling: Is this the end of thought experiments in science? , 2011.

SONNE, J. et al. Reparameterization of all-atom dipalmitoylphosphatidylcholine lipid parameters enables simulation of fluid bilayers at zero tension. **Biophys J**, v. 92, n. 12, p. 4157-67, Jun 15 2007. ISSN 0006-3495 (Print) 0006-3495 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17400696>>.

SRINIVASAN, S.; MARCH, C. J.; SUDARSANAM, S. An automated method for modeling proteins on known templates using distance geometry. **Protein Sci**, v. 2, n. 2, p. 277-89, Feb 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8443604>.

STATES, D. J.; GISH, W.; ALTSCHUL, S. F. Improved sensitivity of nucleic acid database searches using application-specific scoring matrices. **Methods**, v. 3, n. 1, p. 66-70, 1991. ISSN 1046-2023.

STEFANELLO¹, A. L. et al. Programação Paralela Híbrida em CPU e GPU: Uma Alternativa na Busca por Desempenho.

SVANBERG, B. M. RESEARCH NOTE An improved leap-frog rotational algorithm. **Molecular physics**, v. 92, n. 6, p. 1085-1088, 1997. ISSN 0026-8976.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. **Curr Protoc Bioinformatics**, v. Chapter 2, p. Unit 2 3, Aug 2002. ISSN 1934-340X (Electronic) 1934-3396 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18792934>>.

TILDESLEY, D.; ALLEN, M. Computer simulation of liquids. **Clarendon, Oxford**, 1987.

TURCHENKOV, D. A.; BYSTROV, V. S. Conductance Simulation of the Purinergic P2X2, P2X4, and P2X7 Ionic Channels Using a Combined Brownian Dynamics and Molecular Dynamics Approach. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 31, p. 9119-9127, 2014. ISSN 1520-6106.

VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. Computer simulation of molecular dynamics: Methodology, applications, and perspectives in chemistry. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 29, n. 9, p. 992-1023, 1990. ISSN 1521-3773.

VRIEND, G. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. **J Mol Graph**, v. 8, n. 1, p. 52-6, 29, Mar 1990. ISSN 0263-7855 (Print) 0263-7855 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2268628> >.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative protein structure modeling using Modeller. **Current protocols in bioinformatics**, p. 5.6. 1-5.6. 32, 2014. ISSN 0471250953.

WOLF, M. G. et al. g_membed: Efficient insertion of a membrane protein into an equilibrated lipid bilayer with minimal perturbation. **J Comput Chem**, v. 31, n. 11, p. 2169-74, Aug 2010. ISSN 1096-987X (Electronic) 0192-8651 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20336801> >.

WOOD, W., CICCOTTI, G., AND HOOVER, W. G. in Molecular Dynamics Simulations of Statistical Mechanics Systems. **Proceedings of the 97th Int. "Enrico Fermi" School on Physics**, p. 2-14, 1986.

WU, Y.; LEE, J.; WANG, Y. **A Comparative Study of GROMACS and NAMD**: Unpublished 2007.

ANEXOS – Configuração das máquinas utilizadas

Tabela 5: Configuração do Cluster SMP diskless, com foco nos principais periféricos.

Cluster SMP DISKLESS com 5 nós	Processador	Placa Gráfica	Memória RAM	Sistema Operacional
1 nó mestre	1 x ®Intel core i5 Terceira geração	1 x GTX 650T	16 gigabytes	Centos 6.4 (®Red-hat clone)
4 nós escravos	4 x ®Intel core i5 Terceira geração	Ausentes	32 gigabytes	Centos 6.4 (®Red-hat clone)

Tabela 6: Configuração dos servidores utilizados, com foco nos principais periféricos.

	Processador	Placas gráficas	Memória RAM	Sistema Operacional
Servidor 1	2 x ®Intel Xeon 6 núcleos	®Nvidia GTX Titan	128 gigabytes	Centos 6.5 (®Red-hat clone)
Servidor 2	2 x ®Intel Xeon 6 núcleos	®Nvidia GTX Titan	64 gigabytes	Centos 6.5 (®Red-hat clone)
Servidor 3 e 4	2 x ®Intel Xeon 6 núcleos	®Nvidia GTX 780ti	64 gigabytes	Centos 6.5 (®Red-hat clone)

ANEXOS – Arquivo de entrada para inserção da proteína em bicamada

```
include          =
define          =
; RUN CONTROL PARAMETERS
integrator      = md
; Start time and timestep in ps
tinit          = 0
dt             = 0.002
nsteps         = 2000
; For exact run continuation or redoing part of a run
init_step      = 0
; mode for center of mass motion removal
comm-mode      = Linear
; number of steps for center of mass motion removal
nstcomm       = 1
; group(s) for center of mass motion removal
comm-grps     =
; TEXT PARTICLE INSERTION OPTIONS
rtpi          = 0.05
; OUTPUT CONTROL OPTIONS
; Output frequency for coords (x), velocities (v) and forces (f)
nstxout       = 100000
nstvout       = 100000
nstfout       = 100000
; Output frequency for energies to log file and energy file
nstlog        = 100000
nstenergy     = 50
; OPTIONS FOR ELECTROSTATICS AND VDW
; Method for doing electrostatics
coulombtype   = Cut-off
rcoulomb-switch = 0
rcoulomb      = 1.2
```

```

; Dielectric constant (DC) for cut-off or DC of reaction field
epsilon-r          = 1
; Method for doing Van der Waals
vdw-type          = Cut-off
; cut-off lengths
rvdw-switch       = 0
rvdw              = 1.2
; Apply long range dispersion corrections for Energy and Pressure
DispCorr          = no
; Extension of the potential lookup tables beyond the cut-off
table-extension   = 1
; Spacing for the PME/PPPM FFT grid
fourierspacing    = 0.14
; FFT grid size, when a value is 0 fourierspacing will be used
fourier_nx        = 0
fourier_ny        = 0
fourier_nz        = 0
; EWALD/PME/PPPM parameters
pme_order         = 4
ewald_rtol        = 1e-05
ewald_geometry    = 3d
epsilon_surface   = 0
optimize_fft      = no
; GENERALIZED BORN ELECTROSTATICS
; Algorithm for calculating Born radii
gb_algorithm      = Still
; Frequency of calculating the Born radii inside rlist
nstgbradii       = 1
; Cutoff for Born radii calculation; the contribution from atoms
; between rlist and rgradii is updated every nstlist steps
rgradii          = 2

```

```

;Dielectric coefficient of the implicit solvent
gb_epsilon_solvent    = 80
;Salt concentration in M for Generalized Born models
gb_saltconc           = 0
; Scaling factors used in the OBC GB model. Default values are OBC(II)
gb_obc_alpha          = 1
gb_obc_beta           = 0.8
gb_obc_gamma          = 4.85
; Surface tension (kJ/mol/nm^2) for the SA (nonpolar surface) part of
GBSA
; The default value (2.092) corresponds to 0.005 kcal/mol/Angstrom^2.
sa_surface_tension    = 2.092
; IMPLICIT SOLVENT (for use with Generalized Born electrostatics)
implicit_solvent      = No
; OPTIONS FOR WEAK COUPLING ALGORITHMS
; Temperature coupling
Tcoupl                 = v-rescale
; Groups to couple separately
tc-grps                = Protein DPPC    SOL
; Time constant (ps) and reference temperature (K)
tau_t                  = 0.1    0.1 0.1
ref_t                  = 300    300 300
; Pressure coupling
Pcoupl                 = Berendsen
Pcoupltype             = semiisotropic
; Time constant (ps), compressibility (1/bar) and reference P (bar)
tau_p                  = 1 1
compressibility         = 5.3e-05 5.3e-05
ref_p                   = 1.01325 1.01325
; Scaling of reference coordinates, No, All or COM
refcoord_scaling       = No

```

```

; OPTIONS FOR QMMM calculations
QMMM          = no
; Groups treated Quantum Mechanically
; QMMM scheme
QMMMScheme    = normal
; Scale factor for MM charges
MMChargeScaleFactor = 1
; GENERATE VELOCITIES FOR STARTUP RUN
gen_vel       = yes
gen_temp      = 300
gen_seed      = 173529
; OPTIONS FOR BONDS
constraints    = all-bonds
; Type of constraint algorithm
constraint-algorithm = Lincs
; Do not constrain the start configuration
continuation  = no
; Use successive overrelaxation to reduce the number of shake
iterations
Shake-SOR     = no
; Relative tolerance of shake
shake-tol     = 1e-04
; Highest order in the expansion of the constraint coupling matrix
lincs-order   = 4
; Number of iterations in the final step of LINCS. 1 is fine for
; normal simulations, but use 2 to conserve energy in NVE runs.
; For energy minimization with constraints it should be 4 to 8.
lincs-iter    = 1
; Lincs will write a warning to the stderr if in one step a bond
; rotates over more degrees than
lincs-warnangle = 30
; Convert harmonic bonds to morse potentials
morse        = no

```



```

; ENERGY GROUP EXCLUSIONS
; Pairs of energy groups for which all non-bonded interactions are
excluded
energygrp_excl      = Protein Protein
; WALLS
; Number of walls, type, atom types, densities and box-z scale factor for
Ewald
nwall               = 0
wall_type           = 9-3
wall_r_linpot       = -1
wall_ewald_zfac     = 3
; COM PULLING
; Pull type: no, umbrella, constraint or constant_force
pull                = no
; NMR refinement stuff
; Distance restraints type: No, Simple or Ensemble
disre               = No
; Force weighting of pairs in one distance restraint: Conservative or
Equal
disre-weighting     = Conservative
; Use sqrt of the time averaged times the instantaneous violation
disre-mixed         = no
disre-fc            = 1000
disre-tau           = 0
; Output frequency for pair distances to energy file
nstdisreout        = 100
; Orientation restraints: No or Yes
orire               = no
; Orientation restraints force constant and tau for time averaging
orire-fc            = 0
orire-tau           = 0
orire-fitgrp        =

```

```
; Output frequency for trace(SD) to energy file
nstorireout      = 100
; Dihedral angle restraints: No, Simple or Ensemble
dihre           = No
dihre-fc        = 1000
; Free energy control stuff
free-energy      = no
init-lambda     = 0
delta-lambda    = 0.001
sc-alpha        = 0
sc-power        = 0
sc-sigma        = 0.3
couple-moltype  =
couple-lambda0  = vdw-q
couple-lambda1  = vdw-q
couple-intramol = no
; Non-equilibrium MD stuff
acc-grps        =
accelerate      =
freezegrps      = Protein
freezedim       = Y Y Y
cos-acceleration =
deform          =
```

Arquivo de entrada para simulações de bicamada lipídica

```
include      =
define      =
; RUN CONTROL PARAMETERS
integrator   = md
; Start time and timestep in ps
tinit       = 0
dt          = 0.002
nsteps      = 40000000
; For exact run continuation or redoing part of a run
init_step   = 0
; mode for center of mass motion removal
comm-mode   = Linear
; number of steps for center of mass motion removal
nstcomm     = 100
; group(s) for center of mass motion removal
comm-grps   =
; LANGEVIN DYNAMICS OPTIONS
; Temperature, friction coefficient (amu/ps) and random seed
bd-fric     = 0
ld-seed     = 1993
; OUTPUT CONTROL OPTIONS
; Output frequency for coords (x), velocities (v) and forces (f)
nstxout     = 500
nstvout     = 500
nstfout     = 0
; Output frequency for energies to log file and energy file
nstlog      = 500
nstenergy   = 500
```

```

; Output frequency and precision for xtc file
nstxtcout          = 500
xtc-precision      = 500
; This selects the subset of atoms for the xtc file. You can
; select multiple groups. By default all atoms will be written.
xtc-grps           =
; NEIGHBORSEARCHING PARAMETERS
cutoff-scheme      = Verlet
verlet-buffer-drift = 0.005
; nblast update frequency
nstlist            = 10
; ns algorithm (simple or grid)
ns_type            = grid
; Periodic boundary conditions: xyz (default), no (vacuum)
; or full (infinite systems only)
pbc                = xyz
; nblast cut-off
; OPTIONS FOR ELECTROSTATICS AND VDW
; Method for doing electrostatics
coulombtype        = pme
rcoulomb-switch    = 0
; Dielectric constant (DC) for cut-off or DC of reaction field
epsilon-r          = 1
; Method for doing Van der Waals
vdw-type           = Cut-off
; cut-off lengths
rvdw-switch        = 0
; Apply long range dispersion corrections for Energy and Pressure
DispCorr           = EnerPres

```

```

; Extension of the potential lookup tables beyond the cut-off
; Spacing for the PME/PPPM FFT grid
fourierspacing      = 0.14
; FFT grid size, when a value is 0 fourierspacing will be used
fourier_nx          = 0
fourier_ny          = 0
fourier_nz          = 0
; EWALD/PME/PPPM parameters
pme_order           = 4
ewald_rtol          = 1e-05
ewald_geometry      = 3d
epsilon_surface     = 0
optimize_fft        = yes
; OPTIONS FOR WEAK COUPLING ALGORITHMS
; Temperature coupling
Tcoupl              = v-rescale
; Groups to couple separately
tc-grps             = DPPC SOL
; Time constant (ps) and reference temperature (K)
tau_t               = 0.1  0.1
ref_t               = 300  300
; Pressure coupling
Pcoupl              = berendsen
Pcoupltype          = Semiisotropic
; Time constant (ps), compressibility (1/bar) and reference P (bar)
tau_p               = 1.0  1.0
compressibility     = 4.5e-5 4.5e-5
ref_p               = 1  1
refcoord_scaling    = all

```

```

; GENERATE VELOCITIES FOR STARTUP RUN
gen_vel          = yes
gen_temp         = 300
gen_seed         = 173529
; OPTIONS FOR BONDS
constraints      = all-bonds
; Type of constraint algorithm
constraint-algorithm = Lincs
; Do not constrain the start configuration
continuation     = no
; Use successive overrelaxation to reduce the number of shake
iterations
Shake-SOR        = no
; Relative tolerance of shake
shake-tol        = 1e-04
; Highest order in the expansion of the constraint coupling matrix
lincs-order      = 6
; Number of iterations in the final step of LINCS. 1 is fine for
; normal simulations, but use 2 to conserve energy in NVE runs.
; For energy minimization with constraints it should be 4 to 8.
lincs-iter       = 1
; Lincs will write a warning to the stderr if in one step a bond
; rotates over more degrees than
lincs-warnangle  = 30
; Convert harmonic bonds to morse potentials
morse           = no

```

Arquivo de entrada para simulações de dinâmica molecular do sistema com restrição dos movimentos da proteína e efeito de campo

```
include          =
define          = -DPOSRES
; RUN CONTROL PARAMETERS
integrator       = md
; Start time and timestep in ps
tinit           = 0
dt              = 0.002
nsteps          = 5000000
; For exact run continuation or redoing part of a run
init_step       = 0
; mode for center of mass motion removal
comm-mode       = Linear
; number of steps for center of mass motion removal
nstcomm         = 100
nstcalcenergy   = 100
; group(s) for center of mass motion removal
comm-grps       =
; LANGEVIN DYNAMICS OPTIONS
; Temperature, friction coefficient (amu/ps) and random seed
bd-fric         = 0
ld-seed         = 1993
; OUTPUT CONTROL OPTIONS
; Output frequency for coords (x), velocities (v) and forces (f)
nstxout         = 500
nstvout         = 500
nstfout         = 0
; Output frequency for energies to log file and energy file
nstlog          = 500
nstenergy       = 500
```

```

; Output frequency and precision for xtc file
nstxtcout          = 50
xtc-precision      = 500
; This selects the subset of atoms for the xtc file. You can
; select multiple groups. By default all atoms will be written.
xtc-grps           =
; Selection of energy groups
energygrps        =

; NEIGHBORSEARCHING PARAMETERS
cutoff-scheme      = Verlet
verlet-buffer-drift = 0.005
; nblast update frequency
nstlist           = 10
; ns algorithm (simple or grid)
ns_type           = grid
; Periodic boundary conditions: xyz (default), no (vacuum)
; or full (infinite systems only)
pbc               = xyz
; OPTIONS FOR ELECTROSTATICS AND VDW
; Method for doing electrostatics
coulombtype       = pme
rcoulomb-switch   = 0
; Dielectric constant (DC) for cut-off or DC of reaction field
epsilon-r         = 1
; Method for doing Van der Waals
vdw-type          = Cut-off
; cut-off lengths
rvdw-switch       = 0
; Apply long range dispersion corrections for Energy and Pressure
DispCorr          = EnerPres

```



```

; Spacing for the PME/PPPM FFT grid
fourierspacing      = 0.14
; FFT grid size, when a value is 0 fourierspacing will be used
fourier_nx          = 0
fourier_ny          = 0
fourier_nz          = 0
; EWALD/PME/PPPM parameters
pme_order           = 4
ewald_rtol          = 1e-05
ewald_geometry      = 3d
epsilon_surface     = 0
optimize_fft        = yes

; OPTIONS FOR WEAK COUPLING ALGORITHMS
; Temperature coupling
Tcoupl              = v-rescale
; Groups to couple separately
tc-grps             = Protein DPPC SOL CL K
; Time constant (ps) and reference temperature (K)
tau_t               = 0.1  0.1  0.1  0.1  0.1
ref_t               = 314  314  314  314  314
; Pressure coupling
Pcoupl              = berendsen
Pcoupltype          = Semiisotropic
refcoord-scaling    = com
; Time constant (ps), compressibility (1/bar) and reference P (bar)
tau_p               = 1.0  1.0  1.0  1.0  1.0 ;1.0
compressibility      = 4.5e-5 4.5e-5 4.5e-5 4.5e-5 4.5e-5
ref_p               = 1  1  1  1  1
; GENERATE VELOCITIES FOR STARTUP RUN
gen_vel             = yes
gen_temp            = 314
gen_seed            = 173529

```

```

; OPTIONS FOR BONDS
constraints          = all-bonds
; Type of constraint algorithm
constraint-algorithm = Lincs
; Do not constrain the start configuration
continuation        = no
; Use successive overrelaxation to reduce the number of shake
iterations
Shake-SOR           = no
; Relative tolerance of shake
shake-tol           = 1e-04
; Highest order in the expansion of the constraint coupling matrix
lincs-order         = 6
; Number of iterations in the final step of LINCS. 1 is fine for
; normal simulations, but use 2 to conserve energy in NVE runs.
; For energy minimization with constraints it should be 4 to 8.
lincs-iter          = 1
; Lincs will write a warning to the stderr if in one step a bond
; rotates over more degrees than
lincs-warnangle     = 30
; Convert harmonic bonds to morse potentials
morse               = no

; Electric fields   =
; Format is number of terms (int) and for all terms an amplitude (real) =
; and a phase angle (real) =
;E-x                =
;E-xt               =
;E-y                =
;E-yt               =
E-z                 = 1 -0.046 0
;E-zt               =

```

Arquivo de entrada para minimização de energia

```
define = -DFLEXIBLE
constraints = none
integrator = steep
dt = 0.002 ; ps !
nsteps = 20000
nstlist = 10
ns_type = grid
rlist = 1.0
coulombtype = PME
rcoulomb = 1.0
vdwtype = cut-off
rvdw = 1.4
optimize_fft = yes
;
; Energy minimizing stuff
;
emtol = 1000.0
emstep = 0.01
```