

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
INSTITUTO DE FÍSICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

**STÉPHANO ANDRADE DE VASCONCELOS**

**Engenharia Virtual da PETase termoestável da Ideonella Sakaiensis para  
degradação altamente eficiente do PET**

**CAMPO GRANDE - MS**

**2021**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
INSTITUTO DE FÍSICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIA DOS MATERIAIS

STÉPHANO ANDRADE DE VASCONCELOS

Engenharia Virtual da PETase termoestável da *Ideonella Sakaiensis* para  
degradação altamente eficiente do PET

Orientador: Prof. Dr. Marcos Serrou do Amaral

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais do Instituto de Física da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - INFI / UFMS como parte dos requisitos de qualificação para obtenção do título de Mestre.

Campo Grande - MS

2021

**Engenharia Virtual da PETase termoestável da Ideonella Sakaiensis para  
degradação altamente eficiente do PET**

STÉPHANO ANDRADE DE VASCONCELOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais do Instituto de Física da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - INFI/UFMS como parte dos requisitos de qualificação para obtenção do título de Mestre.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcos Serrou do Amaral - UFMS

Prof. Dr. Sergio Leandro Preza - UFMS

Prof. Dr. Fábio Mallmann Zimmer - UFMS

Prof. Dr. Danilo da Silva Olivier - UFT

Campo Grande - MS, Março de 2021

# Agradecimentos

À minha mãe, Maria de Jesus Andrade, pela paciência e carinho e compreensão nos momentos difíceis;

À minha namorada e amiga Jéssica Carretone;

Aos meu amigos e irmãos Marcio Fernandes da Silva e Bruno Camargo, pessoas que sempre me incentivaram e acreditaram em meu potencial;

Ao meu orientador Prof° Dr. Marcos Serrou do Amaral por ter me proporcionado condições e conhecimentos para a realização desta dissertação;

Ao meu coorientador Prof° Dr. Sergio Leandro Preza por ter colaborado com meu projeto;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

*“Penso noventa e nove vezes e nada descubro; deixo de pensar, mergulho em profundo silêncio*

*– e eis que a verdade se me revela.”*

*Albert Einstein*

# Resumo

No mundo são produzidos mais de 300 milhões de toneladas de plástico todos os anos, incluindo bilhões de garrafas plásticas, e 5 bilhões de malas plásticas, sendo que metade desses usaremos apenas uma vez e o jogaremos fora depois. Até 2050 a população mundial chegará a 10 bilhões de pessoas, enquanto que o consumo de plástico triplicará. Tendo isso em vista, optei por fazer um estudo computacional da enzima PETase que provou ser altamente eficiente na degradação da garrafa PET a uma temperatura muito mais baixa, quando comparada a enzimas homólogas. Com uso da Dinâmica Molecular conseguimos provar que a variação do pH e mutações em resíduos interfere diretamente na estabilidade térmica da PETase.

**Palavras-chave:** Plástico; PETase; Dinâmica Molecular; pH; Mutação.

# Abstract

Over 300 million tons of plastics are produced worldwide each year, including billions of plastic bottles, and 5 billion plastic bags, half of which we will use only once and throw away later. By 2050 the world population had reached 10 billion people, while plastic consumption will triple. Because of this serious problem, I chose to do a computational study of the PETase enzyme. The dynamics consists of the following steps: Study the handling and programming on the Linux operating system, because the Amber package can only be operated on Linux; To learn the computational dynamics of Monte Carlo, in parallel I used the auxiliary programs, Visual Molecular Dynamics (VMD) and Chimera, for visualization, handling and editing of enzyme amino acid sets.

**Keywords:** Plastics; PETase; Computational Dynamics; Amino Acids.

# Índice

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
1.1	Plástico no Meio Ambiente . . . . .	1
1.2	<i>Ideonella sakaiensis</i> . . . . .	2
1.2.1	Enzima . . . . .	2
1.2.2	O Mecanismo de Degradação da PETase . . . . .	3
<b>2</b>	<b>Objetivos</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>Metodologia</b>	<b>6</b>
3.1	Métodos Computacionais . . . . .	6
3.2	AMBER . . . . .	7
3.3	Dinâmica Molecular . . . . .	7
3.3.1	Modelagem Molecular . . . . .	8
3.3.2	Campos de Força e Água . . . . .	8
3.4	Ferramentas das Simulações por Dinâmica Molecular . . . . .	11
3.4.1	Simulação Computacional . . . . .	13
3.4.2	Minimização de Energia . . . . .	13
3.5	O método Steepest - Descent . . . . .	14
3.5.1	O método conjugate gradient (gradientes conjugados) . . . . .	14
<b>4</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	<b>16</b>
4.1	Análise de Resultados . . . . .	23
<b>5</b>	<b>Conclusões</b>	<b>32</b>



# Lista de Figuras

1.1	Produção Global de Plástico pelo setor industrial em 2015. . . . .	1
1.2	Tabela Periódica de Aminoácidos. . . . .	3
1.3	Bactéria Thermobifida Fusca. . . . .	4
3.1	Informações básicas sobre o software AMBER. . . . .	13
4.1	RMSD da PETase tipo nativa em 300K e pH9. . . . .	16
4.2	RMSF da PETase tipo nativa em 300K e pH9. . . . .	17
4.3	RMSD da PETase tipo nativa em 326K e pH9. . . . .	18
4.4	RMSF da PETase tipo nativa em 326K e pH9. . . . .	19
4.5	RMSD da PETase tipo mutante(S121D;D186H;R280A) em 300K e pH9. . . . .	20
4.6	RMSF da PETase tipo mutante(S121D;D186H;R280A) em 300K e pH9. . . . .	21
4.7	RMSD da PETase tipo mutante(S121D;D186H;R280A) em 326K e pH9. . . . .	22
4.8	RMSF da PETase tipo mutante(S121D;D186H;R280A) em 326K e pH9. . . . .	23

# Lista de Tabelas

4.1	Estados de protonação da PETase WT, 300K em pH=9,0. . . . .	24
4.2	Média total de protonação da PETase WT, 300K em pH=9,0. . . . .	24
4.3	Estados de protonação da PETase WT, 326K em pH=9,0 . . . . .	25
4.4	Média total de protonação PETase WT, 326K em pH=9,0. . . . .	26
4.5	Estados de protonação da PETase MT(S121D;D186H;R280A), 300K em pH=9,0.	28
4.6	Média total de protonação PETase MT(S121D;D186H;R280A), 300K em pH=9,0	29
4.7	Estados de protonação da PETase MT(S121D;D186H;R280A), 326K em pH=9,0	30
4.8	Média total de protonação PETase MT(S121D;D186H;R280A), 326K em pH=9,0	31

# Capítulo 1

## Introdução

### 1.1 Plástico no Meio Ambiente

O plástico é leve, higiênico e um material que pode ser moldado de diferentes maneiras. Possui uma ampla aplicação, mas carrega dois detalhes igualmente marcantes: é bom por que é durável, e ao mesmo tempo, ruim pelo mesmo motivo.

Desde a década de 50 ocorreu um crescimento na produção de plástico, ultrapassando qualquer outro material. Houve uma mudança global no padrão de consumo dos materiais plásticos. O que deveria ser durável e usado diversas vezes se tornou descartável, muitas vezes após seu primeiro uso.

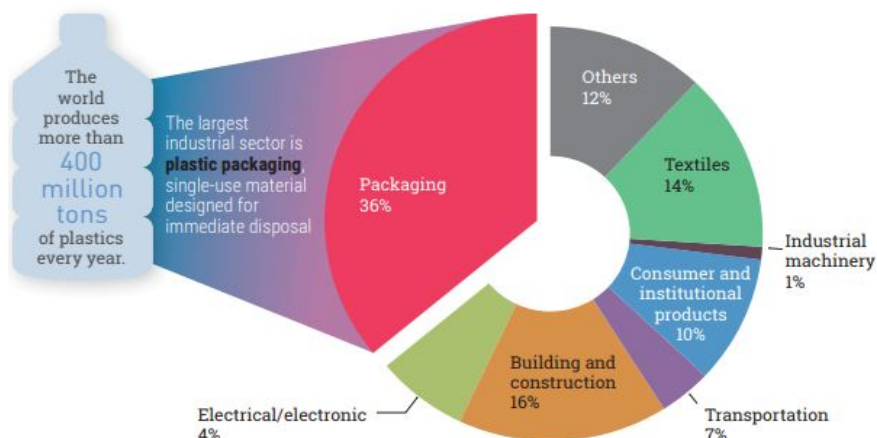


Figura 1.1: Produção Global de Plástico pelo setor industrial em 2015.

Fonte: UNEP(2018). SINGLE-USE PLASTICS

No gráfico da figura 1 observa-se que anualmente são produzidos mais de 400 milhões de toneladas de plásticos, divididos em dois grandes grupos: o grupo dos Termoplásticos, cujos

principais representantes desta categoria são o Polietileno Tereftalato (PET), Polietileno Tereftalato (PE), Polietileno de baixa densidade (LDPE); e o outro grupo são os Termoendurecíveis, como o Poliuretano (PUR), Resina Fenólica e o Silicone[1].

Estima-se que até o ano de 2050 aumente em 300% o consumo mundial de plásticos, ao passo que a população aumente apenas 50%, ambos os dados com relação a valores atuais. À essa taxa, pode ser que exista mais plásticos do que peixes no oceano, causando grandes impactos ambientais[2].

## 1.2 *Ideonella sakaiensis*

Em 2016, foi descoberta, em Osaka no Japão a bactéria Gram-negativa *Ideonella Sakaiensis* com a rara habilidade de degradar o plástico, pelo fato de ter como principal fonte de energia o carbono[3].

Uma colônia dessa bactéria degradou um filme de PET amorfo a uma taxa de 0,13 mg/(cm<sup>2</sup> dia) a uma temperatura de 28°C. Ao longo de 3 semanas o consórcio degradou o filme de PET de dimensões de 2,5 cm por 2,0 cm por 0,1 de espessura[4].

Os sequenciamentos do genoma da *Ideonella sakaiensis* demonstram que é homóloga a *Thermobifida fusca* (TfH), carregando 51% de semelhança no sequenciamento dos aminoácidos[5].

Outra enzima homóloga a TfH é a Cutinase presente no composto foliar de um fungo. Apesar de possuírem a mesma capacidade, a enzima da *I.sakaiensis* é mais eficiente na degradação do PET. Isso levou a sua nomeação de hidrolase PET ou PETase[6].

A PETase exibe alta atividade hidrolítica a temperatura ambiente, mas é lábil ao calor, o que é ótimo pelo fato de, bioquimicamente falando, enzimas hidrolíticas de PET(PHEs), que são enzimas hidrolisadoras de PET, geralmente exibem alta termoestabilidade[7].

### 1.2.1 Enzima

Enzimas são proteínas que tem a função de acelerar uma reação química em um processo biológico. Sabe-se que praticamente todas as enzimas são proteínas, mas a recíproca não é verdadeira. Além de proteínas o RNA pode assumir uma função catalítica.

Seja uma proteína ou enzima, ambas são constituídas de aminoácidos que por sua vez são descritos através das funções orgânicas sendo elas a carboxila, referenciando o ácido carboxílico, e um amino, referenciando o grupo amina, e o radical, que acabará por diferenciar cerca de 20

aminoácidos diferentes encontrados naturalmente.

Os aminoácidos se dividem em subgrupos segundo as suas propriedades: Básicos, não polar hidrofóbicos, polar não carregado e os ácidos[8].

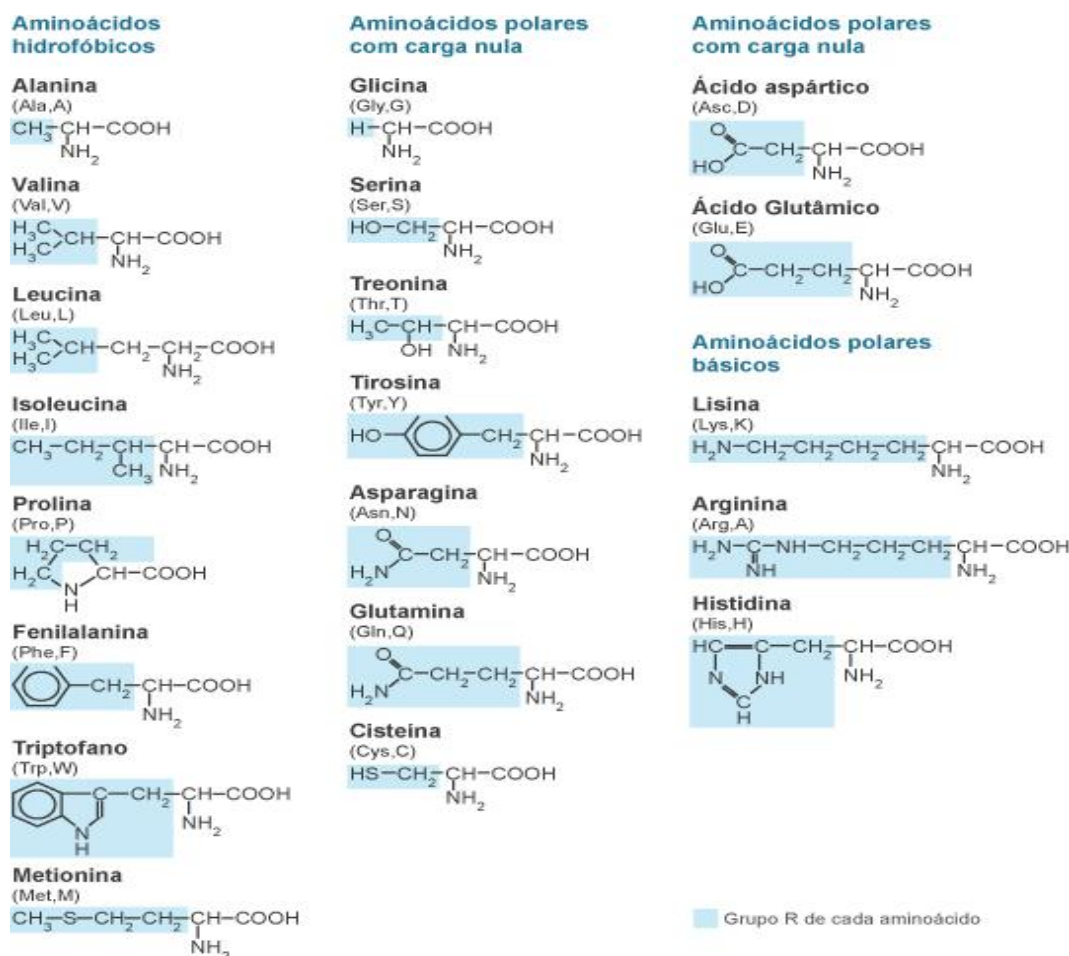


Figura 1.2: Tabela Periódica de Aminoácidos.

Fonte: ReaNCBI

## 1.2.2 O Mecanismo de Degradação da PETase

Primeiramente, a PETase armazena duas pontes de sulfeto, diferentemente de outras enzimas homólogas a ela que tem apenas uma. A segunda ponte de sulfeto (DS2) é ligada ao C-terminal com a última hélice, e é estritamente conservada em todas as enzimas com estrutura homóloga. A DS1, e localizada adjacente  $\beta 7 - \alpha 5$  e  $\beta 8 - \alpha 8$ , que tem armazenado o ácido catalítico D177 que faz parte da tríade catalítica com a base Histidina 208 respectivamente. Em adição o loop  $\beta 8 - \alpha 6$  na PETase e os 3 resíduos ao longo de outras enzimas homólogas. Este último loop é proposto para criar uma espécie de subsítio para armazenar o PET, enquanto

que loops mais curtos dificultam a formação deste subsítio. Destaca-se que a ausência desta ponte de sulfeto reduz consideravelmente a taxa de degradação do PET[9-10].

Um outro fenômeno interessante é que a oscilação em torno do W156 tem importância na ligação da enzima com o substrato. Também é observado que a Serina da posição 185 em outras enzimas tem uma histidina, reduzindo a atividade enzimática[11].



Figura 1.3: Bactéria *Thermobifida Fusca*.

# Capítulo 2

## Objetivos

Verificar a influência da variação dos parâmetros temperatura, pH e mutação na termo estabilidade da PETase, analisando a influência na protonação e desprotonação, visto que esta é a base para o mantimento da atividade enzimática.

# Capítulo 3

## Metodologia

### 3.1 Métodos Computacionais

Nos últimos anos, com a evolução dos componentes computacionais, o método computacional tem melhorado. Os métodos de cálculos computacionais muito utilizados na química e física cobrem tanto situações estáticas quanto dinâmicas. Contudo, a medida que os parâmetros intensivos e extensivos do sistema aumentam, o tempo de cálculo e a utilização de outros recursos como memória ram e espaço em HD também aumentam. O sistema pode ser uma única molécula, um grupo de moléculas ou um sólido cristalino. Os métodos da física e química computacional baseiam-se em teorias que podem fornecer uma alta precisão, aplicáveis em sistemas pequenos, e também muito apropriado para grandes sistemas com muitas partículas. Os métodos abinitio são baseados na teoria de primeiros princípios. Outros métodos não tão precisos, chamados de empíricos ou semiempíricos, tem perda de precisão pelo fato de serem baseados em parâmetros experimentais, em geral obtidos em modelos aceitáveis de átomos e moléculas, mas com elementos teóricos científicos.

Tanto no método abinitio, quanto o semiempírico, é utilizado aproximações que podem ser simplificadas em equações de primeiros princípios que realizam aproximações e limitam o tamanho do sistema, utilizando condições de contorno periódicas como as de Neumann ou Dirichlet, ou aproximações em equações para se chegar a um resultado. A maioria dos cálculos abinitio faz uso da aproximação de Born-Oppenheimer, que tem uma grande simplificação dos cálculos pelo fato de desconsiderar o deslocamento do núcleo atômico. Tem-se como consequência que a medida que é reduzido o número de aproximações, tem a sua convergência a solução das equações fundamentais.



Em alguns casos, a estrutura eletrônica é menos importante do que o comportamento molecular, por exemplo o substrato durante um certo tempo. Sendo mais específico, é feito um estudo conformacional da qual tem como principal interesse a geometria e o equilíbrio energético da estrutura associada[12].

## 3.2 AMBER

*Amber Tools* é munido de ferramentas como *AddToBox* que tem a função de adicionar uma molécula de solvente em torno de um soluto ou célula cristalina; *antechamber* que é utilizado para parametrizar ligantes a pequenas moléculas; *cpinutil.py* que é uma ferramenta necessária para Simulações com pH constante; *cpptraj* que é um programa utilizado para fazer análises das trajetórias após a finalização da Dinâmica; *cphstats* cuja função é informar os diferentes estados de protonação e desprotonação quando o pH foi constante; *mdout\_analyser.py*, um programa utilizado para obtenção de gráficos de diferentes tipos de energia cinética e potencial de uma molécula; *parmchk2*, um programa para analisar os parâmetros de entrada na biblioteca do campo de força escolhido; o *parmed* é utilizado para manipulação do arquivo de topologia do sistema; *pdb4amber* é utilizado para fazer reparos no PDB; *pmemd* é um mecanismo de dinâmica molecular; *reduce* é utilizado para adicionar e remover átomos de hidrogênio; *sander* é a máquina para rodar a simulação molecular no Amber; *tleap* é o programa utilizado para criação do arquivo de topologia e de coordenadas do sistema; *xleap*, programa com interface gráfica para visualização de estruturas; *packmol-memgen*, que é utilizado para gerar sistema de simulação de membrana; *pmemd.cuda*, que tem a mesma função do *pmemd*, mas sua velocidade é superior pelo fato de ser usado uma GPU[13].

## 3.3 Dinâmica Molecular

A Simulação consiste de quatro etapas: Minimização, Aquecimento, Equilibração e Produção. A minimização consiste na obtenção do estado de menor energia do sistema, ou o mais próximo possível dele. Ela é dividida em duas etapas; o *Steepest descend* e o *Gradient Conjugate*. Em um exemplo genérico, uma simulação que tenha 5000 passos de minimização, o *Gradient Conjugate* vai fazer 4500 passos até chegar em um estado de menor energia, terminada esta etapa o *Steepest descend* finaliza a minimização completando a etapa e encontrando o menor estado de energia.

No aquecimento, temos uma rampa de aquecimento partindo de uma temperatura inicial

até chegar a um valor final. Nesta etapa temos a variação da energia cinética e a potencial. Em seguida temos a etapa de equilíbrio, onde mantém-se constante na temperatura final do aquecimento, objetivando o equilíbrio das energias potenciais e cinéticas. A etapa de produção é a mais demorada de todas, variando entre algumas horas até dias dependendo do tamanho do sistema, resultando no arquivo de trajetória para o objeto de estudo[14].

### 3.3.1 Modelagem Molecular

Uma das melhores maneiras de fazer um estudo teórico de moléculas biológicas é o da Dinâmica Molecular (MD). Através deste método é possível calcular o comportamento do objeto de estudo fazendo uma integração da trajetória, utilizando passos de integração. Simulações computacionais fornecem detalhadamente as flutuações e mudanças conformacionais através das variações das energias potenciais e cinéticas. Esse método é muito utilizado para investigação da dinâmica e termodinâmica das moléculas biológicas e seus complexos. Também pode ser utilizado para a determinação da estrutura cristalográfica.

Na Modelagem Molecular (MM) o sistema átomo-elétron é considerado como uma única partícula. Isso ocorre por que o elétron não é considerado explicitamente. Já em MM é comumente utilizado em grandes sistemas para aferir o potencial energético de uma conformação molecular específica. Os valores absolutos para energia potencial não são significativos para esses cálculos, mas a variação da energia entre as conformações são.

As interações entre os átomos são baseadas no sistema clássico da massa e mola e em outros potenciais, como por exemplo o de *Lennard-Jones*. A energia potencial total é dada pela soma entre as energias potenciais; a energia de ligação, variação de ângulo de ligação, diedral e interações de origem coulombiana de átomos não ligados. A partir da soma desses potenciais chega-se na *Hamiltoniana* do Campo de Força (Force Field)[15].

### 3.3.2 Campos de Força e Água

- **ff14SB**

Este campo de força adequado para proteína é uma evolução do campo de força ff99SB. Ele foi criado objetivando um melhor valor de balanço energético entre uma helicoidal e regiões de peptídeos e coluna principal de proteínas, da qual os outros campos antecessores a ele o ff94 e ou ff99 não fornecem. Uma outra correção que foi efetuada é no aminoácido Glicina, melhorando a

reparametrização com relação a coluna principal, isso em termos de um ângulo de torção, melhorando conseqüentemente a estrutura secundária da folha Beta. Também foram implementadas melhoras quanto a peptídeos solvatados, sendo feito inclusive ajustes empíricos[16].

- **water.tip3p**

Este é um modelo de água, mas não é o padrão. Ele pode ser utilizado para resíduos nomeados de HOH ou WAT, seguindo uma longa tradição. Apesar do fato de que muitas propriedades deste modelo de água mais antigo se desviam da representação real da água, ele ainda é um modelo popular para simulações biomoleculares, ainda que haja diversos tipos, como o tip4p, tip5p e tip6p. Existe mais do que uma boa razão por trás dessa tendência, além do simples fato dela ser inerte. Particularmente ela foi utilizada por muitos campos de força predecessores, erros na parte do solvente ficam compensados até um certo limite, por parâmetros ajustados na parte do soluto. Isso teve como consequência o fato de muitos campos dos últimos anos são tendenciados ao TIP3P em diferentes graus de liberdade [17].

- **constph**

Neste campo também são carregadas outras bibliotecas residuais de carboxilato e modificações em outros campos de força, sendo eles: constph.lib e frcmod.constaph que faz alteração em átomos de hidrogênio, em regiões que contém hidrogênio protonável, formato syn ou anti para os átomos de oxigênios, e como o próprio nome sugere, ele é utilizado para simulações com pH constante[18].

$$E_{total} = \sum_{bonds} k_b(r-r_0)^2 + \sum_{angles} k_\theta(\theta-\theta_0)^2 + \sum_{dihedrals} V_n[1+\cos(n\phi-\gamma)] + \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=1+i}^N \left[ \frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right] \quad (3.1)$$

Equação do Campo de Força do AMBER.

Fonte: Manual AMBER.

Desta equação podemos deduzir que a energia potencial associada a uma conformação em equilíbrio e descrever os estados conformacionais do estado de menor energia, seja ela local ou global, mesmo o sistema sob a influencias térmica ou externa[19].

Cada somatório é interpretado da seguinte maneira:

- **Termos Harmônicos**

$$\sum_{bonds} k_b(r - r_0)^2 \quad (3.2)$$

Neste somatório sobre todas as ligações, representa a energia entre os átomos covalentemente ligados de uma distância de equilíbrio. Este potencial é associado a oscilação entre (C-C, C-H, N-H).

- **Termos Angulares**

$$\sum_{angles} k_\theta(\theta - \theta_0)^2 \quad (3.3)$$

Neste somatório é associada a energia entre a geometria dos orbitais eletrônicos envolvidos em ligação covalente.

- **Termos Torcional**

$$\sum_{dihedrals} V_n[1 + \cos(n\phi - \gamma)] \quad (3.4)$$

Neste somatório temos a soma sobre as torções vizinhas ou pares solitários de elétrons,  $n$  é o fator de periodicidade,  $\phi$  é o ângulo diedral para a ligação central e  $\gamma$  que é a fase no ângulo diedral.

- **Termos de van der Waals e de Coulomb**

$$\sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=1+i}^N \left[ \frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right] \quad (3.5)$$

Neste somatório é aferido a interação dos átomos não ligados. O termo que vai com o expoente 12 especifica a repulsão entre os átomos considerando a interação entre as eletrosferas e os núcleos dos diferentes átomos, já o termo que vai com o expoente 6 mede a atração entre os elétrons de um átomo com o núcleo do outro átomo e vice-versa.

O último termo é o potencial eletrostático de coulomb, que descreve a interação das cargas parciais separadas por uma distância, juntamente com a permissividade elétrica[19].

## 3.4 Ferramentas das Simulações por Dinâmica Molecular

O estudo de enzimas em meio aquoso foi feito através de cálculos de Dinâmica Molecular híbrida, pelo fato de ter tido como ponto de partida um resultado experimental, objetivando a confirmação via Simulação Computacional. Os resultados dos cálculos da Dinâmica foram aferidos via estudo das diversas maneiras que as energias potenciais e cinéticas podem se manifestar e também pela análise da trajetória ao longo da Dinâmica, utilizando-se o pacote de programas AMBER versão 18, distribuído pela Universidade da Califórnia em São Francisco.

Como citado no Item 3.2 AMBER é o nome designado para um conjunto de ferramentas que permite a realização de Dinâmica Molecular em proteínas, enzimas, moléculas de DNA ou RNA, utilizando conhecimentos provenientes da Mecânica Clássica, Quântica, ou a Híbrida. O termo AMBER é o termo utilizado para se referir aos campos utilizados ao longo da Dinâmica, por exemplo o ff14SB e o ff19SB, sendo tanto o código quanto o campo de força diferente entre si, e outros campos de força podem ser implementados utilizando programas contidos no pacote AMBER, por exemplo o Leap.

Os principais softwares utilizados neste trabalho são:

- **ANTECHAMBER:** é a principal ferramenta de preparação de arquivos de entrada;
- **LEaP:** é a principal ferramenta para criar um novo sistema, ou para modificar um sistema já existente;
- **SANDER:** é a ferramenta que realiza as minimizações de energia, simulações por dinâmica molecular e refinamentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Utiliza-se dos algoritmos *teapest-descent* e *gradiente-conjugate* para realizar a etapa de minimização de energia por mecânica molecular e corrigir energias iniciais muito desfavoráveis. Suas Configurações podem ser guardados em intervalos de tempo regulares durante a simulação para análise posterior, e cálculos de energia livre podem ser realizados usando a integração termodinâmica;
- **CPPTRAJ:** é um utilitário de função geral para a análise e processamento de trajetória ou coordenar arquivos criados a partir de simulações de MD (ou de várias outras fontes);

- ***CPINUTIL.PY***: Este programa é usado para criar uma ambientação de pH constante, através de um arquivo de entrada chamado *cpin*;
- ***CPHSTATS***: Um programa para computar estados de protonação estatisticamente em simulações em pH constante;
- ***MDOUT\_ANALIZER.PY***: Um script que permite rapidamente analisar gráficos no formato data dos arquivos de saída provenientes do *sander* e *pmemd*;
- ***PARMCHK2***: Um programa para analisar um arquivo de entrada da biblioteca do campo de força, e extrai parâmetros relevantes através do arquivo *frmod*;
- ***PARMED***: Um programa para manipulação do arquivo de topologia do sistema;
- ***PDB4AMBER***: Este programa tem a função de preparar os arquivos PDB para ser usado no LEaP;
- ***REDUCE***: Este programa permite a manipulação via adição ou remoção de átomos de Hidrogênio para o PDB;
- ***PMEMD.CUDA***: Versão acelerada através do uso de uma GPU do *pmemd*;
- ***VMD***: Programa utilizado para exibição e análise de conjuntos moleculares;
- ***CHIMERA***: Programa utilizado para visualização e manipulação de estruturas moleculares, tais como trajetórias e conformações.

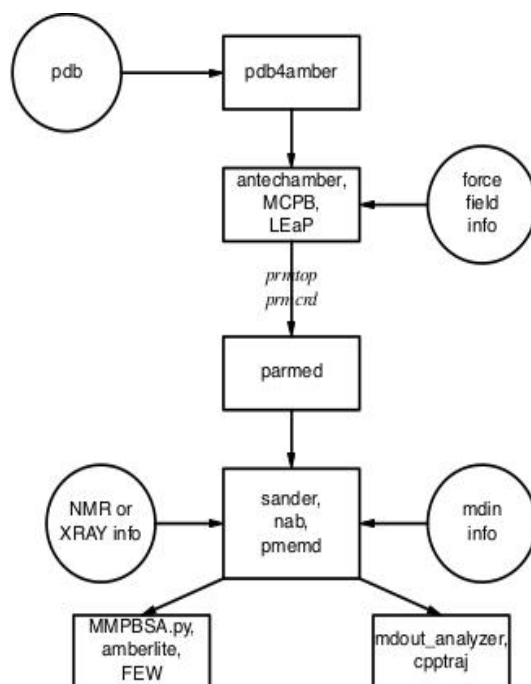


Figura 3.1: Informações básicas sobre o software AMBER.

Fonte: Manual AMBER

### 3.4.1 Simulação Computacional

O passo fundamental para a simulação da Dinâmica Molecular é o conhecimento da equação do movimento para o sistema considerado. O algoritmo de um programa de Dinâmica Molecular consiste da solução numérica desta equação de movimento fornecendo uma trajetória (coordenadas e momentos conjugados em função do tempo) do sistema sob estudo. Escolhendo o passo de integração, a resolução temporal e extensão da trajetória podem ser adaptadas aos eixos de relaxação temporal para os processos dinâmicos. A partir da trajetória, propriedades de equilíbrio e grandezas dinâmicas podem ser calculadas em um programa de Dinâmica Molecular[13].

### 3.4.2 Minimização de Energia

A minimização da energia do sistema tem por finalidade reduzir a energia potencial. Em outras palavras, tem por objetivo aproximar-se do estado fundamental, facilitando na etapa seguinte de aquecimento, pelo fato da energia térmica ser descrita em termos da vibração das moléculas do sistema, por consequência aumento da energia cinética. A não minimização correta do sistema acarretará no surgimento de gradientes de temperatura ao invés de um aquecimento

uniforme. Obviamente isso comprometerá o resultado final.

A minimização é reiterada em um processo cíclico, em coordenadas cartesianas, com diversos métodos utilizados para obtenção do estado de menor energia como: Genetic algorithms, Reaction path determination, Steepest-descent e Conjugate gradient. Apenas os dois últimos foram utilizados, primeiramente o Conjugate gradiente e em seguida o Steepest-descent[20].

## 3.5 O método Steepest - Descent

O método tem como sua tradução livre “descida íngreme”. É um método de primeira derivada convergindo lentamente na região do mínimo, tornando-se por consequência uma ferramenta poderosa em situações que o valor entregue pelo método do gradiente conjugado fica muito distante do real mínimo global de energia. Generalizando, com o método “steepest-descent” é possível melhorar estruturas cristalinas com pouco refinamento, otimizar as que já estão construídas ou construir novas estruturas que já tenham informações obtidas a partir de uma Ressonância Magnética Nuclear ou ainda utilizar informações de estruturas conhecidas e por homologia construir novas.

A força resultante sobre um átomo “i” é obtida pelo gradiente da energia potencial em:

$$F_i = -\nabla U \quad (3.6)$$

Neste método, o incremento no sistema de coordenadas referente a posição da molécula de um átomo “i”, é dado na direção e sentido da força resultante sobre este átomo[21].

### 3.5.1 O método conjugate gradient (gradientes conjugados)

É um método de minimização da função da energia potencial em suas diferentes manifestações, além de utilizar as informações da primeira derivada, considera-se também o caminho já percorrido na busca do mínimo global. Este método é mais rápido do que o anterior pelo fato de já partir do valor de um mínimo já calculado pelo *steepest-descent* que utiliza as informações do gradiente da informação já atualizada. O método *conjugate gradiente*, gradiente conjugado, em tradução livre, utiliza o gradiente do passo anterior, na obtenção do novo valor.

A vantagem na utilização do gradiente conjugado advém do fato de que a ortogonalidade é garantida ao longo de toda a trajetória, ou seja, ponto a ponto o vetor posição sempre será perpendicular ao gradiente no passo anterior e consequentemente ortogonal a todas as



outras direções anteriores. Desta maneira garante-se um caminho mais direto, elucidando a proximidade ao mínimo global, ou pelo menos mais próximo. Outra vantagem é a garantia de não retornar sobre caminhos já percorridos, diferentemente ao algoritmo *steepest - descent* que utiliza a informação de um ponto, não excluindo essa possibilidade.

Em termos práticos, em sistemas macromoleculares o algoritmo *steepest - descente* é mais efetivo e rápido nos passos iniciais, mas quando o mínimo se encontra muito equidistante do mínimo global o método de *gradient conjugate* é mais preciso. Neste trabalho foi utilizado os dois métodos na obtenção na primeira etapa da simulação, primeiramente o gradiente conjugado com critério de convergência baixo em seguida o *steepest - descent* para o refinamento[20].

# Capítulo 4

## Resultados e Discussão

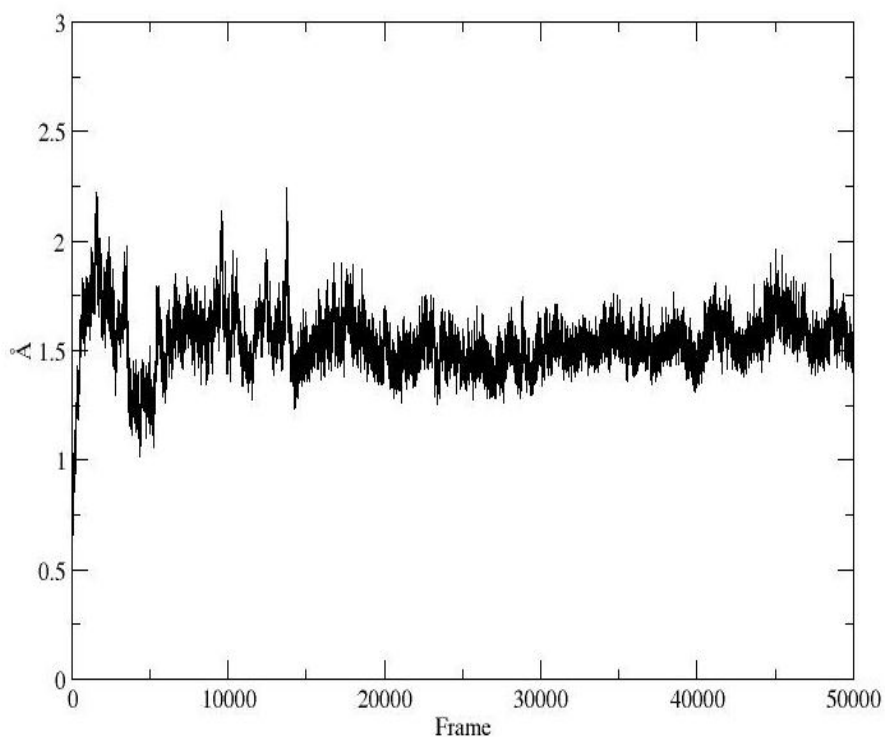


Figura 4.1: RMSD da PETase tipo nativa em 300K e pH9.

Neste gráfico temos a enzima PETase nativa, em pH mais básico igual a 9 em relação ao sistema anterior, ela foi aquecida até 300K. Na etapa de equilibração o ensemble utilizado foi NPT e na etapa de produção foi NVT. A enzima permanece em torno do valor de 1,5 Å com relação a espinha dorsal.

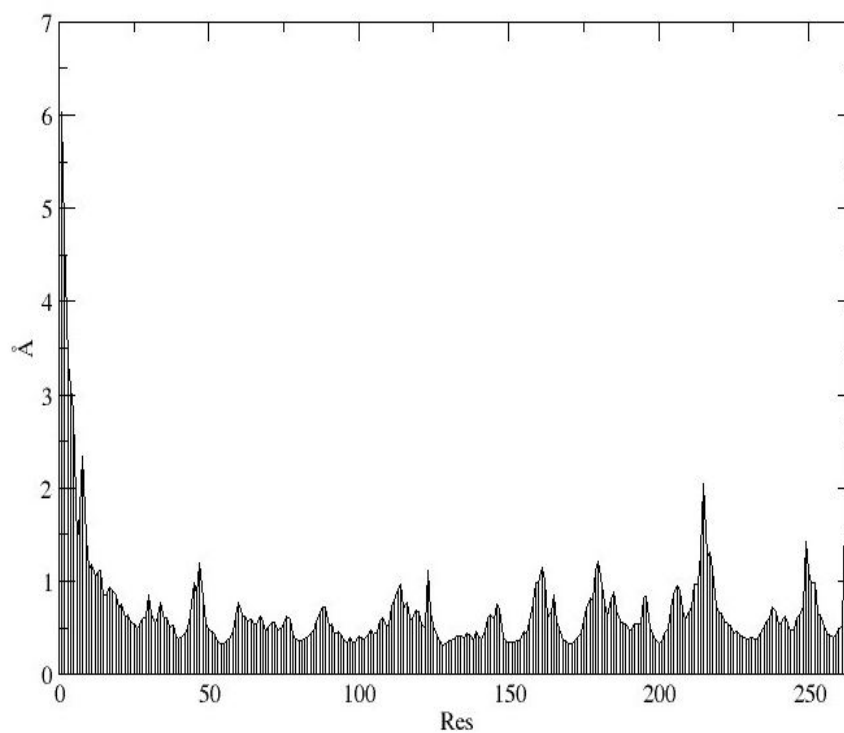


Figura 4.2: RMSF da PETase tipo nativa em 300K e pH9.

Já neste gráfico temos o comportamento individual de cada um dos aminoácidos residuais da enzima PETase nativa, em pH básico=9,0 aquecida até 300K. Na etapa de equilíbrio o ensemble utilizado foi NPT e na etapa de produção foi NVT. Excluindo as extremidades, observa-se que cada um dos 263 resíduos restantes oscilou entre 0,5 Å até cerca de 1,0 Å em média.

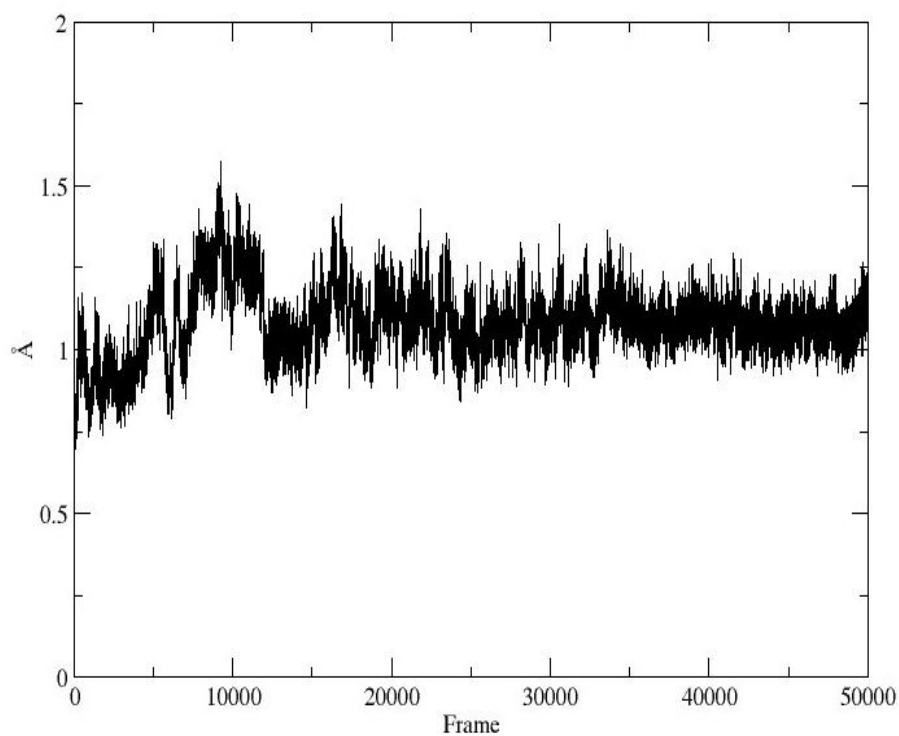


Figura 4.3: RMSD da PETase tipo nativa em 326K e pH9.

Neste gráfico temos a enzima PETase nativa, em pH=9,0 aquecida até 326K. Na etapa de equilibração o ensemble utilizado foi NPT e na etapa de produção foi o NVT. A enzima oscilou entre os valores de 0,75 Å até 1,25 Å durante os primeiros 25 nanosegundos da simulação, após esse tempo a estrutura preservou-se constante em torno de 1,0Å durante os 75 nanosegundos restantes da simulação com relação a espinha dorsal.

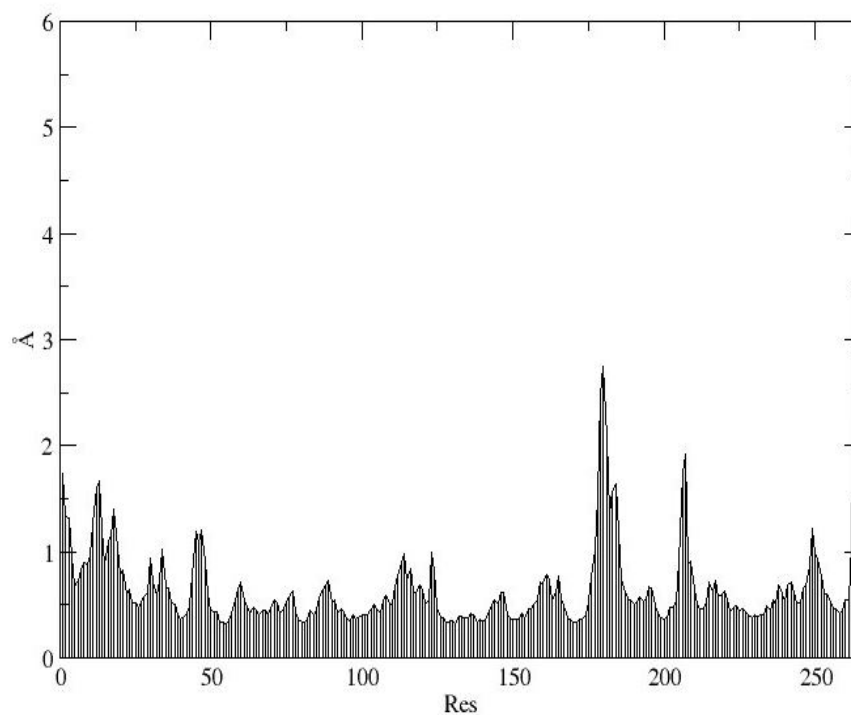


Figura 4.4: RMSF da PETase tipo nativa em 326K e pH9.

Na figura 8 temos a flutuação de cada um dos aminoácidos residuais da PETase nativa com relação a sua espinha dorsal, em pH=9,0 aquecida até 326K. Na etapa de equilíbrio o ensemble utilizado foi o NPT e na etapa de produção foi o NVT. Excluindo as extremidades, observa-se que cada um dos 263 resíduos restantes oscilou entre 0,5 Å até cerca de 1,0 Å, mas também se observa uma maior variação nos aminoácidos 170 a 190, com valores ultrapassando 2,5 Å.

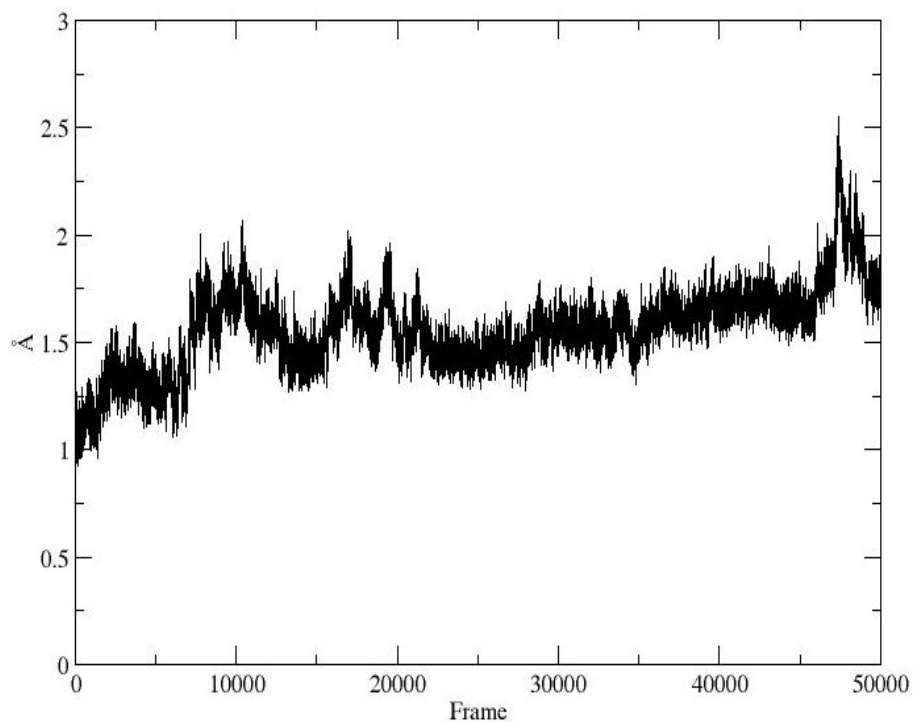


Figura 4.5: RMSD da PETase tipo mutante(S121D;D186H;R280A) em 300K e pH9.

Neste gráfico temos a enzima PETase tipo mutante, em pH=9,0 aquecida até 300K. Na etapa de equilibração o ensemble utilizado foi o NPT e na etapa de produção foi o NVT, a enzima oscilou entre os valores de 1,0Å até 1,5 Å durante os primeiros 25 nanosegundos da simulação. Após esse tempo, a estrutura permanece constante em torno de 1,0 Å durante os 75 nanosegundos restantes da simulação com relação a espinha dorsal.

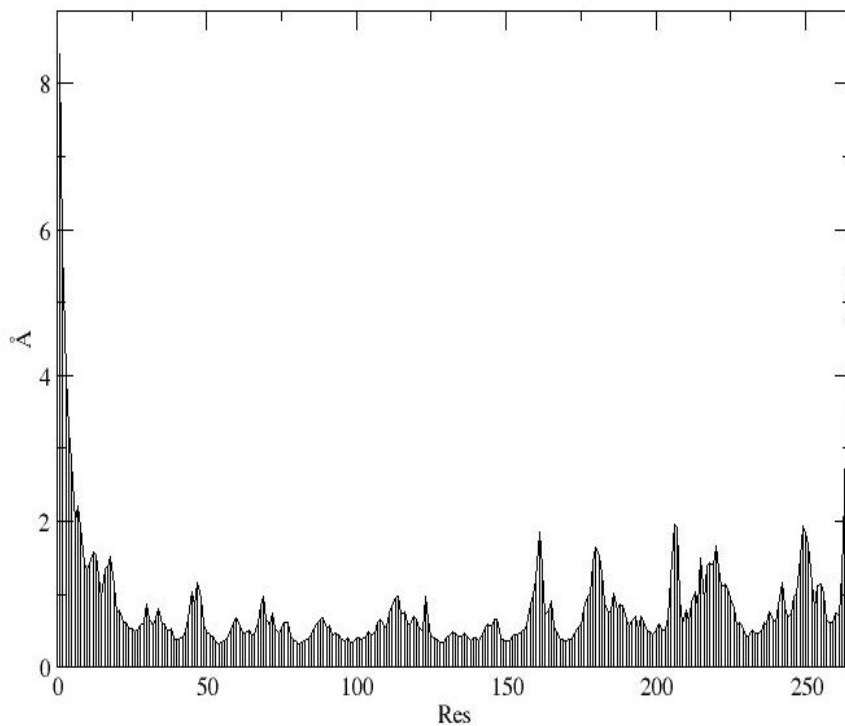


Figura 4.6: RMSF da PETase tipo mutante(S121D;D186H;R280A) em 300K e pH9.

Já neste gráfico 10, temos o comportamento individual de cada um dos aminoácidos residuais da enzima PETase, em pH básico=9,0 aquecida até 300K. Na etapa de equilibração o ensemble utilizado foi o NPT e na etapa de produção foi o NVT. Excluindo as extremidades, observa-se que cada um dos 263 resíduos restantes oscilou em torno do valor médio de 1,0 Å até o resíduo 150, desse valor em diante a oscilação aumenta para o valor de 1,5 Å até 2,0 Å.

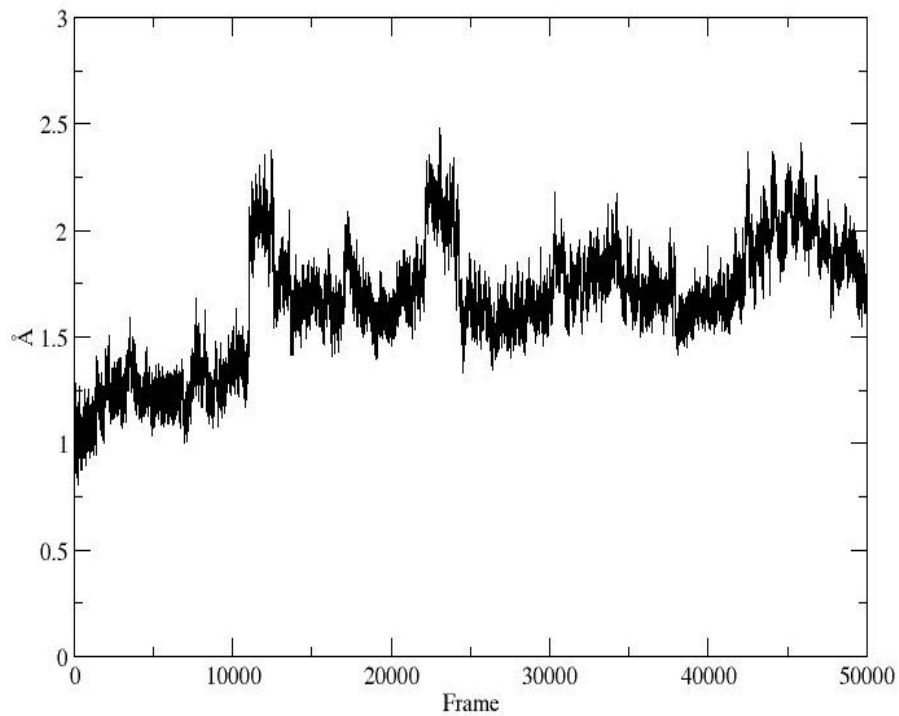


Figura 4.7: RMSD da PETase tipo mutante(S121D;D186H;R280A) em 326K e pH9.

Ao comparar o gráfico acima com a figura 9, correspondente a simulação feita a 300K, percebe-se que a oscilação aumentou com relação a estrutura de referência. Durante os primeiros 20ns da simulação a oscilação ficou em torno de 1,25 Å, após os 20ns, o valor sobe para 1,75Å à 2,0Å.



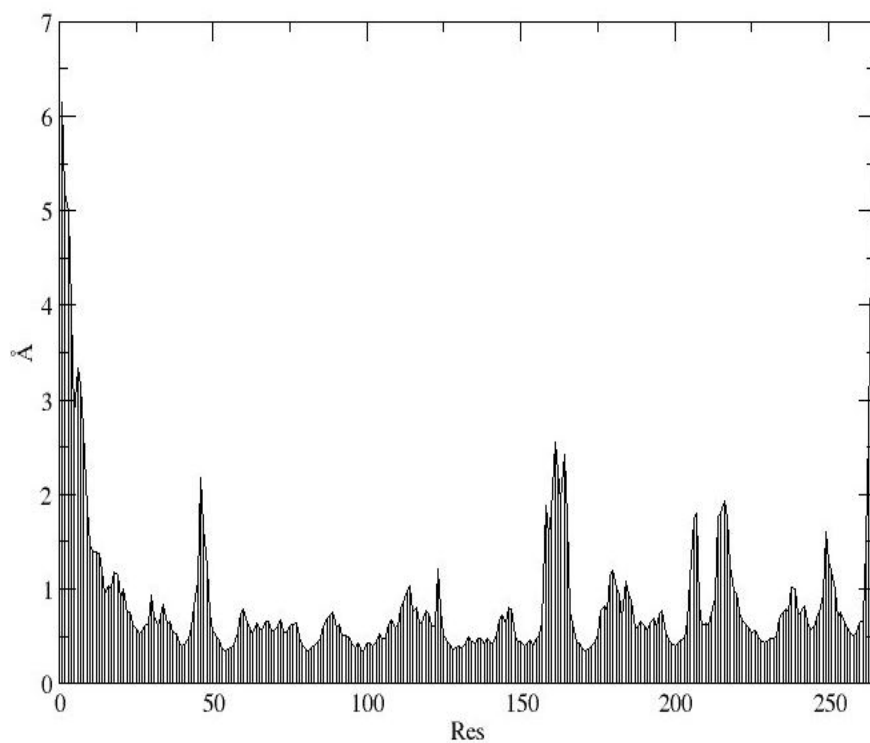


Figura 4.8: RMSF da PETase tipo mutante(S121D;D186H;R280A) em 326K e pH9.

Em corroboração ao gráfico de RMSD a flutuação teve aumento com relação a simulação feita a 300K, de fato ao se comparar os experimentos é detectável o comportamento anisotrópico dos resíduos como um todo.

## 4.1 Análise de Resultados

Aqui temos uma amostra da PETase tipo selvagem. Ela foi inserida em um meio básico com  $\text{pH} = 9,0$  a temperatura ambiente de 300K.

Tabela 4.1: Estados de protonação da PETase WT, 300K em pH=9,0.

Residue:	Number	State 0	State 1
Residue:	TYR 4	0,944264(1)	0,055736(0)
Residue:	TYR 35	1,000000(1)	0,000000(0)
Residue:	TYR 41	0,999248(1)	0,000752(0)
Residue:	TYR 42	0,996968(1)	0,003032(0)
Residue:	TYR 59	0,989536(1)	0,010464(0)
Residue:	LYS 67	0,288450(3)	0,711550(2)
Residue:	TYR 118	0,996664(1)	0,003336(0)
Residue:	LYS 120	0,708198(3)	0,291802(2)
Residue:	LYS 149	0,840295(3)	0,159705(2)
Residue:	TYR 191	0,999936(1)	0,000064(2)
Residue:	LYS 199	0,971976(3)	0,028024(2)
Residue:	LYS 224	0,472572(3)	0,527428(2)
Residue:	LYS 225	0,972552(3)	0,027448(2)
Residue:	LYS 231	0,942456(3)	0,057544(2)
Residue:	TYR 240	0,999984(1)	0,000016(0)

Nesta tabela percebe-se que foram 15 os resíduos tituláveis, da qual a maioria ficou mais de 80% do tempo no estado 0, que corresponde a protonação da enzima. Destaca-se a Lisina 67 e a 224, que permaneceram 71% e 52% respectivamente no estado 1 que é correspondente a protonação Syn. Essa variação de estado demonstra que teve variação espacial da cadeia doadora de próton.

Tabela 4.2: Média total de protonação da PETase WT, 300K em pH=9,0.

TYR 4	Offset	1,229	Pred	10,229	Frac Prot	0,944	Transitions	13066
TYR 35	Offset	inf	Pred	inf	Frac Prot	1,000	Transitions	0
TYR 41	Offset	3,123	Pred	12,123	Frac Prot	0,999	Transitions	102
TYR 42	Offset	2,517	Pred	11,517	Frac Prot	0,997	Transitions	114
TYR 59	Offset	1,976	Pred	10,976	Frac Prot	0,990	Transitions	2588
LYS 67	Offset	-0,392	Pred	8,608	Frac Prot	0,288	Transitions	23810
TYR 118	Offset	2,475	Pred	11,475	Frac Prot	0,997	Transitions	830
LYS 120	Offset	0,385	Pred	9,385	Frac Prot	0,708	Transitions	14468
LYS 149	Offset	0,721	Pred	9,721	Frac Prot	0,840	Transitions	18804
TYR 191	Offset	4,194	Pred	13,194	Frac Prot	1,000	Transitions	16
LYS 199	Offset	1,540	Pred	10,540	Frac Prot	0,972	Transitions	1984
LYS 224	Offset	-0,048	Pred	8,952	Frac Prot	0,473	Transitions	9238
LYS 225	Offset	1,549	Pred	10,549	Frac Prot	0,973	Transitions	590
LYS 231	Offset	1,214	Pred	10,214	Frac Prot	0,942	Transitions	1012
TYR 240	Offset	4,796	Pred	13,796	Frac Prot	1,000	Transitions	4

Average total molecular protonation: 2.292.

Aqui percebe-se que a baixa taxa de protonação total é um indicativo de baixa hidrofobicidade, tornando-se mais suscetível a novas ligações de hidrogênio, por exemplo.

Nas próximas duas tabelas, é retratado um sistema com a PETase nativa, em meio básico=9,0 aquecido até 326K.

Tabela 4.3: Estados de protonação da PETase WT, 326K em pH=9,0

Residue:	Number	State 0	State 1	State 2	State 3	State 4
Residue:	GL4 16	1,000000(0)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)
Residue:	HIP 76	0,273226(2)	0,675317(1)	0,051456(1)	—	—
Residue:	AS4 84	1,000000(0)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)
Residue:	AS4 90	1,000000(0)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)
Residue:	AS4 122	1,000000(0)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)
Residue:	AS4 158	0,999008(0)	0,000648(1)	0,000648(1)	0,000048(1)	0,000064(1)
Residue:	GL4 176	0,996664(0)	0,000496(1)	0,000496(1)	0,000392(1)	0,001376(1)
Residue:	AS4 178	0,998288(0)	0,001624(1)	0,000000(1)	0,000088(1)	0,000000(1)
Residue:	AS4 192	1,000000(0)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)
Residue:	GL4 203	0,999936(0)	0,000064(1)	0,000000(1)	0,000832(1)	0,000000(1)
Residue:	HIP 209	0,009104(2)	0,762480(1)	0,220938(1)	—	—
Residue:	AS4 235	1,000000(0)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)
Residue:	AS4 237	1,000000(0)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)
Residue:	GL4 246	0,992552(0)	0,027448(1)	0,000000(1)	0,001952(1)	0,000000(1)
Residue:	AS4 255	0,982456(0)	0,057544(1)	0,000000(1)	0,000040(1)	0,000000(1)
Residue:	GL4 264	0,999984(0)	0,000016(1)	0,000016(1)	0,000192(1)	0,000000(1)

Nesta tabela percebe-se que foram 16 os aminoácidos tituláveis, absolutamente nenhum se repetiu com relação ao sistema aquecido até 300K, sem contar que teve aumento dos estados, da qual os prótons podem ocupar, ocupando o segundo estado que é correspondente a antiprotonado. Demonstrando que teve variação espacial da cadeia doadora de prótons.

Tabela 4.4: Média total de protonação PETase WT, 326K em pH=9,0.

GL4 16	Offset	-inf	Pred	-inf	Frac Prot	0,000	Transitions	0
HIP 76	Offset	-0,425	Pred	8,575	Frac Prot	0,273	Transitions	194
AS4 84	Offset	-inf	Pred	-inf	Frac Prot	0,000	Transitions	0
AS4 90	Offset	-inf	Pred	-inf	Frac Prot	0,000	Transitions	0
AS4 122	Offset	-inf	Pred	-inf	Frac Prot	0,000	Transitions	0
AS4 158	Offset	-3,003	Pred	5,997	Frac Prot	0,001	Transitions	12
GL4 176	Offset	-2,537	Pred	6,463	Frac Prot	0,003	Transitions	62
AS4 178	Offset	-2,766	Pred	6,234	Frac Prot	0,002	Transitions	44
AS4 192	Offset	-inf	Pred	-inf	Frac Prot	0,000	Transitions	0
GL4 203	Offset	-2,793	Pred	6,207	Frac Prot	0,002	Transitions	76
HIP 209	Offset	-2,037	Pred	6,963	Frac Prot	0,009	Transitions	59
AS4 235	Offset	-inf	Pred	6,963	Frac Prot	0,000	Transitions	0
AS4 237	Offset	-inf	Pred	-inf	Frac Prot	0,000	Transitions	0
GL4 246	Offset	-2,629	Pred	6,371	Frac Prot	0,002	Transitions	16
AS4 255	Offset	-4,319	Pred	4,681	Frac Prot	0,000	Transitions	2
GL4 264	Offset	-3,319	Pred	5,681	Frac Prot	0,000	Transitions	16

Average total molecular protonation: 27.123

Nesta tabela destaca-se que a média total de protonação ficou muito alta, indicando que a enzima teve um comportamento altamente hidrofóbico. Por consequência a ligação via interações de origem eletrostáticas tornam-se mais difíceis de serem feitas. Um outro destaque é a baixa transição de estado chegando em torno de 500 transições.

As tabelas a seguir ilustram o sistema da PETase tipo mutante, sendo essas mutações as seguintes: Serina 121, sendo substituída por um Ácido Aspartamico; O Ácido Aspartamico 186 foi substituído por uma Histidina e por último, a substituição da Arginina 280 por uma Alanina a temperatura fixa de 300K. Aqui percebe-se que em temperatura ambiente as enzimas permanecem altamente protonadas.

Na tabela acima, percebe-se que teve grande aumento, mais que o dobro do número de aminoácidos residuais, 33 no total. Destaca-se a Lisina 67, Histidina 76, 209 e a 252, Lisina 224. O restante permaneceu maior durante todo o tempo de dinâmica protonada.

As tabelas a seguir ilustram o sistema da PETase tipo mutante, sendo essas mutações as seguintes: Serina 121 substituída por um Ácido Aspartamico; O Ácido Aspartamico 186 substituída por uma Histidina, e por último foi substituído a Arginina 280 por uma Alanina a temperatura fixa de 326K. Aqui percebe-se que em temperatura ambiente as enzimas permaneceram altamente protonadas.

Com base na 6ª tabela, percebe-se que a alta média total de protonação, pode ser uma

consequência das diversas vezes que os aminoácidos fizeram transições, como podemos observar na última coluna da tabela.

Na tabela acima destaca-se a Histidina 76,158, 209 e 252, e a Lisina 67 e 224 que permaneceu maior parte do tempo nos estados 1, 2 e 3. Com isso, pode-se inferir que ocorreram mudanças localizadas nesses aminoácidos citados, da cadeia doadora de prótons.

Average total molecular protonation: 30,943

Na tabela acima, percebe-se que a media total de protonação permaneceu bem alta em comparação ao sistema aquecido até 300K, sendo este um indicativo de que há várias regiões com caráter de hidrofobicidade, piorando as interações intra e intermoleculares, com grande presença de resíduos aromáticos.

Tabela 4.5: Estados de protonação da PETase MT(S121D;D186H;R280A), 300K em pH=9,0.

Residue:	Number	State 0	State 1	State 2	State 3	State 4
Residue:	TYR 4	0,809959(1)	0,190041(0)	—	—	—
Residue:	GL4 16	0,997516(0)	0,000608(1)	0,000076(1)	0,001776(1)	0,000024(1)
Residue:	TYR 35	1,000000(1)	0,000000(0)	—	—	—
Residue:	TYR 41	0,998852(1)	0,001148(0)	—	—	—
Residue:	TYR 42	0,997524(1)	0,002476(0)	—	—	—
Residue:	TYR 59	0,996464(1)	0,003536(0)	—	—	—
Residue:	LYS 67	0,182905(3)	0,817095(2)	—	—	—
Residue:	HIP 76	0,009252(2)	0,681279(1)	0,309469(1)	—	—
Residue:	AS4 84	1,000000(0)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)
Residue:	AS4 90	1,000000(0)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)
Residue:	AS4 93	1,000000(0)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)
Residue:	TYR 118	0,996236(1)	0,003764(0)	—	—	—
Residue:	LYS 120	0,747587(3)	0,257885(2)	—	—	—
Residue:	AS4 122	1,000000(0)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)
Residue:	LYS 149	0,742115(3)	0,257885(2)	—	—	—
Residue:	HIP 158	0,008132(2)	0,000012(1)	0,194626(1)	—	—
Residue:	GL4 176	0,999560(0)	0,000304(1)	0,000000(1)	0,000284(1)	0,000004(1)
Residue:	AS4 178	0,999968(0)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000020(1)	0,000000(1)
Residue:	TYR 191	0,999696(1)	0,000304(0)	—	—	—
Residue:	AS4 192	0,999976(0)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000024(1)	0,000000(1)
Residue:	LYS 199	0,967384(3)	0,032616(2)	—	—	—
Residue:	GL4 203	0,999780(0)	0,000044(1)	0,000000(1)	0,0000176(1)	0,000000(1)
Residue:	HIP 209	0,003864(2)	0,317417(1)	—	—	—
Residue:	LYS 224	0,144789(3)	0,855211(2)	—	—	—
Residue:	LYS 225	0,679959(3)	0,320041(2)	—	—	—
Residue:	LYS 231	0,658679(3)	0,341321(2)	—	—	—
Residue:	AS4 235	1,000000(0)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)
Residue:	AS4 237	1,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)
Residue:	TYR 240	0,997968(0)	0,002032(0)	—	—	—
Residue:	GL4 246	0,999920(1)	0,000056(1)	0,000000(1)	0,000024(1)	0,000000(1)
Residue:	HIP 252	0,006780(2)	0,700299(1)	0,292921(1)	—	—
Residue:	AS4 255	1,000000(0)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)
Residue:	GL4 264	0,999768(0)	0,000064(1)	0,000004(1)	0,000152(1)	0,000012(1)

Tabela 4.6: Média total de protonação PETase MT(S121D;D186H;R280A), 300K em pH=9,0

GL4 16	Offset	-2,604	Pred	6,396	Frac Prot	0,002	Transitions	108
TYR 35	Offset	-inf	Pred	-inf	Frac Prot	1,000	Transitions	0
TYR 41	Offset	2,940	Pred	11,940	Frac Prot	0,999	Transitions	126
TYR 42	Offset	2,605	Pred	11,605	Frac Prot	0,998	Transitions	144
TYR 59	Offset	2,450	Pred	11,450	Frac Prot	0,996	Transitions	1764
LYS 67	Offset	-0,650	Pred	8,350	Frac Prot	0,183	Transitions	34536
HIP 76	Offset	-2,030	Pred	6,970	Frac Prot	0,009	Transitions	1407
AS4 84	Offset	-inf	Pred	-inf	Frac Prot	0,000	Transitions	0
AS4 90	Offset	-inf	Pred	-inf	Frac Prot	0,000	Transitions	0
AS4 93	Offset	-inf	Pred	-inf	Frac Prot	0,000	Transitions	0
TYR 118	offset	2,423	Pred	11,423	Frac Prot	0,996	Transitions	1868
LYS 120	Offset	0,459	Pred	9,472	Frac Prot	0,748	Transitions	31078
AS4 122	Offset	-inf	Pred	-inf	Frac Prot	0,000	Transitions	0
LYS 149	Offset	0,459	Pred	9,459	Frac Prot	0,742	Transitions	41774
HIP 158	Offset	-1,734	Pred	7,266	Frac Prot	0,018	Transitions	6062
GL4 176	Offset	-3,356	Pred	5,644	Frac Prot	0,000	Transitions	44
AS4 178	Offset	-4,495	Pred	4,505	Frac Prot	0,000	Transitions	6
TYR 191	Offset	3,517	Pred	12,517	Frac Prot	1,000	Transitions	138
AS4 192	Offset	-4,620	Pred	4,380	Frac Prot	0,000	Transitions	2
LYS 199	Offset	1,472	Pred	10,472	Frac Prot	0,967	Transitions	5149
GL4 203	Offset	-3,657	Pred	5,343	Frac Prot	0,000	Transitions	22
HIP 209	Offset	-2,411	Pred	6,589	Frac Prot	0,004	Transitions	990
LYS 224	Offset	-0,705	Pred	8,295	Frac Prot	0,165	Transitions	19955
LYS 225	Offset	0,327	Pred	9,327	Frac Prot	0,680	Transitions	5185
LYS 231	Offset	0,286	Pred	9,286	Frac Prot	0,659	Transitions	9665
AS4 235	Offset	-inf	Pred	-inf	Frac Prot	0,000	Transitions	0
AS4 237	Offset	-inf	Pred	-inf	Frac Prot	0,000	Transitions	0
TYR 240	Offset	2,691	Pred	11,691	Frac Prot	0,998	Transitions	460
GL4 246	Offset	-4,097	Pred	4,903	Frac Prot	0,000	Transitions	12
HIP 252	Offset	-2,166	Pred	6,834	Frac Prot	0,007	Transitions	2062
AS4 255	Offset	-inf	Pred	-inf	Frac Prot	0,000	Transitions	0
GL4 264	Offset	3,634	Pred	5,366	Frac Prot	0,000	Transitions	26

Tabela 4.7: Estados de protonação da PETase MT(S121D;D186H;R280A), 326K em pH=9,0

Residue:	Number	State 0	State 1	State 2	State 3	State 4
Residue:	TYR 4	0.987600(1)	0.012400(0)	—	—	—
Residue:	GL4 16	0.999480(0)	0.000152(1)	0.000000(1)	0.000228(1)	0.000140(1)
Residue:	TYR 35	1.000000(1)	0.000000(0)	—	—	—
Residue:	TYR 41	0.998336(1)	0,001664(0)	—	—	—
Residue:	TYR 42	0,997940(1)	0,002060(0)	—	—	—
Residue:	TYR 59	0,990824(1)	0,009176(0)	—	—	—
Residue:	LYS 67	0,376586(3)	0,623414(2)	—	—	—
Residue:	HIP 76	0,435458(2)	0,456618(1)	0,107924(1)	—	—
Residue:	AS4 84	1,000000(0)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)
Residue:	AS4 90	0,999980(0)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000020(1)	0,000000(1)
Residue:	AS4 93	0,999996(0)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000004(1)	0,000000(1)
Residue:	TYR 118	0,995152(1)	0,004848(0)	—	—	—
Residue:	LYS 120	0,601894(3)	0,398106(2)	—	—	—
Residue:	AS4 122	1,000000(0)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)
Residue:	LYS 149	0,775611(2)	0,224389(2)	—	—	—
Residue:	HIP 158	0,019704(2)	0,709455(1)	0,200841(1)	—	—
Residue:	GL4 176	0,998236(0)	0,000440(1)	0,000668(1)	0,000496(1)	0,000160(1)
Residue:	AS4 178	0,999988(0)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000012(1)	0,000000(1)
Residue:	TYR 191	0,999508(1)	0,000492(0)	—	—	—
Residue:	AS4 192	1,000000(0)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)
Residue:	LYS 199	0,957420(3)	0,042580(2)	—	—	—
Residue:	GL4 203	0,996944(0)	0,002708(1)	0,000000(1)	0,000276(1)	0,000072(1)
Residue:	HIP 209	0,003196(2)	0,434038(1)	0,562766(1)	—	—
Residue:	LYS 224	0,175889(3)	0,824111(2)	—	—	—
Residue:	LYS 225	0,872615(3)	0,127385(2)	—	—	—
Residue:	LYS 231	0,748183(3)	0,251817(2)	—	—	—
Residue:	AS4 235	0,996696(0)	0,000032(1)	0,003872(1)	0,000000(1)	0,000000(1)
Residue:	AS4 237	1,000000(0)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000000(1)
Residue:	TYR 240	0,996064(1)	0,003936(0)	—	—	—
Residue:	GL4 246	0,999844(0)	0,000056(1)	00000004(1)	0,000092(1)	00000004(1)
Residue:	HIP 252	0,002044(2)	0,797371(1)	0,200585(1)	—	—
Residue:	AS4 255	0,999988(0)	0,000000(1)	0,000000(1)	0,000012(1)	0,000000(1)
Residue:	GL4 264	0,999972(0)	0,000000(1)	0,000004(1)	0,000020(1)	0,000004(1)



Tabela 4.8: Média total de protonação PETase MT(S121D;D186H;R280A), 326K em pH=9,0

TYR 4	Offset	1,901	Pred	10,901	Frac Prot	0,988	Transitions	3652
GL4 16	Offset	-3,284	Pred	5,716	Frac Prot	0,001	Transitions	40
TYR 35	Offset	inf	Pred	inf	Frac Prot	1,000	Transitions	0
TYR 41	Offset	2,778	Pred	11,778	Frac Prot	0,998	Transitions	3366
TYR 42	Offset	2,685	Pred	11,685	Frac Prot	0,998	Transitions	210
TYR 59	Offset	2,033	Pred	11,033	Frac Prot	0,991	Transitions	4564
LYS 67	Offset	-0,219	Pred	8,781	Frac Prot	0,377	Transitions	59194
HIP 76	Offset	-0,113	Pred	8,887	Frac Prot	0,435	Transitions	940
AS4 84	Offset	- inf	Pred	- inf	Frac Prot	0,000	Transitions	0
AS4 90	Offset	-4,699	Pred	4,301	Frac Prot	0,000	Transitions	2
AS4 93	Offset	-5,398	Pred	3,602	Frac Prot	0,000	Transitions	2
TYR 118	Offset	2,312	Pred	11,312	Frac Prot	0,995	Transitions	2408
LYS 120	Offset	0,180	Pred	9,180	Frac Prot	0,602	Transitions	24702
AS4 122	Offset	- inf	Pred	- inf	Frac Prot	0,000	Transitions	0
LYS 149	Offset	0,539	Pred	9,539	Frac Prot	0,776	Transitions	40310
HIP 158	Offset	-1,697	Pred	7,303	Frac Prot	0,020	Transitions	7449
GL4 176	Offset	-2,753	Pred	6,247	Frac Prot	0,002	Transitions	94
AS4 178	Offset	-4,921	Pred	4,079	Frac Prot	0,000	Transitions	2
TYR 191	Offset	3,308	Pred	12,308	Frac Prot	1,000	Transitions	234
AS4 192	Offset	- inf	Pred	- inf	Frac Prot	0,000	Transitions	0
LYS 199	Offset	1,352	Pred	10,352	Frac Prot	0,957	Transitions	8244
GL4 203	Offset	2,514	Pred	6,486	Frac Prot	0,003	Transitions	68
HIP 209	Offset	-2,494	Pred	6,5066	Frac Prot	0,176	Transitions	782
LYS 224	Offset	-0,671	Pred	8,329	Frac Prot	0,873	Transitions	20371
LYS 225	Offset	0,836	Pred	9,836	Frac Prot	0,748	Transitions	3101
LYS 231	Offset	0,473	Pred	9,473	Frac Prot	0,004	Transitions	10728
AS4 235	Offset	-2,407	Pred	6,593	Frac Prot	0,000	Transitions	14
AS4 237	Offset	- inf	Pred	- inf	Frac Prot	0,000	Transitions	0
TYR 240	Offset	2,403	Pred	11,403	Frac Prot	0,996	Transitions	820
GL4 246	Offset	-3,807	Pred	5,193	Frac Prot	0,000	Transitions	20
HIP 252	Offset	-2,689	Pred	6,311	Frac Prot	0,002	Transitions	725
AS4 255	Offset	-4,921	Pred	4,079	Frac Prot	0,000	Transitions	2
GL4 264	Offset	-5,553	Pred	4,447	Frac Prot	0,000	Transitions	8

# Capítulo 5

## Conclusões

Com base nas tabelas 1;2;3;4, correspondente a PETase Nativa, com o aumento da temperatura para 326K houve grande queda da estabilidade térmica da enzima, já que com o aumento da média total de protonação e também os estados acessíveis pelas cadeias doadoras de prótons, o caráter hidrofóbico da enzima aumentou, com isso diminui as ligações de hidrogênio e as interações eletrostáticas[22].

Já com base nas tabelas 5;6;7;8, correspondente a PETase Mutante (S121D;D186H;R280A) o aumento da temperatura de 300K para 326K mostrou-se pouco significativo. Isso pode ter ocorrido principalmente com as duas últimas mutações, já que foi substituído aminoácidos com pH mais ácido por aminoácidos com pH básico e um aminoácido básico por um não polar e hidrofóbico, aumentando como um todo a hidrofobicidade da estrutura quaternária da enzima[23].

# Referências Bibliográficas

- [1] UNEP (2018). SINGLE-USE PLASTICS:A Roadmap for Sustainability (Rev. ed., pp. vi; 6).
- [2] Beveridge & Diamond, P.C. (2009). Rio de Janeiro Imposes Retailer Responsibility for Plastic Shopping Bags, Latin American Region Environmental Quarterly.
- [3] Müller, Rolf-Joachim, et al. "Enzymatic degradation of poly (ethylene terephthalate): rapid hydrolyse using a hydrolase from *T. fusca*." *Macromolecular rapid communications* 26.17 (2005): 1400-1405.
- [4] Taniguchi, Ikuo, et al. "Biodegradation of PET: current status and application aspects." *ACS Catalysis* 9.5 (2019): 4089-4105.
- [5] G. J. Palm, L. Reisky, D. Boettcher, H. Mueller, E. A. P. Michels, M. C. Walczak, L. Berndt, M. S. Weiss, U. T. Bornscheuer, G. Weber, *Nat. Comm.* 2019, 10, DOI: 10.1038/s41467-019-09326-3.
- [6] F. Kawai, M. Oda, T. Tamashiro, T. Waku, N. Tanaka, M. Yamamoto, H. Mizushima, T. Miyakawa, M. Tanokura, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 98, 10053.
- [7] Son, Hyeoncheol Francis, et al. "Rational protein engineering of thermo-stable PETase from *Ideonella sakaiensis* for highly efficient PET degradation." *ACS Catalysis* 9.4 (2019): 3519-3526.
- [8] Lehninger, Albert L., David L. Nelson, and Michael M. Cox. *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan, 2005.
- [9] Chen, Chun-Chi, et al. "Structural studies reveal the molecular mechanism of PETase." *The FEBS Journal* 285.20 (2018): 3717-3723.
- [10] Han X, Liu W, Huang JW, Ma J, Zheng Y, Ko TP, Xu L, Cheng YS, Chen CC & Guo RT (2017) Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase. *Nat Commun* 8, 2106.
- [11] Austin HP, Allen MD, Donohoe BS, Rorrer NA, Kearns FL, Silveira RL, Pollard BC,

Dominick G, Duman R, El Omari K et al. (2018) Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyestherase. *Proc Natl Acad Sci USA* 115, E4350– E4357.

[12] Cramer, C.J., *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models*, 2 ed., John Wiley & Sons, New York, 2002.

[13] D.A. Case, K. Belfon, I.Y. Ben-Shalom, S.R. Brozell, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, V.W.D. Cruzeiro, T.A. Darden, R.E. Duke, G. Giambasu, M.K. Gilson, H. Gohlke, A.W. Goetz, R. Harris, S. Izadi, S.A. Izmailov, K. Kasavajhala, A. Kovalenko, R. Krasny, T. Kurtzman, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, V. Man, K.M. Merz, Y. Miao, O. Mikhailovskii, G. Monard, H. Nguyen, A. Onufriev, F. Pan, S. Pantano, R. Qi, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, S. Schott-Verdugo, J. Shen, C.L. Simmerling, N.R. Skrynnikov, J. Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, L. Wilson, R.M. Wolf, X. Wu, Y. Xiong, Y. Xue, D.M. York and P.A. Kollman (2020), *AMBER 2020*, University of California, San Francisco.

[14] Frenkel, Daan, and Berend Smit. *Understanding molecular simulation: from algorithms to applications*. Vol. 1. Elsevier, 2001.

[15] Y. Shi, Z. Xia, J. Zhang, R. Best, C. Wu, J. W. Ponder, and P. Ren, “Polarizable atomic multipole-based AMOEBA force field for proteins,” *J. Chem. Theory Comput.* 9, 4046–4063 (2013).

[16] He, Xibing, et al. “Fast, Accurate, and Reliable Protocols for Routine Calculations of Protein–Ligand Binding Affinities in Drug Design Projects Using AMBER GPU-TI with ff14SB/GAFF.” *ACS omega* 5.9 (2020): 4611-4619.

[17] W. L. Jorgensen; J. Chandrasekhar; J. Madura; M. L. Klein. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.*, 1983, 79, 926–935.

[18] J. M. Swails; D. M. York; A. E. Roitberg. Constant pH replica exchange molecular dynamics in explicit solvent using discrete protonation states: implementation, testing, and validation. *J. Chem. Theory Comput.*, 2014, 10, 1341–1352.

[19] Box, Vernon GS. “The molecular mechanics of quantized valence bonds.” *Molecular modeling annual* 3.3 (1997): 124-141.

[20] Van Ravenzwaaij, Don, Pete Cassey, and Scott D. Brown. “A simple introduction to Markov Chain Monte–Carlo sampling.” *Psychonomic bulletin & review* 25.1 (2018): 143-154.

[21] Catlow, C. R. A., A. N. Cormack, and F. Theobald. “Structure prediction of transition-metal oxides using energy-minimization techniques.” *Acta Crystallographica Section B: Structural Science* 40.3 (1984): 195-200.

[22] Watanabe, Masahiro, Harumi Fukada, and Kazuhiko Ishikawa. "Construction of thermophilic xylanase and its structural analysis." *Biochemistry* 55.31 (2016): 4399-4409.

[23] Georis, Jacques, et al. "An additional aromatic interaction improves the thermostability and thermophilicity of a mesophilic family 11 xylanase: structural basis and molecular study." *Protein science* 9.3 (2000): 466-475.