



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

Ana Paula Ribeiro Povinelli

Abordagem físico-química da interação da piperlongumina com alvos
farmacológicos

São José do Rio Preto

2022

Ana Paula Ribeiro Povinelli

Abordagem físico-química da interação da piperlongumina com alvos
farmacológicos

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. Marinônio Lopes Cornélio

São José do Rio Preto

2022

P879a

Povinelli, Ana Paula Ribeiro

Abordagem físico-química da interação da piperlongumina com alvos farmacológicos / Ana Paula Ribeiro Povinelli. -- São José do Rio Preto, 2022

93 f. : il., tabs.

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

Orientador: Marinônio Lopes Cornélio

1. Piperlongumina. 2. RSA. 3. HSP70. 4. Espectroscopia de Fluorescência. 5. Dinâmica Molecular. 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.

Ana Paula Ribeiro Povinelli

Abordagem físico-química da interação da piperlongumina com alvos farmacológicos

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. Marinônio Lopes Cornélio

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Amando Siuiti Ito
Universidade Federal do ABC – Câmpus de Santo André

Prof.Dr. Antonio José da Costa Filho
USP – Câmpus de Ribeirão Preto

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

Prof.Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

28 de Janeiro de 2022

Agradecimentos

Agradeço ao prof. Marinônio pela orientação deste trabalho e pelos ensinamentos transmitidos ao longo destes anos de convívio. Ao prof. Alan Jones por ter me recebido em seu laboratório e pela orientação durante o período de doutorado sanduíche.

A parte experimental deste trabalho foi possível graças à realização dos experimentos de fluorescência estacionária, dicroísmo circular e fluorescência resolvida no tempo. Por isso, deixo meus agradecimentos aos professores Marcio Colombo, Marcelo de Freitas Lima, João Ruggiero Neto e Valdecir Farias Ximenes pelo uso dos equipamentos necessários para a realização dos experimentos. Ao prof. Valdecir eu agradeço também pelos ensinamentos e conversas que me ajudaram a organizar as ideias no que diz respeito ao fenômeno de fluorescência e ao sistema proteína-ligante.

As simulações computacionais deste trabalho foram possíveis graças aos recursos computacionais disponibilizados pelo Núcleo de Computação Científica (NCC/GridUNESP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Agradeço ao corpo docente do departamento de Física do IBILCE por todos os ensinamentos transmitidos durante os 10 anos de convívio que tivemos. Também gostaria de deixar meus agradecimentos aos técnicos Bruno, Barbosa e Fábio que estiveram presente diariamente me ajudando no que fosse necessário para a condução deste trabalho.

Agradeço ao meu companheiro Gabriel Zazeri por ter estado ao meu lado durante todo este tempo, por não me deixar desanimar mesmo quando eu não tinha mais vontade de continuar. Agradeço por toda ajuda na realização deste trabalho, pelas discussões e pelas discordâncias que me ajudaram a evoluir.

À minha família, eu agradeço por todo o apoio que recebi desde os meus primeiros passos. Não posso deixar de citar minha mãe Solange, minha avó Ruth, meu avô Aderson, meus tios Sandra, Aderson e Josiara que me apoiaram e me ajudaram a chegar até aqui. Também agradeço a Márcia por todo apoio e incentivo durante esta trajetória.

E por fim agradeço ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Resumo

A busca por metabólitos com potencial farmacológico oriundos de plantas e de micro-organismos sempre foi uma área bastante explorada pela comunidade científica. Foi reportado que a piperlongumina (PPL), molécula extraída de espécies de pimenta, apresenta ação anti-inflamatória e por isso, o objetivo deste trabalho foi a descrição da interação da PPL com alguns alvos farmacológicos envolvidos no processo de transporte e de inflamação. A primeira etapa deste trabalho foi dedicada ao estudo da interação da PPL com a albumina de camundongo (RSA), pois entender a interação de pequenas moléculas com esta proteína contribui para compreensão da distribuição dos fármacos no organismo. Os resultados de supressão de fluorescência mostraram que a PPL se liga na RSA espontaneamente e que o processo é entropicamente dirigido. Também foi mostrado que a PPL acessa dois sítios cooperativos da RSA com constantes de ligação de $(2.3 \pm 0.1) \cdot 10^5$ e $(1.3 \pm 0.1) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Com as ferramentas de docagem e dinâmica molecular verificou-se os sítios de interação como sendo ricos em resíduos apolares. Além disso, com a análise dos dados de supressão de fluorescência do sistema RSA-PPL, nós mostramos a necessidade da correção do efeito de filtro interno antes de associar os desvios no máximo de intensidade de fluorescência à mudanças de polaridade no ambiente da sonda fluorescente. Também mostramos a possibilidade de utilizar as áreas do espectro de emissão do Trp, em vez de um único comprimento de onda. A segunda etapa deste trabalho foi dedicada ao estudo da interação da PPL com o domínio NBD da HSP70. A análise dos dados de supressão de fluorescência mostrou o equilíbrio das componentes entrópicas e entálpica na interação da PPL com o NBD. Além disso, foi mostrado que a PPL acessa dois sítios do NBD com constantes de ligação equivalentes a $(6.3 \pm 0.2) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, de modo cooperativo. Os ambientes de interação foram descritos com o uso do docagem molecular. Com a dinâmica molecular associada ao método de MMPBSA (Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area), a energia livre de interação foi estimada como sendo (-58 ± 3) e $(-49 \pm 3) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ para os sítios 1 e 2. A terceira etapa deste trabalho foi dedicada à modificação de alguns grupos químicos da estrutura da PPL. As estruturas inspiradas na PPL foram submetidas aos cálculos de docagem molecular para a verificação na mudança de afinidade pela proteína NF- κ B.

Palavras-chave: Piperlongumina, RSA, HSP70, Espectroscopia de Fluorescência, Dicroísmo circular, Docking Molecular, Dinâmica Molecular, MMPBSA.

Abstract

The search for metabolites with pharmacological potential from plants and microorganisms has always been an area widely explored by the scientific community. It was reported that piperlongumine (PPL), a molecule extracted from pepper species, exhibits anti-inflammatory property and therefore the aim of this work, was the description of the interaction of PPL with some pharmacological targets involved in the transport and inflammation process. The first step of this work was dedicated to the study of the interaction of PPL with rat serum albumin (RSA), once understanding the interaction of small molecules with albumin contributes to the understanding of the distribution of the drug in the body. Fluorescence quenching results showed that PPL binds to RSA spontaneously and that the process is entropically driven. It was also shown that PPL accesses two cooperative sites in RSA structure with binding constants of $(2.3 \pm 0.1) \cdot 10^5$ e $(1.3 \pm 0.1) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. With the docking and dynamic analyses, the interaction sites were found to be rich in non-polar residues. Furthermore, by analyzing the fluorescence quenching data from the RSA-PPL system, we showed the importance of applying inner filter correction over the entire fluorescence spectrum prior to any conclusion regarding changes in the polarity of the fluorophore microenvironment. We also demonstrated the convergence of the results obtained from the treatment of fluorescence data using the area below the spectrum curve and the intensity in a single wavelength. The second stage of this work was dedicated to the study of the interaction of PPL with the NBD domain of HSP70. Analysis of the fluorescence quenching data showed the balance of entropic and enthalpic components in the interaction of PPL with NBD. Furthermore, it was shown that PPL has a cooperatively mode of binding, accessing two NBD sites with a binding constant of $(6.3 \pm 0.2) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. The interaction environments were described using molecular docking. With molecular dynamics associated with the MMPBSA method (molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area), the free energies of interaction were estimated to be (-58 ± 3) e $(-49 \pm 3) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ for sites 1 and 2. The third step of this work was dedicated to the modification of some chemical groups of the PPL structure. PPL inspired molecules were submitted to molecular docking calculations in order to verify the changes in affinity for NF-kB protein.

Keywords: Piperlongumine, RSA, HSP70, Fluorescence Spectroscopy, Circular Dichroism, Molecular Docking, Molecular Dynamics, MMPBSA.

Lista de Ilustrações

Figura 1: Estrutura química da PPL	13
Figura 2: Caminho pelo qual a HSP70 ativa a proteína NF- κ B.	15
Figura 3: Diagrama de Jablonski.....	19
Figura 4: Gráfico de BDF da proteína SSB em duas concentrações diferentes com oligonucleotídeos ligados.	27
Figura 5: Gráficos de Scatchard para sistemas (A) com cooperatividade negativa (B) com cooperatividade positiva.....	28
Figura 6: Modelo de cálculo para a energia livre de ligação ΔG	32
Figura 7: Forma geral dos campos de força utilizados na dinâmica molecular.	34
Figura 8: (a) Espectro de emissão de fluorescência antes da correção de filtro interno da RSA com incrementos de 2 μ M de PPL ($a^* \rightarrow q^*$: de 0 a 32 μ M), [RSA] = 4 μ M, T = 298 K e $\lambda_{exc} = 295$ nm. A linha tracejada marca a intensidade em 340 nm e a linha sólida marca os deslocamentos nos máximos da intensidade de cada espectro. O inset da figura mostra a estrutura da PPL. (b) Espectro de fluorescência sincronizada antes da correção de filtro interno da RSA com incrementos de 2 μ M de PPL ($a^* \rightarrow q^*$: de 0 a 32 μ M), [RSA] = 4 μ M, T = 298 K, $\lambda_{exc} = 240 - 350$ nm e $\Delta\lambda = 60$ nm. A linha tracejada marca a intensidade da emissão em $\lambda_{exc} = 283$ nm e a linha sólida marca o deslocamento no máximo de intensidade de cada espectro. (c) Espectro de emissão de fluorescência da RSA após a correção de filtro interno, onde a linha sólida marca o máximo das intensidades em 340 nm. (d) Espectro de fluorescência sincronizada após a correção de filtro interno, onde a linha sólida marca o máximo das intensidades de fluorescência em $\lambda_{exc} = 283$ nm.	41
Figura 9: Espectro de emissão de fluorescência da RSA (linha sólida) e espectro de absorção da PPL (linha tracejada). Ambos os espectros foram normalizados.....	42
Figura 10: Gráficos de Stern-Volmer nas temperaturas de 288, 298 e 308 K. (a) Razão das intensidades de fluorescência em 340 nm. (b) Razão das áreas abaixo dos espectros de fluorescência (de 305 a 400 nm). Na ordenada direita dos gráficos foi plotada a razão dos tempos de vida do Trp214.	43
Figura 11: Decaimento de fluorescência resolvida no tempo de (a) RSA e PPL nas estequiometrias de 1:0, 1:1, 1:3 e 1:8 (a \rightarrow d), com [RSA] = 4 μ M, T = 298 K e $\lambda_{exc} = 295$ nm. IRF indica a função resposta do instrumento e a linha sólida vermelha é ao ajuste biexponencial para cada decaimento. ..	44
Figura 12: Gráficos de duplo-logaritmo utilizando (a) As intensidades em 340 nm e (b) As áreas abaixo dos espectros (de 305 a 400 nm).....	45
Figura 13: Gráficos de Van't Hoff obtidos a partir das intensidades de fluorescência em 340 nm (círculos pretos) e a partir das áreas abaixo dos espectros (de 305 a 400 nm) (quadrados vermelhos). As linhas sólidas são os ajustes lineares.....	46
Figura 14: Porcentagem de supressão de fluorescência em função do logaritmo da concentração de PPL titulada nas amostras de RSA a 2, 4 e 8 μ M. A linha horizontal indica a mesma porcentagem de supressão para diferentes concentrações de RSA. O inset exemplifica as retas referentes à equação de conservação de massa obtidas para três porcentagens de supressão fluorescência.	48

Figura 15: (a) Gráfico de Scatchard da interação RSA – PPL e (b) Gráfico de Hill da interação RSA – PPL.....	48
Figura 16: Dicroísmo circular da RSA representado com linha sólida e da RSA com PPL na estequiometria de 1: 8 representado com linha tracejada.....	49
Figura 17: (a) Resultado da docagem molecular com o resíduo de Trp214 destacado em laranja, a PPL no sítio 1 em lilás e no Sítio 2 em verde. Resíduos de aminoácidos que compõe o microambiente de interação da PPL no (b) Sítio 1 e (c) Sítio 2. Principais interações encontradas pelo LigPlot entre a PPL e os resíduos de aminoácido no (d) Sítio 1 e (e) Sítio 2.	51
Figura 18: (a) Estrutura da PPL otimizada por cálculos de primeiros princípios e o mapa de potencial eletrostático (MEP). (b) Espectro experimental de absorção da PPL em água. (c) Transições eletrônicas da PPL calculadas por TD-DFT	52
Figura 19: RMSD calculado para o “backbone” da RSA livre (em preto), da RSA com a PPL inserida no sítio 1 (em vermelho) e da RSA com a PPL inserida no sítio 2 (em verde).....	53
Figura 20: Estrutura secundária dos aminoácidos que compõe o sítio 1 durante os 50 ns de dinâmica molecular da (a) RSA livre de ligante e (b) RSA com a PPL inserida no sítio 1. Estrutura secundária dos aminoácidos que compõe o sítio 2 durante os 50 ns de dinâmica molecular da (c) RSA livre de ligante e (d) RSA com a PPL inserida no sítio 2.....	54
Figura 21: Distância entre os centros de geometria (COG) da RSA e PPL no sítio 1 (em preto) e no sítio 2 (em vermelho) ao longo dos 50 ns de dinâmica molecular. O inset mostra a porcentagem de tempo no qual a RSA e PPL fazem ligação de hidrogênio no sítio 1 (em preto) e no sítio 2 (em vermelho).	55
Figura 22: Espectro de emissão de fluorescência da NBD após a correção de filtro interno obtido a partir de experimentos de titulação de PPL com incremento de 1 μM (a \rightarrow y = 0 \rightarrow 24 μM). [NBD] = 4 μM , pH = 7.4, T = 283 K, λ_{exc} = 295 nm. O inset mostra a estrutura química da PPL.	59
Figura 23: A ordenada esquerda mostra os gráficos de Stern-Volmer nas temperaturas de 283, 293 e 303 K. [NBD] = 4 μM , [PPL] = 0 – 24 μM . A ordenada direita mostra a razão dos tempos de vida do Trp90 ao variar a concentração de PPL.....	60
Figura 24: Decaimento de fluorescência resolvida no tempo do NBD (4 μM) e PPL nas estequiometrias de 1:0, 1:2, 1:4 e 1:6, T = 298 K e λ_{exc} = 295 nm.....	60
Figura 25: Gráficos de duplo-logaritmo dos dados de supressão de fluorescência da NBD (4 μM) coletados em 283, 293 e 303 K.	62
Figura 26: Gráfico de Van’t Hoff obtido a partir dos dados de K_a calculados pelo modelo de equilíbrio de ligação e o ajuste linear dos pontos.	62
Figura 27: : Porcentagem de supressão de fluorescência em função do logaritmo da concentração de PPL titulada nas amostras de NBD a 6 e 8 μM	63
Figura 28: (a) Gráfico de Scatchard da interação NBD – PPL e (b) Gráfico de Hill da interação NBD – PPL.....	64
Figura 29: (a) Curva de desnaturação da NBD monitorada em 222 nm. (b) Fração de proteína enovelada calculada a partir da Equação 51.....	65

Figura 30: Espectro de dicroísmo circular do NBD livre de ligante (linha sólida) e do NBD na presença de PPL na estequiometria de 1:12 (linha tracejada). Os experimentos foram feitos a 293 K.	65
Figura 31: Clusters encontrados pelo docking molecular e suas funções de energia.	66
Figura 32: Representação dos clusters a – h calculados pela docking molecular. A molécula de ADP está representada em preto, os clusters a, b, c, d, e, f, g, e h estão representados em vermelho, amarelo, cinza, marrom, azul, laranja e cor-de-rosa.	67
Figura 33: Sítios de interação do NBD acessados pela PPL: (a) Estrutura da NBD com a PPL no sítio 1 (vermelho) e no sítio 2 (verde), nesta figura a molécula de ADP está representada em preto. (b) Composição de aminoácidos do Sítio 1 e as interações entre o NBD e a PPL, a ligação de hidrogênio entre o resíduo Gly339 e PPL está representada pela linha azul tracejada. (c) Composição aminoácidos do Sítio 2 e as interações entre o NBD e a PPL, a ligação de hidrogênio entre o resíduo Gln93 e PPL está representada pela linha azul tracejada.	68
Figura 34: Parâmetros obtidos a partir da simulação de dinâmica molecular do NBD com a PPL no sítio 1 (vermelho) e no sítio 2 (verde). O gráfico à esquerda mostra: (a) O RMSD calculado para os átomos do “backbone”do NBD e (b) o RMSD da molécula de PPL. O gráfico à direita mostra a distância entre o COG do NBD e o COG da PPL quando inserida no sítio 1 e no sítio 2.	69
Figura 35: O gráfico à esquerda mostra o RMSF dos resíduos do NBD quando a proteína foi simulada (a) livre de ligante, (b) quando a proteína foi simulada com o PPL ocupando o sítio 1 e (c) quando a proteína foi simulada com a PPL ocupando o sítio 2. O gráfico à direita mostra a porcentagem de tempo em que foi calculado os números de ligação de hidrogênio feitos entre o NBD e a PPL no: (a) sítio 1 e (b) sítio 2.	70
Figura 36: Análise das estruturas secundária dos aminoácidos que compõe o sítio 1. (a) Simulação do NBD na ausência de PPL. (b) Simulação com a PPL inserida no sítio1.	71
Figura 37: Análise das estruturas secundária dos aminoácidos que compõe o sítio 2. (a) Simulação do NBD na ausência de PPL. (b) Simulação com a PPL inserida no sítio2.	71
Figura 38: Análise global da estrutura do NBD. (a) Simulação do NBD na ausência de PPL. (b) Simulação do NBD com a molécula PPL inserida no sítio 1. (c) Simulação do NBD com a molécula PPL inserida no sítio 2.	72
Figura 39: Decomposição das energias obtidas por MMPBSA para a interação da PPL com o NBD nos sítios 1 e 2. Contribuição de Van der Waals (VDW), eletrostática, solvatação polar, área acessível ao solvente (SASA) para o calculo de energia de ligação.	73
Figura 40: Cascata de ativação do heterodímero p50/p65 em células estimuladas com LPS. (Fonte: Sun e colaboradores, 2015 ⁶⁴).	75
Figura 41: Estrutura da proteína p65 com a molécula de DNA no sítio de interação (PDB 2O61). As estruturas em CPK são as posições encontras pelo cálculo de docking cega. A molécula de piperlongumina está representada em azul, as moléculas análogas 9a, 9b e 10 estão representadas em rosa, cinza e verde, respectivamente.	77
Figura 42: Composição de aminoácidos do microambiente de interação da PPL e das moléculas análogas 9a , 9b e 10. Ligações de hidrogênio são representadas pelas linhas tracejadas.	78

Lista de Tabelas

- Tabela 1: Constante de Stern-Volmer (K_{sv}), constante bimolecular (k_q), constante de ligação (K_a) e número de sítios calculados por meio da intensidade de fluorescência em 340 nm e por meio da área abaixo dos espectros de fluorescência no intervalo de 300 a 400 nm. 43
- Tabela 2: Tempos de vida obtidos a partir ajuste bi-exponencial dos dados de fluorescência resolvida no tempo e os tempos de vida médios obtidos a partir da equação 49. 44
- Tabela 3: Parâmetros termodinâmicos (ΔG , ΔH e ΔS) da interação RSA – PPL e a comparação dos resultados obtidos utilizando a intensidade em um ponto e a área abaixo do espectro. 46
- Tabela 4: Porcentagens de estruturas secundárias obtidas experimentalmente por dicroísmo circular (CD) da RSA pura e com a PPL na estequiometria 1:8. A tabela também mostra as porcentagens de estruturas secundárias obtidas computacionalmente depois de executar 50 ns de dinâmica molecular (MD) da RSA pura e a RSA com PPL no sítio 1 (MD 1) e sítio 2 (MD 2) 50
- Tabela 5: Tempos de vida obtidos a partir ajuste bi-exponencial dos dados de fluorescência resolvida no tempo e os tempos de vida médios obtidos a partir da equação 49. 61
- Tabela 6: Constante de Stern-Volmer (K_{sv}), constante bimolecular (K_q) e constante de ligação (K_a) do sistema NBD – PPL em 283, 293 e 303 K. 61
- Tabela 7: Parâmetros termodinâmicos do complexo NBD – PPL nas temperaturas de 283, 293 e 303 K 63
- Tabela 8: Características dos aminoácidos que compõe os microambientes dos sítios 1 e 2 do NDB. 69
- Tabela 9: Ranqueamento de energia dos cálculo de docagem da estrutura da PPL e das análogas 9a, 9b e 10. 77

Sumário

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Piperlongumina	13
1.2	Alvos Moleculares	14
1.2.1	Albumina de soro de Camundongo (RSA).....	14
1.2.2	Heat Shock Protein 70 (HSP70)	14
1.3	Interação Proteína-Ligante.....	15
2	TÉCNICAS EXPERIMENTAIS	17
2.1	UV-VIS	17
2.2	Espectroscopia de fluorescência do estado estacionário.....	18
2.2.1	Supressão estática	19
2.2.2	Supressão colisional ou dinâmica.....	21
2.2.3	Combinação de supressão colisional e estática	22
2.3	Fluorescência Sincronizada	23
2.4	Efeito de filtragem interna	24
2.5	Termodinâmica de interação	24
2.6	Função densidade de ligação e modelo de Scatchard	25
2.7	Fluorescência resolvida no tempo.....	29
2.8	Dicroísmo Circular	30
3	TÉCNICAS COMPUTACIONAIS.....	31
3.1	Docagem Molecular.....	31
3.2	Dinâmica Molecular	33
4	INTERAÇÃO RSA – PIPERLONGUMINA	36
4.1	Materiais	36
4.2	Métodos	36
4.2.1	Preparação da amostra	36
4.2.2	Espectroscopia de Fluorescência	37
4.2.3	Dicroísmo Circular	38
4.2.4	Docagem Molecular	38
4.2.5	Parametrização da PPL.....	39
4.2.6	Dinâmica Molecular	39
4.3	Resultados	40
4.4	Conclusão	55

5	INTERAÇÃO NBD – PIPERLONGUMINA	56
5.1	Materiais	56
5.2	Métodos	56
5.2.1	Preparação da amostra	56
5.2.2	Espectroscopia de Fluorescência	56
5.2.3	Dicroísmo Circular	57
5.2.4	Docagem Molecular	58
5.2.5	Dinâmica Molecular	58
5.3	Resultados	59
5.4	Conclusão.....	73
6	MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA PPL	74
6.1	Docagem Molecular.....	76
6.2	Perspectivas futuras	78
	REFERÊNCIAS	79
	APÊNDICE A – Publicação dos resultados obtidos para a interação RSA – PPL	84
	APÊNDICE B – Publicação dos resultados obtidos para a interação NBD – PPL	85
	APÊNDICE C – Programa para corrigir o efeito de filtragem interna em todos os comprimentos de onda.....	86
	APÊNDICE D – Programa para tratar os dados do modelo de densidade de ligação	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 Piperlongumina

A natureza sempre foi uma fonte profundamente explorada para obtenção de fármacos. Nos últimos 20 anos, um terço dos fármacos aprovados pelo FDA (do inglês Food and Drug Administration) foram baseados em produtos naturais ou em seus derivados.¹ Atualmente a busca por metabólitos com potencial farmacológico oriundos de plantas e de micro-organismos continua sendo uma área de pesquisa bastante explorada pela comunidade científica.

Um exemplo de produto natural que vem sendo estudado recentemente é a piperlongumina, também conhecida como pipartina (PPL). Esta molécula tem apresentado resultados promissores como ansiolítico, anti-tumoral, anti-inflamatório e antiangiogênico.² Entre os alvos moleculares da PPL encontram-se proteínas kinases como MAPK, JNK e p38, receptores como IL-8R e MDR1, fatores de transcrição como AP-1 e NF-κB, entre outros revisados por Prasad e Tyagi.³

A piperlongumina é um alcalóide amida isolada da casca do caule e de raízes de diferentes espécies de pimenta, mas esta molécula destaca-se como sendo o principal componente presente na pimenta-longa (*Piper longum L*).⁴ A pimenta-longa tem um longo histórico de uso na medicina tradicional indiana, conhecida como Ayurveda, sendo utilizada no tratamento tumores, malária, asma, infecções respiratórias, entre outras doenças revisadas por Bezerra e colaboradores.⁴

A PPL tem massa molecular igual a 317.3 g/mol e é uma molécula lipofílica com coeficiente de partição (logP) igual a 1.63. Este metabólito foi isolado pela primeira vez em 1961 por químicos indianos que estudavam a pimenta-longa e sua estrutura química (Figura 1) foi caracterizada em 1968⁴.

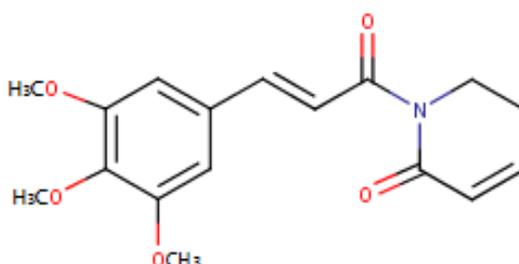


Figura 1: Estrutura química da PPL

1.2 Alvos Moleculares

1.2.1 Albumina de soro de Camundongo (RSA)

Além da importância de entender as interações entre os ligantes e a proteínas que participam de processos inflamatórios, entender as interações entre os ligantes e a albumina é de extrema importância, pois um dos mais importantes fatores que afetam a distribuição e a concentração ativa de muitas drogas no organismo é a afinidade pela albumina.

Um grau de afinidade por esta proteína é desejável, de modo a contribuir para a solubilização de substâncias que, de outro modo, agregariam e seriam mal distribuídas. No caso oposto, os fármacos com uma alta afinidade pela proteína necessitariam de grandes doses para alcançarem uma concentração efetiva *in vivo*, pois seriam lentamente distribuídos aos locais de ação e não poderiam ser eficientemente eliminados^{5,6}.

Neste contexto, entender como essas drogas se ligam à albumina é de extremo interesse para a área farmacológica. Os modelos experimentais *in vivo* de anti-inflamatórios são realizados em camundongos e pouco se sabe sobre as interações com a albumina destes animais, tampouco sobre os sítios de ligação desta proteína.

1.2.2 Heat Shock Protein 70 (HSP70)

Os organismos vivos, independente do reino, são constantemente submetidos a diversas situações estressantes e respondem a esses estímulos por meio de alterações no metabolismo celular, ativando seus mecanismos de defesa.⁷ A resposta ao estresse inclui a atuação de proteínas denominadas proteínas de choque térmico, HSPs (do inglês Heat Shock Protein), sendo esta uma das respostas primárias de proteção celular.⁸ As HSPs fazem parte da grande família das proteínas conhecidas como chaperonas moleculares, assim chamadas por possuir a capacidade de interagir de forma reversível com outras proteínas, auxiliando na formação, dobramento e transporte trans-membrana.⁹ A HSP70 é uma proteína de choque térmico de 70 kDa composta por um domínio N-terminal altamente conservado que possui atividade de ATPase, conhecido NBD (do inglês nucleotide binding domain), um domínio de ligação de substrato conhecido como SBD (do inglês substrate binding domain) e um domínio C-terminal. O NBD é um domínio de 40 kDa e possui uma estrutura altamente flexível, sendo ela uma proteína bastante interessante para estudos biofísicos.

Assumindo sua função de proteger a célula, a HSP70 costuma ser super expressa em tumores, principalmente em resposta a tratamentos quimioterápicos, o que leva à proteção das células cancerígenas e a resistência à quimioterapia.¹⁰

Apesar de inicialmente as Hsp_s terem sido identificadas como proteínas induzidas pelo estresse térmico¹¹, estudos recentes iniciaram uma mudança de paradigma na compreensão destas macromoléculas. Estudos recentes a nível celular mostraram que a proteína HSP70 é encontrada no meio extracelular, possuindo potente atividade de citocina com habilidade de ligar-se com alta afinidade à membrana plasmática, de modo a desencadear um fluxo rápido de íons Ca²⁺ que provoca o início da via de ativação da proteína NF-κβ, proteína esta responsável por regular a expressão de citocinas pró-inflamatórias em humanos^{12,13}. Foi reportado nestes artigos que a produção de citocinas pró-inflamatórias induzidas pela HSP70 é mediada através da transdução de sinal pelo caminho da MyD88/ Irak / NF-κβ, onde a Hsp70 utiliza tanto a proteína receptora TLR2 (receptor para bactérias gram-positivas) quanto a TLR4 (receptor para bactérias gram-negativas) para enviar seu sinal pró-inflamatório (Figura 2).

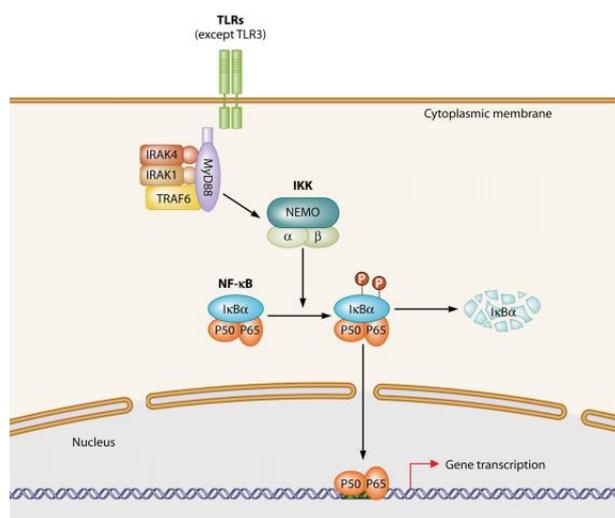


Figura 2: Caminho pelo qual a HSP70 ativa a proteína NF-κB (Fonte: Adaptado de Picard e colaboradores, 2011¹⁴).

Como estudos recentes demonstraram que a HSP70 tem caráter pró-inflamatório dando início a via de ativação da proteína regulatória de citocinas, o estudo da interação entre moléculas com ação anti-inflamatória e esta proteína se torna importante para obter informações sobre as interações e possivelmente encontrar uma molécula eficiente para interromper o processo inflamatório.

1.3 Interação Proteína-Ligante

As interações não covalentes entre pequenas moléculas e alvos farmacológicos são a base molecular para a atividade de grande parte dos compostos farmacêuticos, por isso o

estudo da físico-química de interação é importante para o entendimento do mecanismo de ação de fármacos e também para o desenvolvimento de moléculas com maior afinidade e seletividade.^{15,16}

A energia livre de interação é resultado de interações intermoleculares entre o ligante e a macromolécula. Estas interações estão intimamente envolvidas no reconhecimento molecular e no equilíbrio entálpico-entrópico que dirige a formação do complexo.

As interações intermoleculares podem ser produto da interação de cargas, como a interação eletrostática; podem ser produto da interação de dipolos elétricos que estão presentes em moléculas e resíduos de aminoácidos devido ao deslocamento de nuvens eletrônicas causadas pela diferença da eletronegatividade dos átomos, a formação de dipolos elétricos dá origem a interações como as ligações de hidrogênio; e também podem ser resultado de flutuações nas nuvens eletrônicas das moléculas que geram dipolos momentâneos ou induzidos dando origem às interações de Van der Waals.¹⁷

Estas interações estabilizam o ligante no sítio de interação e também são responsáveis pelo reconhecimento molecular e pela especificidade da interação, principalmente quando se trata de interações com alta orientação direcional como no caso da ligação de hidrogênio¹⁸ e das interações envolvendo grupos aromáticos como π - π e cátion- π ^{19,20}.

Embora as áreas de farmacologia e de produtos naturais tenham em seu acervo múltiplas técnicas experimentais para estudo *in vivo* e *in vitro* da ação destas moléculas, as técnicas experimentais com base em biofísica são importantes ferramentas que foram incorporadas pela área de desenvolvimento de fármacos, uma vez que a aplicação destas técnicas proporciona o entendimento mais aprofundado das interações proteína-ligante.

Técnicas experimentais como a espectroscopia de fluorescência, dicroísmo circular, ressonância magnética nuclear (RMN), ressonância plasmônica de superfície (SPR), termoforese em microescala (MST) e calorimetria de titulação isotérmica (ITC) são frequentemente utilizadas para a descrição experimental da interação proteína-ligante²¹.

As técnicas computacionais como o docagem e a dinâmica molecular também são frequentemente utilizadas na descrição das interações proteína-ligante. O uso de dinâmica molecular permite o cálculo de energia livre por meio de métodos como o “Molecular Mechanics Poisson-Boltzman (MMPBSA)”, “Free Energy Perturbation (FEP)”, “Umbrella Sampling (US)”, entre outros.²²

2. TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

2.1 UV-VIS

De acordo com a mecânica quântica, quando átomos e moléculas são expostas a uma fonte de radiação eletromagnética, elétrons que compõem orbitais com níveis energéticos bem definidos podem absorver fótons da radiação e realizar transições de orbitais energeticamente menores para orbitais energeticamente maiores^{23,24}. A condição fundamental para que estas transições aconteçam é aquela na qual a energia do fóton a ser absorvido pelo átomo ou molécula tenha a mesma magnitude da diferença entre os níveis de energia que o elétron sofrerá a transição, em outras palavras, a energia do fóton $h \cdot \nu$ tem de ser igual a diferença de energia dos níveis energéticos ΔE , onde h é a constante de Planck ($h=6.63 \cdot 10^{-34}$ J.s) e ν é a frequência do fóton²⁴ (Equação 1).

$$\Delta E = h \cdot \nu \quad (1)$$

A região espectral que compreendem do ultravioleta ao visível está na faixa de 200 nm à 700nm e muitas moléculas possuem ΔE de mesma magnitude da energia fornecida pelos fótons dessa faixa espectral. Devido a esta igualdade energética, quando estas moléculas são expostas a estes tipos de radiações, os fótons da radiação são absorvidos pela molécula e utilizados para promover transições eletrônicas, além de proporcionar mudanças de estados dos spins e excitar os modos de vibração das ligações químicas para atingir o equilíbrio térmico^{23,24}.

Essa característica da molécula de absorver radiação em certos comprimentos de onda possibilitou o surgimento de uma técnica espectroscópica capaz de determinar a concentração do composto a ser estudado, conhecida como espectroscopia do UV-VIS. Neste contexto, considerando uma placa fina da solução de espessura dx que contém n moléculas absorvedoras de luz por cm^3 , a intensidade de luz dI absorvido pela espessura dx é proporcional à intensidade da luz incidente I , n e σ , onde n é o número de moléculas por cm^3 e σ é a seção transversal efetiva para absorção da radiação em cm^2 (Equação 2)²³.

$$\frac{dI}{dx} = -I \cdot \sigma \cdot n \quad (2)$$

Realizando a integração com os parâmetros do sistema tem-se:

$$\int_{I_0}^I -\frac{dI}{I} = \int_0^d n \cdot \sigma \cdot dx \quad (3)$$

Como resultado da integração tem-se:

$$\log \frac{I_0}{I} = \frac{n \cdot \sigma \cdot d}{2.3} \quad (4)$$

Onde $\log(I_0/I)$ é a densidade óptica do sistema, que também é conhecida como absorvância. A absorvância também pode ser escrita como mostra a equação 5, em termos do coeficiente de extinção ϵ (em $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e da concentração C (em M^{-1}), conhecida como lei de Beer-Lambert:

$$\text{Absorvância} = \log \frac{I_0}{I} = C \cdot \epsilon \cdot d \quad (5)$$

2.2 Espectroscopia de fluorescência do estado estacionário

Luminescência por definição é o processo no qual as moléculas constituintes de alguma substância emite luz quando ocorre o decaimento dos elétrons de níveis mais energéticos para os níveis menos energéticos, este processo é dividido em fluorescência e fosforescência dependendo da natureza do estado excitado²³.

O processo que caracteriza a fluorescência é quando ocorre emissão de fótons no decaimento dos elétrons de um estado excitado singleto S_1 para outro estado singleto S_0 de menor energia. A taxa de emissão do processo de fluorescência é tipicamente de 10^8 s^{-1} , o que resulta em um tempo de vida de fluorescência próximo de 10ns.

Por outro lado, o processo de fosforescência se caracteriza quando ocorre emissão de fótons a partir do decaimento dos elétrons de um estado excitado tripleto T_1 para um estado singleto S_1 . A taxa de emissão do processo de fosforescência é lento, sendo da ordem de 10^3 a 1 s^{-1} , o que resulta em um tempo de vida da ordem de milissegundos. Na Figura 3 está representado o diagrama de Jablonski ilustrando os processos de fluorescência e fosforescência²³.

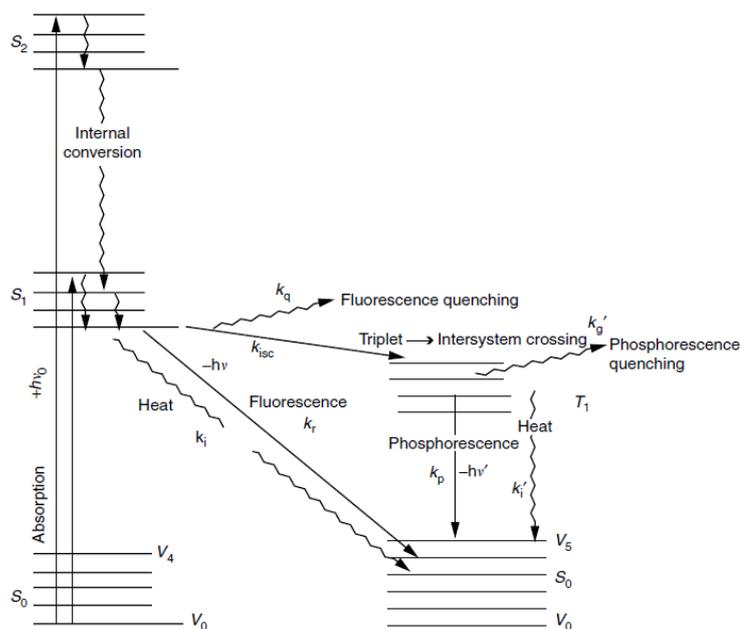


Figura 3: Diagrama de Jablonski.(Fonte: Albani, 2008 ²⁵)

Levando em consideração o mecanismo de fluorescência, foi desenvolvida uma técnica espectroscópica capaz de entender como que ocorre a interação entre proteínas e pequenas moléculas acompanhando as mudanças no sinal de fluorescência. Os espectros de fluorescência podem ser obtidos através da varredura dos comprimentos de onda de excitação, da varredura dos comprimentos de onda de emissão ou da varredura sincronizada de ambos.

Uma das variáveis monitoradas nos espectros que possibilita a análise de interação de proteínas com pequenos ligantes é a intensidade da fluorescência dos aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina e triptofano. A intensidade de fluorescência destes cromóforos pode ser diminuída por uma variedade de processos e esta diminuição recebe o nome de supressão, podendo ser estática ou colisional (dinâmico) dependendo das naturezas de interações ²³. Na supressão colisional, o fluoróforo no estado excitado é desativado retornando ao seu estado fundamental quando entra em contato com alguma outra molécula presente na solução, que recebe o nome de supressor. Por outro lado, quando ocorre a formação de um complexo fluoróforo-supressor no estado fundamental, tem-se a supressão estática ²³.

2.2.1 Supressão estática

Como mencionado anteriormente, a supressão estática é resultado da formação de um complexo fluoróforo-supressor não fluorescente. Quando este complexo absorve radiação

eletromagnética, imediatamente retorna para seu estado fundamental sem e emissão de fótons ²³.

O mecanismo estático baseia-se em formação de complexo fluoróforo-supressor, sendo assim, em um sistema contendo uma solução com o fluoróforo presente na proteína (P) e pequenas moléculas (L) como sendo os supressores, tem-se o seguinte processo de formação de complexo onde modela-se a acomodação de supressores um a um nos sítios ²⁶ :



Assumindo no modelo que os sítios são iguais e independentes, obtém-se que:

$$K_{a1} = K_{a2} = K_{a3} = \dots = K_{an} = K_a = \frac{[L_nP]}{[L]^n [P_{free}]} \quad (6)$$

Portanto resulta em uma constante de associação:

$$K_a^n = \frac{[L_n \cdot P]}{[L]^n \cdot [P_{free}]} \quad (7)$$

Onde $[P_{free}]$ é a concentração de proteína livre, $[L_{free}]$ é a concentração de supressor livre e $[L_nP]$ é a concentração de complexo proteína-supressor. Modelando o sistema onde existam duas condições para a proteína onde ou ela está livre em solução ou ligada aos supressores, tem-se a relação $[P_t] = [L_nP] + [P_{free}]$, em que $[P_t]$ é a concentração de proteína total do sistema. Dessa maneira pode-se escrever uma relação na qual a razão entre a intensidade de fluorescência da solução que contém a proteína livre F_0 e a intensidade de fluorescência após a complexação F é igual à razão entre a concentração de proteína livre e complexada.

$$\frac{[P_t]}{[P_{free}]} = \frac{F_0}{F} \quad (8)$$

Substituindo então $[P_{free}]$ por $-[L_nP] + [P_t]$ na equação 8, tem-se:

$$[L_nP] = [P_t] \cdot \frac{(F_0 - F)}{F_0} \quad (9)$$

Sabendo que a concentração de supressor total $[L_t]$ é a soma das concentrações dos supressores livres $[L_{free}]$ e complexados $[L_nP]$, tem-se que $[L_{free}] = [L_t] - [L_nP]$, reescrevendo a constante de associação K_a^n em função de $[L_t], [P_t]$ e das intensidades de fluorescência F e F_0 , chega-se a seguinte relação:

$$K_a^n = \left(\frac{F_0 - F}{F} \right) \cdot \left(\frac{1}{[L_t] - \left(\frac{F_0 - F}{F} \right) \cdot [P_t]} \right)^n \quad (10)$$

Aplicando a função logaritmo na expressão obtida e rearranjando chegamos a uma relação onde podemos extrair a partir dos sinais de fluorescência F e F_0 o número n de sítios e a constante de associação K_a :

$$\log \left(\frac{F_0 - F}{F} \right) = n \cdot \log K_a - n \cdot \log \left(\frac{1}{[L_t] - \left(\frac{F_0 - F}{F} \right) \cdot [P_t]} \right) \quad (11)$$

Após coletado os dados de fluorescência, é necessário construir um gráfico e extrair os coeficientes angular e linear da reta para obter os parâmetros n e K_a .

2.2.2 Supressão colisional ou dinâmica

A supressão colisional da fluorescência é descrita pela equação de Stern-Volmer utilizando os parâmetros k_q (constante biomolecular de supressão), τ_0 (tempo de vida do fluoróforo na presença do supressor) e K_D (constante de supressão colisional)²³:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \cdot \tau_0 \cdot [L_t] = 1 + K_D \cdot [L_t] \quad (12)$$

A equação de Stern-Volmer pode ser obtida considerando as intensidades de fluorescência observadas na ausência e presença de supressor. A intensidade de fluorescência observada para um fluoróforo é proporcional à sua concentração no estado excitado, $[F^*]$. Sob radiação contínua, uma constante população de fluoróforos excitados é estabelecida e portanto $d[F^*]/dt = 0$ ²³. Na ausência e presença do supressor, as equações diferenciais que descrevem $[F^*]$ são:

$$\frac{d[F^*]}{dt} = f(t) - \gamma[F^*]_0 = 0 \quad (13)$$

$$\frac{d[F^*]}{dt} = f(t) - (\gamma + k_q \cdot [L_t]) \cdot [F^*] = 0 \quad (14)$$

Onde γ é a taxa de decaimento do fluoróforo na ausência do supressor e $f(t)$ é a função de excitação. Resolvendo as equações diferenciais, chega-se a relação:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\gamma + k_q \cdot [L_t]}{\gamma} = 1 + k_q \cdot [L_t] \cdot \tau_0 = 1 + K_D \cdot [L_t] \quad (15)$$

Como $\tau_0^{-1} = \gamma$ e $\tau_0 = (\gamma + k_q \cdot [L])^{-1}$, tem-se:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [L_t] \quad (16)$$

Esta equação mostra uma característica importante da supressão colisional, que é uma diminuição equivalente na intensidade e tempo de vida da fluorescência:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} \quad (17)$$

A diminuição no rendimento ocorre porque a supressão provoca o despovoamento do estado excitado sem emissão de fluorescência. No caso estático o tempo de vida não decresce porque apenas as moléculas fluorescentes são observadas e possuem o tempo de vida constante igual a τ_0 ²³.

2.2.3 Combinação de supressão colisional e estática

Em muitos casos, o fluoróforo pode sofrer contribuição de supressão tanto da forma estática quanto da forma dinâmica em um mesmo sistema. Nesse caso cada tipo de supressão possui uma fração de contribuição da supressão do sinal de fluorescência, onde a equação de Stern-Volmer é uma combinação dos mecanismos²³:

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D \cdot [L_t]) \cdot (1 + K_{SV} \cdot [L_t]) \quad (18)$$

Onde K_{SV} é a constante de supressão estática. Realizando o produto, tem-se um comportamento quadrático em função da concentração de supressor total $[L_t]$:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + (K_D + K_{SV})[L_t] + K_D \cdot K_{SV}[L_t]^2 \quad (19)$$

Rearranjando a equação, pode se obter uma equação linear:

$$\left(\frac{F_0}{F} - 1\right) \cdot \frac{1}{[L_t]} = (K_D + K_{SV}) + K_D \cdot K_{SV}[L_t] \quad (20)$$

Escrever a equação é conveniente, pois a partir dos dados de intensidades de fluorescência F e F_0 pode-se construir um gráfico seguindo a equação linear. A partir da construção de uma reta obtém-se um sistema de equações com os coeficientes angular (α) e linear (q) e com esse sistema é possível obter as constantes de Stern-Volmer para o mecanismo estático (K_{SV}) e dinâmico (K_D):

$$\begin{cases} \alpha = K_D \cdot K_{SV} \\ q = K_D + K_{SV} \end{cases}$$

2.3 Fluorescência Sincronizada

A Fluorescência sincronizada é baseada no escaneamento simultâneo dos monocromadores de excitação e emissão, mantendo uma distância entre os comprimentos de onda de excitação e emissão ($\Delta\lambda$). Em uma amostra contendo tirosina e triptofano, é possível selecionar o fluoróforo a ser analisado por meio do ajuste de $\Delta\lambda$. Com $\Delta\lambda=15$ nm monitora-se o comportamento dos resíduos de tirosina, enquanto que com $\Delta\lambda= 60$ nm monitora-se o comportamento dos resíduos de triptofano.

Esta técnica tem sido amplamente aplicada para análise qualitativa de mudança conformacional no microambiente do fluoróforo, causada por interação com pequenas moléculas. A análise baseia-se na observação do deslocamento do pico do espectro de fluorescência sincronizada, que é associado à mudança de polaridade no microambiente do fluoróforo.

Desta forma, deslocamento do pico para comprimentos de onda maiores (red shift) indicam a exposição do fluoróforo a um ambiente mais polar, enquanto que deslocamento do máximo de fluorescência para comprimento de ondas menores (blue shift) indica a exposição do fluoróforo a ambientes mais hidrofóbicos.

Apesar da sua ampla utilização, a fluorescência sincronizada também está exposta ao efeito de filtragem interna²⁷. Neste caso, a correção de filtragem interna deve ser feita para todos os comprimentos de onda de excitação e de emissão. A não correção do efeito de filtragem interna para todas as intensidades do espectro pode acarretar em deslocamentos do máximo de intensidade levando a uma análise equivocada de mudança de polaridade do microambiente do fluoróforo.

Neste trabalho, durante a análise da interação da RSA com a piperlongumina (seção 4.3), foi observado que o deslocamento do máximo de fluorescência tanto no espectro de emissão quanto na fluorescência sincronizada era, na verdade, um efeito de filtragem interna.

2.4 Efeito de filtragem interna

Como o efeito de filtragem interna causa a diminuição do sinal de fluorescência, ele pode ser confundido com o efeito de supressão e gerar resultados equivocados na análise da interação proteína-ligante. O efeito de filtragem interna pode ser dividido em duas etapas: o efeito de filtragem primário, quando a luz que incide na cubeta é absorvida pelos componentes da amostra antes de excitar o fluoróforo; e o efeito de filtragem secundário, quando a luz emitida pelo fluoróforo é absorvida pelos componentes da amostra e, portanto não chega aos detectores.

Quando o espectro de absorção sobrepõe em grande parte o espectro de emissão do fluoróforo, como é o caso da piperlongumina e o Trp (Figura 9), o efeito de filtragem interna pode gerar deslocamentos consideráveis do comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência, o que pode ser interpretado equivocadamente como mudança de polaridade no ambiente do fluoróforo. Por isso, a correção deste efeito é de extrema importância, para todos os comprimentos de onda do espectro, antes de dar prosseguimento às análises.

A correção do efeito de filtro interno é feito meio da equação 21, onde F_{corr} e F_{obs} são as intensidades de fluorescência corrigida e observada e A_{ex} e A_{em} são as absorbâncias nos comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente.

$$F_{corr} = F_{obs} \cdot 10^{\frac{(A_{ex}+A_{em})}{2}} \quad (21)$$

2.5 Termodinâmica de interação

Para o estudo e obtenção de novas moléculas que podem ser utilizados como alvos terapêuticos atuando no processo de inibição de proteínas que fazem parte de cascatas de reações envolvidas em diversos processos patológicos, é de suma importância entender quais são as interações que estão envolvidas no processo de formação e estabilização do complexo proteína-ligante²⁸. Para determinar quais são as interações predominantes no sistema é necessário entender a termodinâmica do sistema, onde os parâmetros de entalpia ΔH , entropia ΔS e energia livre de Gibbs ΔG indicam a natureza das interações mais relevantes para o sistema²⁸. Considerando o sistema contendo proteína e ligantes, tem-se que a energia livre de Gibbs do sistema é :

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K_a \quad (22)$$

Onde R é a constante universal dos gases (8.1 J/mol.K), T a temperatura do sistema e K_a a constante de associação obtida nos experimentos de supressão de fluorescência pela equação duplo-logaritma (equação 11). Sabe-se também que a variação da energia livre de Gibbs está relacionada com a variação de entalpia e com a variação de entropia:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (23)$$

Substituindo a equação 23 na equação 22 e rearranjando os termos, chega-se na equação de van't Hoff:

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H}{R.T} + \frac{\Delta S}{R} \quad (24)$$

Tendo a constante K_a e as temperaturas T, pode-se então construir um gráfico que pela inclinação da reta e o coeficiente linear obtém-se a variação de entalpia ΔH e variação de entropia ΔS , respectivamente. De acordo com Ross e colaboradores²⁹, as interações mais predominantes podem ser associadas aos sinais dos potenciais termodinâmicos, onde as interações predominantes para a estabilização do complexo com os parâmetros $\Delta H < 0$ combinado com $\Delta S > 0$ ou $\Delta S < 0$ são as ligações de hidrogênio, Van der Waals e forças eletrostáticas e quando tem-se $\Delta H > 0$ combinado com $\Delta S > 0$ as interações predominantes são as hidrofóbicas.

2.6 Função densidade de ligação e modelo de Scatchard

Para acompanhar as ligações entre proteína-ligante, foi desenvolvida uma técnica experimental conhecida como função densidade de ligação (do inglês Binding Density Function, BDF)³⁰, onde é escolhido um observável físico para fazer este monitoramento das interações, podendo ser absorvância, intensidade de fluorescência, entre outros. Para este trabalho, a intensidade de fluorescência emitida pela proteína foi escolhida como observável físico, onde em um sistema aquoso contendo certa proteína, é titulado o ligante que deseja ser estudado como supressor³⁰.

Considerando o sistema em equilíbrio, o número médio de supressores ligados por proteína $\sum v_i$ é determinado a partir de uma dada concentração de supressor livre (L_{free}), sendo assim, se a concentração de supressor livre é a mesma para duas ou mais soluções de diferentes concentrações de proteína total P_t , então o número médio de supressores ligados

por proteína também será o mesmo, chegando na relação de conservação de massa para o sistema:

$$[L_t] = [L_{free}] + \left(\sum v_i \right) \cdot [P_t] \quad (25)$$

Sendo $[L_t]$ a concentração de supressor total, $[L_{free}]$ a concentração de supressor livre e $[P_t]$ a concentração de proteína total.

Para a obtenção do número médio de supressores ligados $\sum v_i$, pode-se construir um gráfico de concentração de supressores total $[L_t]$ em função proteína total $[P_t]$, onde pelo coeficiente angular obtém-se o $\sum v_i$ e pelo coeficiente linear da reta obtém-se $[L_{free}]$. Como a concentração de proteína é a mesma da solução estoque, este não precisa ser obtido, entretanto a concentração de ligante total titulado para causar a mesma supressão de fluorescência em duas amostras com diferentes concentrações de proteína não é conhecida e para ser obtida usa-se a definição de porcentagem de supressão ΔF ³⁰:

$$\Delta F = \frac{F - F_0}{F_0} \cdot 100\% \quad (26)$$

Onde F é o sinal de intensidade de fluorescência na presença do supressor e F_0 é o sinal na ausência de supressor. Sendo assim, é possível a construção de um gráfico de porcentagem de supressão em função da concentração de supressor total para duas ou mais concentrações de proteínas e para uma dada porcentagem de supressão é obtido do gráfico as concentrações do supressor total. A Figura 4 ilustra um exemplo do gráfico para dois sistemas com duas concentrações distintas de proteína total (P_{t1} e P_{t2}), onde a reta horizontal marca a concentração de ligante necessária para causar a mesma porcentagem de supressão de fluorescência nas duas amostras.³⁰

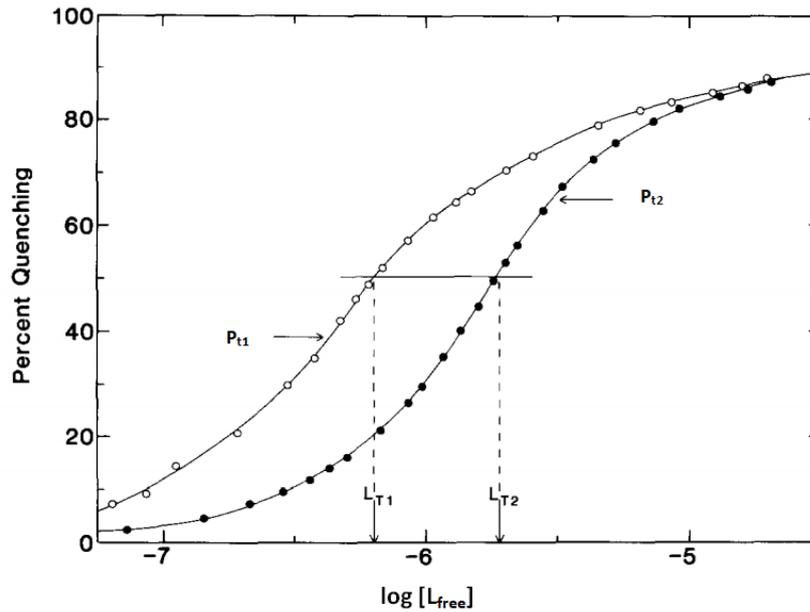


Figura 4: Gráfico de BDF da proteína SSB em duas concentrações diferentes com oligonucleotídeos ligados (Fonte: Adaptado de Lohman, 1991³⁰).

Uma vez obtidos os valores de $\sum v_i$ e $[L_{free}]$ a partir do gráfico no modelo BDF, pode-se utilizar o modelo desenvolvido por Scatchard³¹ para modelar as interações da proteína e supressor. Com este modelo pode-se determinar o número de sítios n que a proteína alvo de estudo possui para um determinado supressor, a constante de ligação K_b do supressor com os sítios e além disto pode-se entender a relação entre o supressor e a proteína no que se diz respeito à cooperatividade dos sítios³¹. Para retirar todas estas informações do modelo, constrói-se um gráfico de $\sum v_i/[L_{free}]$ contra $\sum v_i$ e a partir da função obtida no gráfico pode-se dizer se os sítios possuem cooperatividade ou se são iguais e independentes.

Bordbar e colaboradores³² relacionaram a função matemática que descreve o comportamento do sistema nos gráficos de Scatchard com o tipo de cooperatividade caso exista. Eles verificaram que se a função for polinomial com a concavidade positiva a proteína em questão possui cooperatividade negativa (Figura 5A) entre os sítios e no caso em que a função polinomial possui concavidade negativa a proteína exibe uma cooperatividade positiva (Figura 5B)³². Por outro lado, se a função que descreve a interação for de caráter linear, o modo de ligação é não cooperativo.

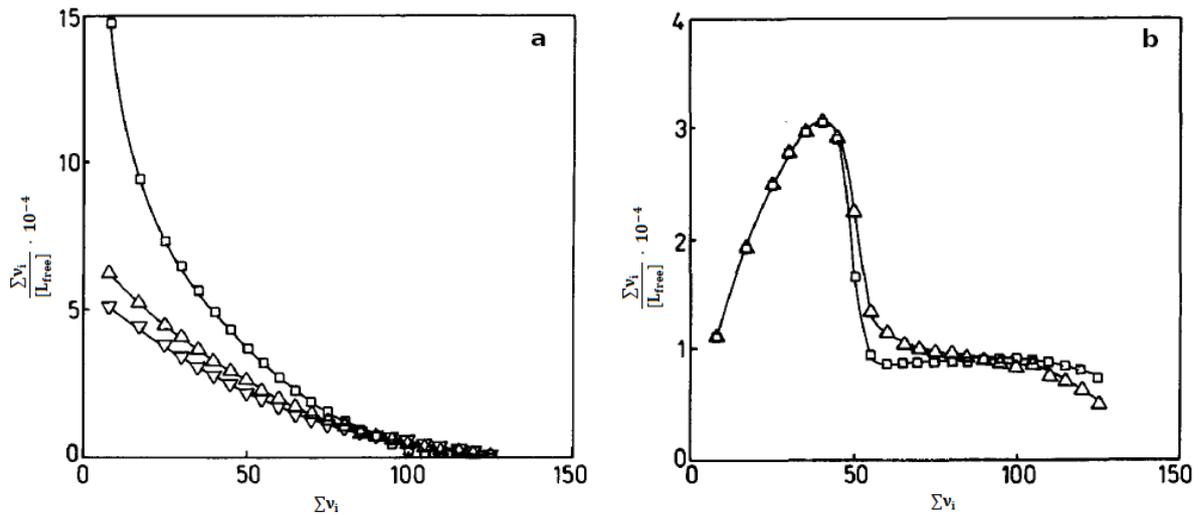


Figura 5: Gráficos de Scatchard para sistemas (A) com cooperatividade negativa (B) com cooperatividade positiva (Fonte: Adaptado de Bordbar e colaboradores, 1996 ³²)

Para estes casos onde o gráfico de Scatchard apresentou cooperatividade, pode-se aplicar a equação desenvolvida por Hill ²⁸ para determinar o número de sítios n de cada conjunto de sítios e a constante de ligação K_n de cada sítio:

$$\sum v_i = \frac{n_1(k_1[L_{free}])^{h_1}}{1 + (k_1[L_{free}])^{h_1}} + \frac{n_2(k_2[L_{free}])^{h_2}}{1 + (k_2[L_{free}])^{h_2}} + \dots \quad (27)$$

Onde $[L_{free}]$ é a concentração de supressores livres e h é índice de Hill. Se $h=1$ o sistema é não cooperativo, $h>1$ o sistema possui cooperatividade positiva e $h<1$ o sistema possui cooperatividade negativa ²⁸³².

Se a função que descreve o sistema for linear, a proteína não possui cooperatividade e todos os sítios são idênticos e independentes. Para este comportamento, o próprio Scatchard ³¹ desenvolveu seu modelo matemático para encontrar o número de sítios n e a constante de ligação K_b :

$$\sum v_i = \frac{n \cdot K_b \cdot [L_{free}]}{1 + K_b \cdot [L_{free}]} \quad (28)$$

Invertendo o racional, tem-se:

$$\frac{1}{\sum v_i} = \frac{1 + K_b \cdot [L_{free}]}{n \cdot K_b \cdot [L_{free}]} \quad (29)$$

Separando em duas frações:

$$\frac{1}{\sum v_i} = \frac{1}{n \cdot K_b \cdot [L_{free}]} + \frac{1}{n} \quad (30)$$

Subtraindo $1/n$ dos dois lados e aplicando a obtendo o mínimo múltiplo comum, tem-se:

$$\frac{n \cdot \sum v_i}{n \cdot K_b \cdot [L_{free}]} = n - \sum v_i \quad (31)$$

Para deixar na forma da equação linear da reta para modelar o gráfico de Scatchard, é rearranjado como se segue:

$$\frac{\sum v_i}{[L_{free}]} = n \cdot K_b - K_b \cdot \sum v_i \quad (32)$$

Com o gráfico de $\sum v_i / [L_{free}]$ contra $\sum v_i$ pode-se obter o número de sítios idênticos e independentes n pelo coeficiente linear da reta e a constante de ligação K_b pelo coeficiente angular da reta.

2.7 Fluorescência resolvida no tempo

A técnica de fluorescência resolvida no tempo (FRT) é utilizada para medir intensidades e tempos de decaimento de fluorescência. Diferentemente da fluorescência estacionária, que é realizada com uma radiação emitida constantemente, a fluorescência resolvida no tempo utiliza um pulso de onda eletromagnética para excitar a amostra. FRT é uma técnica útil para a caracterização de complexos proteína-ligante, uma vez que esta técnica consegue extrair informações referentes ao processo de supressão do sinal da sonda fluorescente devido a interação com ligante.

Um típico experimento de FRT consiste em uma solução de proteína com sonda fluorescente, onde a concentração da proteína é dada por $[P]$. Pulsos são emitidos na amostra em $t=0$, como consequência os elétrons de um número de moléculas P serão excitados para o estado singlete S_1 através da absorção de fótons. Depois de um tempo, os elétrons retornarão ao estado S_0 através de processos radiativos, não radiativos e cruzamento entresistemas.²³ Neste contexto a taxa de desexcitação do estado S_1 pode ser descrita como:

$$-\frac{d[P^{S_1}]}{dt} = (k_r^{S_1} + k_{nr}^{S_1}) \cdot [P^{S_1}] \quad (33)$$

Onde k_r^{S1} é taxa de decaimento radiativo do fluoróforo, k_{nr}^{S1} taxa de decaimento não radiativo e $[P^{S1}]$ concentração de fluoróforo excitados S_1 . Integrando a equação 33, temos que:

$$[P^{S1}] = [P_0^{S1}] \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (34)$$

Onde $[P_0^{S1}]$ é a concentração inicial de fluoróforos no estado excitado e τ é o tempo de vida do estado excitado S_1 , $\tau = \frac{1}{k_r^{S1} + k_{nr}^{S1}}$. A intensidade de fluorescência I_f após a excitação da amostra por um pulso de luz é proporcional, à $[P^{S1}]$, em que a constante de proporcionalidade é dado por k_r^{S1} :

$$I_f = k_r^{S1} \cdot [P^{S1}] = [P_0^{S1}] \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (35)$$

O tempo de decaimento de fluorescência (τ) é a variável temporal do fenômeno dinâmico do sistema. Se τ permanece constante tem-se que o fluoróforo não está sofrendo um processo de supressão dinâmica quando em contato com outros componentes da solução.

Neste trabalho foi explorado o fenômeno de supressão de fluorescência da sonda endógena da proteína, o resíduo de triptofano. O triptofano tem um arranjo estrutural de dois anéis ligados (pirrol e benzeno) que formam a estrutura indólica. O indol possui dois estados excitados singletos de mais baixa energia degenerados (1La e 1Lb). Na maioria das proteínas, 1La é o estado excitado responsável pela emissão de fluorescência.³³ Além disso, outra característica do triptofano é que ele apresenta dois tempos de vida de fluorescência, que estão associados a diferentes rotâmeros desta molécula.^{23,34} Por isso utilizamos o modelo de decaimento bi-exponencial para tratar os resultados de FRT.

2.8 Dicroísmo Circular

Dicroísmo circular (CD, do inglês circular dichroism) é uma técnica espectroscópica que mede a diferença da absorção de luz circularmente polarizada no sentido horário e anti-horário³⁵. A elipticidade de uma amostra em cada comprimento de onda é proporcional a diferença de absorção:

$$\theta = 32.982 \frac{(A_L - A_R)}{c \cdot l} = 32.982 (\epsilon_L - \epsilon_R) \quad (36)$$

Onde A_L e A_R (do inglês left-hand polarized and right-hand polarized) são absorções de luz circularmente polarizada no sentido horário e anti-horário, respectivamente; c é a

concentração molar da amostra, l é o caminho óptico e $\epsilon_{(L/R)}$ são os coeficientes de extinção molar para cada direção de polarização da luz.

A técnica de dicroísmo circular é muito utilizada na caracterização de estrutura de proteínas, já que na faixa do UV (180-250 nm) estas macromoléculas possuem duas bandas de absorção referentes a transições eletrônicas das ligações peptídicas ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$) que estão orientadas de acordo com os ângulos diedros Φ e ψ , que por sua vez dependem da estrutura terciária da proteína³⁶.

Fazendo a varredura das elipticidades em função dos comprimentos de onda é possível extrair informação a respeito da composição de estrutura secundárias da proteína e monitorar como estas estruturas respondem a variações de temperatura, a adição de solvente, a adição de pequenas moléculas, entre outras.

3. TÉCNICAS COMPUTACIONAIS

3.1 Docagem Molecular

Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas em busca de novas moléculas que possam ser de interesse da indústria farmacêutica, entretanto, quando se trata de testes *in vivo* ou *in vitro*, o custo financeiro para a obtenção de instrumentos e reagentes para a realização de experimentos é muito alto. Por conta disso, os cálculos computacionais de docagem molecular torna-se uma alternativa interessante que possibilita a predição de possíveis sítios de interação para determinado fármaco em um alvo molecular. A combinação das técnicas experimentais com as técnicas computacionais se torna uma aliada no processo de descobertas de novos fármacos e agilidade nos estudos de obtenção dos mesmos³⁷.

Para este trabalho, foi utilizado o Autodock4.2 para a realização dos cálculos computacionais, este software usa o campo e força semi-empírico Amber para encontrar as diferentes conformações do complexo de interação entre a macromolécula e o ligante. A energia de ligação ΔG é calculada como sendo a diferença entre a energia das conformações intramolecular do ligante e da macromolécula antes da ligação entre eles e a energia intermolecular do complexo formado depois da ligação, assim como ilustra a Figura 6³⁷.

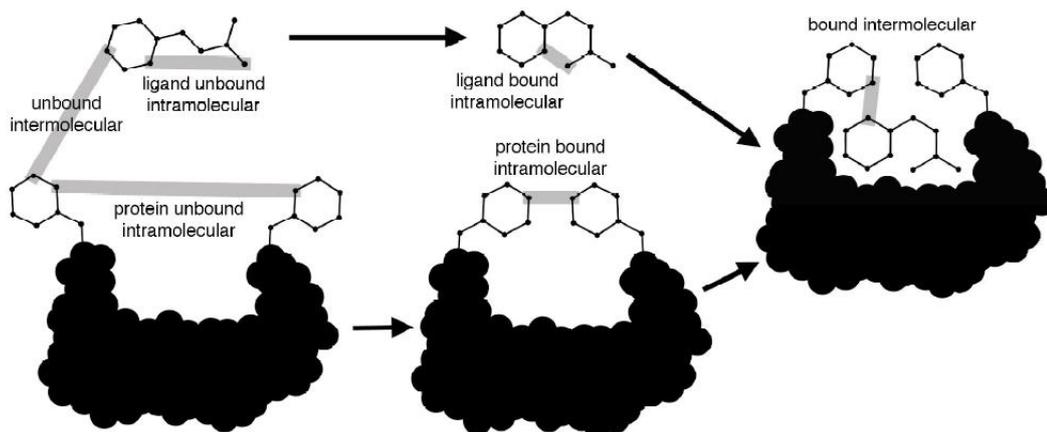


Figura 6: Modelo de cálculo para a energia livre de ligação ΔG (Fonte: Morris, 2009³⁷).

O campo de força para o cálculo da energia de ligação ΔG entre a macromolécula P e o ligante L, inclui seis pares de potenciais V e uma aproximação para o cálculo de entropia S³⁷.

$$\Delta G = (V_{ligado}^{L-L} - V_{desligado}^{L-L}) + (V_{ligado}^{P-P} - V_{desligado}^{P-P}) + (V_{ligado}^{P-L} - V_{desligado}^{P-L}) + \Delta S_{conformação} \quad (37)$$

O campo de força possui potenciais eletrostático, Van der Waals, Ligações de hidrogênio e de desolvatação³⁷:

$$V = I. \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + J. \sum_{i,j} E(t). \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + K. \sum_{i,j} \frac{q_i \cdot q_j}{\epsilon \cdot r_{ij}^2} + W. \sum_{i,j} (S_i \cdot V_j + S_j \cdot V_i). e^{-\frac{r_{ij}^2}{2 \cdot \sigma^2}} \quad (38)$$

Onde as constantes de ponderação I, J, E(t), K, W são aquelas otimizadas para calibrar a energia livre empírica baseada em um conjunto de complexos caracterizados experimentalmente. O primeiro termo é o potencial de Lenard-Jones, no qual os parâmetros A e B são tomados do campo de força Amber³⁷. O segundo termo se refere à ligação de hidrogênio, no qual os parâmetros C e D são obtido para garantir uma mínima energia de 5 kcal/mol em 1.9 Å para O – H e N – H, e de 1 kcal/mol em 2.5 Å para S – H. A função E(t) fornece a direcionalidade baseada no ângulo t da geometria de uma ligação de hidrogênio ideal³⁷. O terceiro termo é um potencial de Coulomb blindado para a interação eletrostática. O último termo é o potencial de dessolvatação baseado no volume de átomo (V) que cerca um dado átomo e abriga-o do solvente, ponderado por um parâmetro de solvatação (S) e o termo exponencial com fator de ponderação de distância $\sigma = 3.5 \text{ \AA}$ ³⁷.

O termo para a perda de entropia conformacional na ligação (ΔS_{conf}) é diretamente proporcional ao número de ligações rotativas na molécula (N_{tors}):

$$\Delta S_{conf} = W_{conf} \cdot N_{tors} \quad (39)$$

O número de ligações rotativas incluem todos os graus de liberdade de torção, incluindo rotações de átomos de hidrogênio polares e grupos hidroxilas, entre outros³⁷.

O campo de força de energia livre semi-empírico utilizado pelo programa AutoDock 4.2 faz uso de um tipo de pré-cálculo realizado pelo programa AutoGrid 4.2 para redução do custo computacional. O AutoGrid constrói mapas de grades para cada tipo de átomo presente na molécula de ligante a ser usada na docagem³⁷. Os mapas de grades consistem de uma matriz tridimensional de pontos espaçados regularmente, centrada (geralmente) no sítio ativo da proteína ou macromolécula em estudo. Cada ponto dentro dos mapas de grades registra a energia interação de um átomo de prova com a proteína³⁷.

Com os resultados obtidos por estes cálculos computacionais, pode-se relacionar a energia livre de ligação ΔG obtida pela modelagem computacional com a energia livre ΔG obtida experimentalmente e assim através da docagem molecular pode-se obter as informações dos aminoácidos participantes nas interações a serem descritas com o ligante supressor oferecendo as informações sobre o sítio de interação³⁷.

3.2 Dinâmica Molecular

Dinâmica Molecular é uma ferramenta utilizada para o estudo das interações e de movimento que utiliza os princípios da mecânica clássica e trata um sistema onde cada átomo está sujeito a forças descritas por diferentes potenciais. Esta ferramenta computacional é de grande importância para estudo de macromoléculas biológicas e principalmente para o estudo de interação proteína ligante, visto que o paradigma de interação chave-fechadura foi substituído por modelos de ajuste induzindo e modelo de seleção conformacional, sendo assim a dinâmica conformacional da proteína é bastante relevante para a interação com pequenas moléculas. Neste sentido, com a dinâmica molecular é possível modelar o complexo proteína – ligante levando em consideração a flexibilidade da macromolécula que é bastante limitada nos cálculos de docagem.²²

De forma geral, os potenciais utilizados para descrever os sistemas biológicos apresentam componentes referentes às ligações covalentes (estiramento, ângulo e diedros) e componentes relacionada a interações não covalentes como o potencial de Lenard-Jones e

potencial eletrostático (Figura 7). Os campos de força mais utilizados para simular o comportamento de proteína são o OPLS, o GROMOS e o AMBER. Conhecendo a energia potencial do sistema, através da equação 40 obtêm-se a força sobre cada átomo e assim é possível determinar suas posições em cada instante de tempo.

$$\vec{F} = -\vec{\nabla}V \quad (40)$$

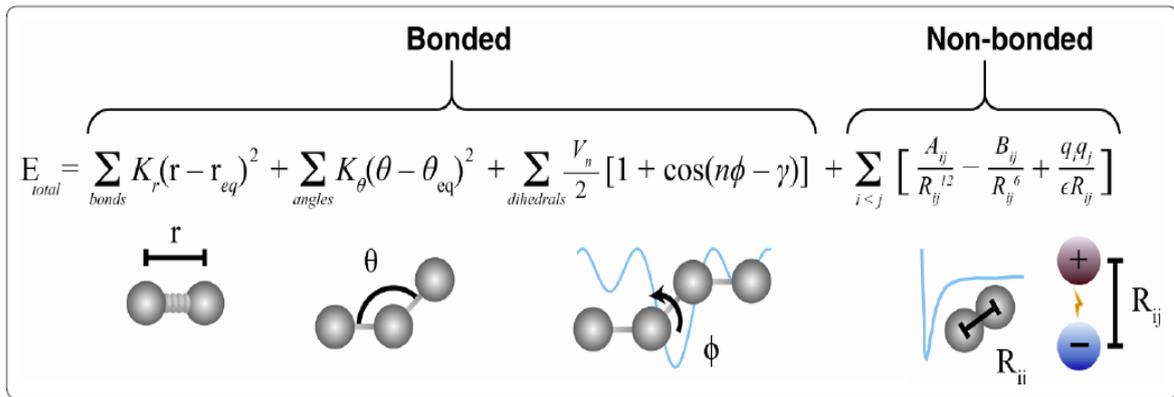


Figura 7: Forma geral dos campos de força utilizados na dinâmica molecular. (Fonte: Durrant & McCammon, 2011³⁸).

Utilizando o valor da força (F), as velocidades e as posições são atualizadas de acordo com o intervalo de tempo determinado (equações 41 e 42), que geralmente é da ordem de femtosegundos.³⁹

$$v\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = v\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + \frac{\Delta t}{m}F(t) \quad (41)$$

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \Delta t v\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) \quad (42)$$

O controle da temperatura é feito acoplando o sistema a um termostato, dessa maneira as velocidades dos átomos que compõe o sistema são re-escalados de forma a ajustar a energia cinética do sistema de acordo com a temperatura indicada no arquivo de submissão.

Durante a simulação, a pressão também pode ser controlada por meio do acoplamento do sistema a um barostato, que re-escala o volume do sistema para manter a pressão indicada no arquivo de submissão.

Uma forma de caracterizar e comparar as interações entre proteínas e ligantes é por meio a energia livre de cada sistema, visto que a energia livre está relacionada com a

constante de ligação (equação 22). Neste trabalho, a energia livre será calculada por meio do método de Poisson – Boltzman surface área (PBSA).⁴⁰

$$\Delta G_{\text{ligação}} = G_{\text{complexo}} - (G_{\text{proteína}} + G_{\text{ligante}}) \quad (43)$$

Onde G_{complexo} é a energia livre do complexo proteína-ligante, $G_{\text{proteína}}$ é a energia livre a proteína livre do ligante e G_{ligante} é a energia livre do ligante em solução. A energia livre referente a cada termo desta equação pode ser expresso da forma:

$$\begin{aligned} G_{\text{complexo}} &= \langle E_{MM} \rangle_{\text{complexo}} - TS_{\text{complexo}} + \langle G_{\text{solatação}} \rangle_{\text{complexo}} \\ G_{\text{proteína}} &= \langle E_{MM} \rangle_{\text{proteína}} - TS_{\text{proteína}} + \langle G_{\text{solatação}} \rangle_{\text{proteína}} \\ G_{\text{ligante}} &= \langle E_{MM} \rangle_{\text{ligante}} - TS_{\text{ligante}} + \langle G_{\text{solatação}} \rangle_{\text{ligante}} \end{aligned} \quad (44)$$

Onde $\langle E_{MM} \rangle$ é a média da energia potencial no vácuo, que por sua vez é composta pelos termos presentes no campo de força:

$$E_{MM} = E_{\text{covalente}} + E_{VDW} + E_{\text{elet}} \quad (45)$$

Para o cálculo de $\Delta G_{\text{ligação}}$ o termo de $E_{\text{covalente}}$ referente ao complexo cancela os termos de $E_{\text{covalente}}$ referentes a proteína e ao ligante, uma vez que os componentes são equivalentes.

O termo $\langle G_{\text{solatação}} \rangle$ é composto por uma contribuição polar e uma contribuição apolar. O termo polar (G_{polar}) é o resultado da solução da equação de Poisson-Boltzman para a proteína, para o ligante e para o complexo.

$$\nabla \cdot [\varepsilon(r)\nabla \cdot \varphi(r)] - \varepsilon(r)\kappa(r)^2 \sinh[\varphi(r)] + \frac{4\pi\rho(r)}{kT} = 0 \quad (46)$$

Onde $\varphi(r)$ é o potencial eletrostático, $\varepsilon(r)$ é a constante dielétrica, $\rho(r)$ é a densidade de carga e $\kappa(r)$ é o inverso do comprimento de Debye. Considerando que o sistema biológico estudado neste trabalho não é altamente carregado, temos que a energia térmica dos componentes do sistema é muito maior que a energia eletrostática.⁴⁰ Neste contexto, foi utilizado a aproximação de Debye-Huckel ($\varphi(r) \ll kT$) para linearizar a equação de Poisson Boltzmann, obtendo a aproximação $\sinh[\varphi(r)] \approx \varphi(r)$.

O termo apolar utilizado neste trabalho foi estimado como sendo proporcional a área acessível ao solvente (SASA), onde γ é a tensão superficial do solvente.

$$G_{apolar} = \gamma SASA + b \quad (47)$$

Para os cálculos de $\Delta G_{ligação}$ dos complexos estudados neste trabalho foi utilizado a ferramenta *g-mmpbsa*⁴⁰ que não inclui o cálculo dos termos entrópicos (TS) e por isso o valor de energia calculado não é absoluto. Os valores de $\Delta G_{ligação}$ obtidos com esta ferramenta são adequados para fazer comparações entre interações de diferentes ligantes por um sítio ou para comparar a energia de interação da mesma molécula por dois sítios distintos, como no caso deste trabalho.

4. INTERAÇÃO RSA – PIPERLONGUMINA

4.1 Materiais

A Piperlongumina (>97%) e a albumina de soro de camundongo (>99%) foram adquiridas da Sigma-Aldrich Chemical Co, bem como os reagentes fosfato de sódio dibásico (>99%), ácido cítrico anidro (>99%) e cloreto de sódio (>99%) utilizados na preparação da solução tampão. A água ultrapura utilizada no tampão foi preparada por um sistema de purificação de água (Direct-Q UV-3) da Millipore. O álcool metílico utilizado para preparar as soluções estoques de piperlongumina foi adquirido da Dinâmica Química Contemporânea LTDA

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação da amostra

A RSA foi reconstituída em tampão fosfato 50 mM, contendo 150 mM de cloreto de sódio dibásico e o pH foi ajustado para 7.4 com ácido cítrico anidro. A concentração das soluções estoques de RSA e de PPL foram medidas por meio do experimento de absorção de UV-Vis. O espectro de absorção da macromolécula e do ligante foi coletado no espectrofotômetro Cary-3E (Varian, Palo Alto, CA) à temperatura ambiente (298K), controlado por ar condicionado e monitorado por termômetro, equipado com lâmpadas de tungstênio e deutério. Duas cubetas de quartzo, cada uma com caminho óptico igual a 10 mm, foram utilizadas nos experimentos. Os espectros foram coletados varrendo os comprimentos de onda entre 200 e 500 nm, com tempo de integração de 0.333 s. O software Cary foi utilizado para coletar os dados medidos. A concentração da proteína foi obtida por meio da lei de Beer-Lambert aplicada a absorção no comprimento de onda de 280 nm, sabendo que o coeficiente de extinção molar (ϵ) da macromolécula neste comprimento é de $38.915 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.⁴¹ A concentração da solução estoque de PPL também foi obtida pela lei de Beer-Lambert, desta vez aplicada ao comprimento de onda de 326 nm, onde $\epsilon = 18.700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.2.2 Espectroscopia de Fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos com os espectrofluorímetros de estado estacionário ISS PC1 (Champaign, IL, USA). Uma cubeta de quartzo de 3 ml e com caminho óptico de 10x10 mm foi utilizada nos experimentos. Os aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina) são capazes de absorver luz na faixa do UV, mas com o comprimento de onda em 295 nm evita-se a excitação dos resíduos de tirosina e de fenilalanina e proporciona a excitação do único resíduo de triptofano das proteínas que estão sendo estudadas.

Nos experimentos de supressão de fluorescência para a determinação das constantes de ligação pelo modelo de equilíbrio de ligação, pequenas alíquotas de ligante foram adicionadas na solução de RSA a 4 μM de modo a gerar incrementos de 2 μM de ligante. As medidas foram realizadas nas temperaturas de 288, 298 e 308 K.

Os espectros de fluorescência sincronizada foram obtidos com o espectrofluorímetro Lumina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Uma cubeta de quartzo de 3 ml e com caminho óptico de 10x10 mm foi utilizada nos experimentos e a temperatura foi mantida em 298 K. O comprimento de onda de excitação variou de 240 a 350 nm e o intervalo entre os comprimentos de onda de excitação e emissão ($\Delta\lambda$) foi de 60 nm, para que o resíduo de Trp fosse analisado. Alíquotas de piperlongumina foram tituladas em uma amostra com concentração fixa de RSA (4 μM) de modo a gerar incrementos de 2 μM de ligante. Para a aplicação do modelo de densidade de ligação (BDF), pequenas alíquotas de ligante foram adicionadas nas soluções de RSA a 2, 4 e 8 μM .

Em todos os experimentos de fluorescência, o volume final de álcool metílico no tampão foi menor que 1%. A correção dos efeitos de filtragem interna foi feita como descrito na seção 2.4, por meio da equação 21.

As medidas do tempo de vida de fluorescência do triptofano da RSA foram realizadas no Mini-Tau (Edinburgh Instruments, Livingston, UK) acoplado ao sistema TCSPC (do inglês Time-Correlated Single Photon Counting). Aliquotas PPL foram tituladas em uma solução de RSA a 5 μM . A excitação foi realizada usando diodo pulsado de picosegundo de 340 nm e emissão usando um filtro de corte de 375 nm. Os perfis de decaimento de fluorescência foram ajustados utilizando o software F980 com a equação de decaimento multi-exponencial:

$$I_T = \sum_{i=1}^n \alpha_i \cdot e^{-\frac{T}{\tau_i}} \quad (48)$$

Onde τ_i é o tempo de vida de cada componente e α_i é a contribuição de cada componente para o total de decaimento de fluorescência. O tempo de vida médio foi então calculado utilizando a equação abaixo:

$$\tau_{medio} = \frac{\sum \alpha_i \tau_i^2}{\sum \alpha_i \tau_i} \quad (49)$$

4.2.3 Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular da RSA foram obtidos com o espectropolarímetro Jasco J-815 utilizando uma cubeta de quartzo desmontável de 0.01 cm de caminho óptico. O espectro foi obtido no intervalo de 200 a 260 nm a uma velocidade de 20 nm/min com 0.1 nm de resolução. Os espectros finais são resultados de 15 corridas e tiveram o sinal do tampão subtraído. As proporções de RSA:PPL adotadas nos experimentos foram de 1:0 e 1:8. A elipticidade molar média $[\Theta]$ foi calculada por meio da equação 50, onde Θ é a elipticidade coletada, $[P]$ é a concentração de RSA, l é o caminho óptico da cubeta e n é o número de resíduos de aminoácido da proteína.

$$[\Theta] = \frac{\Theta(mdeg)}{[P] \cdot l \cdot n} \quad (50)$$

As porcentagens de estrutura secundária foram calculadas com o CDPro utilizando o método CONTIN com a biblioteca SP43.⁴²

4.2.4 Docagem Molecular

A estrutura tridimensional da RSA utilizada foi obtida por modelagem comparativa utilizando como modelo a albumina equina (5HOZ) e relaxada com dinâmica molecular por 50 ns. A estrutura obtida ao fim da dinâmica foi utilizada para os cálculos de docagem. O software AutoDockTools do programa MGL Tools 1.5.4 foi utilizado para preparar a RSA adicionando átomos de hidrogênio polar e cargas parciais. A origem rígida da PPL foi automaticamente selecionada e não foram atribuídos possíveis giros e torções para a molécula, exceto pelos grupos metoxi presente em sua extremidade.

Os mapas foram gerados pelo programa AutoGrid 4.2 com um espaçamento de 0.375 Å e dimensão de 66 x 70 x 58 pontos. O programa AutoDock 4.2 foi utilizado para investigar o

sítio de interação entre os alcaloides e a RSA aplicando o Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA). As interações entre os aminoácidos presente nos sítios de interação e a PPL foram verificadas com o LigPlot⁴³.

4.2.5 Parametrização da PPL

Para os cálculos de dinâmica molecular, a topologia da PPL foi calculada por meio do servidor PRODRG e as cargas parciais foram substituídas por cargas obtidas por meio de cálculos *ab initio*. Para o cálculo das cargas, foi utilizado o pacote computacional de mecânica quântica Gamess2013^{44,45}, utilizando o formalismo de Hartree-Fock (HF)⁴⁶ junto da Teoria do Funcional Densidade (DFT)⁴⁷ com os funcionais B3LYP⁴⁸ para a piperina e M11 para a PPL. Foi utilizado como primeiro conjunto de bases o 6-31G (d,p) seguido de uma refinamento da estrutura com o conjunto de bases 6-311G (d,p). As geometrias otimizadas dos alcaloides foram determinadas com modelo de solvente PCM (do inglês polarizable continuum model) em água⁴⁹. O mapa de potencial eletrostático MEP e as cargas parciais foram determinados utilizando o método geodésico⁵⁰ juntamente com os mesmos funcionais, conjuntos de bases e modelo de solvente utilizado para a otimização da estrutura.

4.2.6 Dinâmica Molecular

As coordenadas iniciais dos complexos proteína-ligante foram as obtidas pela docagem molecular submetida ao cálculo de dinâmica utilizando a versão 5.1.4 do GROMACS³⁹, com o campo de força gromos53a6⁵¹. O sistema foi solvatado com o modelo de água SPC⁵² em uma caixa dodecaédrica com as dimensões das arestas posicionadas no mínimo a 1 nm de distância da proteína. O sistema foi neutralizado com Na⁺ e Cl⁻ na concentração de 150 mM.

A minimização de energia foi realizada com o algoritmo steepest descent com 5000 passos e tolerância de 10 kJ/mol. A primeira etapa de equilibração foi realizada no ensemble NVT, em que durante os 100 ps de simulação a temperatura foi mantida a 300 K (acoplada ao termostato de V-rescale⁵³). As velocidades aleatórias foram geradas pela distribuição de Maxwell-Boltzman. Posteriormente a equilibração foi feita no ensemble NPT, em que durante os 100 ps de simulação a temperatura foi mantida a 300 K e a pressão a 1 atm (acoplada ao barostato Parrinello-Rahman⁵⁴). Para interações de curto alcance o cut-off foi 12 Å e as interações eletrostáticas de longo alcance foram tratadas com PME⁵⁵. O algoritmo de LINCS foi utilizado para restringir as ligações⁵⁶. Nos passos de equilibração a posição dos átomos pesados foi restringido aplicando um potencial de 1000 kJ.mol⁻¹.nm⁻². Após as etapas de

equilíbrio, as restrições foram desligadas e a dinâmica foi realizada com passos de 2 fs. Os cálculos de root mean square deviation (RMSD), distância e ligações de hidrogênio foram executados pelos programas do GROMACS: *gmx rms*, *gmx distance* e *gmx hbond*, respectivamente. Os cálculos de estrutura secundária foram feitos pelo plug-in STRIDE do VMD.

Os cálculos de dinâmica molecular foram realizados na estrutura computacional do GRID UNESP.

4.3 Resultados

A descrição da interação RSA – PPL começou a ser feita por meio do acompanhamento do sinal de fluorescência relativo ao Trp214. Como discutido na seção 2.2 existem algumas vantagens em acompanhar o sinal do resíduo de triptofano, uma delas é eficiência quântica que é maior quando comparada a outros aminoácidos como a tirosina e a fenilalanina. Para selecionar a excitação apenas do resíduo de triptofano, irradia-se a amostra com onda eletromagnética no comprimento de onda de 295 nm.

A Figura 8-a mostra o efeito da adição de PPL na amostra de RSA. A primeira observação é que a adição de PPL ocasionou a supressão do sinal de fluorescência do Trp214. Mas além da diminuição do sinal de fluorescência, a adição de PPL também causou o deslocamento no valor máximo das intensidades para comprimentos de onda maiores que 340 nm, o que é conhecido como “red shift”. Este mesmo comportamento foi observado no espectro de fluorescência sincronizada, como mostra a Figura 8-b.

Deslocamentos no máximo de intensidade de fluorescência são frequentemente relatados na literatura e podem ter interpretações físicas relevantes. Especificamente na área de estudo de interações proteína – ligante este fenômeno é geralmente interpretado qualitativamente como resultado de mudanças conformacionais que induzem alterações na polaridade no microambiente onde o fluoróforo está localizado. Seguindo este raciocínio, o deslocamento para o vermelho é interpretado como resultado da exposição do fluoróforo a um ambiente mais hidrofílico, enquanto que o deslocamento para o azul é interpretado como resultado da exposição do fluoróforo a um ambiente mais hidrofóbico.⁵⁷

Entretanto, neste trabalho foi verificado que no caso em que os espectros de absorção do ligante e da proteína apresentam uma grande faixa de intersecção e são assimétricos (Figura 9), os deslocamentos de máximo de intensidade são apenas “ilusões de óptica” causadas pelo efeito de filtro interno.

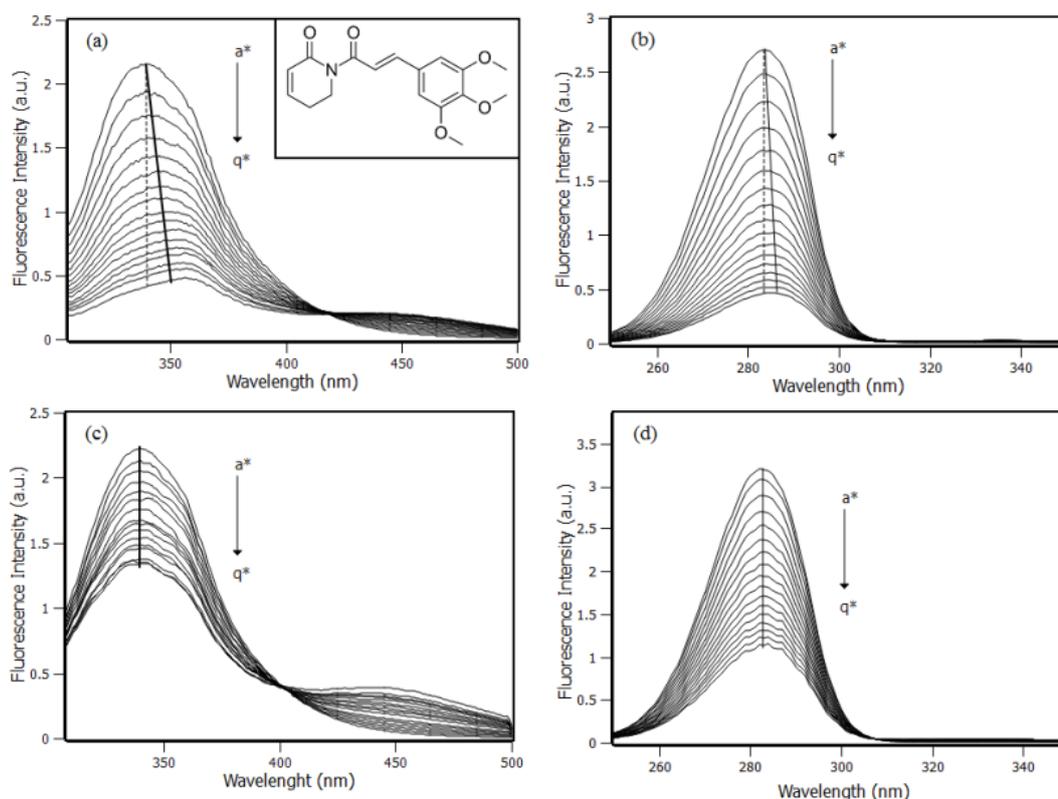


Figura 8: (a) Espectro de emissão de fluorescência antes da correção de filtro interno da RSA com incrementos de $2 \mu\text{M}$ de PPL ($a^* \rightarrow q^*$: de 0 a $32 \mu\text{M}$), $[\text{RSA}] = 4 \mu\text{M}$, $T = 298 \text{ K}$ e $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$. A linha tracejada marca a intensidade em 340 nm e a linha sólida marca os deslocamentos nos máximos da intensidade de cada espectro. O inset da figura mostra a estrutura da PPL. (b) Espectro de fluorescência sincronizada antes da correção de filtro interno da RSA com incrementos de $2 \mu\text{M}$ de PPL ($a^* \rightarrow q^*$: de 0 a $32 \mu\text{M}$), $[\text{RSA}] = 4 \mu\text{M}$, $T = 298 \text{ K}$, $\lambda_{\text{exc}} = 240 - 350 \text{ nm}$ e $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$. A linha tracejada marca a intensidade da emissão em $\lambda_{\text{exc}} = 283 \text{ nm}$ e a linha sólida marca o deslocamento no máximo de intensidade de cada espectro. (c) Espectro de emissão de fluorescência da RSA após a correção de filtro interno, onde a linha sólida marca o máximo das intensidades em 340 nm . (d) Espectro de fluorescência sincronizada após a correção de filtro interno, onde a linha sólida marca o máximo das intensidades de fluorescência em $\lambda_{\text{exc}} = 283 \text{ nm}$.

Aplicando a correção de filtro interno para $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 305 - 500 \text{ nm}$ nos espectros de emissão de fluorescência da Figura 8-a verificou-se que o máximo de intensidade foi mantido em 340 nm (Figura 8 - c). O comprimento de onda do máximo de emissão também foi mantido quando o espectro de fluorescência sincronizada da Figura 8-b foi corrigido para $\lambda_{\text{exc}} = 240 - 350 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 300 - 410 \text{ nm}$, como mostra a Figura 8-d o máximo de emissão ocorreu quando a amostra era excitada em 283 nm independente da quantidade de

PPL adicionada à amostra. Com estes experimentos foi verificado que os deslocamentos na intensidade máxima de fluorescência foram eliminados ao aplicar a correção do filtro interno em todos os comprimentos de onda do espectro e, portanto a hipótese de mudança no microambiente do Trp214 não foi confirmada.

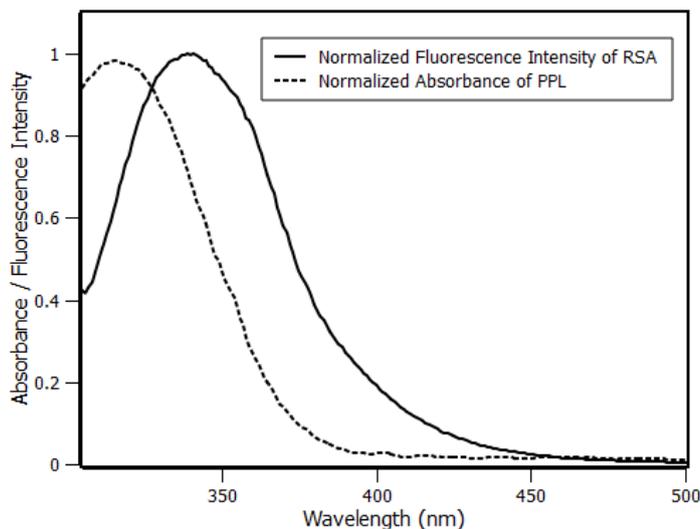


Figura 9: Espectro de emissão de fluorescência da RSA (linha sólida) e espectro de absorção da PPL (linha tracejada). Ambos os espectros foram normalizados.

Os experimentos de supressão podem fornecer mais do que dados qualitativos, quando aplicamos os modelos discutidos na seção 2.2 aos espectros de fluorescência corrigidos é possível extrair informações quantitativas sobre a interação proteína-ligante. A primeira análise a ser feita é a comparação dos gráficos de Stern-Volmer em diferentes temperaturas. Esta análise pode ser feita utilizando o máximo das intensidades de fluorescência ou as áreas abaixo dos espectros, como mostrado na Figura 9. Posteriormente veremos o efeito do uso da razão das áreas no tratamento dos dados. Mas neste momento vamos nos concentrar na interação.

Verificar como o sistema reage ao aumento da temperatura pode nos fornecer muitas informações a respeito da interação (Figura 10). No caso da interação RSA – PPL, o aumento da temperatura provocou o aumento na inclinação das retas de Stern-Volmer, conhecida como K_{sv} (Tabela 1). Ou seja, o fato de aumentar a temperatura aumentou o efeito de supressão de fluorescência.

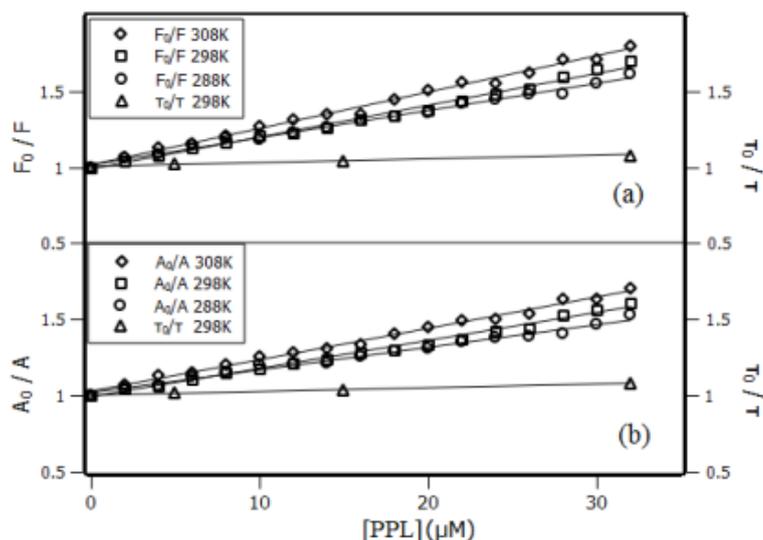


Figura 10: Gráficos de Stern-Volmer nas temperaturas de 288, 298 e 308 K. (a) Razão das intensidades de fluorescência em 340 nm. (b) Razão das áreas abaixo dos espectros de fluorescência (de 305 a 400 nm). Na ordenada direita dos gráficos foi plotada a razão dos tempos de vida do Trp214.

A primeira hipótese que podemos fazer sobre este sistema é que a supressão é resultado de colisões entre o fluoróforo e o ligante, de tal forma que a agitação causada pelo aumento de temperatura favorece a colisão entre eles. Sendo assim, a supressão deve ser maior ao elevar a temperatura e neste caso não existiria formação de complexo proteína-ligante.

A segunda hipótese é que a temperatura favorece a formação do complexo proteína – ligante porque a termodinâmica da interação é dirigida entropicamente. Sendo assim, ao aumentar a temperatura o termo entrópico estaria favorecendo a diminuição da energia livre. Neste caso o complexo RSA – PPL estaria sendo formado

Tabela 1: Constante de Stern-Volmer (K_{SV}), constante bimolecular (k_q), constante de ligação (K_a) e número de sítios calculados por meio da intensidade de fluorescência em 340 nm e por meio da área abaixo dos espectros de fluorescência no intervalo de 300 a 400 nm.

Temp. (K)	$K_{SV}(\times 10^4 M^{-1})$		$k_q(\times 10^{12} M^{-1}s^{-1})$		$K_a (\times 10^4 M^{-1})$		n	
	Intens.	Areas	Intens.	Areas	Intens.	Areas	Intens.	Areas
288	1.78±0.04	1.49±0.04	2.65±0.01	2.22±0.01	1.72±0.07	1.49±0.04	0.83	0.86
298	2.11±0.05	1.83±0.04	3.14±0.01	2.72±0.01	2.24±0.09	1.84±0.07	1.02	0.97
308	2.38±0.05	2.08±0.05	3.54±0.01	3.09±0.01	2.54±0.09	2.17±0.09	0.88	0.80

Para resolver a esta questão, recorreremos ao uso da técnica de fluorescência resolvida no tempo (Figura 11). Como detalhado na seção 2.2.2, supressões resultados de colisões apresentam $\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau}$, enquanto que supressões resultado de formação de complexo apresentam $\frac{\tau_0}{\tau} \sim 1$. Como mostrado na ordenada direita da Figura 10, a relação de $\frac{\tau_0}{\tau}$ para o sistema RSA – PPL foi de aproximadamente 1 ao longo da titulação. Outra característica de supressões causadas por colisões é que a constante bimolecular (k_q), que foi definida na seção 2.2.2, é da ordem de $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Para este sistema, k_q calculado é duas ordens de grandeza maior.

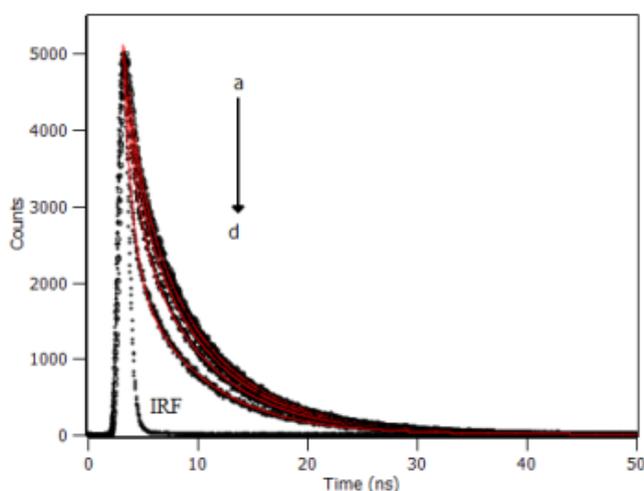


Figura 11: Decaimento de fluorescência resolvida no tempo de (a) RSA e PPL nas estequiometrias de 1:0, 1:1, 1:3 e 1:8 (a \rightarrow d), com $[\text{RSA}] = 4 \mu\text{M}$, $T = 298 \text{ K}$ e $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$. IRF indica a função resposta do instrumento e a linha sólida vermelha é ao ajuste bi-exponencial para cada decaimento.

Os valores dos tempos de vida obtidos a partir do ajuste bi-exponencial estão apresentados na Tabela 2, junto dos valores de tempo médio (τ_{medio}) calculados a partir da equação 49.

Tabela 2: Tempos de vida obtidos a partir ajuste bi-exponencial dos dados de fluorescência resolvida no tempo e os tempos de vida médios obtidos a partir da equação 49.

RSA : PPL	α_1	τ_1	α_2	τ_2	τ_{medio}
1:0	0.08	1.51	0.92	6.81	6.71
1:1	0.09	1.33	0.91	6.74	6.64
1:3	0.10	1.11	0.90	6.60	6.50
1:8	0.13	0.81	0.86	6.28	6.28

Sendo assim, foi verificado para o sistema RSA – PPL que a supressão é resultado da formação de complexo e, portanto a segunda hipótese é a que melhor descreve este sistema.

Uma vez que a formação do complexo foi verificada, é possível aplicar o modelo de equilíbrio de ligação para descrever a interação. Com o uso da equação 11 aplicada aos dados de fluorescência, os valores de constante de ligação (K_a) foram obtidos a partir do coeficiente linear das retas apresentadas na Figura 12.

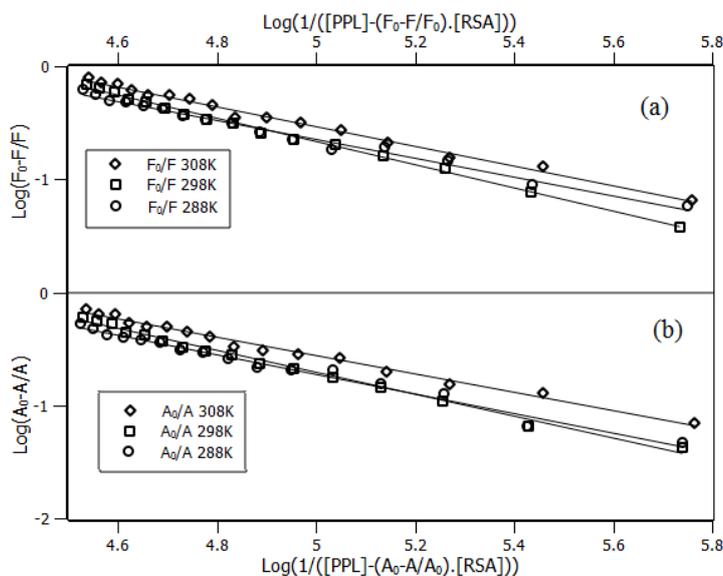


Figura 12: Gráficos de duplo-logaritmo utilizando (a) As intensidades em 340 nm e (b) As áreas abaixo dos espectros (de 305 a 400 nm).

Os valores de K_a , organizados na Tabela 1, mostram novamente o aumento da constante em função do aumento da temperatura. Os valores das constantes foram inseridos na equação de Van't Hoff (equação 24) e a partir do ajuste linear dos pontos (Figura 13) foram obtidos os valores da variação de ΔH e ΔS por meio dos coeficientes angular e linear, respectivamente.

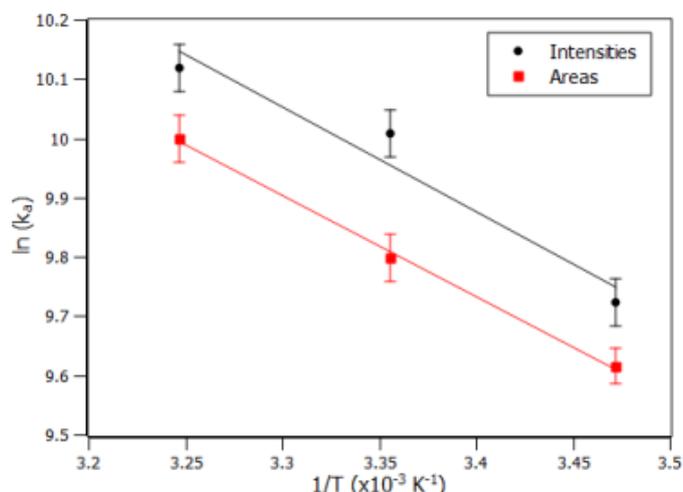


Figura 13: Gráficos de Van't Hoff obtidos a partir das intensidades de fluorescência em 340 nm (círculos pretos) e a partir das áreas abaixo dos espectros (de 305 a 400 nm) (quadrados vermelhos).

As linhas sólidas são os ajustes lineares.

Os parâmetros termodinâmicos (Tabela 3) apontam que a variação de energia livre ΔG foi de -23.34 a -25.96 kJ/mol no intervalo de temperatura de 288 a 308 K e que a maior contribuição foi da componente entrópica (37.97 a 40.61 kJ/mol). Sendo assim, as interações presentes no complexo RSA – PPL devem ser em sua maioria de natureza hidrofóbica. A interação da molécula de PPL com a proteína HSA foi estudada anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa.⁵⁸ Apesar de ambas as proteínas serem albuminas e apresentarem alta identidade na estrutura primária (73%), o resultado do balanço termodinâmico mostrou alta influencia da componente entálpica e pouca influência da componente entrópica levando a conclusão de que as principais interações para o sistema HSA – PPL são as interações de van der Waals e ligações de hidrogênio.

Tabela 3: Parâmetros termodinâmicos (ΔG , ΔH e ΔS) da interação RSA – PPL e a comparação dos resultados obtidos utilizando a intensidade em um ponto e a área abaixo do espectro.

T (K)	ΔG° (kJ/mol)		ΔH° (kJ/mol)		ΔS° (J/mol.K)		T. ΔS° (kJ/mol)	
	Intens.	Areas	Intens.	Areas	Intens.	Areas	Intens.	Areas
288	-23 ± 1	-23 ± 1					38 ± 3	37 ± 1
298	-25 ± 1	-24 ± 1	15 ± 3	14 ± 1	132 ± 11	129 ± 2	39 ± 3	38 ± 1
308	-26 ± 1	-26 ± 1					41 ± 4	40 ± 1

Em relação ao uso das áreas para os cálculos mostrados até o momento, verificou-se que os resultados convergiram. Utilizar a abordagem das áreas pode ser muito interessante

principalmente em sistemas onde o ligante não apresenta a fluorescência, ou sua fluorescência não interfere na fluorescência da sonda analisada. Esta abordagem pode ser extremamente útil para analisar sistemas que apresentam variações no máximo de intensidade mesmo depois da correção de filtragem interna, uma vez que utilizando a área abaixo dos espectros diminui-se o erro associado a apenas um comprimento de onda máximo que está se deslocando.

Para explorar um pouco mais a respeito da interação RSA – PPL foi aplicado o modelo de densidade de ligação aos dados de fluorescência (Seção 2.6). Para isso, foram feitas titulações de PPL em 3 sistemas com concentrações de RSA diferentes (Figura 14). Para esta análise foram feitas várias linhas horizontais, como mostrado na Figura 14. Cada linha horizontal marca a mesma variação de fluorescência ΔF para cada amostra de RSA (a 2, 4 e 6 μM). Intuitivamente entende-se que a amostra com maior concentração de RSA deve ter maior concentração de PPL para apresentar a mesma variação de fluorescência ΔF das outras amostras com concentrações menores de RSA. A linha horizontal representa graficamente a sentença acima.

No modelo de BDF considera-se que se os sistemas apresentam a mesma supressão de fluorescência ΔF , então eles têm a mesma distribuição de ligante por proteína ($\sum v_i$) e a mesma concentração de ligantes livres ($[L_{\text{free}}]$). Sendo assim, cada reta horizontal permite a aplicação da lei de conservação de massas (equação 25) resultando em várias retas (inset da Figura 14) cujos coeficientes angulares são $\sum v_i$ e os coeficientes lineares são $[L_{\text{free}}]$.

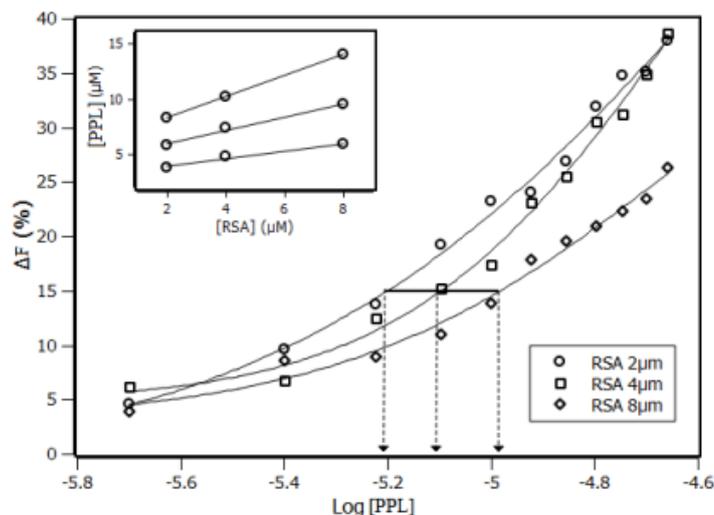


Figura 14: Porcentagem de supressão de fluorescência em função do logaritmo da concentração de PPL titulada nas amostras de RSA a 2, 4 e 8 μM . A linha horizontal indica a mesma porcentagem de supressão para diferentes concentrações de RSA. O inset exemplifica as retas referentes à equação de conservação de massa obtidas para três porcentagens de supressão fluorescência.

Encontrar o numero de ligantes ligados por proteína e a concentração de ligantes livres é o primeiro passo para a caracterização do sistema, pois com estes valores é possível utilizar o modelo de Scatchard e Hill para descrever o complexo. Aplicando o modelo de Scatchard (Figura 15 – a) verifica-se que a curva obtida é uma função côncava, o que indica que o sistema RSA – PPL apresenta cooperativada positiva entre os sítios de interação. Entretanto, com o modelo de Scatchard não é possível determinar quantos sítios de interação a PPL acessa. Para esta tarefa, utilizamos o modelo de Hill (Equação 27).

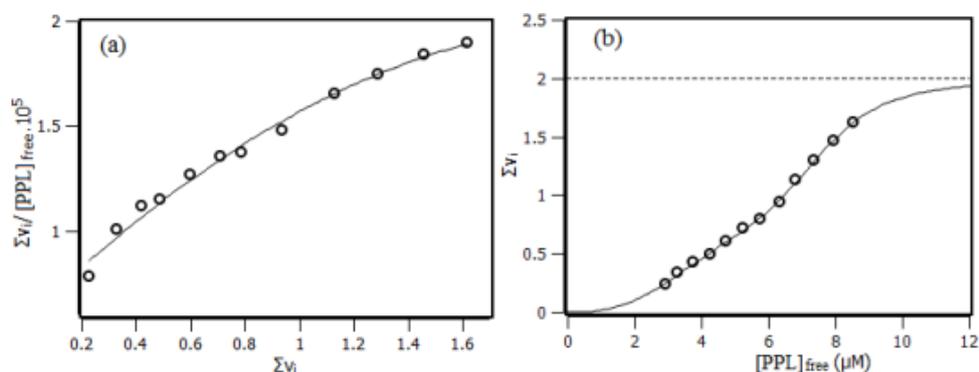


Figura 15: (a) Gráfico de Scatchard da interação RSA – PPL e (b) Gráfico de Hill da interação RSA – PPL.

O modelo de Hill aplicado nos dados de $\sum v_i$ e $[L_{free}]$ foi ajustado de acordo com a Equação 27 (Figura 15). A curva obtida para o ajuste dos dados foi:

$$\sum v_i = \frac{1(2.3 \cdot 10^5 [L_{free}])^{2.93}}{1 + (2.3 \cdot 10^5 [L_{free}])^{2.93}} + \frac{1(1.3 \cdot 10^5 [L_{free}])^{8.15}}{1 + (1.3 \cdot 10^5 [L_{free}])^{8.15}}$$

Com isso, o modelo de Hill mostrou a presença de dois sítios, com cooperatividade positiva, uma vez que $h > 1$. Além disso, as constantes de afinidade calculadas para os sítios foram $k_1 = (2.3 \pm 0.1)10^5 \text{ M}^{-1}$ e $k_2 = (1.3 \pm 0.1)10^5 \text{ M}^{-1}$.

O modelo de BDF também foi aplicado no sistema HSA – PPL estudado anteriormente. Neste caso, a interação da PPL com a HSA apresentou apenas um sítio de interação com constante de afinidade de $(4.5 \pm 0.1)10^6 \text{ M}^{-1}$.⁵⁸

Uma vez detectado a cooperatividade positiva na interação da PPL com a RSA, o próximo passo foi estudar se a interação provocou mudanças conformacionais na proteína. Para isso, a técnica de dicroísmo circular (Figura 16) foi utilizada para analisar os espectros de RSA pura e RSA com PPL na proporção 1:8. Ambos os espectros mostraram o padrão característico de α -hélice formado por uma banda negativa em 208 nm e em 222 nm referentes às transições eletrônicas das ligações peptídicas $n \rightarrow \pi$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ o que mostrou que após a adição de PPL a estrutura da RSA foi preservada.

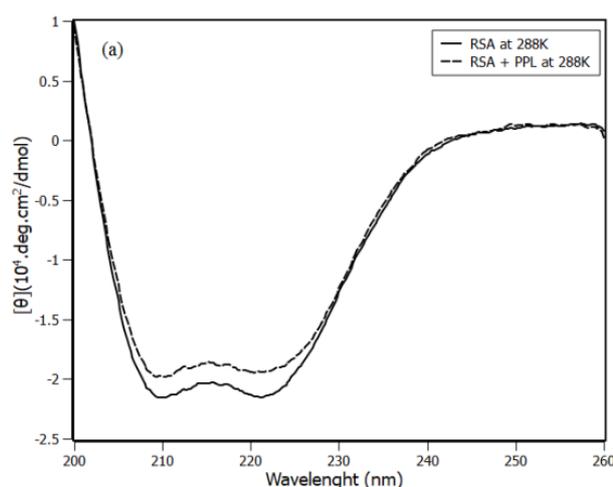


Figura 16: Dicroísmo circular da RSA representado com linha sólida e da RSA com PPL na estequiometria de 1: 8 representado com linha tracejada.

A deconvolução dos espectros de dicroísmo (Tabela 4) mostrou que a variação do conteúdo de α -hélice foi pequena, de 63% da RSA pura para 61% quando a PPL foi adicionada a amostra. Estes dados mostraram que a cooperatividade obtida pelas análises de Hill não foi acompanhada de grandes mudanças conformacionais na estrutura da proteína. Os dados de estrutura secundária obtidos após a dinâmica molecular serão discutidos posteriormente.

Tabela 4: Porcentagens de estruturas secundárias obtidas experimentalmente por dicroísmo circular (CD) da RSA pura e com a PPL na estequiometria 1:8. A tabela também mostra as porcentagens de estruturas secundárias obtidas computacionalmente depois de executar 50 ns de dinâmica molecular (MD) da RSA pura e a RSA com PPL no sítio 1 (MD 1) e sítio 2 (MD 2).

Amostra	α-hélice	Turns	Random Coil
RSA 298K – CD	63%	17%	17%
RSA+PPL 298K – CD	61%	18%	18%
RSA 298K – MD	65%	17%	16%
RSA+PPL 298K – MD 1	64%	19%	17%
RSA+PPL 298K – MD 2	64%	16%	19%

A docagem molecular foi utilizada para encontrar os possíveis sítios de interação nas redondezas do resíduo de Trp214. O cálculo de docagem revelou dois possíveis sítios de interação com rankings de energia de -4.75 e -4.67 kcal/mol referentes ao Sítio 1 e Sítio 2.

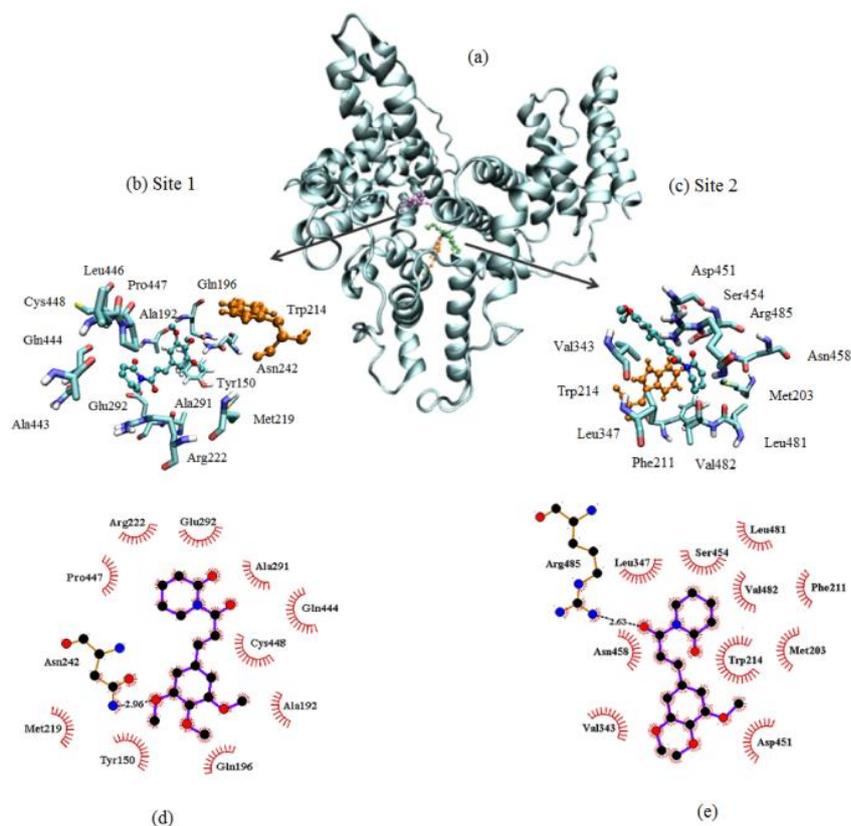


Figura 17: (a) Resultado da docagem molecular com o resíduo de Trp214 destacado em laranja, a PPL no sítio 1 em lilás e no Sítio 2 em verde. Resíduos de aminoácidos que compõe o microambiente de interação da PPL no (b) Sítio 1 e (c) Sítio 2. Principais interações encontradas pelo LigPlot entre a PPL e os resíduos de aminoácido no (d) Sítio 1 e (e) Sítio 2.

O sítio 1 é composto pelos aminoácidos apolares: Leu446, Met219, Trp214, Ala443, Ala291, Cys448, Pro447, Gln196, Gln44; e por aminoácidos polares: Glu292, Arg222 e Asn242. Tal composição de aminoácidos sugere que interações de caráter hidrofóbico são relevantes para a interação. Além disso, a análise das interações mostrou uma ligação de hidrogênio entre a PPL e o Asn242, que posteriormente nas análises de dinâmica molecular, voltaremos a discutir a presença de ligações de hidrogênio.

A análise do sítio 2 mostra que o microambiente de interação é composto por resíduos apolares: Trp 214, Val343, Ser454, Leu347, Leu481, Val482, Phe211 e Met203; e também de resíduos polares: Arg485, Asp451 e Asn458. A característica de aminoácidos apolares também está presente no sítio 2, o que reforça a análise da contribuição hidrofóbica para a interação RSA – PPL. No sítio 2 também foi observado uma ligação de hidrogênio entre a PPL e a Arg485.

Com as estruturas obtidas por docagem molecular da PPL nos sítio 1 e 2 da RSA, o próximo passo foi fazer a análise da dinâmica molecular destes sistemas. Para isso a molécula de PPL foi submetida no servidor PRODRG para gerar o arquivo de topologia compatível com o campo de força gromos53A6 que seria utilizado na dinâmica. As cargas parciais da PPL calculadas pelo PRODRG foram substituídas pelas cargas parciais obtidas pela cálculo de DFT.

Para verificar se o cálculo de primeiros princípios da PPL tinha convergido para a estrutura e densidade de cargas compatível com o que observamos experimentalmente, algumas análises foram feitas. A primeira delas mostra que a estrutura otimizada pelos cálculos apresenta uma estrutura planar, que era o esperado uma vez que a ressonância causada pelas duplas ligações na cadeia da PPL não permite liberdade de rotação (Figura 18). A segunda análise foi o cálculo das transições eletrônicas (Figura 18 –c) que quando aproximada para forma de gaussiana reproduziram o espectro experimental de absorção da PPL em água. Portanto, os parâmetros escolhidos para a parametrização da molécula geraram resultados compatíveis com os observados experimentalmente. Sendo assim, as cargas parciais obtidas pelo cálculo foram inseridas na topologia da PPL.

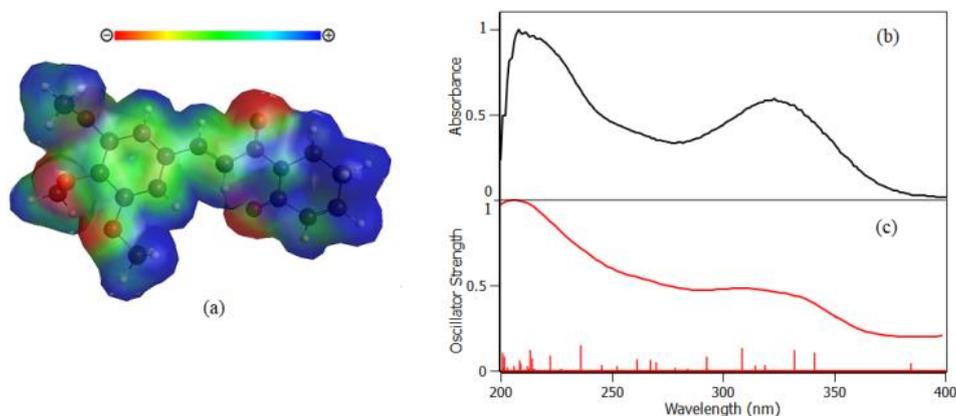


Figura 18: (a) Estrutura da PPL otimizada por cálculos de primeiros princípios e o mapa de potencial eletrostático (MEP). (b) Espectro experimental de absorção da PPL em água. (c) Transições eletrônicas da PPL calculadas por TD-DFT .

Com a topologia da PPL calculada, o complexo RSA – PPL foi submetido aos cálculos de dinâmica molecular com a PPL no sítio 1 e no sítio 2, individualmente.

A estabilidade do sistema foi observada por meio das análises de root mean square deviation (RMSD). O RMSD da proteína livre (Figura 19) mostra que nos primeiros 20 ns de simulação a estrutura da RSA sofreu variações quando comparada a estrutura inicial da

dinâmica e após este período o RMSD oscilou em torno de 0.6 nm. O RMSD da RSA com a PPL inserida no sítio 1 atingiu estabilidade logo nos primeiros 10 ns de dinâmica e oscilou em torno de 0.25 nm. Nas simulações da PPL inserida no sítio 2, a estrutura da RSA estabilizou nos primeiros 10 ns e manteve-se estável oscilando em torno de 0.3 nm ao longo da dinâmica.

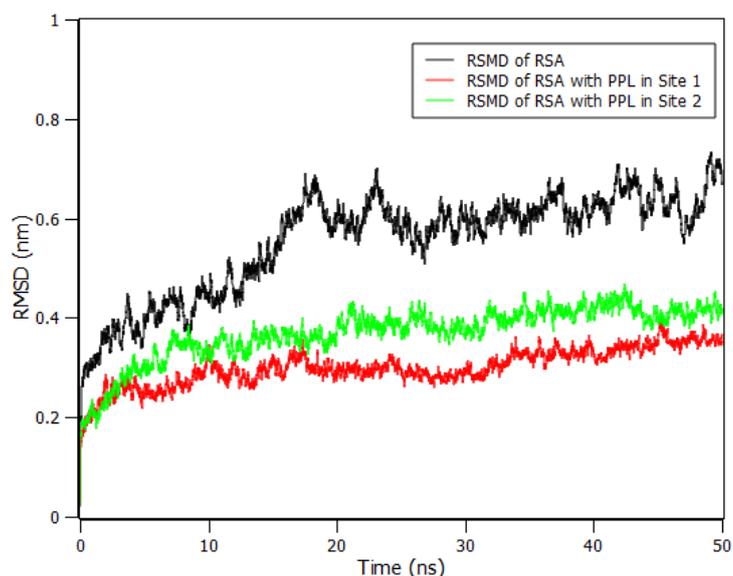


Figura 19: RMSD calculado para o “backbone” da RSA livre (em preto), da RSA com a PPL inserida no sítio 1 (em vermelho) e da RSA com a PPL inserida no sítio 2 (em verde).

O cálculo global das estruturas secundárias após os 50 ns de dinâmica molecular (Tabela 4) mostrou que para a estrutura livre de ligante, a porcentagem de α -hélice foi de 65%. Após a dinâmica com a PPL inserida nos sítios 1 e 2, a porcentagem de α -hélice foi de 64%. Uma pequena variação de α -hélice para turn nos resíduos Arg222, Asp237 e Val238 foi observada localmente quando a PPL foi inserida no sítio 1 (Figura 20). De forma geral, as estruturas secundárias nos locais de interação da PPL nos sítios 1 e 2 (Figura 20) sofreram poucas variações.

Assim como os dados de dicroísmo circular, os dados de dinâmica molecular não apontaram para nenhuma mudança considerável na estrutura secundária da RSA. O que era esperado, visto que a RSA é uma proteína grande (584 Aa) e possui 17 ligações dissulfeto que “amarram” a estrutura tridimensional desta proteína.

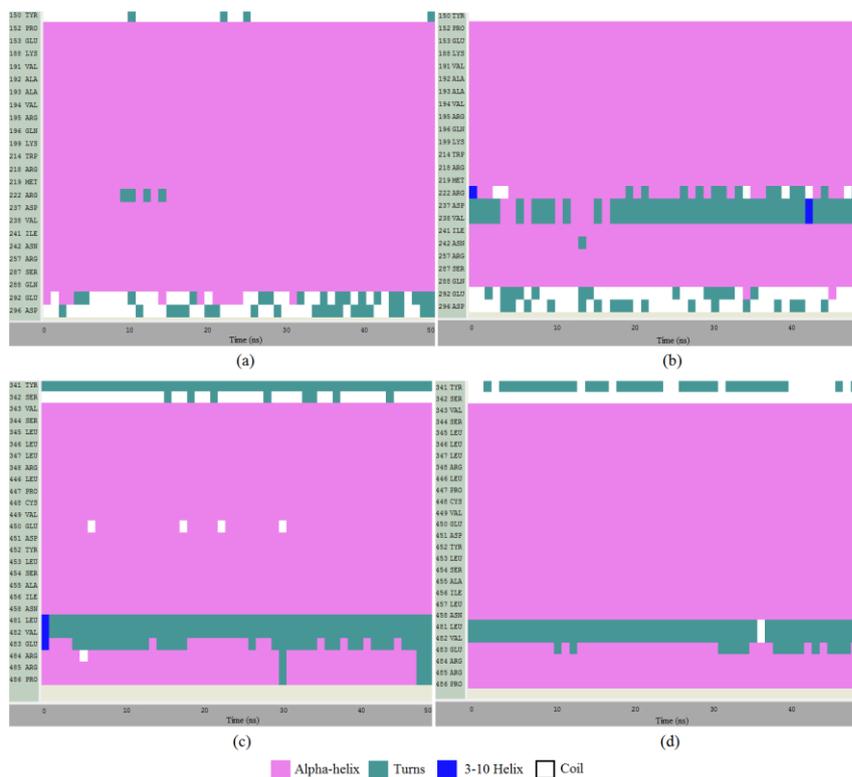


Figura 20: Estrutura secundária dos aminoácidos que compõe o sítio 1 durante os 50 ns de dinâmica molecular da (a) RSA livre de ligante e (b) RSA com a PPL inserida no sítio 1. Estrutura secundária dos aminoácidos que compõe o sítio 2 durante os 50 ns de dinâmica molecular da (c) RSA livre de ligante e (d) RSA com a PPL inserida no sítio 2.

Para verificar a estabilidade do complexo RSA – PPL, a distância do centro de geometria (COG) da proteína ao COG da PPL foi calculada ao longo da dinâmica (Figura 21). Este dado mostrou que a PPL no sítio 1 tendeu a se deslocar por volta de 0.2 nm para o interior da proteína. O mesmo foi observado na simulação da RSA com PPL no sítio 2.

O inseto da Figura 21 mostra as ligações de hidrogênio feitas entre a RSA e a PPL no sítio 1 e no sítio 2. Os dados da dinâmica molecular mostraram que no sítio 1 a PPL faz entre 0 e 1 ligação de hidrogênio 83 % do tempo de simulação. Já no sítio 2, a PPL faz entre 0 e 1 ligação de hidrogênio 64 % do tempo de simulação. Este número é relativamente baixo quando levamos em conta que a PPL tem 5 aceptores de ligação de hidrogênio. E, portanto as ligações de hidrogênio não são as principais responsáveis pela formação do complexo RSA – PPL.

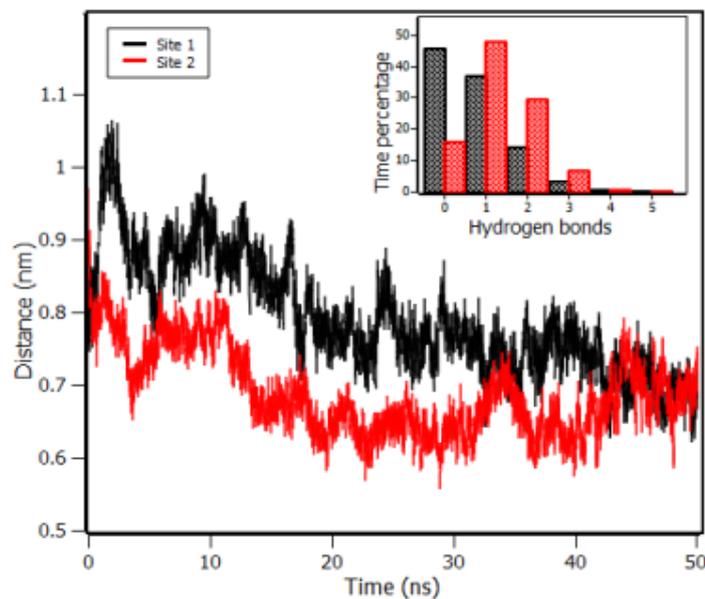


Figura 21: Distância entre os centros de geometria (COG) da RSA e PPL no sítio 1 (em preto) e no sítio 2 (em vermelho) ao longo dos 50 ns de dinâmica molecular. O inset mostra a porcentagem de tempo no qual a RSA e PPL fazem ligação de hidrogênio no sítio 1 (em preto) e no sítio 2 (em vermelho).

4.4 Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho revelaram a importância da correção do efeito de filtragem interna em todos os pontos do espectro, seja ele de emissão ou sincronizado. A correção do efeito de filtragem deve ser feita antes de qualquer análise de deslocamento no máximo de intensidade já que os efeitos de deslocamento podem ser ocasionados puramente por filtragem do ligante. Neste trabalho também foi mostrado a convergência dos resultados quando se trabalha com as intensidades de fluorescência em um único comprimento de onda e quando se trabalha com a área abaixo da curva de emissão. Com relação ao sistema RSA – PPL foi verificado a interação do ligante com a macromolécula. O modelo de Van't Hoff aplicado aos dados de fluorescência mostrou que a interação é dirigida entropicamente. O modelo de BDF aplicado aos dados de supressão mostrou que a PPL interage com dois sítios de modo cooperativo com constantes de afinidade $2.3 \cdot 10^5$ e $1.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Dois sítios prováveis de interação foram calculados com a ferramenta de docagem molecular. Os ambientes de interação dos dois sítios apresentaram alto número de resíduos apolares. As duas estruturas obtidas com a docagem foram submetidas a dinâmica molecular que mostrou a estabilidade da interação.

5. INTERAÇÃO NBD – PIPERLONGUMINA

5.1 Materiais

O domínio NBD foi manufaturado pela GenScript e o certificado de análise fornecido pela empresa encontra-se no Anexo A. A piperlongumina, o TRIS e o cloreto de sódio foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. A água ultrapura utilizada no tampão foi preparada por um sistema de purificação de água (Direct-Q UV-3) da Millipore. O álcool metílico utilizado para preparar as soluções estoques de piperlongumina foi adquirido da Dinâmica Química Contemporânea LTDA

5.2 Métodos

5.2.1 Preparação da amostra

O NBD foi diluído em tampão com as mesmas características daquele com o qual foi recebido, contendo 50mM de TRIS e 150mM de NaCl com o pH ajustado com ácido clorídrico. O espectro de absorção da macromolécula e do ligante foram coletados no espectrofotômetro Cary-3E (Varian, Palo Alto, CA) à temperatura ambiente (298K), controlado por ar condicionado e monitorado por termômetro, equipado com lâmpadas de tungstênio e deutério. Duas cubetas de quartzo, cada uma com caminho óptico igual a 10 mm, foram utilizadas nos experimentos. Os espectros foram coletados varrendo os comprimentos de onda entre 200 e 500 nm, com tempo de integração de 0.333 s. O software Cary foi utilizado para coletar os dados medidos. A concentração da proteína foi obtida por meio da lei de Beer-Lambert aplicada a absorção no comprimento de onda de 280 nm, sabendo que o coeficiente de extinção molar (ϵ) da macromolécula neste comprimento é de $20.525 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

1 41

5.2.2 Espectroscopia de Fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos com os espectrofluorímetro de estado estacionário Lumina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Os experimentos com o NBD foram realizados em uma cubeta de quartzo de 100 μL com caminho óptico de 10x2 mm e excitados no comprimento de onda de 295 nm.

Nos experimentos de supressão de fluorescência para a determinação das constantes de ligação pelo modelo de equilíbrio de ligação, pequenas alíquotas de PPL foram adicionadas na solução de NBD a 4 μM de modo a gerar incrementos de 1 μM de ligante. As medidas

foram realizadas a temperaturas de 288, 298 e 308K. Para a aplicação do modelo de densidade de ligação (BDF), pequenas alíquotas de PPL foram adicionadas nas soluções de NBD a 4, 6 e 8 μM . As medidas foram realizadas a temperatura fixa (288K).

Em todos os experimentos de fluorescência, o volume final de álcool metílico no tampão foi menor que 1%. Filtro interno.

As medidas do tempo de vida de fluorescência do triptofano da NBD foram realizadas no Mini-Tau (Edinburgh Instruments, Livingston, UK) acoplado ao sistema TCSPC (do inglês Time-Correlated Single Photon Counting). Alíquotas de PPL foram tituladas em uma solução de NBD a 25 μM . A excitação foi realizada usando diodo pulsado de picosegundo de 340 nm e emissão usando um filtro de corte de 375 nm. Os perfis de decaimento de fluorescência foram ajustados utilizando o decaimento bi-exponencial (equação 48) com o software F980; os tempos de vida médios foram calculados com a equação 49.

5.2.3 Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular da NBD foram obtidos com o espectropolarímetro Jasco J-815 utilizando uma cubeta de quartzo desmontável de 0.01 cm de caminho óptico. Para o experimento de interação com a PPL, o espectro foi obtido no intervalo de 200 a 260 nm a uma velocidade de 20 nm/min com 0.1 nm de resolução. Os espectros finais são resultados de 15 acumulações e tiveram o sinal do tampão subtraído. A razão molar NBD:PPL foi de 1:12. A elipticidade molar média $[\Theta]$ ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) foi calculada por meio da equação 50, onde Θ é a elipticidade coletada, $[P]$ é a concentração de NBD, l é o caminho óptico da cubeta e n é o número de resíduos de aminoácido da proteína.

As porcentagens de estrutura secundária foram calculadas com o CDPro utilizando o método CONTIN com a biblioteca SP43.⁴²

Os experimentos de desnaturação da NBD foram feitos no intervalo de temperatura de 280 a 340 K, utilizando as elipticidades medidas em 222 nm. A fração de proteína desnaturada foi calculada por meio da equação 51, onde $[\Theta]^{\text{nat}}$ e $[\Theta]^{\text{den}}$ são as elipticidades molar a 280 e 340 K, respectivamente.

$$f = \frac{([\Theta]^{\text{obs}} - [\Theta]^{\text{den}})}{([\Theta]^{\text{nat}} - [\Theta]^{\text{den}})} \quad (51)$$

5.2.4 Docagem Molecular

A estrutura tridimensional do domínio NBD utilizada no cálculo de docagem foi obtida no bando de dados de proteínas (PDB 1S3X). O software AutoDockTools do programa MGL Tools 1.5.4 foi utilizado para preparar o NBD adicionando átomos de hidrogênio polar e cargas parciais. A origem rígida da PPL foi automaticamente selecionada e não foi atribuído possíveis giros e torções para a molécula, exceto pelos grupos metoxi presente em sua extremidade.

Os mapas foram gerados pelo programa AutoGrid 4.2 com um espaçamento de 0.375 Å e dimensão de 66 x 70 x 58 pontos. O programa AutoDock 4.2 foi utilizado para investigar o sítio de interação entre a PPL e o NBD aplicando o Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA).

5.2.5 Dinâmica Molecular

Para os cálculos de dinâmica molecular do complexo NBD – PPL, topologia da PPL foi calculada por meio do servidor ATB⁵⁹. As coordenadas iniciais dos complexos proteína-ligante foram as obtidas pela docagem molecular.

A dinâmica molecular do complexo foi realizada pela versão 5.1.4 do GROMACS³⁹, com o campo de força gromos54a7⁶⁰. O sistema foi solvatado com o modelo de água SPC⁵² em uma caixa cúbica com as dimensões das arestas posicionadas no mínimo a 1 nm de distância da proteína. O sistema foi neutralizado com Na⁺ e Cl⁻ na concentração de 150 mM.

A minimização de energia foi realizada com o algoritmo steepest descent com 5000 passos e tolerância de 10 kJ/mol. A primeira etapa de equilibração foi no ensemble NVT, em que durante os 100ps de simulação a temperatura foi mantida a 300 K (acoplada ao termostato de V-rescale⁵³). As velocidades aleatórias foram geradas pela distribuição de Maxwell-Boltzman. Posteriormente a equilibração foi feita no ensemble NPT, em que durante os 100 ps de simulação a temperatura foi mantida a 300 K e pressão de 1 atm (acoplada ao barostato Parrinello-Rahman⁵⁴). Para interações de curto alcance o cut-off foi 12 Å e as interações eletrostáticas de longo alcance foram tratadas com PME⁵⁵. O algoritmo de LINCS foi utilizado para restringir as ligações⁵⁶. Nos passos de equilibração, a posição dos átomos pesados foi restringida aplicando um potencial de 1000 kJmol⁻¹nm⁻². Após as etapas de equilibração, as restrições foram desligadas e a dinâmica foi realizada com passos de 2 fs.

Os cálculos de energia livre foram feitos com a ferramenta G_mmpbsa⁴⁰ aplicando o método de PBSA a snapshots extraídos da trajetória de dinâmica molecular em intervalos de 500 ps. Os parâmetros de coarse grid-box (cfac) e finner grid-box (fadd) foram definidos

como 2 e 20, respectivamente. A concentração de íons positivos e negativos foi definida como 0.150 e os raios foram definidos como 0.95 e 1.81 Å, que correspondem aos íons de sódio e cloro, respectivamente. Os valores de contante dielétrica do vácuo (ϵ_{vdie}), do solvente (ϵ_{sdie}) e do soluto (ϵ_{pdie}) foram definidas como 1, 80 e 4, respectivamente.

Os cálculos de dinâmica molecular e de PBSA foram realizados na estrutura computacional do GRID UNESP.

5.3 Resultados

A análise da supressão de fluorescência foi feita utilizando o Trp90 do NBD. Quando excitado em 295 nm, o Trp90 emite o sinal de fluorescência com intensidade máxima em 330 nm, que foi o comprimento de onda utilizado para fazer as análises. A Figura 22 mostra a emissão do NBD na ausência (a) e na presença de diferentes concentrações de PPL ($\rightarrow y$). Além disso, a Figura 22 mostra a emissão de fluorescência da PPL centrada em 450 nm. Na máxima concentração de PPL (24 μM) a largura da banda a meia altura é de ± 45 nm e portanto a fluorescência da PPL não influencia os valores de intensidade do Trp90 em 330 nm que foram utilizados nas análises posteriores.

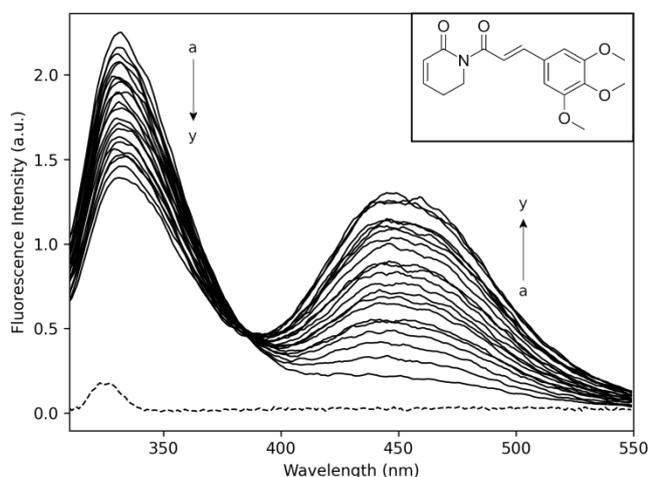


Figura 22: Espectro de emissão de fluorescência da NBD após a correção de filtro interno obtido a partir de experimentos de titulação de PPL com incremento de 1 μM ($a \rightarrow y = 0 \rightarrow 24 \mu\text{M}$). $[\text{NBD}] = 4 \mu\text{M}$, $\text{pH} = 7.4$, $T = 283 \text{ K}$, $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$. O inset mostra a estrutura química da PPL.

Após a correção do filtro interno (APÊNDICE C), o efeito de supressão foi observado ao adicionar alíquotas de PPL a amostra de NBD a 4 μM . A primeira análise a respeito da interação foi verificar como o complexo NBD – PPL reage ao aumento de temperatura. Para isso utilizamos os gráficos de Stern – Volmer nas temperaturas de 283, 293 e 303 K.

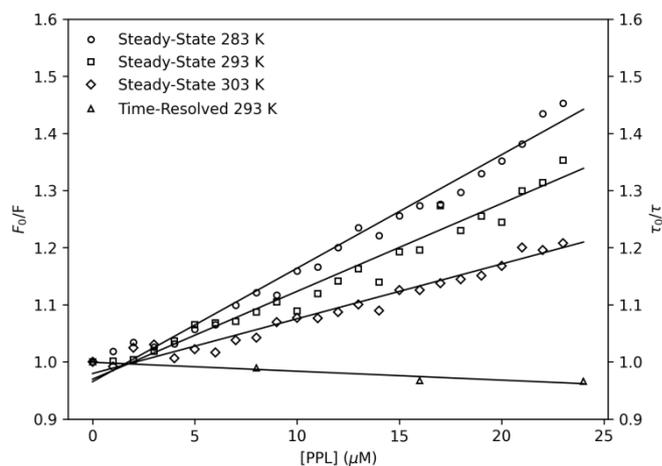


Figura 23: A ordenada esquerda mostra os gráficos de Stern-Volmer nas temperaturas de 283, 293 e 303 K. $[NBD] = 4 \mu\text{M}$, $[PPL] = 0 - 24 \mu\text{M}$. A ordenada direita mostra a razão dos tempos de vida do Trp90 ao variar a concentração de PPL.

Os gráficos de Stern-Volmer (Figura 23) mostraram que a inclinação da reta diminuiu e, portanto o efeito de supressão diminuiu ao passo que a temperatura aumentou de 283 para 303 K. Com esta análise já é possível descartar a hipótese da supressão ser causada por colisões, uma vez que o aumento da temperatura não favoreceu a supressão. Mesmo assim, o sistema foi submetido à análise dos tempos de vida do fluoróforo para confirmar este resultado.

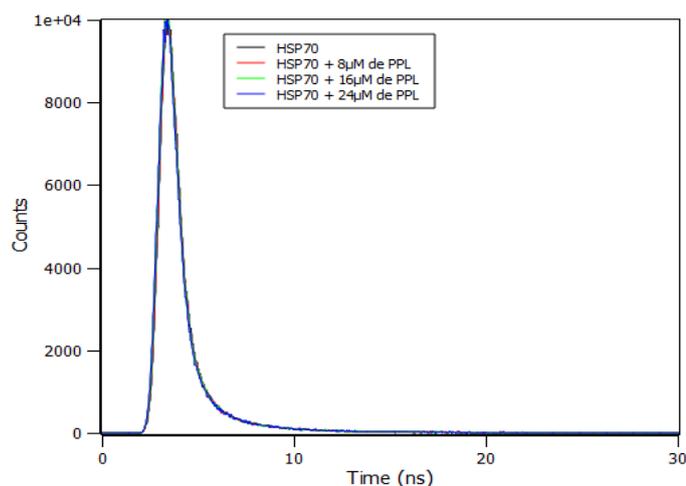


Figura 24: Decaimento de fluorescência resolvida no tempo do NBD ($4 \mu\text{M}$) e PPL nas estequiometrias de 1:0, 1:2, 1:4 e 1:6, $T = 298 \text{ K}$ e $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$.

Os valores dos tempos de vida obtidos a partir do ajuste bi-exponencial estão apresentados na Tabela 5, junto dos valores de tempo médio (τ_{medio}) calculados a partir da equação 49.

Tabela 5: Tempos de vida obtidos a partir ajuste bi-exponencial dos dados de fluorescência resolvida no tempo e os tempos de vida médios obtidos a partir da equação 49.

NBD : PPL	α_1	τ_1	α_2	τ_2	τ_{medio}
1:0	0.78	0.72	0.23	3.34	2.22
1:2	0.77	0.71	0.23	3.34	2.24
1:4	0.79	0.75	0.20	3.58	2.29
1:6	0.77	0.71	0.23	3.40	2.30

Como mostrado na ordenada direita da Figura 23, a razão dos tempos de vida $\left(\frac{\tau_0}{\tau}\right)$ ao adicionar PPL na amostra de NBD manteve-se em aproximadamente 1. A constante bimolecular (K_q) para o sistema NBD – PPL, calculada a partir da equação 12 variou entre (8.9 e 4.3) $10^{12} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Estes valores são duas ordens de magnitude maior do que o observado para sistemas colisionais ($\sim 10^{10}$).

Tabela 6: Constante de Stern-Volmer (K_{sv}), constante bimolecular (K_q) e constante de ligação (K_a) do sistema NBD – PPL em 283, 293 e 303 K.

T (K)	$K_{SV} (\times 10^4 \text{ M}^{-1})$	$K_q (\times 10^{12} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$K_a (\times 10^4 \text{ M}^{-1})$
283	1.9 ± 0.1	8.9 ± 0.1	2.5 ± 0.8
293	1.5 ± 0.1	6.9 ± 0.1	2.2 ± 0.5
303	1.0 ± 0.1	4.3 ± 0.1	1.8 ± 0.2

Os dados de fluorescência foram inseridos no modelo de equilíbrio de ligação por meio da equação de duplo-logaritmo (Equação 11). As constantes de ligação (K_a) para cada temperatura (Tabela 6) foram calculadas a partir do coeficientes lineares dos gráficos apresentados na Figura 25. Para o sistema NBD – PPL foi verificado que os valores de K_a diminuem ao passo que a temperatura do sistema aumenta.

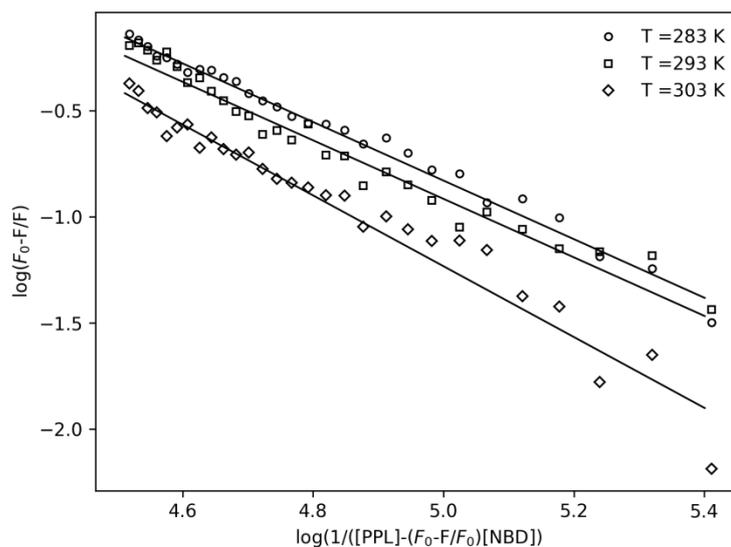


Figura 25: Gráficos de duplo-logaritmo dos dados de supressão de fluorescência da NBD (4 μM) coletados em 283, 293 e 303 K.

Com os valores de K_a calculados é possível utilizar o modelo de Van't Hoff para entender a termodinâmica de interação do complexo NBD – PPL. Para isso, os valores de K_a foram inseridos na Equação 24, resultando na gráfico apresentado na Figura 26 que foi ajustado para uma reta cujos coeficientes de linear e angular serão proporcionais aos valores de ΔH e ΔS , respectivamente.

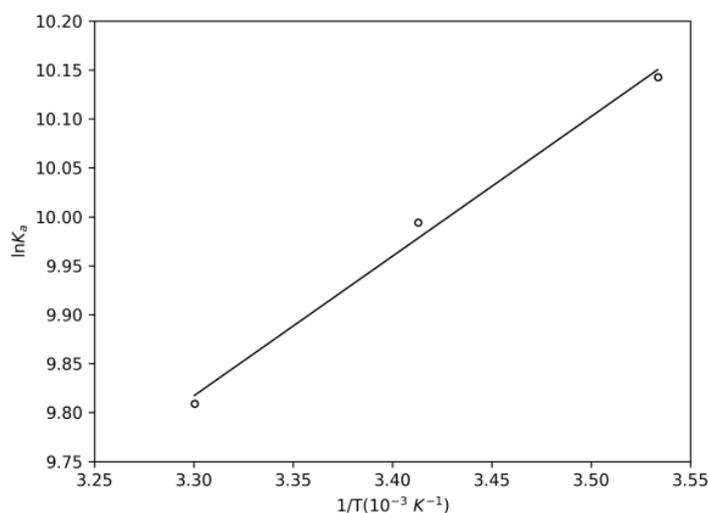


Figura 26: Gráfico de Van't Hoff obtido a partir dos dados de K_a calculados pelo modelo de equilíbrio de ligação e o ajuste linear dos pontos.

De acordo com os resultados dos parâmetros termodinâmicos apresentados na Tabela 7, o complexo NBD – PPL apresenta $\Delta G < 0$ e portanto a formação do complexo é espontânea. Além disso, observou-se que as componentes entálpica e entrópica contribuem de maneira equiparada para a energia livre.

Tabela 7: Parâmetros termodinâmicos do complexo NBD – PPL nas temperaturas de 283, 293 e 303 K

T (K)	ΔG (kJmol ⁻¹)	ΔH (kJmol ⁻¹)	ΔS (J.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	T. ΔS (kJmol ⁻¹)
283	-23.7 ± 1.3			11.9 ± 0.9
293	-24.2 ± 1.3	-11.9 ± 0.9	42.4 ± 3.4	12.4 ± 0.9
303	-24.6 ± 1.3			12.8 ± 1.0

Para explorar um pouco mais a respeito dos sítios de interação da NBD, os dados de supressão de fluorescência foram inseridos no modelo de BDF (Secao 2.6). Uma vez que os parâmetros que melhor ajustaram as sigmóides foram encontrados, eles foram submetidos ao programa descrito no (APÊNDICE D) para encontrar os valores de [PPL] que causavam a mesma porcentagem de supressão de fluorescência nas amostras com 6 e 8 μM de NBD e utilizá-los na equação de conservação de massas.

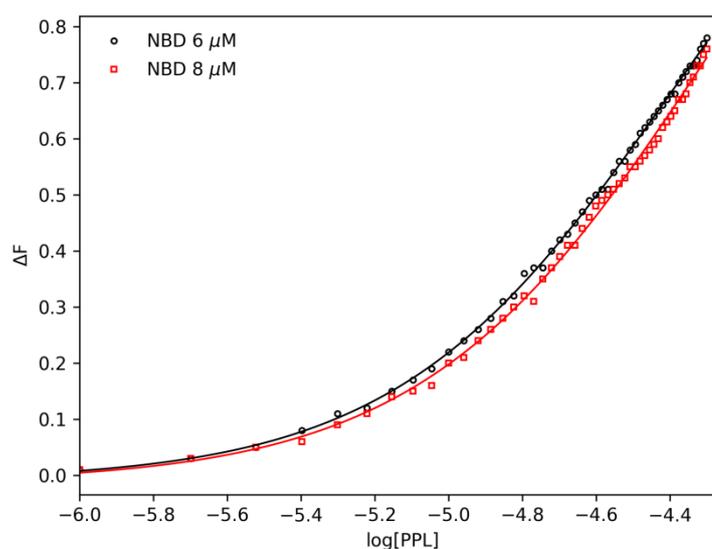


Figura 27: : Porcentagem de supressão de fluorescência em função do logaritmo da concentração de PPL titulada nas amostras de NBD a 6 e 8 μM.

Com os valores de $\sum v_i$ e $[L]_{\text{free}}$ calculados pelos coeficientes angular e linear das retas o gráfico de Scatchard foi construído (Figura 28 - a). O perfil do gráfico de Scatchard para o sistema NBD – PPL apresentou uma função côncava indicando cooperatividade positiva dos sítios de interação. A interação do domínio NBD com a molécula de piperina foi estudada pelo nosso grupo e apresentou um comportamento semelhante ao encontrado neste trabalho⁶¹. Estes resultados mostraram que diferentes ligantes podem induzir modos semelhantes de interação no que diz respeito a cooperatividade.

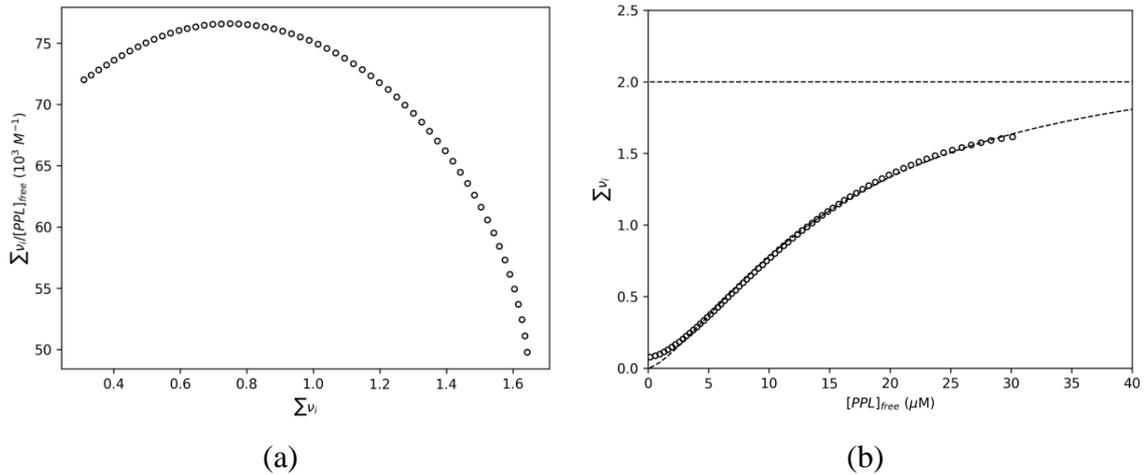


Figura 28: (a) Gráfico de Scatchard da interação NBD – PPL e (b) Gráfico de Hill da interação NBD – PPL.

Para encontrar o número de sítios que a PPL acessa no NBD, os valores de $\sum v_i$ e $[L]_{free}$ foram aplicados ao modelo de Hill (Figura 28 – b). O ajuste da curva foi feito com a expressão:

$$\sum v_i = \frac{2.2 \cdot (6.3 \cdot 10^4 [PPL]_{free})^{1.4}}{1 + (6.3 \cdot 10^4 [PPL]_{free})^{1.4}}$$

Sendo assim, o modelo de Hill apontou para 2.2 ± 0.1 sítios de interação com constantes de ligação equivalentes de $(6.3 \pm 0.2) \cdot 10^4 M^{-1}$. O coeficiente de Hill para o ajuste da curva foi de 1.4 ± 0.1 , o que confirma o efeito de cooperatividade, uma vez que $h > 1$. Os valores da constante de ligação obtidos por meio do modelo de equilíbrio de ligação e por meio do modelo de Hill concordaram em relação à ordem de magnitude de $10^4 M^{-1}$.

Para verificar possíveis mudanças conformacionais causada pela interação da PPL com o NBD, a técnica de dicroísmo circular foi empregada. Inicialmente a estabilidade térmica do domínio NBD foi monitorada seguindo a elipticidade em 222 nm ao passo que a temperatura aumentava (Figura 29 – a). A fração de proteína enovelada foi calculada por meio da Equação 51 resultando no gráfico da Figura 29 – b que mostra que a transição entre os estados enovelado e desenovelado ocorre por volta de 314 K. Resultados semelhantes foram encontrados para o NBD de bactéria, conhecido também como DnaK, por meio de estudos de calorimetria e espectroscopia.^{62,63}

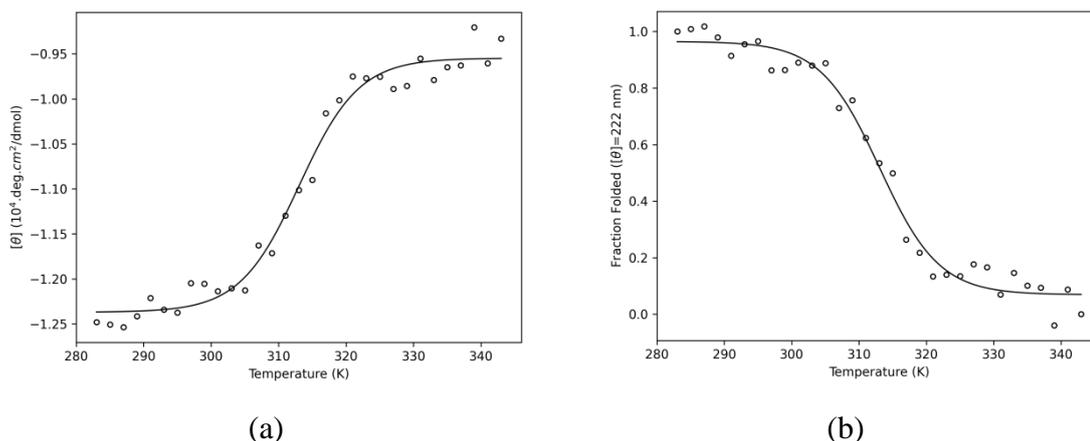


Figura 29: (a) Curva de desnaturação da NBD monitorada em 222 nm. (b) Fração de proteína enovelada calculada a partir da Equação 51.

A técnica de dicroísmo circular também foi aplicada para avaliar os efeitos da adição de PPL na estrutura secundária do NBD. Para isso o espectro da NBD livre de ligante foi comparado ao espectro da NBD com PPL na estequiometria de 1:12 (Figura 30). De acordo com os resultados de deconvolução, o espectro do NBD livre apresentou 38 % de α -hélice, 14 % de folha- β , 20% de turns e 28% de coil. Depois da adição da PPL, a estrutura da NBD sofreu pequenas mudanças conformacionais apresentando 33% de α -hélice, 17 % de folha- β , 19% de turns e 31% de coil. O conteúdo de α -hélice diminuiu 5% enquanto que o conteúdo de folha- β aumentou 3 %. Um comportamento similar a este foi observado na interação da piperina com o NBD⁶¹.

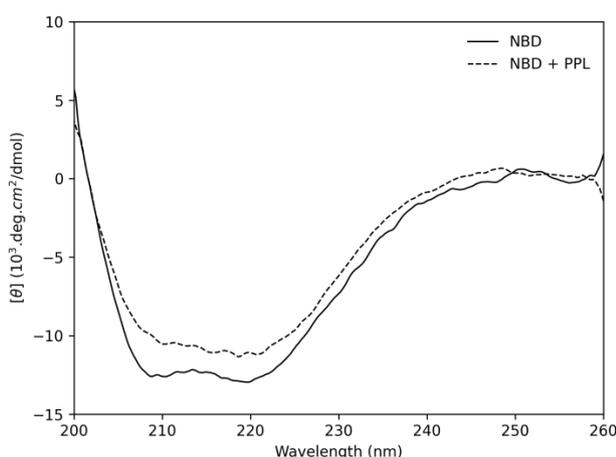


Figura 30: Espectro de dicroísmo circular do NBD livre de ligante (linha sólida) e do NBD na presença de PPL na estequiometria de 1:12 (linha tracejada). Os experimentos foram feitos a 293 K.

Para encontrar os possíveis sítios de interação do NBD acessados pela PPL, foi utilizado a técnica de docagem molecular. Para o cálculo de docagem molecular, foi utilizada a

estrutura da NBD obtida do PDB 1S3X. A Figura 31 mostra os clusters encontrados pelo cálculo de docagem molecular.

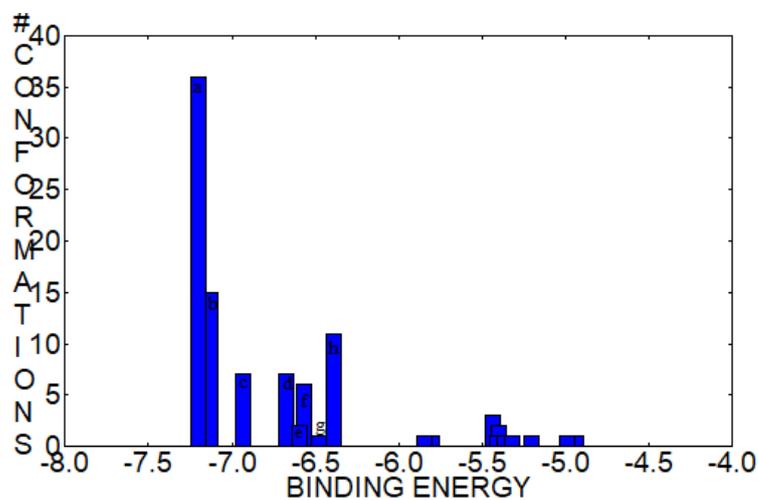


Figura 31: Clusters encontrados pelo docagem molecular e suas funções de energia.

Os clusters mais acessados pela PPL e de menor energia (a → h) foram dispostos na estrutura do NBD para melhor visualização (Figura 32). As coordenadas da PPL nos clusters de “a” a “g” estão na redondeza do sítio de interação do ADP e por isso foi selecionado apenas o cluster de menor energia (“a”). O cluster na “h” foi o segundo selecionado uma vez que ele foi o que teve maior acesso e menor energia em comparação com os outros, que tiveram energia maior que -6.0 kJ/mol e baixo numero de conformações.

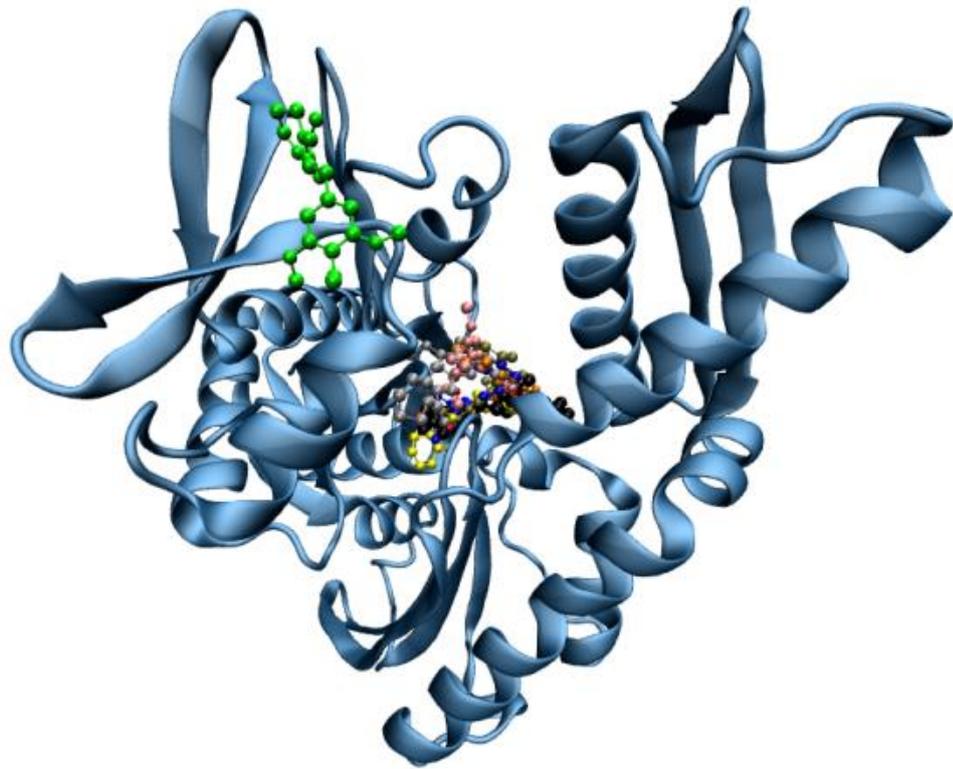


Figura 32: Representação dos clusters a – h calculados pela docking molecular. A molécula de ADP está representada em preto, os clusters a, b, c, d, e, f, g, e h estão representados em vermelho, amarelo, cinza, marrom, azul, laranja e cor-de-rosa.

A análise dos resíduos de aminoácido que compõe o sítio 1 mostrou que o ambiente é rico em glicinas, possui resíduos polares como a Tyr15, Thr37 e Ser340 e resíduos carregados como Lys271, Arg272,342 e Asp10,366 . O software LigPlot detectou a presença de uma ligação de hidrogênio entre o nitrogênio da Gly339 que constitui o backbone da proteína e um oxigênio da PPL.

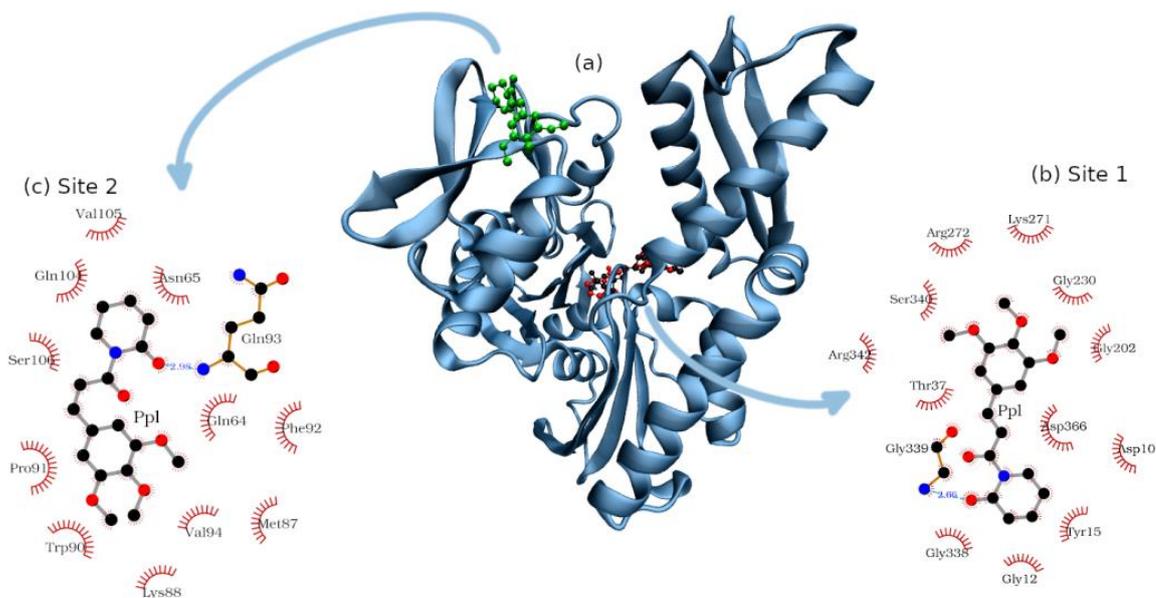


Figura 33: Sítios de interação do NBD acessados pela PPL: (a) Estrutura da NBD com a PPL no sítio 1 (vermelho) e no sítio 2 (verde), nesta figura a molécula de ADP está representada em preto. (b) Composição de aminoácidos do Sítio 1 e as interações entre o NBD e a PPL, a ligação de hidrogênio entre o resíduo Gly339 e PPL está representada pela linha azul tracejada. (c) Composição aminoácidos do Sítio 2 e as interações entre o NBD e a PPL, a ligação de hidrogênio entre o resíduo Gln93 e PPL está representada pela linha azul tracejada.

O ambiente do sítio 2 também é composto por vários resíduos apolares como Val94,105, Met87, Pro91, Trp90 e Phe92; e também por resíduos polares como Asn65, Gln64,93,104 e Ser106. No ambiente do sítio 2, resíduos carregados são mais escassos, tendo apenas a Lys88. O software Ligplot detectou uma ligação de hidrogênio entre o resíduo Gln93 e a PPL. As ligações de hidrogênio observadas nas poses calculadas pela docagem serão analisadas posteriormente com base nos cálculos de dinâmica molecular.

Tabela 8: Características dos aminoácidos que compõe os microambientes dos sítios 1 e 2 do NDB.

Sítio	Aminoácidos			
	Apolar	Carregado positivamente	Carregado negativamente	Polar
1	Gly12, 202, 230, 338, 339	Lys271; Arg272, 342	Asp10, 366	Tyr15; Thr37; Ser340
2	Val94, 105; Met87; Pro91; Trp90; Phe92	Lys88	-	Asn65; Gln64; 93, 104; Ser106

As estruturas dos complexos obtidas por meio da docagem molecular foram submetidas aos cálculos de dinâmica molecular. A estabilidade do sistema foi verificada por meio do cálculo de RMSD (Figura 34), que foi feito para os átomos do “backbone” do NBD com a PPL inserida nos sítios 1 e 2 e para a molécula de PPL. Os valores de RMSD do NBD variaram em torno de 0.25 nm ao longo dinâmica, enquanto que o RMSD da PPL variou em torno de 0.1 nm, mostrando que o sistema permaneceu estável. Além disso, o cálculo da distancia entre os centros de geometria (COG) do NBD e da PPL no sítio 1 mostrou que o ligante ficou ligado à proteína e permaneceu no ambiente encontrado pela docagem com a distância flutuando em torno de 0.7 nm. A PPL também se mostrou estável no sítio 2 com a distância flutuando em torno 2.5 nm.

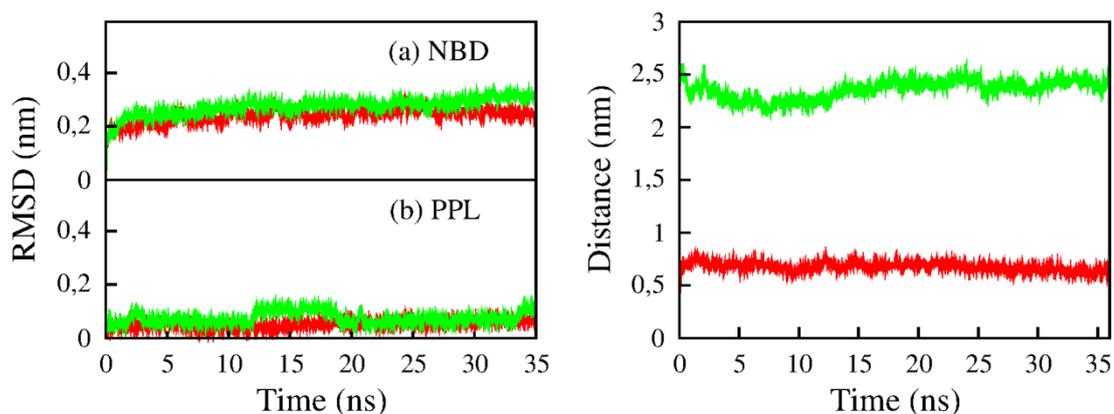


Figura 34: Parâmetros obtidos a partir da simulação de dinâmica molecular do NBD com a PPL no sítio 1 (vermelho) e no sítio 2 (verde). O gráfico à esquerda mostra: (a) O RMSD calculado para os átomos do “backbone” do NBD e (b) o RMSD da molécula de PPL. O gráfico à direita mostra a distância entre o COG do NBD e o COG da PPL quando inserida no sítio 1 e no sítio 2.

O RMSF do NBD livre e com a PPL ligada nos sítios 1 e 2 mostrou que não houve nenhuma mudança drástica na dinâmica dos resíduos quando a PPL interagiu com o sítio 1 ou 2. Foi observada apenas uma pequena mudança na dinâmica dos resíduos 78 – 87 que compõem uma α -hélice próxima ao sítio 1. Entretanto, esta mudança não está necessariamente associada à inserção da PPL no sítio 1, uma vez que a dinâmica destes mesmos resíduos sofreu alteração quando o NBD foi simulado com a PPL no sítio 2.

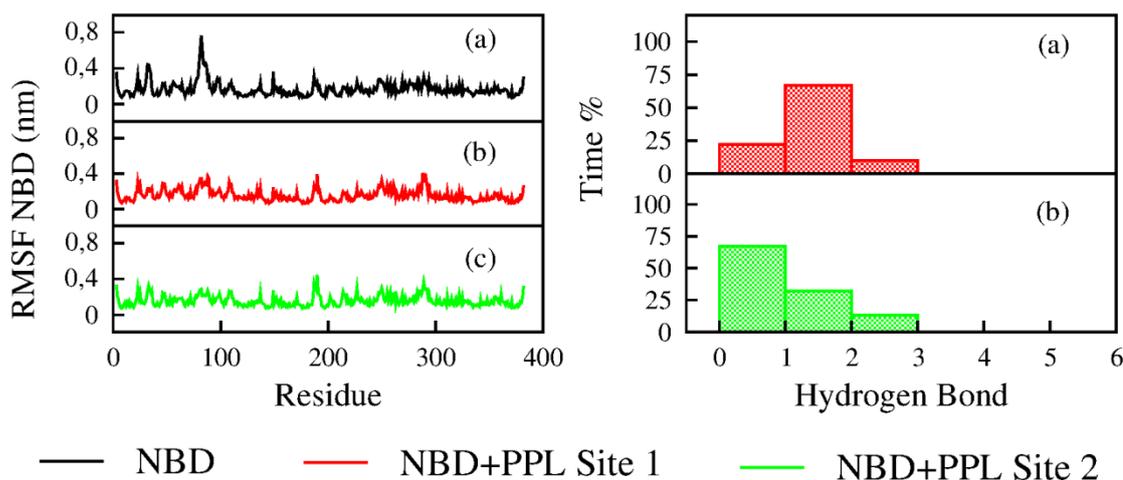


Figura 35: O gráfico à esquerda mostra o RMSF dos resíduos do NBD quando a proteína foi simulada (a) livre de ligante, (b) quando a proteína foi simulada com o PPL ocupando o sítio 1 e (c) quando a proteína foi simulada com a PPL ocupando o sítio 2. O gráfico à direita mostra a porcentagem de tempo em que foi calculado os números de ligação de hidrogênio feitos entre o NBD e a PPL no: (a) sítio 1 e (b) sítio 2.

As análises de ligação de hidrogênio mostraram que no Sítio 1 a PPL faz entre 1 e duas ligações com os resíduos do NBD 72% do tempo de simulação. As ligações de hidrogênio foram menos frequentemente observadas na interação da PPL com o sítio 2, o número de ligações de hidrogênio ficou entre 0 e 1 em 73 % do tempo de simulação. As ligações de hidrogênio dão uma contribuição entálpica para o balanço termodinâmico. O modelo de Van't Hoff aplicado aos dados experimentais de supressão mostrou que o balanço termodinâmico dos termos entálpicos e entrópicos da interação da PPPL com o NBD é bastante equilibrado. Os dados de dinâmica molecular corroboram com os dados experimentais visto que o número de ligações de hidrogênio encontradas para este sistema é bastante moderado.

Diferentemente do que foi indicado pelo dicroísmo circular, a análise das estruturas secundárias locais do sítio 1 (Figura 36) mostrou que a inserção da molécula de PPL favoreceu a estabilidade de alguns trechos de α -hélice por volta do resíduo de Lys56 e Leu274.

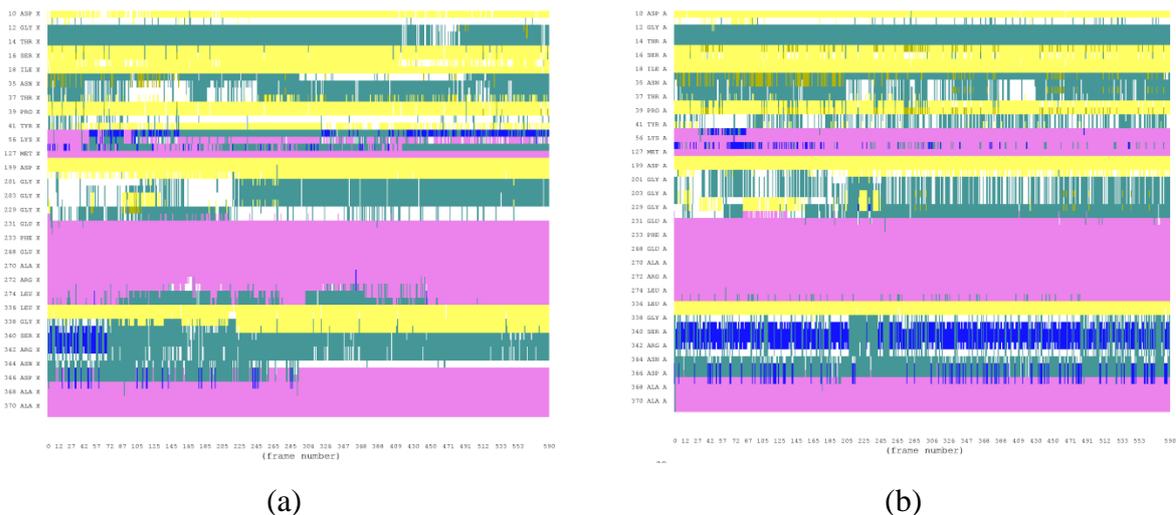


Figura 36: Análise das estruturas secundária dos aminoácidos que compõe o sítio 1. (a) Simulação do NBD na ausência de PPL. (b) Simulação com a PPL inserida no sítio1.

No sítio 2 também foi verificado o favorecimento da formação de α -hélice após a inserção da molécula de PPL por volta do resíduo de Ser85.

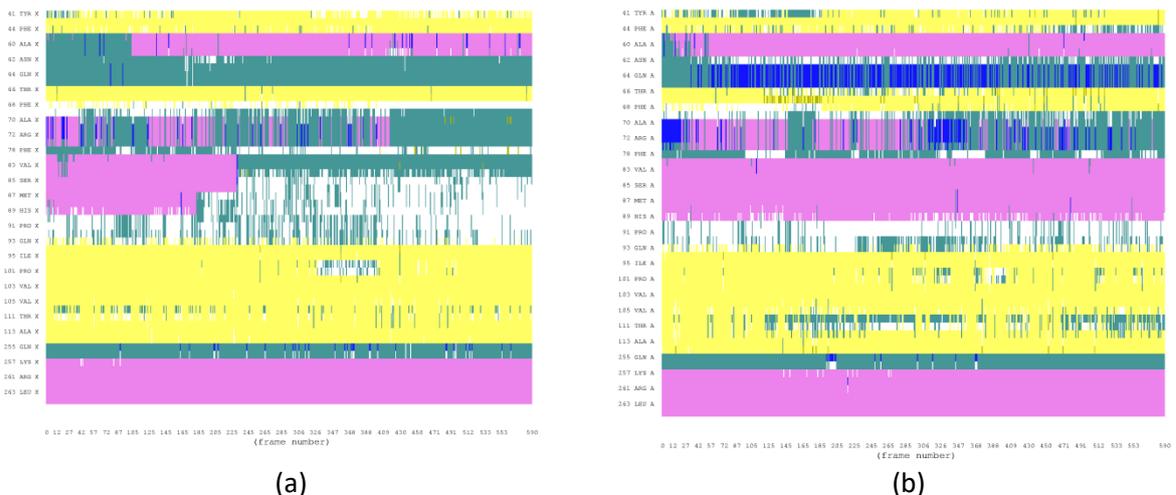


Figura 37: Análise das estruturas secundária dos aminoácidos que compõe o sítio 2. (a) Simulação do NBD na ausência de PPL. (b) Simulação com a PPL inserida no sítio2.

Como mostrado na Figura 38, grandes mudanças na estrutura global da proteína não foram observadas. Apenas uma pequena mudança na região dos resíduos entre Asp69 a Pro91 foi notada. Quando o NBD foi simulado na ausência de ligante (Figura 38-a) estes resíduos ficaram na conformação de coil. Quando o NBD foi simulado com a PPL inserida nos sítios 1 ou 2, a região entre Asp69 a Pro91 assumiu conformações de α -hélice de folha- β (Figura 38 b e c). Esta região tinha sido mencionada anteriormente na análise de RMSF. Para a proteína sem ligantes, o RMSF desta região foi alto. Já nas análises de RMSF da proteína com a PPL nos sítios 1 ou 2 o RMSF foi baixo porque estes resíduos se envolveram em estruturas secundárias e portanto perderam flexibilidade.

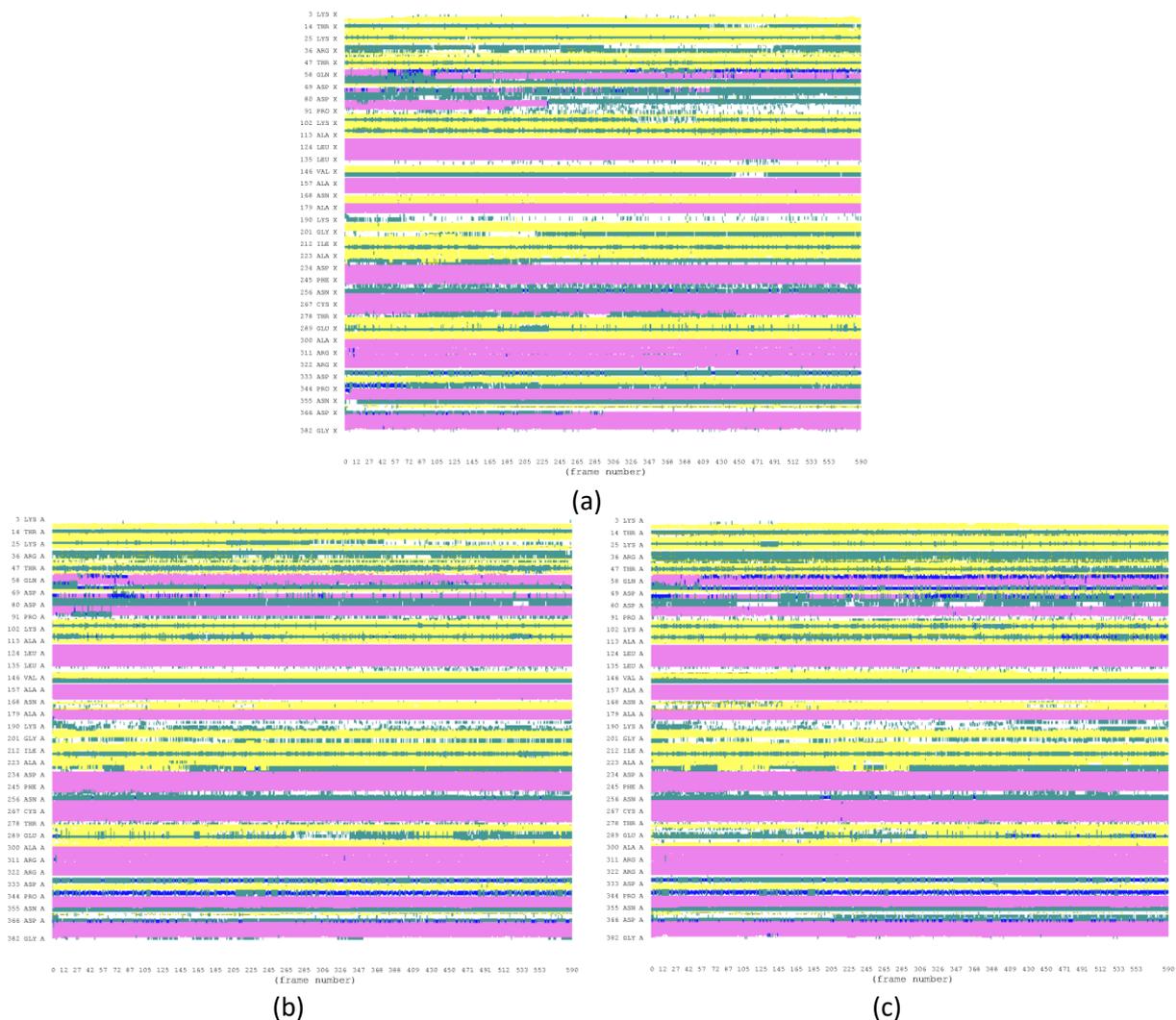


Figura 38: Análise global da estrutura do NBD. (a) Simulação do NBD na ausência de PPL. (b) Simulação do NBD com a molécula PPL inserida no sítio 1. (c) Simulação do NBD com a molécula PPL inserida no sítio 2.

Para encontrar a energia de ligação referente a interação nos sítios 1 e 2, as trajetórias de dinâmica molecular foram submetidas ao cálculo de Poisson Boltzmann Surface Area (MMPBSA). De acordo com os resultados, os sítios 1 e 2 apresentaram energia de ligação de $(-58 \pm 3) \text{ kJ.mol}^{-1}$ and $(-49 \pm 3) \text{ kJ.mol}^{-1}$, respectivamente. O cálculo de MMPBSA mostrou que para ambos os sítios as interações de VDW são predominantes, assim como tinha sido mostrado pelas análises de Van't Hoff.

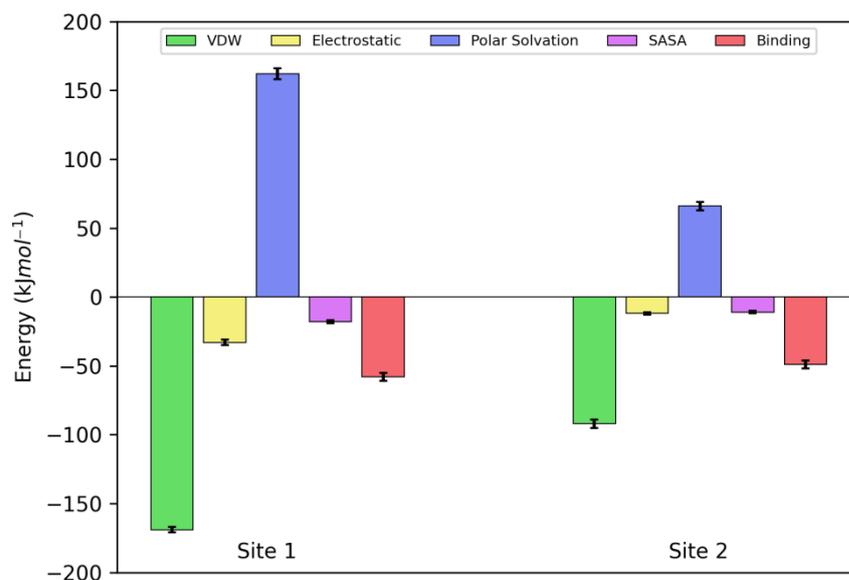


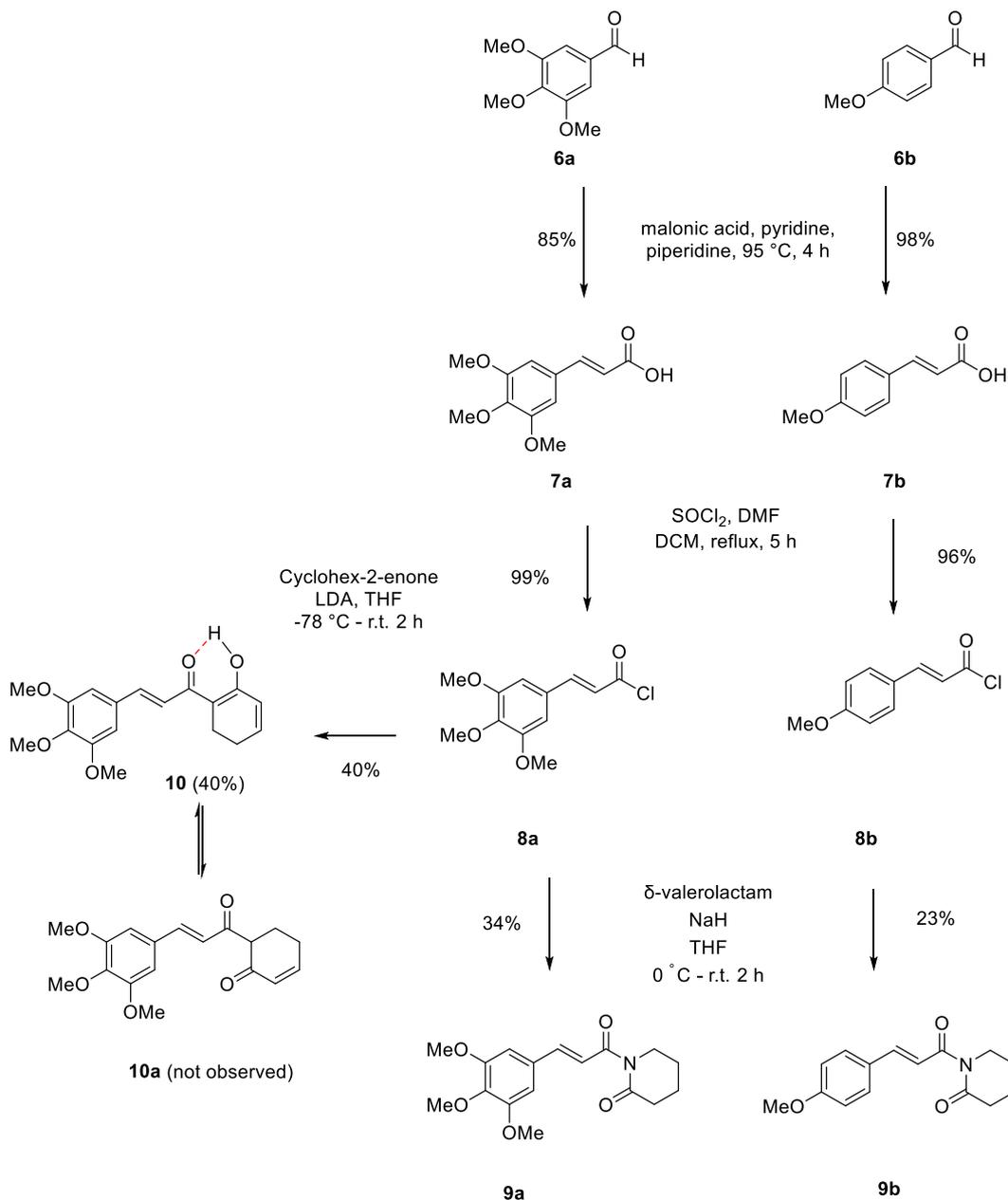
Figura 39: Decomposição das energias obtidas por MMPBSA para a interação da PPL com o NBD nos sítios 1 e 2. Contribuição de Van der Waals (VDW), eletrostática, solvatação polar, área acessível ao solvente (SASA) para o cálculo de energia de ligação.

5.4 Conclusão

Neste capítulo foi mostrado a descrição da interação da PPL com o domínio NBD da HSP70. Os dados de supressão de fluorescência mostraram a formação do complexo e o tratamento dos dados com o modelo de Van't Hoff mostrou que o balanço termodinâmico da interação tem as componentes entálpicas e entrópicas bastante equilibradas. O tratamento dos dados com o modelo de BDF permitiu a obtenção da densidade de ligação. Quando os dados foram interpretados utilizando os modelos de Scatchard e Hill, verificou-se que a PPL acessa dois sítios de interação no NBD e que a interação com estes sítios ocorre de modo cooperativo. Com a ferramenta de docagem e dinâmica molecular foi possível descrever os possíveis ambientes de interação da PPL. Além disso, com o cálculo de MMPBSA foi possível verificar que as interações de Van der Waals são predominantes no complexo NBD – PPL. Um aspecto interessante sobre a interação NBD – PPL é que apesar dos sítios possuírem quantidades relevantes de resíduos polares e a PPL ter 6 doadores de ligação de hidrogênio, esta interação não se mostrou predominante. Futuras modificações químicas com o intuito de aumentar a afinidade da PPL pelo NBD se beneficiariam da inserção de doadores de ligação de hidrogênio para alcançar os resíduos polares presentes no sítio e aumentar a componente entálpica da interação. Em resumo, este trabalho revelou os aspectos principais envolvidos na interação da PPL com o NBD.

6. MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA PPL

As modificações químicas na estrutura da PPL foram feitas com o intuito de aumentar a afinidade da molécula pela proteína p65 da família dos fatores nuclear- κ B (NF- κ B). Para isso foram sintetizadas 3 estruturas análogas à PPL (Esquema 1). Esta etapa do projeto foi desenvolvida na Universidade de Birmingham, com colaboração com o grupo do Prof. Alan M. Jones⁶⁴.



Esquema 1: Síntese das moléculas análogas a piperlongumina.

As modificações foram baseadas no trabalho publicado por Sun e colaboradores⁶⁵ que verificaram que a PPL inibe várias etapas da cascata de inflamação. Uma das etapas que os

autores verificaram foi a inibição da formação do complexo p50-DNA, que conseqüentemente inibe a transcrição de genes de proteínas pró-inflamatórias. Em relação às estruturas análogas, os autores verificaram que a inibição da formação do complexo p50-DNA foi mais expressiva quando a estrutura 10 foi utilizada.

O fator nuclear kappa B, é uma família constituída por cinco fatores de transcrição (p50, p52, c-Rel, p65 (RelA) and RelB) que participam da regulação de genes de proteínas relacionadas a vários processos celulares como: resposta inflamatória, crescimento celular e apoptose.⁶⁶

Estes fatores de transcrição são encontrados inativos no citoplasma de células não estimuladas na forma de homo/heterodimeros associados a proteínas inibidoras (I κ B α , I κ B β , I κ B γ)⁶⁷. Uma das formas de ativação destes fatores é pela estimulação dos receptores TLR4 com LPS (lipopolissacarídeos), o que desencadeia a cascata de ativação do heterodimero formado p65 e p50 por meio de consecutivas fosforilações (Figura 40).

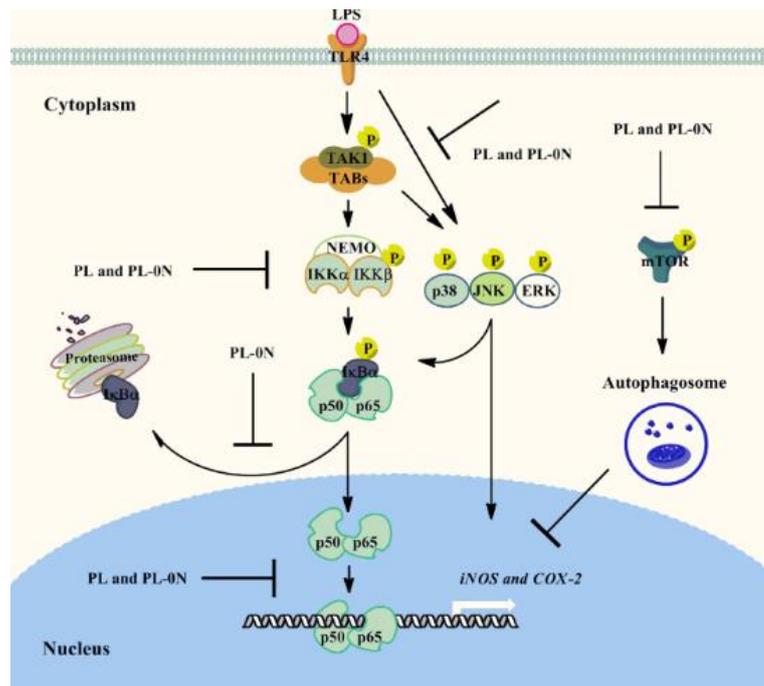


Figura 40: Cascata de ativação do heterodímero p50/p65 em células estimuladas com LPS. (Fonte: Sun e colaboradores, 2015⁶⁵)

A ativação do complexo TAK-TAB feita por meio de fosforilação, leva a fosforilação das IKKs, que são responsáveis pela fosforilação da proteína inibidora I κ B α . Uma vez fosforilada, a proteína I κ B α é degradada, permitindo que o heterodímero (p50/p65) se transloque para o

núcleo da célula e transcreva os genes de proteínas relacionadas aos processos celulares mencionados.⁶⁷

Entretanto, a ativação descontrolada desta proteína está envolvida na patogênese de várias inflamações crônicas como artrite reumatóide, asma e doença de Crohn⁶⁶. Por conta disso, atualmente existe uma procura por fármacos inibidores da ativação/atividade da NF- κ B.

A inibição da NF- κ B pode ocorrer por meio de três mecanismos⁶⁷: o bloqueio do primeiro estágio, por meio da interação de fármacos com os receptores; o bloqueio de algum passo citoplasmático como por exemplo, a interação de ligantes com as proteínas IKK, I κ B α ; e o bloqueio da atividade nuclear da NF- κ B como por exemplo, a inibição da interação NF- κ B – DNA .

Sun e colaboradores⁶⁵ mostraram que o uso de PPL inibiu a via de sinalização da proteína NF- κ B por múltiplos mecanismos, incluindo a interferência nos passos citoplasmáticos através da interação com IKK β e o bloqueio da atividade nuclear do NF- κ B por meio da interação com as unidades p50 e p65. Os autores sugeriram que a interação da PPL com as porções p50 e p65 levou a diminuição da afinidade proteica pelo DNA, resultando no bloqueio da transcrição de citocinas e outras proteínas pró-inflamatórias.

6.1 Docagem Molecular

O ranqueamento de energia (Tabela 9) obtido pela docagem molecular das estruturas PPL, 9a, 9b e 10 mostrou que todas as modificações apresentaram valores de energia inferiores aos valores apresentado pela PPL (-5.36 kcal/mol). Das três moléculas análogas investigadas, estrutura 10 foi a que ancorou no mesmo sítio que a PPL (Figura 41).



Figura 41: Estrutura da proteína p65 com a molécula de DNA no sítio de interação (PDB 2O61). As estruturas em CPK são as posições encontradas pelo cálculo de docagem cega. A molécula de piperlongumina está representada em azul, as moléculas análogas 9a, 9b e 10 estão representadas em rosa, cinza e verde, respectivamente.

Tabela 9: Ranqueamento de energia dos cálculos de docagem da estrutura da PPL e das análogas 9a, 9b e 10

Ligante	Ranking de energia (kcal/mol)
PPL	-5.36
9a	-5.85
9b	-5.87
10	-5.72

Este sítio inclui o contato com resíduos importantes na estabilização da molécula de DNA, como por exemplo, a Cys120 que faz uma ligação de hidrogênio com a PPL e também está no sítio de interação da molécula 10 (Figura 42).

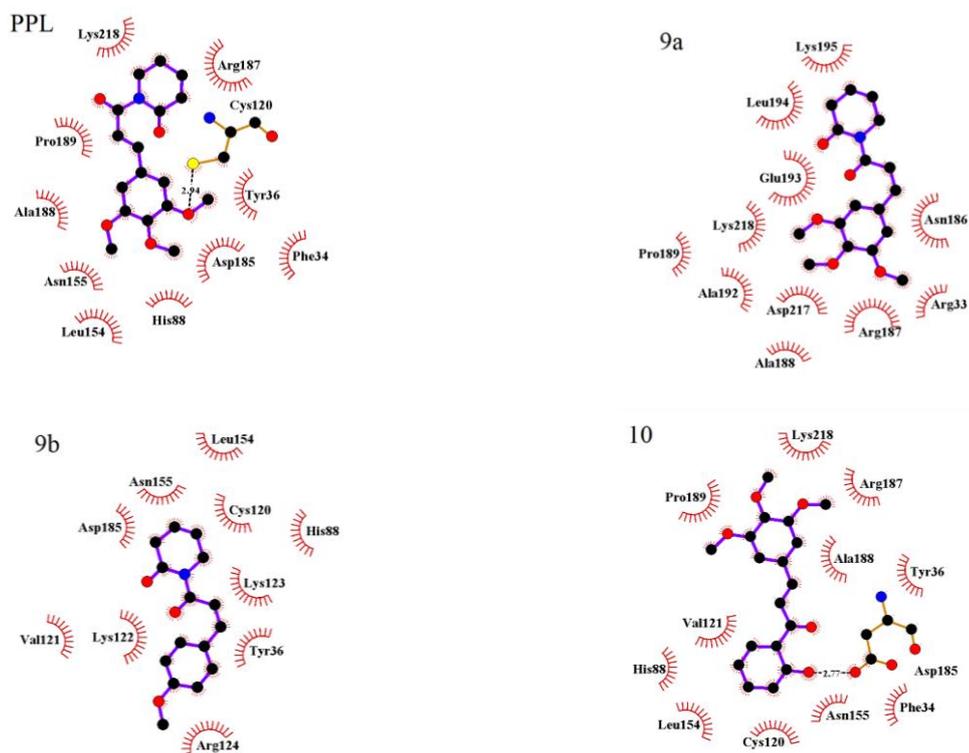


Figura 42: Composição de aminoácidos do microambiente de interação da PPL e das moléculas análogas 9a , 9b e 10. Ligações de hidrogênio são representadas pelas linhas tracejadas.

6.2 Perspectivas futuras

As perspectivas futuras deste trabalho envolvem a análise experimental da interação da PPL e suas estruturas análogas com a proteína NF- κ B. A proteína NF- κ B possui um resíduo de Trp, o que possibilita o uso da técnica de espectroscopia de fluorescência para verificar a interação, obter os parâmetros termodinâmicos e a constante de afinidade dos análogos que interajam com a p65.

REFERÊNCIAS

1. Thomford, N. E. *et al.* Natural products for drug discovery in the 21st century: innovations for novel drug discovery. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1578 (2018).
2. Tripathi, S. K. & Biswal, B. K. Piperlongumine, a potent anticancer phytotherapeutic: Perspectives on contemporary status and future possibilities as an anticancer agent. *Pharmacol. Res.* **156**, 104772 (2020).
3. Prasad, S. & K Tyagi, A. Historical spice as a future drug: therapeutic potential of piperlongumine. *Curr. Pharm. Des.* **22**, 4151–4159 (2016).
4. Bezerra, D. P. *et al.* Overview of the therapeutic potential of piperlongumine (piperlongumine). *Eur. J. Pharm. Sci.* **48**, 453–463 (2013).
5. Ghuman, J. *et al.* Structural Basis of the Drug-binding Specificity of Human Serum Albumin. *J. Mol. Biol.* **353**, 38–52 (2005).
6. He, X. M. & Carter, D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* **358**, 209 (1992).
7. Meyer, T. N. & Da Silva, A. L. Resposta celular ao estresse. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **45**, 181–188 (1999).
8. Lindquist, S. & Craig, E. A. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* **22**, 631–677 (1988).
9. Karp, G. Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos. 1ª edição. *Barueri, SP* 53–54 (2005).
10. Radons, J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress Chaperones* **21**, 379–404 (2016).
11. Ritossa, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Cell. Mol. Life Sci.* **18**, 571–573 (1962).
12. Somensi, N. *et al.* Extracellular HSP70 activates ERK1/2, NF- κ B and pro-inflammatory gene transcription through binding with RAGE in A549 human lung cancer cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **42**, 2507–2522 (2017).
13. Hulina, A. *et al.* Extracellular Hsp70 induces inflammation and modulates LPS/LTA-stimulated inflammatory response in THP-1 cells. *Cell Stress Chaperones* **23**, 373–384 (2018).
14. Picard, C., Casanova, J.-L. & Puel, A. Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or I κ B α deficiency. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**, 490–497 (2011).

15. Cournia, Z., Allen, B. & Sherman, W. Relative binding free energy calculations in drug discovery: recent advances and practical considerations. *J. Chem. Inf. Model.* **57**, 2911–2937 (2017).
16. Gohlke, H. & Klebe, G. Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angew. Chemie Int. Ed.* **41**, 2644–2676 (2002).
17. Israelachvili, J. N. *Intermolecular and surface forces*. (Academic press, 2011).
18. Kuhn, B., Mohr, P. & Stahl, M. Intramolecular hydrogen bonding in medicinal chemistry. *J. Med. Chem.* **53**, 2601–2611 (2010).
19. Neel, A. J., Hilton, M. J., Sigman, M. S. & Toste, F. D. Exploiting non-covalent π interactions for catalyst design. *Nature* **543**, 637–646 (2017).
20. Dougherty, D. A. Cation- π interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science (80-.)*. **271**, 163–168 (1996).
21. Du, X. *et al.* Insights into protein–ligand interactions: mechanisms, models, and methods. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 144 (2016).
22. De Vivo, M., Masetti, M., Bottegoni, G. & Cavalli, A. Role of Molecular Dynamics and Related Methods in Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **59**, 4035–4061 (2016).
23. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, (1999). (2004).
24. Griffiths, D. J. *Introduction to quantum mechanics*. (Cambridge University Press, 2016).
25. Albani, J. R. *Principles and applications of fluorescence spectroscopy*. (John Wiley & Sons, 2008).
26. Bi, S. *et al.* Investigation of the interaction between flavonoids and human serum albumin. *J. Mol. Struct.* **703**, 37–45 (2004).
27. Pacheco, M. E. & Bruzzone, L. Synchronous fluorescence spectrometry: Conformational investigation or inner filter effect? *J. Lumin.* **137**, 138–142 (2013).
28. Van Holde, K. E., Johnson, W. C. & Ho, P. S. *Principles of physical biochemistry*. (2006).
29. Ross, P. D. & Subramanian, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry* **20**, 3096–3102 (1981).
30. Lohman, T. M. & Bujalowski, W. Thermodynamic methods for model-independent determination of equilibrium binding isotherms for protein-DNA interactions: spectroscopic approaches to monitor binding. *Methods Enzymol.* **208**, 258–290 (1991).

31. Scatchard, G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**, 660–672 (1949).
32. Bordbar, A. K., Saboury, A. A. & Moosavi-Movahedi, A. A. The shapes of Scatchard plots for systems with two sets of binding sites. *Biochem. Educ.* **24**, 172–175 (1996).
33. Callis, P. R. Binding phenomena and fluorescence quenching. II: Photophysics of aromatic residues and dependence of fluorescence spectra on protein conformation. *J. Mol. Struct.* **1077**, 22–29 (2014).
34. Kumaran, R. *et al.* Fluorescence and quantum mechanical approach on the interaction of amides and their role on the stability and coexistence of the rotamer conformations of L-tryptophan in aqueous solution. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **243**, 118791 (2020).
35. Andrews, S. S. & Tretton, J. Physical Principles of Circular Dichroism. *J. Chem. Educ.* **97**, 4370–4376 (2020).
36. Corrêa, D. H. A. & Ramos, C. H. I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *African J. Biochem. Res.* **3**, 164–173 (2009).
37. Morris, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **30**, 2785–2791 (2009).
38. Durrant, J. D. & McCammon, J. A. Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biol.* **9**, 1–9 (2011).
39. Van Der Spoel, D. *et al.* GROMACS: fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.* **26**, 1701–1718 (2005).
40. Kumari, R., Kumar, R., Consortium, O. S. D. D. & Lynn, A. g_mmpbsa□ A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *J. Chem. Inf. Model.* **54**, 1951–1962 (2014).
41. Gasteiger, E. *et al.* Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *proteomics Protoc. Handb.* 571–607 (2005).
42. Sreerama, N. & Woody, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* **287**, 252–260 (2000).
43. Wallace, A. C., Laskowski, R. A. & Thornton, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng. Des. Sel.* **8**, 127–134 (1995).
44. Schmidt, M. W. *et al.* General atomic and molecular electronic structure system. *J.*

- Comput. Chem.* **14**, 1347–1363 (1993).
45. Gordon, M. S. & Schmidt, M. W. Advances in electronic structure theory: GAMESS a decade later. in *Theory and applications of computational chemistry* 1167–1189 (Elsevier, 2005).
 46. Slater, J. C. A simplification of the Hartree-Fock method. *Phys. Rev.* **81**, 385 (1951).
 47. Parr, R. G. Density functional theory of atoms and molecules. in *Horizons of Quantum Chemistry* 5–15 (Springer, 1980).
 48. Hertwig, R. H. & Koch, W. On the parameterization of the local correlation functional. What is Becke-3-LYP? *Chem. Phys. Lett.* **268**, 345–351 (1997).
 49. Tomasi, J., Mennucci, B. & Cammi, R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev.* **105**, 2999–3094 (2005).
 50. Spackman, M. A. Potential derived charges using a geodesic point selection scheme. *J. Comput. Chem.* **17**, 1–18 (1996).
 51. Oostenbrink, C., Villa, A., Mark, A. E. & Van Gunsteren, W. F. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J. Comput. Chem.* **25**, 1656–1676 (2004).
 52. Wu, Y., Tepper, H. L. & Voth, G. A. Flexible simple point-charge water model with improved liquid-state properties. *J. Chem. Phys.* **124**, 24503 (2006).
 53. Bussi, G., Donadio, D. & Parrinello, M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* **126**, 14101 (2007).
 54. Parrinello, M. & Rahman, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* **52**, 7182–7190 (1981).
 55. Batcho, P. F., Case, D. A. & Schlick, T. Optimized particle-mesh Ewald/multiple-time step integration for molecular dynamics simulations. *J. Chem. Phys.* **115**, 4003–4018 (2001).
 56. Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C. & Fraaije, J. G. E. M. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* **18**, 1463–1472 (1997).
 57. Vivian, J. T. & Callis, P. R. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys. J.* **80**, 2093–2109 (2001).
 58. de Alcântara-Contessoto, N. S., Caruso, Í. P., Bezerra, D. P., Barbosa Filho, J. M. & Cornélio, M. L. An investigation into the interaction between pipartine (piperlongumine) and human serum albumin. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* (2019).

59. Malde, A. K. *et al.* An automated force field topology builder (ATB) and repository: version 1.0. *J. Chem. Theory Comput.* **7**, 4026–4037 (2011).
60. Schmid, N. *et al.* Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *Eur. Biophys. J.* **40**, 843–856 (2011).
61. Zazeri, G., Povinelli, A. P. R., Lima, M. de F. & Cornélio, M. L. Detailed Characterization of the Cooperative Binding of Piperine with Heat Shock Protein 70 by Molecular Biophysical Approaches. *Biomedicines* **8**, 629 (2020).
62. Montgomery, D., Jordan, R., McMacken, R. & Freire, E. Thermodynamic and structural analysis of the folding/unfolding transitions of the Escherichia coli molecular chaperone DnaK. *J. Mol. Biol.* **232**, 680–692 (1993).
63. Palleros, D. R., Reid, K. L., McCarty, J. S., Walker, G. C. & Fink, A. L. DnaK, hsp73, and their molten globules. Two different ways heat shock proteins respond to heat. *J. Biol. Chem.* **267**, 5279–5285 (1992).
64. Zazeri, G. *et al.* Synthesis and Spectroscopic Analysis of Piperine- And Piperlongumine-Inspired Natural Product Scaffolds and Their Molecular Docking with IL-1 β and NF- κ B Proteins. *Molecules* **25**, 1–17 (2020).
65. Sun, L.-D. *et al.* Development and mechanism investigation of a new piperlongumine derivative as a potent anti-inflammatory agent. *Biochem. Pharmacol.* **95**, 156–169 (2015).
66. Kumar, A., Takada, Y., Boriek, A. M. & Aggarwal, B. B. Nuclear factor- κ B: its role in health and disease. *J. Mol. Med.* **82**, 434–448 (2004).
67. Epinat, J.-C. & Gilmore, T. D. Diverse agents act at multiple levels to inhibit the Rel/NF- κ B signal transduction pathway. *Oncogene* **18**, 6896–6909 (1999).

OPEN

Details of the cooperative binding of piperlongumine with rat serum albumin obtained by spectroscopic and computational analyses

Ana Paula Ribeiro Povinelli^{1,2}, Gabriel Zazeri^{1,3}, Marcelo de Freitas Lima² & Marinônio Lopes Cornélio^{1*}

Piperlongumine (PPL) has presented a variety of important pharmacological activities. In recent pharmacokinetics studies in rats, this molecule reached 76.39% of bioavailability. Although PPL is present in the bloodstream, no information is found on the interaction between PPL and rat serum albumin (RSA), the most abundant protein with the function of transporting endo/exogenous molecules. In this sense, the present study elucidated the mechanism of interaction between PPL and RSA, using in conjunction spectroscopic and computational techniques. This paper shows the importance of applying inner filter correction over the entire fluorescence spectrum prior to any conclusion regarding changes in the polarity of the fluorophore microenvironment, also demonstrates the convergence of the results obtained from the treatment of fluorescence data using the area below the spectrum curve and the intensity in a single wavelength. Thermodynamic parameters revealed that PPL binds to RSA spontaneously ($\Delta G < 0$) and the process is entropically driven. Interaction density function method (IDF) indicated that PPL accessed two cooperative sites in RSA, with moderate binding constants ($2.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ and $1.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$). The molecular docking described the microenvironment of the interaction sites, rich in apolar residues. The stability of the RSA-PPL complex was checked by molecular dynamics.

Piperlongumine, also known as pipartine, is an amide alkaloid isolated from Long pepper¹ that is widely used in Indian traditional medicine. This natural compound has been calling attention of scientific community because of its biological activities such as antitumor, antimetastatic, antiplatelet aggregation and anxiolytic². Piperlongumine (PPL) is a lipophilic molecule, with $\log P = 1.63$ calculated through the software Marvin (ChemAxon, Budapest, Hungary). This molecule is characterized by the presence of electrophilic frames³ and α, β -unsaturated amide as Michael acceptor⁴. In addition, piperlongumine has no Lipinski's and Lead-like rule violations⁵, which makes this molecule an excellent candidate to be launched as a drug. Published pharmacokinetic studies report that oral, intravenous and intraperitoneal administration in rats results in different times of PPL permanence in plasma². Considering the lipophilic characteristics of PPL, its transport through plasma must be assisted by carrier proteins, such as albumin. A few works present in the literature bring the first results of the interaction of PPL with human albumin^{6,7}. Nevertheless, no information about the interaction between PPL and rat serum albumin (RSA) is known. RSA has 584 amino acids with just one tryptophan residue⁸, which enables the use of fluorescence spectroscopy⁹. The crystallographic structure of RSA has not yet been determined. However, RSA modeling has been performed and published in a recent article¹⁰. Therefore, based on the modeled RSA, it can be compared with the HSA structure deposited in PDB (1AO6) and several similarities can be found between them. The comparison presents that RSA has 73% of sequence similarity (Fig. S1), and high preservation of its tertiary structure (Fig. S2). These proteins share the same number of disulfide bridges (17) and a Cys34 thiol group¹¹.

The goal of present investigation is to elucidate the molecular biophysical mechanisms of the interaction between RSA and PPL. Two approach lines of the molecular biophysical field were applied, one experimental

¹Departamento de Física, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), UNESP, Rua Cristóvão Colombo 2265, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil. ²Departamento de Química, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), UNESP, Rua Cristóvão Colombo 2265, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

³These authors contributed equally: Ana Paula Ribeiro Povinelli and Gabriel Zazeri. *email: m.cornelio@unesp.br



Article

Unravelling the Interaction of Piperlongumine with the Nucleotide-Binding Domain of HSP70: A Spectroscopic and In Silico Study

Ana Paula Ribeiro Povinelli ¹, Gabriel Zazeri ¹, Alan M. Jones ^{2,*} and Marinônio Lopes Cornélio ^{1,*}

¹ Departamento de Física, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rua Cristóvão Colombo 2265, São José do Rio Preto 15054-000, Brazil; ana.povinelli@unesp.br (A.P.R.P.); gabriel.zazeri@unesp.br (G.Z.)
² School of Pharmacy, University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham B15 2TT, UK
 * Correspondence: a.m.jones.2@bham.ac.uk (A.M.J.); m.cornelio@unesp.br (M.L.C.)



Citation: Povinelli, A.P.R.; Zazeri, G.; Jones, A.M.; Cornélio, M.L. Unravelling the Interaction of Piperlongumine with the Nucleotide-Binding Domain of HSP70: A Spectroscopic and In Silico Study. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 1298. <https://doi.org/10.3390/ph14121298>

Academic Editor: Osvaldo Andrade Santos-Filho

Received: 17 November 2021
 Accepted: 7 December 2021
 Published: 13 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Piperlongumine (PPL) is an alkaloid extracted from several pepper species that exhibits anti-inflammatory and anti-carcinogenic properties. Nevertheless, the molecular mode of action of PPL that confers such powerful pharmacological properties remains unknown. From this perspective, spectroscopic methods aided by computational modeling were employed to characterize the interaction between PPL and nucleotide-binding domain of heat shock protein 70 (NBD/HSP70), which is involved in the pathogenesis of several diseases. Steady-state fluorescence spectroscopy along with time-resolved fluorescence revealed the complex formation based on a static quenching mechanism. Van't Hoff analyses showed that the binding of PPL toward NBD is driven by equivalent contributions of entropic and enthalpic factors. Furthermore, IDF and Scatchard methods applied to fluorescence intensities determined two cooperative binding sites with K_b of $(6.3 \pm 0.2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Circular dichroism determined the thermal stability of the NBD domain and showed that PPL caused minor changes in the protein secondary structure. Computational simulations elucidated the microenvironment of these interactions, showing that the binding sites are composed mainly of polar amino acids and the predominant interaction of PPL with NBD is Van der Waals in nature.

Keywords: heat shock protein; HSP70; nucleotide-binding domain; piperlongumine; fluorescence spectroscopy; circular dichroism; molecular docking; molecular dynamics; molecular mechanics Poisson–Boltzmann surface area

1. Introduction

Living organisms, regardless of their kingdom, are constantly subjected to stressful situations and respond to these stimuli through changes in cellular metabolism, activating their defence mechanisms [1]. The stress response includes heat shock proteins (HSPs), which is one of the primary cellular protection responses [2,3].

HSPs are part of the large family of proteins known as molecular chaperones, so called because they have the ability to interact reversibly with other proteins, helping in formation, folding and trans-membrane transport [4]. HSP70 is the 70 kDa heat shock protein, composed of a conserved N-terminal nucleotide binding domain (NBD) with ATPase activity, a substrate binding domain (SBD) and a C-terminal domain. Among the domains, NBD is a 40 kDa ATP binding domain [5] with a highly flexible chain.

The HSP70 was found to be over expressed in various cancers in response to the stressful environment of tumors, leading to tumor protection and consequently to therapeutic resistance. Recently, the set of functions of heat shock proteins (HSP) has been extended based on studies that have shown that HSP70 is also found in the extracellular environment and exhibits potent cytokine activity, with the ability to activate the nuclear factor-kappaB (NF-κB) and consequently regulate the expression of pro-inflammatory

APÊNDICE C – Programa para corrigir o efeito de filtragem interna em todos os comprimentos de onda

```
#include <stdio.h>
#include <math.h>
#include <stdlib.h>
#define Max 35
#define CMax 13

/* Correcao de filtro interno que vai gerar um arquivo .csv de todas a titulacoes e
   comprimentos de onda. A correcao e para cubeta de 3ml. */

int main()
{

FILE *Correcao, *tamp, *Extincao_l, *Extincao_p, *Intens, *Teste;

int i, j, lin, col, p_ext_295, l_ext_295;

double incremento, conc_p, conc_l, Intensidade[Max][CMax], Extincao_proteina[Max][1],
   Extincao_ligante[Max][1], correcao[Max][1], tampao[Max][1];

incremento = 0.000001;
p_ext_295 = 9691.0 ;
l_ext_295 = 3843.0 ;
conc_p = 0.000004 ;
conc_l = 0.000000 ;

Correcao=fopen("correcao.csv", "w");

Intens=fopen("intensidade.txt", "r");

Extincao_p=fopen("HSA_325_359_smoothie.txt", "r");
```

```

Extincao_l=fopen("GZ02_325_359nm.txt", "r");

tamp=fopen("tampao.txt", "r");

i=0;
j=0;

for(i=0; i<Max; i++)
{
    Extincao_proteina[i][0]=0.0;
    Extincao_ligante[i][0]=0.0;
    tampao[0][1]=0.0;
for(j=0; j<CMax; j++)
    {
        Intensidade[i][j]=0.0;
        correcao[i][j]=0.0;
    }
}

for(lin=0; lin<Max; lin++)
{
    col=0;
    conc_l=0.0;
    fscanf(Extincao_p, "%lf", &Extincao_proteina[lin][0]);
    fscanf(Extincao_l, "%lf", &Extincao_ligante[lin][0]);
    fscanf(tamp, "%lf", &tampao[lin][0]);

for(col=0; col<CMax; col++)
{

    fscanf(Intens, "%lf", &Intensidade[lin][col]);

    correcao[lin][col]=(Intensidade[lin][col]*(pow(10.0,(((p_ext_295+Extincao_proteina[li

```

```

n][0])*conc_p)/2.0))*((1_ext_295+Extincao_ligante[lin][0])*conc_1)/2.0))
)-tampao[lin][0];

fprintf(Correcao, "%.2lf;", correcao[lin][col]);

conc_1 = conc_1 + incremento;
}

fprintf(Correcao, "\n");

}

fclose(Intens);
fclose(Extincao_p);
fclose(Correcao);
fclose(Extincao_1);
fclose(tamp);

return 0;
}

```

APÊNDICE D – Programa para tratar os dados do modelo de densidade de ligação

```
#include <stdio.h>
#include <stdlib.h>
#include <math.h>
int main()
{
    int i;
    float ni_dividendo, ni_divisor, lfree, ni, conc1, conc2, conc3, concm, proteinm,
    protein1, protein2, protein3, A1, A2, x01, dx1, B1, B2, x02, dx2, C1, C2, x03, dx3, x1,
    x2, x3, yf, y, f, n;

    protein1=0.000006;
    protein2=0.000008;

    proteinm=(protein1+protein2)/2;
    /* Definindo os parâmetros das curvas */
    A1=-0.010736;
    A2=1.3743122;
    x01=-4.398227;
    dx1=0.3725162;

    B1=-0.0137815;
    B2=1.51420067;
    x02=-4.2951532;
    dx2=0.38565153;

    yf=0.73;
    y=0.0;
    f=0.01;
    n=(yf-y)/f;

    for(i=1;i<n;i++)
        if (y<yf)
```

```

{
    x1=x01+(dx1*(log(((A1-A2)/(y-A2))-1)));

    x2=x02+(dx2*(log(((B1-B2)/(y-B2))-1)));

    conc1=pow(10,x1);

    conc2=pow(10,x2);

    concm= (conc1+conc2)/2;

    ni_dividendo= ((protein1-proteinm)*(conc1-concm))+ ((protein2-
proteinm)*(conc2-concm));

    ni_divisor= (pow((protein1-proteinm),2))+ (pow((protein2-proteinm),2));

    ni= ni_dividendo/ni_divisor;

//          ni_dividendo=( protein1*(conc1-concm)) + ( protein2*(conc2-concm));

//          ni_divisor= (protein1*(protein1-proteinm))+ (protein2*(protein2-
proteinm)) ;

//          ni= ni_dividendo/ni_divisor;

    lfree= concm- (ni*proteinm);

    y=y+f;

//    printf( "%.10f %.10f\n", conc1, conc2);
//    printf( "%.10f %.10f\n", ni, lfree);

```

```
    }  
    return 0;  
}
```

ANEXO A - Certificado de análise do domínio NBD fornecido pela GenScript

Confidential and Privileged



SDS-PAGE & Western blot Analysis:

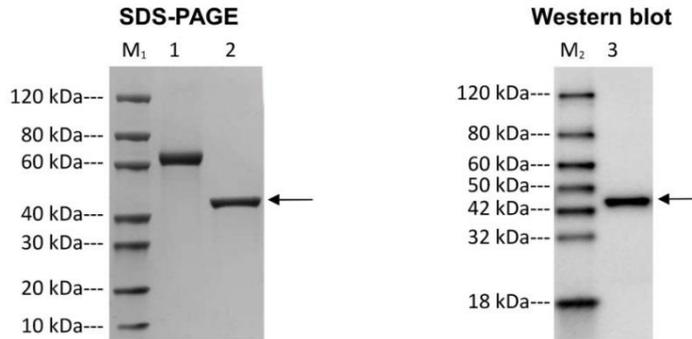


Fig.1 SDS-PAGE and Western blot analysis of FB504_HSP70

Lane M₁: Protein Marker, GenScript, Cat. No. M00516

Lane M₂: Protein Marker, GenScript, Cat. No. M00521

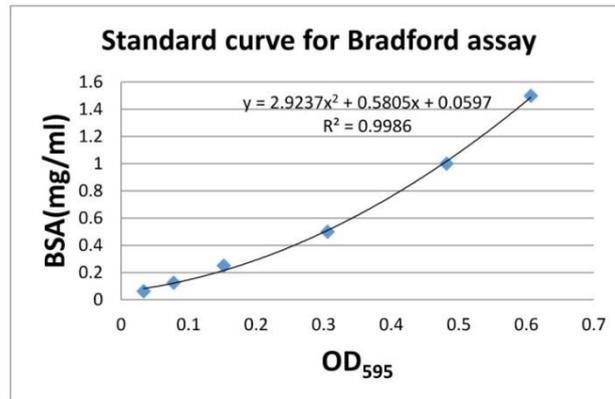
Lane 1: BSA (2.00 µg)

Lane 2: FB504_HSP70 (Reducing condition, 2.00 µg)

Lane 3: FB504_HSP70 (Reducing condition)

Primary antibody: Mouse-anti-His mAb (GenScript, Cat.No. A00186)

Quantification--BSA Standard Curve:



Sample	OD ₅₉₅ (diluted 5 times)	Concentration
FB504_HSP70	0.478	5.03 mg/ml

4

GenScript USA, Inc.

860 Centennial Ave. Piscataway, NJ 08854

Tel: 1-732-885-9188

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, 20/02/2022



Assinatura do autor