

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 07/03/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Paulo Ricardo Mouro

**Estudo do enovelamento da enzima SOD1 por simulações de
dinâmica molecular**

São José do Rio Preto
2019

Paulo Ricardo Mouro

Estudo do enovelamento da enzima SOD1 por simulações de
dinâmica molecular

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Vitor Barbanti. Pereira Leite
Coorientador: Prof. Dr. Jorge Chahine

São José do Rio Preto
2019

M931e

Mouro, Paulo Ricardo

Estudo do enovelamento da enzima SOD1 por simulações de dinâmica molecular / Paulo Ricardo Mouro. -- São José do Rio Preto, 2019

76 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Vitor Barbanti Pereira Leite

Coorientador: Jorge Chahine

1. Biologia molecular. 2. Biofísica. 3. Dobramento de proteínas. 4. Dinâmica Molecular. 5. Esclerose lateral amiotrófica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Paulo Ricardo Mouro

Estudo do enovelamento da enzima SOD1 por simulações de
dinâmica molecular

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Jorge Chahine
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Coorientador

Prof^a. Dr^a. Ana Lígia Scott
UFABC – Santo André

Prof. Dr. Alexandre Suman de Araujo
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Dr. Fabio Rogério de Moraes
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Richard Charles Garrat
USP – São Carlos

São José do Rio Preto
07 de março de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos professores Jorge Chahine e Vitor Leite pela orientação e ensinamentos sem os quais este trabalho não seria realizado.

Aos membros da comissão examinadora por contribuírem para a melhoria desta tese.

A UNESP/IBILCE e ao programa de pós-graduação em Biofísica Molecular, que por meio dos professores e funcionários me deu todo o suporte para a realização desta tese.

Aos meus familiares, em especial ao meu pai Clovis, minha mãe Sílvia e minha irmã Bruna, por não hesitarem em me dar apoio, carinho e conselhos em todos os momentos.

À minha esposa Rafaela, por estar sempre perto e enfrentar comigo todos os momentos deste trabalho.

Aos meus parceiros de sala, Carolina Tatiani e Fernando Bruno, por partilharem as alegrias, confissões e desesperos ao longo destes anos.

Aos companheiros de grupo de pesquisa e aos amigos da pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Códio de Financiamento 001, a qual agradeço.

RESUMO

A ausência de metais ligados (proteína Apo) e mutações na enzima superóxido dismutase humana (SOD1) tem sido associado com a doença Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA). A ELA é uma doença neurodegenerativa, que causa a morte de neurônios motores, tanto do córtex cerebral quanto da medula espinhal, levando o portador a um estado avançado de atrofia muscular. Acredita-se que, no mundo, a prevalência de ELA seja de 3-8 portadores para cada 100 mil habitantes. Utilizando o modelo baseado em estrutura, e modificando a energia de interação entre resíduos de aminoácidos do sítio de ligação ao metal, e entre a ligação dissulfeto C57-C146, detectamos diferenças entre o enovelamento do monômero apo e holo, nas formas oxidada e reduzida, da SOD1. A presença de íons metálicos claramente diminui a barreira de energia livre e também sugere que o caminho de enovelamento sofra mudanças para atingir o estado nativo. A cinética de enovelamento das formas apo também se correlaciona com a quantidade de barreira de energia livre no processo de enovelamento. Além disso, a estabilidade do estado nativo é significativamente afetada pela ausência de íons metálicos. Quanto à ligação dissulfeto, os resultados mostram que a sua ausência diminui a estabilidade da estrutura nativa e afeta menos o estado de transição, sugerindo que esta seja feita tardiamente no processo de enovelamento. Além disso, investigamos o efeito da concentração no enovelamento do dímero, e, incluindo simulações com o método ABF, buscamos elucidar algumas questões sobre o processo de dimerização da SOD1 na presença e ausência de metais.

Palavras-chave: modelo baseado em estrutura, SOD1, ELA, Método de força adaptativa.

ABSTRACT

The absence of bound metals (Apo protein) and mutations in the Cu-Zn Human Superoxide Dismutase (SOD1) have been associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) disease. ALS is a neurodegenerative disease, which causes the death of motor neurons in both the cerebral cortex and the spinal cord, leading to an advanced muscle atrophy state. It is believed that in the world, the ALS prevalence is 3-8 per 100,000 inhabitants. Using a structure based-model and modifying the energy of interaction between amino acids residues in the metal-binding site and between the disulfide bond C57-C146, we detected differences between the folding of the apo and holo, oxidized and reduced monomeric SOD1. The presence of metal ions clearly decreases the free energy barrier and also suggests that the folding pathway may change to reach the native state. The kinetics of folding of the apo forms also correlates with the amount of free energy barrier in the folding process. In addition, the stability of the native state is significantly affected by the absence of the metal ions. As regarding to the disulfide bond, the results show that its absence decreases the stability of the native structure and affects less the transition state, suggesting that it is possible made late in the folding process. Furthermore, we investigated the effect of the concentration on the dimer folding process, and including all-atoms simulations and ABF method, we search to elucidate some questions about SOD1 dimerization process.

Keywords: structure-based model, SOD1, ALS, Adaptive Biasing Force.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVOS	13
3	METODOLOGIA	14
3.1	Dinâmica Molecular	14
3.1.1	Condições periódicas de contorno	15
3.2	Replica-Exchange (REMD)	16
3.3	Modelo Baseado em Estrutura (SBM)	17
3.3.1	Modelo C α – Vanilla	17
3.3.2	Coordenada de reação	18
3.3.3	Interações Não-Nativas	20
3.4	Adaptive Biasing Force Method (ABF)	21
3.5	Detalhes Computacionais	22
3.5.1	SBM-C α com REMD	23
3.5.2	Regiões no perfil de energia livre	26
3.5.3	ABF	26
3.6	Simulações de controle	27
3.6.1	Simulações de cinética de enovelamento com o SBM-C α	28
3.6.2	All-Atoms	28
4	ANÁLISES APLICADAS	29
4.1	Perfil de energia livre	29
4.2	Formação de contatos entre resíduos de aminoácidos	30
4.3	Tempo de enovelamento	30
4.4	Rota de enovelamento	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
5.1	Enovelamento do monômero utilizando SBM-Cα e REMD	32
5.1.1	Simulações de controle – cinética de enovelamento	41
5.2	Enovelamento do dímero	42
5.2.1	Utilizando SBM-C α e REMD	42
5.2.2	Simulações de controle - Cinética de enovelamento do dímero	46
5.2.3	Estabilidade dímero-monômero	47

5.3	Simulações de dimerização	48
5.3.1	Utilizando o Adaptive Biasing Force (ABF)	48
5.3.2	Simulações de controle – Sistema livre	51
6	CONCLUSÕES	56
	REFERÊNCIAS	58
	APÊNDICE A - WHAM - <i>Weighted Histograms Analysis Method</i>	67
	APÊNDICE B - Artigo publicado durante o doutorado	69

Capítulo 1

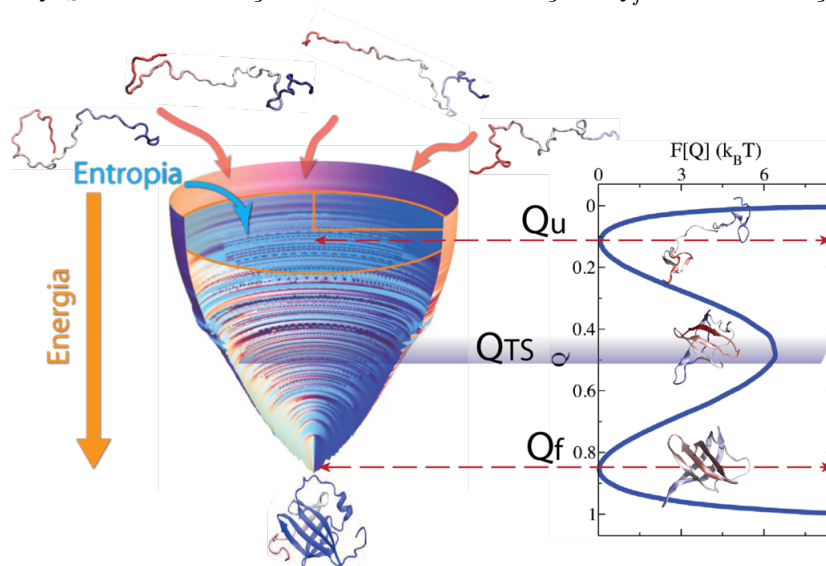
Introdução

Grande parte das transformações moleculares envolvidas no metabolismo celular são mediadas via catálise protéica. As proteínas, além de desempenharem funções catalíticas, também exercem funções estruturais e regulatórias nas células (1). É de grande valia o conhecimento da estrutura protéica para inferirmos aspectos relacionados a função desempenhada por cada proteína, porém, além dos parâmetros estruturais, também é de suma importância o conhecimento dos fatores físico-químicos que regulam o processo de estruturação das proteínas. Para desempenharem uma função biológica nas células, as proteínas devem se moldar em uma estrutura tridimensional funcional, chamada de estrutura nativa (1). O mecanismo, que as levam de uma estrutura linear primária até uma estrutura funcional, é chamado de enovelamento.

Nas últimas décadas, a teoria da superfície de energia tem obtido grande sucesso em explicar aspectos qualitativos e quantitativos envolvidos no estudo teórico e experimental do enovelamento de proteínas (2-9). Nesta teoria, conceitualmente, a superfície de energia possui uma forma afunilada, como representada na Figura 1.1. Utilizando conhecimentos termodinâmicos, considera-se que no topo deste funil de energia há uma alta entropia conformacional dada a grande quantidade de estruturas desenoveladas possíveis para uma mesma proteína. A medida que a proteína começa a se enovelar e formar contatos entre pares de resíduos de aminoácidos que diminuem a sua energia global, temos que esta começa a ser direcionada para o estado nativo, mínima energia do sistema, passando por estados parcialmente enovelados (10).

Para conseguir se enovelar em um tempo hábil para desempenhar uma função biológica, a superfície de energia deve ser íngreme o suficiente para que a proteína consiga passar por algumas rugosidades e mínimos locais (5, 12-16), ocasionados devido ao que chamamos de frustração (12). A frustração energética em proteínas acontece devido a impossibilidade de satisfazer de forma concomitante todas as interações que são

Figura 1.1: **Diagrama esquemático do relevo da superfície de energia.** Esquerda: Funil de enovelamento com alta entropia conformacional na parte superior, e baixa energia e entropia na parte inferior, onde está localizada a estrutura nativa das proteínas. Direita: Perfil de energia livre em função da fração de contatos nativos Q formados. Q_u = Conformação desenovelada. Q_{TS} = Conformação no estado de transição. Q_f = Conformação enovelada.



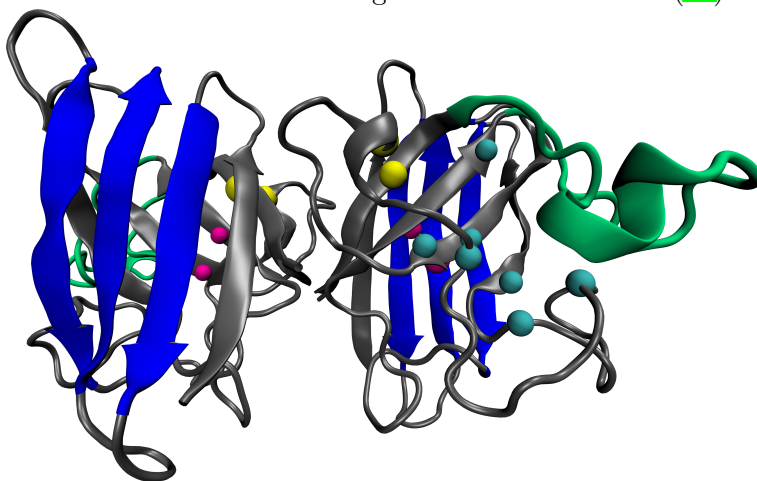
Fonte: Figura adaptada de Oliveira et al (11).

energeticamente favoráveis para o enovelamento (17-20), de tal forma que a proteína necessite fazer alguns contatos entre pares de resíduos de aminoácidos que terão de ser desfeitos ao final do processo. Estes contatos, por não estarem presentes na estrutura nativa, são chamados de contatos não-nativos. Apesar da evolução natural das proteínas ter sido responsável por fazer com que o estado nativo seja minimamente frustrado (17-19, 21, 22), estudos têm mostrado que um pouco de frustração energética pode favorecer o processo de enovelamento (23-25), principalmente nas proteínas que formam mais contatos não-nativos no estado de transição, do que nos estados desenovelados (Para maiores detalhes, veja artigo no Apêndice B).

O aprofundamento dos princípios envolvidos no processo de enovelamento das proteínas podem ajudar no fornecimento de respostas para alguns dos problemas da genômica e da biotecnologia, como por exemplo no desenho consistente de fármacos e enzimas, assim como na compreensão de mecanismos que podem ajudar no controle de doenças genéticas (26) e neurodegenerativas, incluindo as doenças de Alzheimer, Parkinson e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) (24, 27, 28). A ELA, por exemplo, é uma doença neurodegenerativa que causa a perda dos neurônios motores, levando seus portadores a ficarem incapazes de realizar qualquer tipo de movimento voluntário, tal como andar, falar e engolir. Acredita-se que por ano, no mundo, surja de 2-3 novos casos de ELA a cada 100 mil habitantes (29).

Mais de 100 tipos de mutações na enzima SOD1 têm sido encontradas em pacientes portadores de ELA (27, 28, 30), e falhas no enovelamento da SOD1 têm sido relacionadas com a formação de agregados de fibras amilóides. Tais agregados são típicos e característicos de outras estruturas amiloidogênicas encontradas em outras proteínas relacionadas com doenças neurodegenerativas (31). A *Zn,Cu Human Superoxide Dismutase* (SOD1) é uma enzima homodimérica na qual cada monômero é formado por 153 aminoácidos, um íon de zinco e um de cobre (32-34), como representada na Figura 1.2. Esta enzima, em sua forma holo nativa, protege as células do *stress* oxidativo, catalisando a dismutação do radical superóxido (O_2^{-1}) em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (35, 36). Os íons de Zn e Cu, além de desempenharem um papel importante na atividade enzimática da SOD1, também atuam de forma fundamental na manutenção estrutural e na estabilidade da enzima nativa: principalmente na manutenção do Loop IV e Loop VII, os quais são responsáveis por formar um gradiente eletrostático que guia o superóxido até o sítio ativo.

Figura 1.2: **Representação esquemática do homodímero da Superóxido Dismutase de humanos (SOD1)**. PDB code: 1HL5. As folhas- β 2,3 e 6 estão destacadas em azul. Em verde temos a região do Loop Eletrostático (Loop VII, resíduos 121-142 de cada monômero). As esferas na cor ciano representam o $C\alpha$ dos resíduos que se ligam ao cobre e ao zinco. As esferas amarelas representam os $C\alpha$ das cisteínas 57 e 146. As esferas em rosa, indicam a localização dos resíduos 47 e 117, os quais apresentam um elevado valor- ϕ (37, 38). As estruturas secundárias foram identificadas segundo o critério SCOP (39)



Fonte: Elaborada pelo Autor.

Em sua forma nativa, holo e com a ponte dissulfeto entre a C57 e C146 oxidada, a SOD1 é altamente estável, apresentando temperaturas de enovelamento superiores a 90°C (40), assim como tem sido mostrado por experimentos envolvendo desnaturação química ou térmica. Mutantes da SOD1 que perdem a capacidade de se ligar aos metais (36, 41-44) apresentam uma estabilidade menor, reduzindo a sua temperatura de

melting para valores em torno de 52°C. Acrescido a este fato, na ausência da ponte dissulfeto entre as cisteínas 57 e 146, a SOD1 apo fica ainda menos estável, com temperatura de enovelamento da ordem de 42°C, e se mostra mais propícia a permanecer na forma monomérica (45, 46).

Assim como outras metaloenzimas ou proteínas oligoméricas, os mecanismos de enovelamento da SOD1 têm se tornado um problema complexo para se estudar devido ao seu longo processo de maturação pós-traducional (47), como por exemplo: a dimerização, a formação de pontes dissulfeto, e a inserção dos metais. Apesar de todas essas dificuldades, a superóxido dismutase humana têm sido intensamente investigada nas últimas décadas. Um grande número de publicações têm mostrado evidências que mutantes da SOD1 podem agregar e levar ao desenvolvimento da Esclerose Lateral Amiotrófica. No entanto, ainda há na literatura discussões a respeito do que pode estar causando a doença: se é a formação dos agregados, ou da perda de função da SOD1, pois, além das mutações, a ausência dos íons de cobre e zinco também têm sido associados como possíveis agentes para o comportamento patogênico da enzima (28).

Medidas de atividade enzimática indicam que cada monômero da SOD1 trabalha de forma independente um do outro quando a proteína está em sua forma dimérica nativa (48), porém, a atividade enzimática do dímero é em torno de uma ordem de grandeza maior do que quando cada monômero atua de forma isolada (49, 50). Neste caso, o fato dos monômeros conseguirem desempenhar suas funções quando estão isolados, e trabalharem de forma independente quando estão juntos no dímero, fizeram surgir algumas questões à respeito do porque a SOD1 seria uma proteína dimérica (50). Por que a natureza produziria um dímero feito de dois monômeros idênticos que trabalham de forma independente? Além disso, outras questões envolvendo: a presença da formação de pontes dissulfeto, o papel dos metais e como eles podem afetar o processo de enovelamento, assim como a presença de estados intermediários, são elementos relevantes no estudo do enovelamento da SOD1 descrito neste trabalho.

A técnica de Dinâmica Molecular têm sido utilizada nas últimas décadas para ajudar na compreensão de alguns problemas enquadrados pela Física Biológica, e o entendimento dos mecanismos de enovelamento de metaloproteínas diméricas têm sido parte deste grande desafio. Simulações computacionais tem nos ajudado a obter um maior conhecimento à respeito de como as proteínas se enovelam (15, 26, 51-53), e o uso de modelos simplificados que levam em consideração a teoria da superfície de energia, tais como o Modelo Baseado em Estrutura (SBM)(4, 54), tem sido capazes de capturar algumas características essenciais do problema de enovelamento de proteínas (11, 23, 25, 54, 55). Tais modelos, apesar de serem simplificados, apresentam boa concordância com outros modelos e métodos, analíticos ou experimentais (2-5, 12, 56-

59).

Neste estudo, utilizando uma simplificação do SBM, o SBM- C_α , nós buscamos compreender quão bem estes modelos simplificados conseguem capturar o comportamento termodinâmico e cinético envolvido no enovelamento da SOD1, elucidando diferenças entre o enovelamento do monômero na forma holo, apo, reduzida ou oxidada. Além disso, ainda utilizando o SBM- C_α , investigamos o efeito da concentração proteica no enovelamento do dímero, e utilizando técnicas de simulação computacionais mais complexas, incluindo simulações com todos os átomos e solvente explícito, analisamos o efeito da presença e da ausência dos metais no processo de dimerização.

Capítulo 6

Conclusões

As simulações realizadas neste trabalho elucidaram alguns efeitos que a presença dos metais podem causar no enovelamento e dimerização da SOD1. Podemos concluir e reponder a primeira pergunta do nosso objetivo indicando que os metais, Zn e Cu, em concordância com a formação do sítio metálico, auxiliam a proteína a se enovelar, diminuindo a barreira de energia livre. Tal fato indica que eles podem já se ligar na enzima ainda desenovelada, uma vez que esta região se mostrou estar formada já nos primeiros estágios do enovelamento. Neste caso, além de auxiliar a proteína a se enovelar, os metais também são responsáveis por conferir uma maior estabilidade para o estado nativo. A formação precoce do sítio metálico mostrou interferir diretamente no caminho de enovelamento seguido por cada monômero, o qual se torna menos específico. A ausência dos metais, além de retardar o processo de enovelamento, indicou que nesta condição, é maior a probabilidade da SOD1 visitar conformações de transição que podem levar a proteína a formar estruturas patogênicas, tais como as folhas- β 2, 3, e 6.

De uma forma geral, a barreira de energia livre para o enovelamento do monômero, apesar de ter um caráter entrópico, mostrou ser dominada pela entalpia, uma vez que poucos contatos nativos estão sendo realizados no estado de transição. Tanto a entalpia, quanto a variação de entropia conformacional se mostraram importantes para elucidar o papel da ponte dissulfeto no enovelamento de cada monômero. A formação da ponte dissulfeto intracadeia entre as cisteínas 57 e 146, se mostrou importante para garantir a estabilidade do estado nativo de cada monômero, diminuindo a energia do ensemble nativo. O caso com ponte dissulfeto conformacional nos oferece a hipótese de que *in vivo* a ponte dissulfeto seja feita apenas após o estado de transição, não sendo responsável por auxiliar a proteína a superar a barreira de energia livre. Porém, a formação precoce da ponte dissulfeto foi responsável por uma pequena modificação na

posição e na altura da barreira de transição no caso apo, indicando que na presença da ponte dissulfeto oxidada, temos um menor custo entrópico de enovelamento, o qual a proteína reduzida tenta compensar formando mais contatos nativos (diminuindo a entalpia do sistema) para se enovelar. A ausência da ponte dissulfeto, associada com a falta dos metais, também pode favorecer um processo de *misfolding*, uma vez que o caso apo reduzido mostrou ter maior probabilidade de formar regiões da SOD1 com alta propensão de formar agregados. Valores experimentais de estabilidade, de compactação da cadeia, e de cinética de enovelamento, corroboram nossos dados e a forma como foi encontrada a temperatura ambiente em unidades reduzidas.

O enovelamento da SOD1 se mostra dependente das condições de concentração de proteína. O aumento da estabilidade em alta concentração de proteína pode estar associado com a não formação do estado 2M, uma vez que a região da interface, altamente hidrofóbica, reduz a sua área acessível ao solvente quando esta se enovela de forma concomitante com a cadeia. Além disso, formar a interface de forma concomitante com o enovelamento da cadeia mostrou acelerar a cinética de formação do dímero em 15 vezes, diminuindo a exposição dos resíduos da interface ao meio. Atingir o mesmo valor de taxa de desenovelamento em uma temperatura 4.2% maior, indica que o dímero da SOD1 é mais estável do que o monômero isolado, podendo ser essa uma das razões para a enzima atuar como dímero.

Os dados de taxa de desenovelamento, de perfil de energia livre obtidos pelo ABF, e os de flutuações nos resíduos das simulações livres, indicam que a SOD1, apesar de ser formada por dois monômeros que trabalham de forma independente, tem na sua forma dimérica a sua conformação mais termodinamicamente e estruturalmente estável. A formação dos contatos de resíduos de aminoácidos entre as duas cadeias, não só reduz a área acessível ao solvente nestes resíduos da interface, como também interfere na flutuação dos resíduos ao longo da cadeia, uma vez que na presença da interface nativa, a flutuação da cadeia foi menor. O dímero mostra ser a estrutura mais estável mesmo na ausência dos metais, porém, a presença dos metais, também afetam o processo de dimerização. Os metais são responsáveis por diminuir a barreira de energia livre para os dois monômeros se dimerizarem, além de dificultar o processo de separação entre as duas cadeias, dando mais estabilidade para o dímero nativo, e desestabilizar a formação de estados intermediários, os quais se mostraram formados por dímeros não-nativos.

REFERÊNCIAS

1. VOET, D.; PRATT, J.; W, C. Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular. *Artmed*, v. 2 ed, 2008.
2. NYMEYER, H.; GARCIA, A. E.; ONUCHIC, J. N. Folding funnels and frustration in off-lattice minimalist protein landscapes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 95, p. 5921–5928, 1998.
3. SHOEMAKER, B. A.; WANG, J.; WOLYNES, P. G. Structural correlations in protein folding funnels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 94, p. 777–782, 1997.
4. WHITFORD, P. C. et al. An all-atom structure-based potential for proteins: Bridging minimal models with all-atom empirical forcefields. *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.*, v. 75, p. 430–441, 2009.
5. OLIVEIRA, R. J. et al. Coordinate and time-dependent diffusion dynamics in protein folding. *Methods*, v. 52, n. 1, p. 91–98, 2010. ISSN 1046-2023.
6. FERSHT, A. R. Characterizing transition states in protein folding: an essential step in the puzzle. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, v. 5, n. 1, p. 79–84, 1995.
7. Garcia-Mira, M. M. et al. Experimental identification of downhill protein folding. *Science*, v. 298, n. 5601, p. 2191 –2195, 2002.
8. NETTELS, D. et al. Ultrafast dynamics of protein collapse from single-molecule photon statistics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 104, p. 2655–2660, 2007.
9. CHUNG, H. S.; LOUIS, J. M.; EATON, W. A. Experimental determination of upper bound for transition path times in protein folding from single-molecule photon-by-photon trajectories. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 106, n. 29, p. 11837 – 11844, 2009.
10. ONUCHIC, J. N. et al. The energy landscape theory of protein folding: Insights into folding mechanisms and scenarios. In: *Adv. Protein Chem.* [S.l.]: Elsevier, 2000. v. 53, p. 87–152. ISBN 9780120342532.
11. WANG, J. et al. The topography of funneled landscapes determines the thermodynamics and kinetics of protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 109, n. 39, p. 15763–15768, 2012.
12. GOSAVI, S. et al. Topological frustration and the folding of interleukin-1 beta. *J. Mol. Biol.*, v. 357, p. 986–996, 2006.

10. Onuchic, J. N., H. Nymeyer, A. E. Garcia, J. Chahine, and N. D. Socci. 2000. The energy landscape theory of protein folding: Insights into folding mechanisms and scenarios. *In* *Adv. Protein Chem.*, volume 53. Elsevier. 87–152.
11. Wang, J., R. J. Oliveira, X. Chu, P. C. Whitford, J. Chahine, W. Han, E. Wang, and V. B. P. Leite. 2012. The topography of funneled landscapes determines the thermodynamics and kinetics of protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109:15763–15768.
12. Gosavi, S., L. L. Chavez, P. A. Jennings, and J. N. Onuchic. 2006. Topological frustration and the folding of interleukin-1 beta. *J. Mol. Biol.* 357:986–996.
13. Onuchic, J. N., P. G. Wolynes, Z. Luthey-Schulten, and N. D. Socci. 1995. Toward an outline of the topography of a realistic protein-folding funnel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:3626–3630.
14. Onuchic, J. N., Z. Luthey-Schulten, and P. G. Wolynes. 1997. Theory of protein folding: The energy landscape perspective. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 48:545–600.
15. Onuchi, J., H. Nymeyer, A. Garcia, J. Chahine, and N. D. Socci. 2000. The energy landscape theory of protein folding: Insights into folding mechanisms and scenarios. *Adv. Protein Chem.* 53:87–152.
16. Eaton, W. A., P. A. Thompson, C.-K. Chan, S. J. Hage, and J. Hofrichter. 1996. Fast events in protein folding. *Structure.* 4:1133–1139.
17. Shakhnovich, E. I., and A. M. Gutin. 1989. Formation of unique structure in polypeptide chains. theoretical investigation with the aid of a replica approach. *Biophys. Chem.* 34:187–199.
18. Bryngelson, J. D., and P. G. Wolynes. 1989. Intermediates and barrier crossing in a random energy-model (with applications to protein folding). *J. Phys. Chem.* 93:6902–6915.
19. Goldstein, R. A., Z. A. Luthey-Schulten, and P. G. Wolynes. 1992. Optimal protein-folding codes from spin-glass theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:4918–4922.
20. Abkevich, V. I., A. M. Gutin, and E. I. Shakhnovich. 1994. Free energy landscape for protein folding kinetics: Intermediates, traps, and multiple pathways in theory and lattice model simulations. *J. Chem. Phys.* 101:6052–6062.

21. Bryngelson, J. D., J. N. Onuchic, N. D. Socci, and P. G. Wolynes. 1995. Funnels, pathways, and the energy landscape of protein-folding - A synthesis. *Proteins*. 21:167–195.
22. Oliveira, L. C., R. T. H. Silva, V. B. P. Leite, and J. Chahine. 2006. Frustration and hydrophobicity interplay in protein folding and protein evolution. *J. Chem. Phys.* 125:084904.
23. Contessoto, V. G., D. T. Lima, R. J. Oliveira, A. T. Bruni, J. Chahine, and V. B. P. Leite. 2013. Analyzing the effect of homogeneous frustration in protein folding. *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* 81:1727–1737.
24. Clementi, C., and S. S. Plotkin. 2004. The effects of nonnative interactions on protein folding rates: Theory and simulation. *Prot. Sci.* 13:1750–1766.
25. Mouro, P. R., V. de Godoi Contessoto, J. Chahine, R. J. de Oliveira, and V. B. P. Leite. 2016. Quantifying nonnative interactions in the protein-folding free-energy landscape. *Biophys. J.* 111:287 – 293.
26. Dobson, C. M. 2003. Protein folding and misfolding. *Nature*. 426:884–890.
27. Andersen, P. M. 2006. Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the *cuzn* superoxide dismutase gene. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 6:37–46.
28. Banci, L., I. Bertini, M. Boca, S. Girotto, M. Martinelli, J. S. Valentine, and M. Vieru. 2008. Sod1 and amyotrophic lateral sclerosis: Mutations and oligomerization. *PLOS ONE*. 3:1–8.
29. Werneck, L. C., R. Bezerra, O. d. Silveira Neto, and R. H. Scola. 2007. A clinical epidemiological study of 251 cases of amyotrophic lateral sclerosis in the south of Brazil. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 65:189 – 195.
30. Bruijn, L. I., T. M. Miller, and D. W. Cleveland. 2004. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in als. *Annu. Rev. Neurosci.* 27:723–749.
31. Ding, F., Y. Furukawa, N. Nukina, and N. V. Dokholyan. 2012. Local unfolding of cu, zn superoxide dismutase monomer determines the morphology of fibrillar aggregates. *J. Mol. Biol.* 421:548 – 560. *Amyloid Structure, Function, and Molecular Mechanisms (Part II)*.
32. Das, A., and S. S. Plotkin. 2013. Sod1 exhibits allosteric frustration to facilitate metal binding affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 110:3871–3876.

33. Tainer, J. A., E. D. Getzoff, K. M. Beem, J. S. Richardson, and D. C. Richardson. 1982. Determination and analysis of the 2 Å... structure of copper, zinc superoxide dismutase. *J. Mol. Biol.* 160:181 – 217.
34. Valentine, J. S., P. A. Doucette, and S. Z. Potter. 2005. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. *Annu Rev Biochem.* 74:563 – 593.
35. Sturtz, L. A., K. Diekert, L. T. Jensen, R. Lill, and V. C. Culotta. 2001. A fraction of yeast cu,zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, ccs, localize to the intermembrane space of mitochondria: A physiological role for sod1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J. Biol. Chem.* 276:38084–38089.
36. Hassan, H. M., and I. Fridovich. 1979. Paraquat and escherichia coli. mechanism of production of extracellular superoxide radical. *J. Biol. Chem.* 254:10846–10852.
37. Nordlund, A., and M. Oliveberg. 2006. Folding of cu/zn superoxide dismutase suggests structural hotspots for gain of neurotoxic function in als: Parallels to precursors in amyloid disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 103:10218–10223.
38. Schmidlin, T., K. Ploeger, A. L. Jonsson, and V. Daggett. 2013. Early steps in thermal unfolding of superoxide dismutase 1 are similar to the conformational changes associated with the als-associated a4v mutation. *Protein Engineering, Design and Selection.* 26:503–513.
39. Murzin, A. G., S. E. Brenner, T. Hubbard, and C. Chothia. 1995. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* 247:536–540.
40. Roe, J. A., A. Butler, D. M. Scholler, J. S. Valentine, L. Marky, and K. J. Breslauer. 1988. Differential scanning calorimetry of copper-zinc-superoxide dismutase, the apoprotein, and its zinc-substituted derivatives. *Biochemistry.* 27:950–958. PMID: 2835081.
41. Biliaderis, C. G., R. J. Weselake, A. Petkau, and A. D. Friesen. 1987. A calorimetric study of human cuzn superoxide dismutase. *Biochem. J.* 248:981–984.
42. Parge, H. E., E. D. Getzoff, C. S. Scandella, R. A. Hallewell, and J. A. Tainer. 1986. Crystallographic characterization of recombinant human cuzn superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 261:16215–16218.

43. Mei, G., N. Rosato, N. Silva, R. Rusch, E. Gratton, I. Savini, and A. Finazzi-Agro. 1992. Denaturation of human copper-zinc superoxide dismutase by guanidine hydrochloride: a dynamic fluorescence study. *Biochemistry*. 31:7224–7230. PMID: 1510915.
44. Ding, F., and N. V. Dokholyan. 2008. Dynamical roles of metal ions and the disulfide bond in cu, zn superoxide dismutase folding and aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105:19696–19701.
45. Arnesano, F., L. Banci, I. Bertini, M. Martinelli, Y. Furukawa, and T. V. O’Halloran. 2004. The unusually stable quaternary structure of human cu,zn-superoxide dismutase 1 is controlled by both metal occupancy and disulfide status. *J. Biol. Chem*. 279:47998–48003.
46. Strange, R. W., C. W. Yong, W. Smith, and S. S. Hasnain. 2007. Molecular dynamics using atomic-resolution structure reveal structural fluctuations that may lead to polymerization of human cu–zn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104:10040–10044.
47. Rakhit, R., and A. Chakrabartty. 2006. Structure, folding, and misfolding of cu,zn superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1762:1025 – 1037. *Molecular Basis of Amyotrophic Lateral Sclerosis*.
48. Malinowski, D. P., and I. Fridovich. 1979. Bovine erythrocyte superoxide dismutase: diazo coupling, subunit interactions and electrophoretic variants. *Biochemistry*. 18:237–244. PMID: 420775.
49. Bertini, I., M. Piccioli, M. S. Viezzoli, C. Y. Chiu, and G. T. Mullenbach. 1994. A spectroscopic characterization of a monomeric analog of copper, zinc superoxide dismutase. *Eur. Biophys. J*. 23:167–176.
50. Banci, L., M. Benedetto, I. Bertini, R. Del Conte, M. Piccioli, and M. S. Viezzoli. 1998. Solution structure of reduced monomeric q133m2 copper, zinc superoxide dismutase (sod). why is sod a dimeric enzyme?.,. *Biochemistry*. 37:11780–11791. PMID: 9718300.
51. Baldwin, R. 1995. The nature of protein folding pathways: The classical versus the new view. *J. Biomol. NMR*. 5:103–109.
52. Dill, K. A., and H. S. Chan. 1997. From Levinthal to pathways to funnels. *Nat. Struct. Mol. Biol*. 4:10–19.

53. Pande, V. S., A. Y. Grosberg, and T. Tanaka. 1997. On the theory of folding kinetics for short proteins. *Folding and Des.* 2:109–114.
54. Clementi, C., H. Nymeyer, and J. N. Onuchic. 2000. Topological and energetic factors: What determines the structural details of the transition state ensemble and "en-route" intermediates for protein folding? An investigation for small globular proteins. *J. Mol. Biol.* 298:937–953.
55. Clementi, C., A. E. Garcia, and J. N. Onuchic. 2003. Interplay among tertiary contacts, secondary structure formation and side-chain packing in the protein folding mechanism: All-atom representation study of protein L. *J. Mol. Biol.* 326:933–954.
56. Koga, N., and S. Takada. 2001. Roles of native topology and chain-length scaling in protein folding: A simulation study with a gö-like model. *J. Mol. Biol.* 313:171–180.
57. Chavez, L. L., J. N. Onuchic, and C. Clementi. 2004. Quantifying the roughness on the free energy landscape: Entropic bottlenecks and protein folding rates. *J. Am. Chem. Soc.* 126:8426–8432.
58. Snow, C. D., E. J. Sorin, Y. M. Rhee, and V. S. Pande. 2005. How well can simulation predict protein folding kinetics and thermodynamics? *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Structure.* 34:43–69.
59. Chu, X., L. Gan, E. Wang, and J. Wang. 2013. Quantifying the topography of the intrinsic energy landscape of flexible biomolecular recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* :201220699.
60. Karplus, M., and J. A. McCammon. 2002. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 9:646–652.
61. Steinbach, P. J., and B. R. Brooks. 1993. Protein hydration elucidated by molecular dynamics simulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:9135–9139.
62. Verlet, L. 1967. Computer experiments on classical fluids. i thermodynamical properties of lennard-jones molecules. *Phys. Rev.* 159:98–103.
63. Tavares, Rafaela Magalhães. 2016. Estudos da interação de peptídeos antimicrobianos com modelo de membrana por simulações de dinâmica molecular.
64. Sugita, Y., and O. Y. 1999. Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. *Chem. Phys. Lett.* 314:141–151.

65. Geierhaas, C. D., A. A. Nickson, K. Lindorff-Larsen, J. Clarke, and M. Vendruscolo. 2007. Bppred: A web-based computational tool for predicting biophysical parameters of proteins. *Protein Sci.* 16:125–134.
66. Bruno da Silva, F., V. G. Contessoto, V. M. de Oliveira, J. Clarke, and V. B. P. Leite. 2018. Non-native cooperative interactions modulate protein folding rates. *The Journal of Physical Chemistry B.* 122:10817–10824. PMID: 30407825.
67. Miyazawa, S., and R. L. Jernigan. 1999. Self-consistent estimation of inter-residue protein contact energies based on an equilibrium mixture approximation of residues. *Proteins.* 34:48–68.
68. Tuckerman, M. E. 2007. Free energy calculations: Theory and applications in chemistry and biology. *J. Am. Chem. Soc.* 129:10963–10964.
69. Berman, H. M., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, and P. E. Bourne. 2000. The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* 28:235–242.
70. Van Der Spoel, D., E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, and H. J. C. Berendsen. 2005. GROMACS: fast, flexible, and free. *J. Comp. Chem.* 26:1701–1718.
71. Noel, J. K., P. C. Whitford, K. Y. Sanbonmatsu, and J. N. Onuchic. 2010. SMOG@ctbp: simplified deployment of structure-based models in GROMACS. *Nucleic Acids Research.* .
72. Noel, J. K., P. C. Whitford, and J. N. Onuchic. 2012. The shadow map: A general contact definition for capturing the dynamics of biomolecular folding and function. *J. Phys. Chem. B.* .
73. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten. 1996. Vmd: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graphics.* 14:33 – 38.
74. Phillips, J. C., R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kalé, and K. Schulten. 2005. Scalable molecular dynamics with namd. *J. Comp. Chem.* 26:1781–1802.
75. Ferrenberg, A. M., and R. H. Swendsen. 1988. New monte carlo technique for studying phase transitions. *Phys. Rev. Lett.* 61:2635–2638.
76. Ferrenberg, A. M., and R. H. Swendsen. 1989. Optimized monte-carlo data analysis. *Phys. Rev. Lett.* 63:1195–1198.

77. Plotkin, S. S., and J. N. Onuchic. 2000. Investigation of routes and funnels in protein folding by free energy functional methods. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:6509–6514.
78. Kayatekin, C., N. R. Cohen, and C. R. Matthews. 2012. Enthalpic barriers dominate the folding and unfolding of the human cu, zn superoxide dismutase monomer. *J. Mol. Biol.* 424:192 – 202.
79. Vassall, K. A., H. R. Stubbs, H. A. Primmer, M. S. Tong, S. M. Sullivan, R. Sobering, S. Srinivasan, L.-A. K. Briere, S. D. Dunn, W. Colón, and E. M. Meiering. 2011. Decreased stability and increased formation of soluble aggregates by immature superoxide dismutase do not account for disease severity in als. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 108:2210–2215.
80. Kayatekin, C., J. A. Zitzewitz, and C. R. Matthews. 2010. Disulfide-reduced als variants of cu, zn superoxide dismutase exhibit increased populations of unfolded species. *Journal of Molecular Biology*. 398:320 – 331.
81. Broom, Helen. 2015. Stability and aggregation studies of immature superoxide dismutase. Ph.D. thesis.
82. Battistoni, A., S. Folcarelli, L. Cervoni, F. Polizio, A. Desideri, A. Giartosio, and G. Rotilio. 1998. Role of the dimeric structure in cu,zn superoxide dismutase: ph-dependent, reversible denaturation of the monomeric enzyme from escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*. 273:5655–5661.
83. Stathopoulos, P. B., J. A. O. Rumfeldt, G. A. Scholz, R. A. Irani, H. E. Frey, R. A. Hallewell, J. R. Lepock, and E. M. Meiering. 2003. Cu/zn superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis show enhanced formation of aggregates in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100:7021–7026.
84. Kayatekin, C., J. A. Zitzewitz, and C. R. Matthews. 2008. Zinc binding modulates the entire folding free energy surface of human cu,zn superoxide dismutase. *Journal of Molecular Biology*. 384:540 – 555.
85. Li, H.-T., M. Jiao, J. Chen, and Y. Liang. 2010. Roles of zinc and copper in modulating the oxidative refolding of bovine copper, zinc superoxide dismutase. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 42:183–194.
86. Lindberg, M. J., J. Normark, A. Holmgren, and M. Oliveberg. 2004. Folding of human superoxide dismutase: Disulfide reduction prevents dimerization and produces marginally stable monomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:15893–15898.

87. Stefanie D Boyd, L. B., Li Liu, and D. D. Winkler. 2018. Quantifying the interaction between copper-zinc superoxide dismutase (sod1) and its copper chaperone (ccs1). *Journal of Proteomics and Bioinformatics*. 11:1–5.
88. Habibi, M., J. Rottler, and S. S. Plotkin. 2017. The unfolding mechanism of monomeric mutant sod1 by simulated force spectroscopy. *Biochim. et Biophys. Acta*. .
89. Ivanova, M. I., S. A. Sievers, E. L. Guenther, L. M. Johnson, D. D. Winkler, A. Galaleldeen, M. R. Sawaya, P. J. Hart, and D. S. Eisenberg. 2014. Aggregation-triggering segments of sod1 fibril formation support a common pathway for familial and sporadic als. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 111:197–201.
90. Levy, Y., P. G. Wolynes, and J. N. Onuchic. 2004. Protein topology determines binding mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101:511–516.
91. Svensson, A.-K. E., O. Bilsel, E. Kondrashkina, J. A. Zitzewitz, and C. R. Matthews. 2006. Mapping the folding free energy surface for metal-free human cu,zn superoxide dismutase. *J. Mol. Biol.* 364:1084 – 1102.
92. Banci, L., I. Bertini, A. Durazo, S. Girotto, E. B. Gralla, M. Martinelli, J. S. Valentine, M. Vieru, and J. P. Whitelegge. 2007. Metal-free superoxide dismutase forms soluble oligomers under physiological conditions: A possible general mechanism for familial als. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104:11263–11267.
93. Anzai, I., E. Tokuda, A. Mukaiyama, S. Akiyama, F. Endo, K. Yamanaka, H. Misawa, and Y. Furukawa. 2017. A misfolded dimer of cu/zn-superoxide dismutase leading to pathological oligomerization in amyotrophic lateral sclerosis. *Protein Science*. 26:484–496.

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 11 / 03 / 2019

Paula Ricardo Mendes

Assinatura do autor