

# Caracterização Computacional de Flutuações Dinâmicas em Sistemas Moleculares Utilizando a Análise de Padrões Gradientes

Márcia R. Campos<sup>1</sup>  
marcia@lac.inpe.br

Reinaldo R. Rosa<sup>1</sup>  
reinaldo@lac.inpe.br

Fernando M. Ramos<sup>1</sup>  
fernando@lac.inpe.br

Alan Wilter<sup>1</sup>  
alan@lac.inpe.br

Nandamudi L. Vijaykumar<sup>1</sup>  
vijay@lac.inpe.br

Susumu Fujiwara<sup>2</sup>  
fujiwara@ipc.kit.ac.jp

<sup>1</sup> Núcleo para Simulação e Análise de Sistemas Complexos  
Laboratório Associado de Computação e Matemática Aplicada (LAC)  
Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE)  
São José dos Campos, SP

<sup>2</sup> Department of Polymer Science and Engineering  
Faculty of Textile Science, Kyoto  
Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku  
Kyoto 606-8585, Japan

## Abstract

*The Gradient Pattern Analysis (GPA) methodology was applied for the first time in molecular systems (using the Fujiwara-Sato model) in order to characterize small symmetry breaking and phase disorder imposed by thermal fluctuations.*

*In this work we characterize, by means of GPA, the spatio-temporal relaxation of a system composed by short molecular chains, as well as, the influence of the thermal bath in this regime. We also make a discussion about GPA sensibility in describing a gravitational potential influence on biomolecular systems, which is important due to the possibility of performing molecular experiments under dynamic microgravity condition.*

## Resumo

*A Análise de Padrões Gradientes (Gradient Pattern Analysis - GPA) foi aplicada pela primeira vez em sistemas moleculares (usando o modelo de Fujiwara-Sato) com o objetivo de caracterizar pequenas quebras de simetria e desordem de fase impostas por flutuações térmicas.*

*Nesse trabalho caracterizamos, por meio da GPA, a relaxação espaço-temporal de um sistema de pequenas cadeias moleculares, assim como, a influência da tempe-*

*ratura do banho nesse regime. Também fazemos uma discussão da sensibilidade da GPA em caracterizar a influência de um potencial gravitacional em sistemas biomoleculares, o que é importante devido à possibilidade de se realizar experimentos moleculares em condições de microgravidade dinâmica.*

## 1. Introdução

Muitos sistemas macroscópicos podem ser levados para fora do equilíbrio pela imposição de um gradiente espaço-temporal (temperatura, velocidade etc.). A formação de padrões de estruturas complexas em condições fora do equilíbrio tem sido o objeto de numerosos estudos experimentais e teóricos [12]. Assim, a caracterização quantitativa de padrões espaço-temporais é essencial para o entendimento desses fenômenos.

A técnica conhecida como GPA [6-9] foi desenvolvida no INPE, com o objetivo de caracterizar regimes complexos no domínio espaço-temporal e tem aplicabilidade na caracterização desses padrões em plasmas, mapeamentos de grade acoplada, processos moleculares, fluidos reativos-difusivos, materiais semi-condutores, diagnóstico médico por imagens, bem como em outras áreas relacionadas com sistemas de informação e tomada de decisões. Essa técnica é capaz de caracterizar a formação

e evolução de padrões através das correlações espaço-temporais entre as amplitudes das flutuações em pequenas e largas escalas (gradientes de flutuação da energia). Seu desempenho é discutido para caracterizar a emergência de padrões ordenados a partir de padrões iniciais totalmente desordenados: um regime macroscópico usualmente chamado de Relaxação Espaço-Temporal.

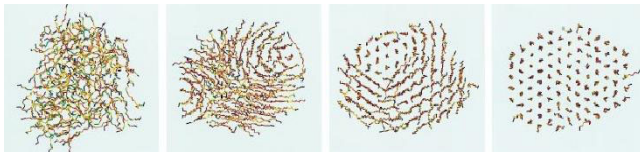
Nesse trabalho analisamos a Relaxação Espaço-Temporal em sistemas biomoleculares (modelo de Fujiwara-Sato), além de discutirmos a adição de um potencial devido a condições de microgravidade (Protease do HIV). Assim, nas seções 2 e 3 são apresentados os modelos de dados utilizados nas análises, o Modelo de Fujiwara-Sato e a Protease do HIV, respectivamente. A seção 4 apresenta a técnica empregada na análise. Finalmente, na seção 5 são apresentados resultados preliminares e conclusões.

## 2. O Modelo de Fujiwara-Sato

O modelo de Fujiwara-Sato consiste de uma seqüência de 100 cadeias de 20 elementos  $\text{CH}_2$  cada uma, cujos elementos interagem entre si por meio de potenciais ligados. Já as cadeias interagem entre si por meio de potenciais não-ligados. Os potenciais ligados são os potenciais de estiramento, dobramento e de torção. Os potenciais não-ligados são devidos à força molecular de *Van der Waals* modelada pelo potencial de *Lennard-Jones*. O sistema interage, principalmente devido ao potencial de *Lennard-Jones* e às flutuações térmicas decorrentes do acoplamento de temperatura a que as moléculas estão submetidas (400K e 440K). Mais detalhes sobre o sistema são dados por Fujiwara *et al* [2, 3, 5].

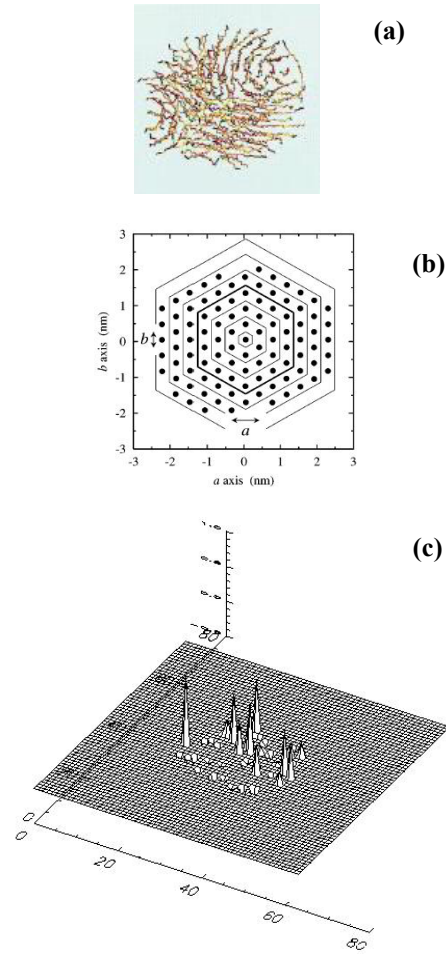
Baseado na interação do sistema, o tempo médio de oscilação, isto é, a flutuação local do sistema imposta pelo potencial total, é dado por  $\tau_{i,j} = 2\pi [(I / k_{i,j})^{1/2} + \Delta_{i,j}]$ , com  $\Delta_{i,j} = R \cdot k_{i,j}$ , em que  $I$  é o momento de inércia do sistema,  $k_{i,j}$  são os termos do potencial de *Lennard-Jones* e  $\Delta_{i,j}$  é um termo local relacionado às flutuações da rigidez ( $R$ ) das cadeias.

A Figura 1 mostra um exemplo da evolução temporal do sistema, para uma temperatura  $T = 400$  K. É possível observar que, no início, a configuração espaço-temporal é desordenada e, com a evolução do sistema, estruturas ordenadas são observadas em várias posições, tendendo a padrões bem ordenados no final.



**Figura 1: Configuração espaço-temporal, visualizada de cima da estrutura, de 100 pequenas cadeias para  $T=400\text{K}$  em vários instantes de tempo ( $t = 1, 200, 300$  e  $2000$  ps).**

Esse regime de relaxação espaço-temporal em três dimensões pode ser bem caracterizado em duas dimensões através da extração de seções transversais centrais do sistema, em intervalos de tempo igualmente espaçados, o que pode ser visualizado pela Figura 2.



**Figura 2: (a) Interações 3D das cadeias de  $\text{CH}_2$ , (b) Uma seção transversal - 2D - do modelo, (c) Campo de flutuações da rigidez das cadeias (valores de  $\Delta_{i,j}$  em  $z$ )**

## 3. A Protease do HIV

Considerando o potencial gravitacional, estamos analisando simulações de Dinâmica Molecular (MD – *Molecular Dynamics*). O novo biosistema em investigação é a protease do HIV tipo 1 complexada com o inibidor Saquinavir (código PDB 1HXB [4]), um homodímero com 99 resíduos de aminoácidos, crucial para o ciclo de vida do HIV (<http://www.hopkins-aids.edu/hivlifecycle/HIVCycle.swf>). Estão sendo utilizados dois casos simulados usando íons com cargas opostas para neutralizar a carga total, com aplicação de PME [1] para tratar as interações eletrostáticas de longa distância. Os dois casos são idênticos, exceto pelo fato de o segundo ter um potencial simulando a atração gravitacional da Terra.

Assim, a aceleração de  $10 \text{ m/s}^2$  ( $10^{-2} \text{ nm/ps}^2$ ) foi aplicada em um dos eixos coordenados ( $y$ ). Esses sistemas são compostos de aproximadamente 40 mil átomos: protease complexada com Saquinavir e moléculas de água (solvente) e, ainda, com ions ( $\text{Cl}^-$ ), em uma caixa com condições de contorno periódicas. O campo de força empregado é o do GROMOS96 [11] e a dinâmica foi executada com o programa de MD GROMACS [10], de cujos resultados são extraídos os dados para análise com a GPA.

Usualmente a MD não considera a força gravitacional, uma vez que o tempo envolvido nessas simulações é da ordem de nanossegundos, ou seja, muito pequeno para detectar qualquer efeito em um sistema molecular. No entanto, como existem muitas questões sobre o fato de como a gravidade pode interferir em sistemas biológicos, de moléculas a células e até mesmo no ser humano – <http://fundamentalbiology.arc.nasa.gov/PO/PObody.html>, é importante investigar, utilizando uma análise de alta sensibilidade como a GPA, a ação da gravidade em um biosistema.

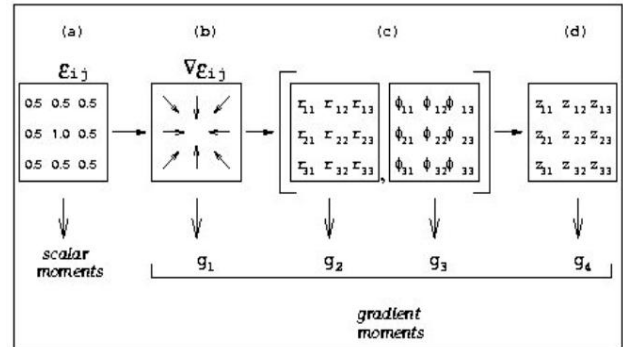
#### 4. Metodologia: Análise de Padrões Gradientes (GPA)

Um padrão espacialmente gerado em duas dimensões ( $x, y$ ) é representado pela matriz das amplitudes  $M = \mathcal{L}^{\mathcal{L} \times \mathcal{L}} \{M(I, I), \dots, M(i, j), \dots, M(\ell, \ell) \mid i, j \in I \text{ e } M \in \mathcal{R}^I\}$ , essencialmente uma grade quadrada,  $\mathcal{L}$ , se as duas dimensões espaciais,  $x$  e  $y$ , estão discretizadas em  $\ell \times \ell$  pixels, com  $i = I, \dots, \ell$  e  $j = I, \dots, \ell$ . Assim, uma sucessão dinâmica de  $N$  grades,  $\mathcal{L}_0, \mathcal{L}_1, \dots, \mathcal{L}_N$ , está relacionada à visualização da evolução temporal de um envelope de amplitude  $M_{x,y,t} \equiv E(x, y, t)$ .

Usualmente, cada intensidade da amplitude  $E(i, j)$ , representa uma medida local de energia espacialmente distribuída (são exemplos a velocidade relativa, a taxa de concentração, etc.). A flutuação espacial do padrão global  $E(x, y)$ , para um dado instante  $t$ , pode ser caracterizado através do campo vetorial gradiente  $G_t = \nabla[E(x, y)]_t$ . A flutuação espacial local, entre um par instantâneo de intensidades, pertencentes ao padrão global, é caracterizada por seu vetor gradiente, definido entre cada par de pontos da grade bi-dimensional. Nesta representação, os valores relativos entre as amplitudes (que determinam a norma e a orientação de cada vetor) são dinamicamente mais relevantes do que os seus valores absolutos.

Dentro do formalismo GPA, um campo vetorial gradiente  $G_t = \nabla[E(x, y)]_t$ , composto por  $V$  vetores  $\mathbf{r}$ , onde cada vetor  $\mathbf{r}_{i,j}$ , localizado na posição  $(i, j)$  do campo gradiente, é caracterizado por sua norma e fase ( $\mathbf{r}_{i,j} = (r, \phi)$ ). Então, um dado campo escalar de valores absolutos pode ser representado por um campo gradiente das flutuações das amplitudes locais e, esse campo gradiente, pode ser representado por um par de matrizes, uma das

normas e a outra das fases. Uma representação subseqüente é dada por uma matriz complexa, onde cada elemento é um número complexo  $z_{i,j}$ , representando cada vetor do padrão gradiente. Assim, um dado campo escalar matricial pode ser representado como a composição de quatro momentos gradientes:  $g_1$ , representação global da distribuição vetorial;  $g_2$ , representação global das normas;  $g_3$ , representação global das fases e  $g_4$ , representação complexa global do padrão gradiente (Figura 3).



**Figura 3: Representação esquemática da Análise de Padrões Gradientes de um campo escalar matricial: (a) um campo escalar arbitrário normalizado; (b) o correspondente padrão gradiente de amplitude das flutuações; (c) a norma e a fase das flutuações; (d) representação complexa das flutuações.**

Para a extração desses momentos são utilizados operadores computacionais. Assim, o operador AAF (*Asymmetric Amplitude Fragmentation*) [7-9] baseado nas assimetrias dos vetores do campo gradiente é utilizado para calcular o valor do momento  $g_1$ . O momento  $g_4$  ( $|g_4|$  e  $\phi g_4$ ), é calculado pelo operador computacional CEF (*Complex Entropic Form*) [6] e os momentos  $g_2$  e  $g_3$  ainda não possuem um operador formal para seu cálculo na literatura. Dessa forma, estamos interessados, nesse trabalho, nos momentos gradientes  $g_1$  e  $g_4$  ( $|g_4|$  e  $\phi g_4$ ).

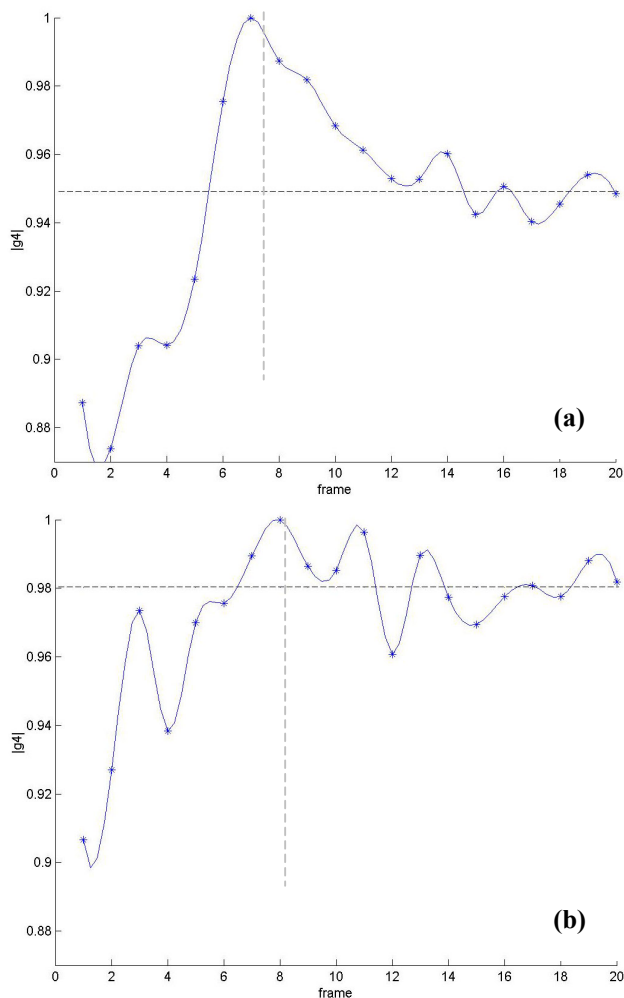
Análises de padrões espaço-temporais, gerados por equações de amplitude, mostraram propriedades importantes desses três momentos gradientes, especialmente sua sensibilidade ao regime de relaxação espaço-temporal e a caracterização do padrão de dinâmica de equilíbrio no plano  $g_1 \times \phi g_4$ . Aplicações da técnica em mapas acoplados caóticos [6] e em soluções da equação de Swift-Hohenberg [8] mostraram que: (i) a medida  $|g_4|$  é bastante sensível ao processo de relaxação espaço-temporal preservando a informação de não-linearidade das flutuações de amplitude e (ii) a medida  $\phi g_4$  caracteriza, por meio da desordem de fase, a transição da dinâmica de amplitudes para a de fases. Vários cálculos de padrões randômicos têm mostrado que o momento gradiente  $g_1$  é mais sensível e preciso na caracterização de estruturas assimétricas que medidas de correlação [9].

Os sistemas abordados aqui, via MD, são do perfil descrito no parágrafo anterior e diversas são as variáveis

que podem ser analisadas. A GPA é aplicada nos resultados do modelo Fujiwara-Sato pegando-se a matriz de flutuação da rigidez das cadeias, ao longo do tempo, previamente calculadas pelos colaboradores japoneses. Na MD da protease do HIV, aplica-se a GPA na matriz de forças de interação para observação da evolução temporal dos gradientes derivados destas forças.

## 5. Resultados Preliminares e Conclusões

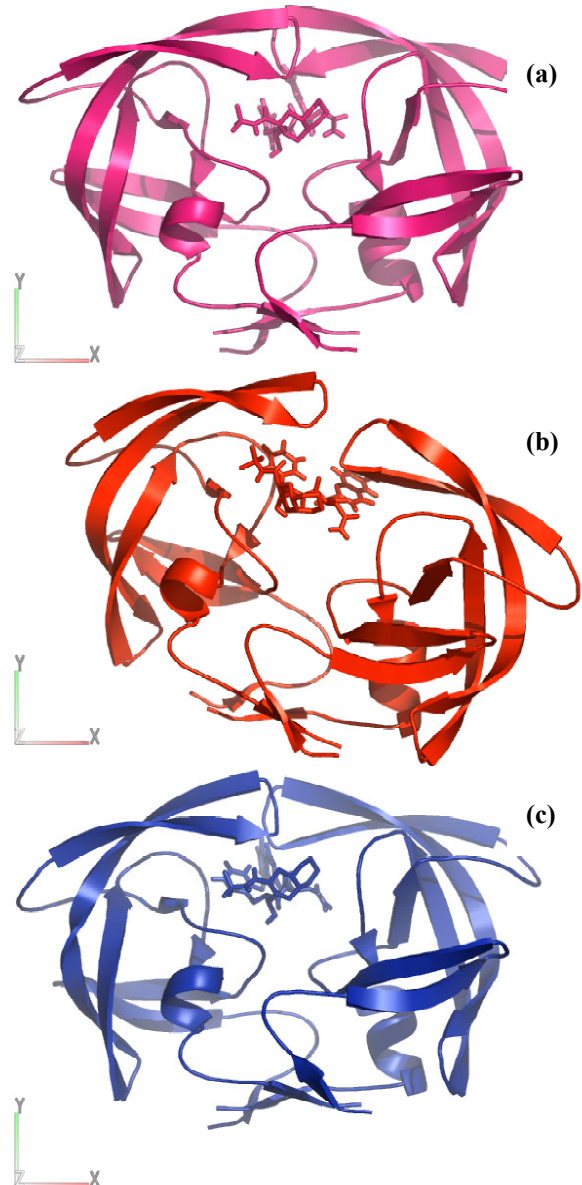
Alguns resultados preliminares do modelo de Fujiwara-Sato são mostrados na Figura 4. Estes resultados mostram a Análise de Padrões Gradientes de duas simulações que diferem pela temperatura inicial (400K e 440K, o que corresponde a uma variação de 10%).



**Figure 4: Comportamento dinâmico dos momentos gradientes dos dados do modelo de Fujiwara-Sato com (a)  $T=400K$  e (b)  $T=440K$ . (a) e (b) mostram a evolução temporal  $|g_i|$ , destacando a transição do regime de dinâmica de amplitude para um regime de relaxação espaço-temporal.**

Nas Figuras 4a e 4b é possível observar que, depois de um período de acomodação randômica, os sistemas caminham para a relaxação e fica evidente que o padrão de relaxação espaço-temporal é menos robusto para  $T = 440K$ . A variabilidade temporal do processo de relaxação (uma assinatura das flutuações térmicas do sistema) é mais não-linear e isto pode afetar a estabilidade do processo durante o intervalo final relaxado (“ordenado”) da evolução do sistema.

As simulações de MD da protease do HIV complexada com o fármaco Saquinavir estão mostradas nas Figuras 5a, 5b e 5c.



**Figura 5: Evolução da simulação mostrando a conformação para o estado inicial (a) comum aos dois casos, (b) quadro final da simulação sem gravidade e (c) quadro final da simulação com gravidade, ambas no instante igual a 1100 ps.**

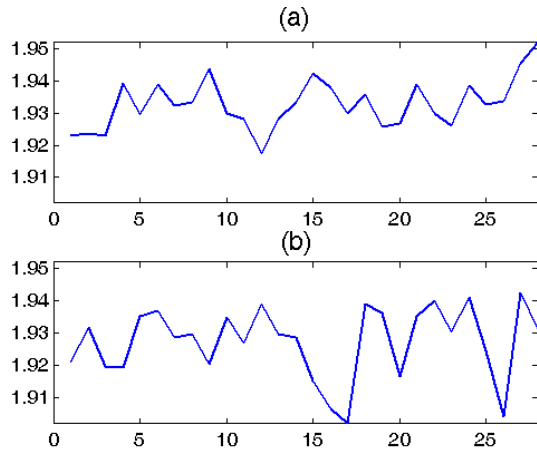


Figura 6: Comparação da evolução temporal do momento gradiente  $|g_1|$  para dinâmicas (a) sem e (b) com o potencial gravitacional.

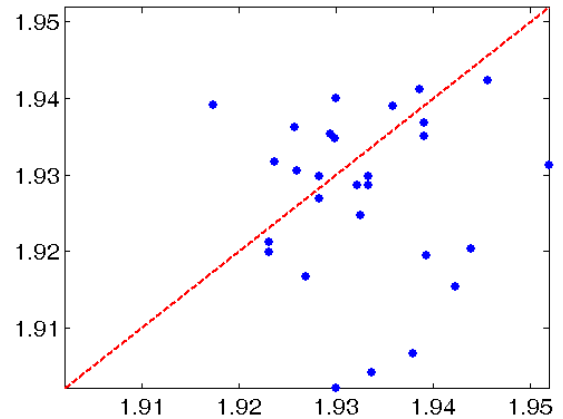


Figura 7: Momento gradiente  $|g_1|$  para dinâmicas sem potencial gravitacional X momento gradiente  $|g_1|$  para dinâmicas com o potencial gravitacional.

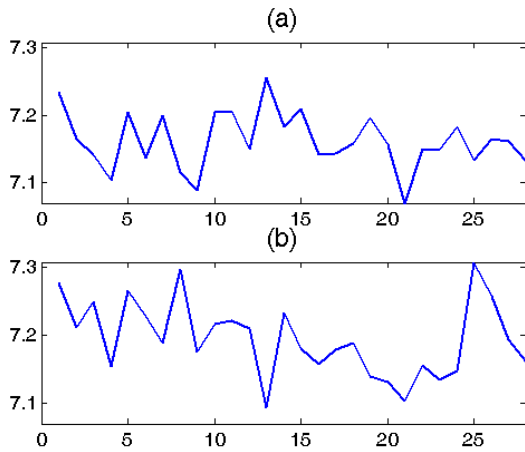


Figura 8: Comparação da evolução temporal do momento gradiente  $|g_4|$  para dinâmicas (a) sem e (b) com o potencial gravitacional.

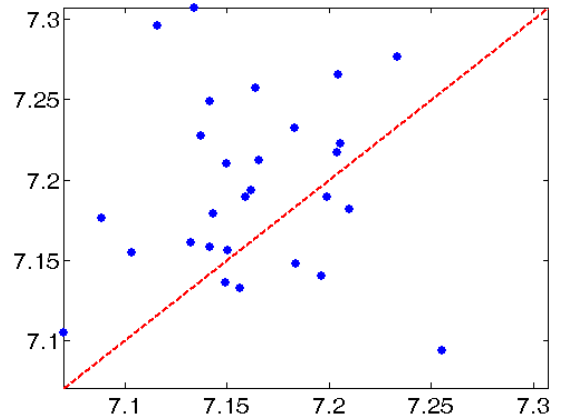


Figura 9: Momento gradiente  $|g_4|$  para dinâmicas sem potencial gravitacional X momento gradiente  $|g_4|$  para dinâmicas com o potencial gravitacional.

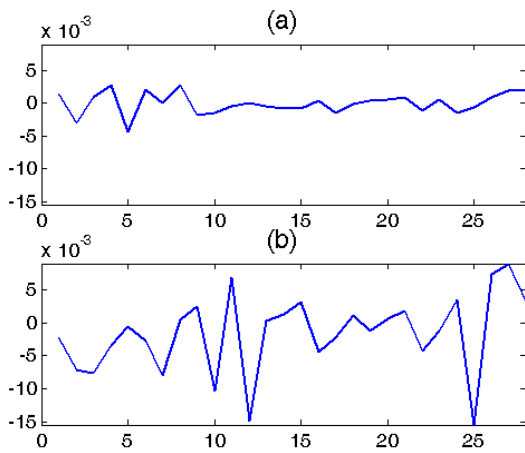


Figura 10: Comparação da evolução temporal do momento gradiente  $\phi_{g_4}$  para dinâmicas (a) sem e (b) com o potencial gravitacional.

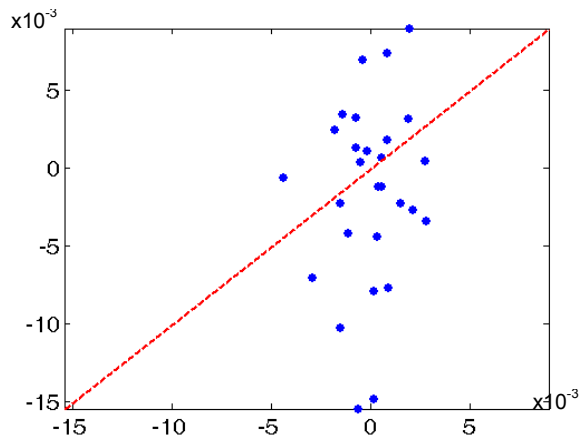


Figura 11: Momento gradiente  $\phi_{g_4}$  para dinâmicas sem potencial gravitacional X momento gradiente  $\phi_{g_4}$  para dinâmicas com o potencial gravitacional.

Foram analisados os padrões de gradiente das forças de interação do ligante Saquinavir com a Protease. Nas Figuras 6 a 11 pode-se ver alguns resultados obtidos das análises destes dados buscando-se verificar a sensibilidade da técnica GPA em detectar a influência do potencial gravitacional. Pode-se observar que há uma perturbação provocada pelo campo gravitacional ao se verificar que os sistemas, partindo das mesmas condições iniciais, têm evoluções espaciais diferentes ao longo do tempo (Figura 5). Porém, cabe perguntar: é essa influência significativa para propósitos teóricos e experimentais?

A partir de uma análise qualitativa das variabilidades (Figuras 6, 8 e 10) e das dispersões (Figuras 7, 9 e 11), nas simulações com gravidade, parece haver maiores flutuações nos momentos gradientes e uma maior entropia no sistema perturbado pela gravidade. Porém mais simulações estão sendo feitas partindo-se de condições iniciais diferentes, uma vez que a MD é caótica, e serão analisadas para que se possa formalizar esta caracterização da influência do potencial gravitacional em dinâmica molecular.

Entretanto, a interpretação do significado fenômeno-lógico das diferentes flutuações detectadas nas simulações com e sem gravidade deverá ser discutida de forma criteriosa tanto no contexto da biologia molecular experimental como no da biologia molecular teórica.

A GPA também está sendo empregada para analisar a flutuação dinâmica do sistema protease/ligante ao se observar a série temporal do desvio padrão estrutural das moléculas, porém estes resultados ainda não foram concluídos.

A aplicação da GPA em dados de MD é nova e, ainda que incipiente, procura identificar um possível padrão característico de sistemas sob influência ou não da gravidade. Uma outra perspectiva é o estudo da GPA na análise de sistemas envolvendo proteases mutantes resistentes a fármacos inibidores (simulações em curso), como observado a partir de cálculos de energia livre Gibbs de ligação [13], em que uma dada protease mutante apresentou menor afinidade pelo Saquinavir do que a protease aqui utilizada.

Assim, acreditando-se que há uma relação direta entre a energia de ligação do sistema ligante/protease e suas forças de interação intermolecular vislumbra-se a possibilidade de a GPA constituir uma nova forma de análise para este tipo de sistemas, investigando a formação de complexos entre fármacos e seus alvos moleculares.

## Referências

- [1] Essman, U.; Perela, L.; Berkowitz, M.L.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L.G., "A Smooth Particle Mesh Ewald Metho", *Journal of Chemical Physics*, 7:654-663, 1995.
- [2] Fujiwara, S.; Sato, T., "Molecular Dynamics Simulation of Structural Formation of Short Polymer Chains", *Physical Review Letters*, 80:991-994, 1998.
- [3] Fujiwara, S.; Sato, T., *Molecular Simulation*, 21, 1999.
- [4] Krohn, A.; Redshaw, S.; Ritchie, J.C.; Graves, B.J.; Hatada, M.H., "Novel Binding Bode of Highly Potent HIV-Proteinase Inhibitors Incorporating the (R)-hydroxyethylamine Isostere", *Journal of Medicinal Chemistry*, 11:3340-3342, 1991.
- [5] Nakamura, H.; Fujiwara, S.; Sato, T., "Rigidity of Orientationally Ordered Domains of Short Chain Molecules", *J. Physical Society of Japan*, 70:943-946, 2000.
- [6] Ramos, F.M.; Rosa, R.R.; Neto, C.R.; Zanandrea, A., "Generalized Complex Entropic Form for Gradient Pattern Analysis of Spatio-temporal Dynamics", *Physica A*, 283:171-174, 2000.
- [7] Rosa, R.R.; Campos, M.R.; Ramos, F.M.; Vijaykumar, N.L.; Fujiwara, S.; Sato, T., "Gradient Pattern Analysis of Structural Dynamics: Application to Molecular System Relaxation", *Brazilian Journal of Physics*, 33:605:610, 2003.
- [8] Rosa, R.R.; Pontes, J.; Christov, C.I.; Ramos, F.M.; Neto, C.R.; Rempel, E.L.; Walgraef, D., "Gradient Pattern Analysis of Swift-Hohenberg Dynamics: Phase Disorder Characterization", *Physica A*, 283:156-159, 2000.
- [9] Rosa, R.R.; Sharma, A.S.; Valdivia, J.A., "Characterization of Asymmetric Fragmentation Patterns in Spatially Extended Systems", *Int. Journal of Modern Physics C*, 10:147-163, 1999.
- [10] van der Spoel, D.; van Buuren, A.R.; Apol, E.; Meulen-ho, P.J.; Tieleman, D.P.; Sij-bers, A.L.T.M.; Hess, B.; Feenstra, K.A.; Lindahl, E.; van Drunen, R.; Berendsen, H.J.C., "Gromacs User Manual version 3.1", *Nij-enborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands*. Disponível em: <http://www.gromacs.org>, 2001.
- [11] van Gunsteren, W.F.; Billeter, S.R.; Eising, A.A.; Hunenberger, P.H.; Kruger, P.; Mark, A.E.; Scott, W. R.P.; Tironi, I.G., "Biomolecular Simulation: The GROMOS96 manual and user guide", *Hochschuleverlag AG an der ETH Zurich, Zurich, Switzerland*, 1996.
- [12] Walgraef, D., "Spatio-Temporal Pattern Formation", *Springer-Verlag, N.Y.*, 1997.
- [13] Wilter, A. *Estudo por Modelagem e Dinâmica Molecular da Protease de Variantes do VIH-1 Resistentes a Drogas Antivirais*. Tese D.Sc. IBCCF/UF RJ, Rio de Janeiro, 2003.