

FERNANDO CÉSAR LOPES FILHO

SIMULAÇÕES POR DINÂMICA MOLECULAR *FINE-* E
COARSE-GRAINED DAS INTERAÇÕES INTERMOLECULARES
ENTRE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DA FAMÍLIA
MASTOPARANO E MEMBRANAS MODELO

Tese apresentada para obtenção do
Título de Doutor em Biofísica Molecular.

FERNANDO CÉSAR LOPES FILHO

SIMULAÇÕES POR DINÂMICA MOLECULAR *FINE- E*
COARSE-GRAINED DAS INTERAÇÕES INTERMOLECULARES
ENTRE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DA FAMÍLIA
MASTOPARANO E MEMBRANAS MODELO

Tese apresentada para obtenção do Título
de Doutor em Biofísica Molecular.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Ruggiero

São José do Rio Preto - SP

2012

Lopes Filho, Fernando César.

Simulações por dinâmica molecular *fine-* e *coarse-grained* das interações intermoleculares entre peptídeos antimicrobianos da família Mastoparano e membranas modelo / Fernando César Lopes Filho. – São José do Rio Preto : [s.n.], 2012.

98 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: José Roberto Ruggiero

Tese (doutorado)-Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Biofísica. 3. Dinâmica molecular. 4. Peptídeos antimicrobianos. I. Ruggiero, José Roberto. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 577.32

FERNANDO CÉSAR LOPES FILHO

Simulações por Dinâmica Molecular *fine-* e *coarse-grained* das interações intermoleculares entre peptídeos antimicrobianos da família Mastoparano e membranas modelo

Tese apresentada 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”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Roberto Ruggiero
Professor Adjunto
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Pedro Geraldo Pascutti
Professor Assistente Doutor
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. José Maria Pires
Professor Associado
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Alexandre Suman de Araújo
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto

Profa Dra. Sabrina Thais Broggio Costa
Professor Associado
FATEC - Taquaritinga

São José do Rio Preto, 06 de julho de 2012.

O que faz que os homens formem um povo é a lembrança das grandes coisas que fizeram juntos e a vontade de realizar outras.

Ernest Renan

À minha mãe, Liliana
e
ao meu irmão, Fabrício.

AGRADECIMENTOS

A minha gratidão a todos que deram a sua contribuição para que esta Tese fosse produzida.

Tautologias e truísmos à parte, o desenvolvimento desta Tese não seria possível sem o auxílio e orientação do Prof. Dr. José Roberto Ruggiero, por isso, eu o agradeço sinceramente. Suas palavras forneceram críticas, conhecimentos e conselhos que foram úteis em situações que vão bem além deste trabalho. Ainda, é pertinente repetir um pensamento de William Shakespeare que dediquei a você em minha Dissertação de Mestrado: "*A aprendizagem é um simples apêndice de nós mesmos; onde quer que estejamos, está também nossa aprendizagem*". Onde quer que eu esteja, estará também seus ensinamentos, caro Professor.

Agradeço aos Profs Drs Pedro Geraldo Pascutti, José Maria Pires, Alexandre Suman de Araújo e Sabrina Thais Broggio Costa pela correção e avaliação desta Tese. Por oportuno, agradeço aos Profs Drs Alexandre Suman de Araújo e Jorge Chahine pela leitura crítica de minha monografia e sugestões feitas durante o Exame Geral de Qualificação.

Agradeço aos Profs Drs Jorge Chahine, Elso Drigo Filho e Marinônio Lopes Cornélio, pois, como Coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, prestaram relevantes serviços para a manutenção da qualidade do Programa e, dessa forma, tornaram possível a realização de meus trabalhos no Departamento de Física ao longo dos meus cursos de mestrado e doutorado. Pelo mesmo motivo, não poderia deixar de agradecer à totalidade do Corpo Docente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq - pela bolsa concedida e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP - pelos recursos que viabilizaram a aquisição de equipamentos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Formação de poro por peptídeos antimicrobianos.....	15
Figura 2.	Representação gráfica do peptídeo MP1.....	24
Figura 3.	Representação gráfica dos lipídeos POPG e POPC.....	26
IV. 1		
Figure 1.	Final configuration obtained after 250 ns of simulation.....	46
Figure 2.	Radial distribution functions (RDF) of all lipid oxygen atoms around the cationic groups of the peptide (charges of the N-terminal and side-chains of the lysines 4, 5 and 11).....	47
Figure 3.	Projections of peptide MP1 obtained from the simulations.....	48
Figure 4.	Analysis of the secondary structure of the peptide in time for the A) POPC and B) POPG simulations.....	49
Figure 5.	Lipid order parameters as a function of the distance from the peptide's center of mass for the POPG simulation.....	50
Figure 6.	Electron density of the phosphorous atoms as a function of the distance from the center of the membrane ($x=0$).....	51
IV. 1 Material Suplementar		
Fig. S1.	POPG membrane formation process.....	58
Fig. S2.	Number of lipids bound to zero, one, two and three ions as a function of time.....	59
Fig. S3.	Area per lipid as a function of time for the POPG bilayer.....	60
Fig. S4.	Lipid order parameters as a function of the distance from the peptide's center of mass for the POPC simulation.....	61
Fig. S5.	Electron density of the phosphorous atoms as a function of the distance from the center of the POPC membrane ($x=0$).....	62
IV. 2		
Figura 1.	Configurações instantâneas.....	84
Figura 2.	Distribuições radiais de pares dos <i>beads</i> PO4 (“grupo fosfato”) em torno dos resíduos básicos dos peptídeos.....	85
Figura 3.	Densidades de massa como função do raio tomado no eixo z normal ao plano da membrana.....	86
Figura 4.	Parâmetros de ordem das cadeias hidrofóbicas dos lipídeos como função da distância do centro de massa do poro.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Parâmetros de LJ e Coulomb presentes no campo de forças Berger para simular lipídeos.....	22
<i>IV. 1</i>		
Table 1	List of the simulations.....	45
<i>IV. 2</i>		
Tabela 1.	Características da estrutura primária dos peptídeos alvo deste estudo.....	81
Tabela 2.	Lista das simulações.....	82
Tabela 3.	Valores de energias das interações peptídeo-peptídeo e peptídeo-membrana..	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PAMs	Peptídeos antimicrobianos
P/L	Concentração peptídeo/lipídeo
PC	Fosfatidilcolina
SM	Esfingomielina
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
PS	Fosfatidilserina
CL	Cardiolipina
POPG	<i>palmitoyl-oleoyl-phosphatidylglycerol</i>
POPC	<i>palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholine</i>
LJ	Potencial de Lennard-Jones
FFT	Transformação rápida de Fourier
S _{CD}	Parâmetro de ordem do deutério
DMPC/DMPG	Dilauroil-fosfatidilcolina/dilauroil-fosfatidilglicerol
RDF	Função de Distribuição Radial
TFE	Trifluoroetanol
NMR	Ressonância Magnética Nuclear
DOPC	Dioleoil-fosfatidilcolina
DOPG	Dioleoil-fosfatidilglicerol
DPPC	Dipalmitoil-fosfatidilcolina
PME	<i>Particle-Mesh Ewald</i>

RESUMO

Peptídeos antimicrobianos são moléculas biologicamente ativas que, geralmente, tem as membranas fosfolipídicas como alvo primário. Resultados de diferentes técnicas experimentais têm sugerido que esses peptídeos permeabilizam as membranas pela formação de poros. Parte dos peptídeos caracterizados apresentam especificidade de disrupção para membranas de bactérias, em detrimento das membranas dos hospedeiros. Essa característica tem atraído a atenção da comunidade científica internacional, porque indica que estas moléculas podem ser modelos para o desenvolvimento de novos antibióticos, portanto o entendimento do mecanismo de ação, ou seja, do mecanismo de formação de poro, tem extrema importância. Simulações por Dinâmica Molecular foram produzidas para investigarmos o impacto que peptídeos antimicrobianos da família Mastoparano tem sobre membranas lipídicas modelo. Dois cenários foram explorados: (i) de baixa concentração peptídeo/lipídeo, $P/L=1/128$, que consistia de simulações *fine-grained* das interações de um peptídeo com uma bicamada pura de 128 lipídeos aniônicos (POPG) ou zwitteriônicos (POPC); (ii) de alta concentração, $P/L=1/21$, que abordava as interações de seis peptídeos com uma bicamada mista de 128 lipídeos POPC/POPG (1/1) usando uma modelagem *coarse-grained*. Tomando o peptídeo MP1 como caso paradigmático, verificamos que em baixo P/L é possível sugerir que sua característica seletiva surge da capacidade de coordenar e perturbar maior número de lipídeos em membrana aniônica comparada à neutra. Essa capacidade fica acentuada nas simulações com membrana mista, onde a atração dos lipídeos aniônicos pelos peptídeos catiônicos guiou a separação local e a formação de domínios de lipídeos aniônicos, o que facilitou o afinamento local da membrana e a formação de poro transmembrânico. Esses achados ajudam a explicar como peptídeos curtos, tal como o MP1, são capazes de formar poro em uma membrana cuja espessura é maior que o comprimento do peptídeo.

Palavras-chave: peptídeos antimicrobianos catiônicos; membranas aniônicas; interações peptídeo-membrana; mastoparano; seletividade; simulações por dinâmica molecular.

ABSTRACT

Antimicrobial peptides are biologically active molecules that, usually, have the phospholipid membranes as a primary target. Results from different experimental techniques have suggested these peptides permeabilize membranes by the pore formation. Part of the characterized peptides have specificity of disruption for bacterial membranes, instead of host membrane. This feature has attracted the attention of the international scientific community, because it indicates that these molecules can be models for the development of novel antibiotics, so understanding the mechanism of action, ie, the mechanism of pore formation, is extremely important. Molecular dynamics simulations were performed to investigate the impact of antimicrobial peptides from the Mastoparano family have on model lipid membranes. Two scenarios were explored: (i) of low peptide/lipid concentration, P/L=1/128, which consisted of fine-grained simulations of the interactions of a peptide with a pure bilayer of 128 anionic (POPG) or zwitterionic (POPC) lipids; (ii) of high concentration, P/L=1/21, which addressed the interactions of six peptides with a mixed bilayer of 128 POPC/POPG (1/1) lipids, using a coarse-grained modeling. Taking the MP1 peptide as a paradigmatic case, we found that in low P/L is possible to suggest that its selective feature arises of its ability to coordinate and disturb large number of lipids in the anionic membrane compared to neutral one. This ability is accentuated in simulations with mixed membrane, where the attraction of the anionic lipids by the cationic peptides led to the local segregation and formation of POPG lipid domains, which facilitated the local thinning of the membrane and the formation of transmembrane pore. These findings help to explain how short peptides, such as MP1, are able of forming pores in a membrane whose thickness is larger than the length of the peptide.

Keywords: cationic antimicrobial peptides; anionic membranes; peptide-membrane interactions; mastoparan; selectivity; molecular dynamics simulations.

SUMÁRIO

I. Introdução	13
Peptídeos antimicrobianos	13
Mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos: formação de poro	13
Seletividade de peptídeos antimicrobianos	15
II. Objetivos	18
III. Métodos	20
Simulações por Dinâmica Molecular	20
IV. Resultados e Discussão	
IV. 1 Selectivity and Membrane Thinning as the Effects of Interaction Between the Antimicrobial Mastoparan Peptide Polybia-MP1 and Phosphatidylglycerol or Phosphatidylcholine membranes	35
IV. 2 Indução de separação local de lipídeos por peptídeos antimicrobianos catiônicos em membranas compostas por lipídeos zwitteriônicos e aniônicos facilita a formação de defeitos e poros transmembrânicos	65
V. Conclusões	93
VI. Referências	95

I. INTRODUÇÃO

I. Introdução

O uso descontrolado ao lado do reduzido número de descobertas de novos antibióticos nas últimas décadas tem escancarado um sério problema que tem de ser enfrentado no século XXI, que é o aumento dramático do número de bactérias resistentes às multidrogas. "A crônica de um problema anunciado" vem desde o fim da II Guerra Mundial, quando Sir Alexander Fleming já alertava que o uso desapropriado da penicilina pressionaria a seleção de formas mutantes de *Staphylococcus aureus*. Poucos anos depois, estava confirmado: 50% das cepas eram resistentes àquela nova droga (Alanis 2005).

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) surgem como uma terapia alternativa para o combate de infecções bacterianas, pois como constituintes do sistema imune de vegetais e animais evoluíram mantendo características de cationicidade e de ação independente de receptor, o que torna as suas interações com membranas aniônicas de bactérias de uma natureza biofísica tão fundamental que parece muito difícil estas desenvolverem alguma resistência (Yeaman e Yount 2003; Papo e Shai 2003; Papo e Shai 2005; Brogden 2005).

Peptídeos antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos têm um grande espectro de alvos; em adição à ação antibiótica, esses peptídeos atacam vírus, fungos e células cancerosas. Portanto, drogas desenhadas para imitar PAMs teriam um grande número de aplicações médicas. PAMs pertencem à primeira linha de defesa do sistema imune inato e combatem micróbios por onde tentam entrar: pela pele, tecidos mucosos e outras superfícies. Essas moléculas podem ser encontradas em plantas, mamíferos, insetos e anfíbios. Alguns dos peptídeos mais estudados são: *protegrins*, extraídos de porcos; *magaininas*, sapos; *indolicidins*, bovinos; *defensins*, humanos; *mastoparanos*, vespas. Seus alvos primários são as membranas plasmáticas de micróbios (Zasloff 2002). Esses peptídeos matam micróbios por induzirem seletiva atividade lítica em membranas, portanto aumentando a permeabilidade membranar para íons ou moléculas maiores sem afetar a célula hospedeira (Ludtke et al. 1996). Peptídeos antimicrobianos são anfipáticos e contém resíduos carregados, tais como lisinas e argininas. Além destas características comuns, estas moléculas bioativas apresentam grande diversidade

em suas sequências (tipicamente de 10 a 40 resíduos de comprimento) e estruturas (hélice- α , folha- β e lineares), entretanto, ainda assim, exibem funções líticas similares.

Mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos: formação de poro

Enquanto muitos novos peptídeos têm sido identificados e caracterizados físico-quimicamente, ainda existe um grande quebra-cabeça de como esses peptídeos matam bactérias e outros micróbios. Ao contrário de antibióticos convencionais que inibem proteínas específicas em bactérias, PAMs atacam os invasores causando vazamento em suas membranas (Wade et al. 1990; Dathe et al. 1996). Muitos experimentos com membranas modelo têm mostrado um aumento na condutância voltaica através de membranas planas e vazamento de íons em vesículas (Dos Santos Cabrera et al. 2008a) quando peptídeos estão incubados com a membrana ou vesícula. Logo, tem sido proposto que o efeito lítico de PAMs está na sua habilidade de induzir poros em membranas (Zaslouff 2002). De qualquer modo, observações diretas de poros em membranas permanecem como um desafio, e o mecanismo físico de como peptídeos antimicrobianos induzem a ruptura em membranas ainda é pouco claro.

Para explicar isso, três mecanismos de ruptura de membranas tem sido sugeridos: barril, tapete e toroidal (Figura 1) (Bechinger 2004; Bechinger e Lohner 2006). De acordo com o modelo barril, peptídeos ligam-se à membrana, reconhecem-se, oligomerizam e inserem-se na região hidrofóbica da membrana formando um poro transmembrânico. A orientação dos peptídeos permite que a superfície hidrofóbica dos peptídeos fique em contato com a matriz hidrofóbica da membrana, enquanto a hidrofílica permanece voltada para o interior estruturando um poro hidrofílico. O modelo de poro toroidal sugere que peptídeos antimicrobianos inicialmente ligam-se à superfície da membrana alvo. A interação eletrostática entre o peptídeo e as cabeças polares dos lipídeos impõe tensão na membrana e a permeação é induzida localmente onde a concentração de peptídeos é mais alta que a concentração peptídeo/lipídeo (P/L) crítica típica da membrana. O poro transmembrânico formado a partir da transição de parte dos peptídeos da orientação paralela para a transmembrânica induz uma mudança de orientação dos lipídeos vizinhos, caracterizando uma estrutura de topologia toroidal. Similarmente, no modelo tapete, os peptídeos ligam-se e interagem com as cabeças lipídicas impondo uma tensão de curvatura na membrana, e a acumulação de peptídeos acima da concentração P/L crítica induz a quebra da membrana em

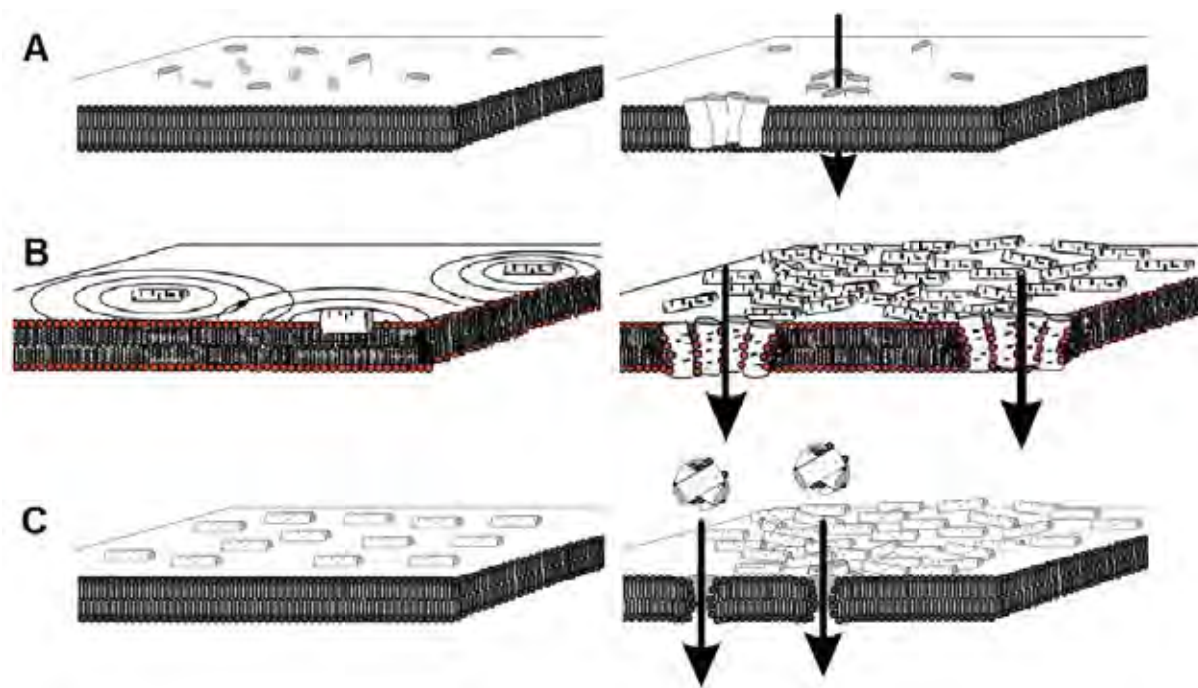


Figura 1. Formação de poro por peptídeos antimicrobianos. **A)** modelo de poro barril; **B)** modelo de poro toroidal e **C)** modelo carpete de ruptura de membranas. Representação gráfica modificada de Bechinger 2004.

pedaços, um efeito da micelização de lipídeos e peptídeos, o que acarreta a formação de grandes canais.

Huang (2000) propôs um modelo de dois estados que compreende o estado adsorvido (S) e um estado inserido (I). É pensado que primeiro o peptídeo se associa com a membrana no estado S, mas acima de uma certa concentração P/L, ocorre o vazamento da membrana, quando o peptídeo está no estado I. Dados de dicroísmo circular orientado mostram que neste estado I, os peptídeos estão orientados perpendicularmente à bicamada (Huang e Wu 1991). A inserção de peptídeos pode ser encontrada nos modelos barril e toroidal. A maior diferença está na orientação dos lipídeos. No modelo barril, os lipídeos não são perturbados quando o poro é formado. Uma mudança na orientação lipídica quando o peptídeo está inserido pode sugerir a formação de poro toroidal.

Seletividade de peptídeos antimicrobianos

Uma característica intrigante de peptídeos antimicrobianos é sua habilidade de distinguir células procarióticas de eucarióticas. Embora existam modelos que indicam como

os peptídeos atuam, a origem da seletividade para a ruptura de membranas ainda não é compreendida. A interação do peptídeo MP1 com vesículas PC (fosfatidilcolina) pura e PCC (PC-Colesterol 80:20) rendem P/L críticos de 1/67 e 1/31, respectivamente (Dos Santos Cabrera et al. 2008b), mostra como as diferenças na composição de vesículas influenciam a afinidade exibida pelo peptídeo antimicrobiano, o que indica que a composição de membranas deve ser considerada para o estudo da afinidade que PAMs têm por micróbios em detrimento das células hospedeiras. A monocamada externa de membranas celulares de mamíferos são compostas principalmente de fosfatidilcolinas (PC), esfingomielinas (SM), fosfatidiletanolaminas (PE) e esteróis (tal como colesterol) que são eletricamente neutros em pH fisiológico (Han e Gross 2005). Em contraste, membranas de bactérias incluem quantidade substancial de fosfolipídeos negativamente carregados, tais como fosfatidilgliceróis (PG) e cardiolipinas (CL) (Murzyn et al. 2005). Além disso, em bactérias Gram-negativas, a monocamada externa é composta principalmente de lipopolissacarídeos, que é uma molécula polianiônica.

A seletividade usualmente tem sido atribuída às cabeças polares, onde os lipídeos aniônicos seriam mais suscetíveis a ação de peptídeos catiônicos. A importância das interações eletrostáticas entre PAMs e lipídeos carregados tem sido demonstrado por meio de ensaios com magaininas mutantes e selvagens aos quais o aumento de atividade foi encontrado nos peptídeos modificados que tinham mais cargas positivas (Matsuzaki et al. 1997). Não obstante, interações eletrostáticas não constituem o único fator determinante que dita a seletividade de PAMs, como sugerido por Dos Santos Cabrera (2008b). Estes autores notaram que a curvatura característica da membrana tem um papel na sua permeabilização, pois a despeito de vesículas PCCL (PC-Cardiolipina 70:30) e PCPG (70:30) apresentarem a mesma densidade de cargas, os espectros de CD mostraram uma helicidade aumentada dos peptídeos em contato com vesículas PCCL, além de ser necessário quatro vezes mais peptídeo para ser alcançado a concentração P/L crítica comparado com a vesícula PCPG.

II. OBJETIVOS

II. Objetivos

Para investigar o impacto que peptídeos mastoparanos tem sobre membranas lipídicas modelo, produzimos simulações por Dinâmica Molecular com os objetivos específicos de:

- 1) investigar o papel que as interações eletrostáticas tem para a seletividade do peptídeo MP1, a partir da análise da perturbação e sua extensão causada por este peptídeo sobre membranas modelo aniônica POPG e neutra POPC e correlacioná-las com as interações intramoleculares no seu N-terminal;
- 2) caracterizar o efeito de separação local de fase lipídica induzida por peptídeos com diferentes números de lisinas representados pelo MP1 (+2), seu análogo N2-MP1 (+3), MK-578 (+4) e MP-B (+5); investigar os estados que os peptídeos estudados adotam ao longo das simulações, bem como avaliar como aquele efeito interfere na formação de poro transmembrânico.

Os objetivos foram distribuídos de forma que os resultados e discussões subsequentes pudessem ser organizados em capítulos distintos. Os dois objetivos elencados estão apresentados respectivamente nos capítulos IV.1 e IV.2. Após algumas correções pertinentes, ambos os capítulos serão submetidos à publicação.

III. MÉTODOS

III. Métodos

Simulações por Dinâmica Molecular

A aproximação de Born-Oppenheimer

Uma completa descrição mecânica-quântica de um átomo é feita pela hamiltoniana

$$H = \hat{T}_N + \hat{T}_e + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{eN} + \hat{V}_{NN},$$

tendo $\hat{T}_e = \sum_i \frac{p_i^2}{2m}$ e $\hat{T}_N = \sum_N \frac{p_N^2}{2M_N}$, onde H contém os operadores para a energia cinética de elétrons (massa m) e núcleos (massa M_N), e para as interações elétron-elétron, elétron-núcleo e interações entre núcleos. A solução para este problema de N -corpos é transformá-lo em um problema de 2-corpos por meio da aproximação de Born-Oppenheimer. Muito simplificada, a dedução surge de uma constatação: sendo $M_N \gg m_e$ (por ex., a massa do núcleo de hidrogênio é 1836 vezes maior que a do elétron), temos que $\frac{p_i^2}{2m} \gg \frac{p_N^2}{2M}$, logo é considerado que os elétrons interagem com o núcleo como se este estivesse espacialmente inerte relativamente a aqueles, portanto os graus de liberdade eletrônicos se ajustariam instantaneamente a uma variação de configuração nuclear. Isso permite o desacoplamento dos movimentos eletrônico e nuclear. Assim temos a função de onda dos elétrons para posições nucleares fixas, $\psi(r, R)$:

$$H_e(r, R) \psi(r, R) = E_e(R) \psi(r, R)$$

sendo $H_e(r, R) = \hat{T}_e + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{eN}$, tendo tomado $\hat{T}_N = 0$. Note que E_e é o auto-valor de energia dos elétrons se movendo no potencial advindo de núcleos fixos e está em função de R (posições nucleares). Com os núcleos em movimento, podemos considerar:

$$\epsilon(R) = V_{NN}(R) + E_e(R),$$

onde $V_{NN}(R)$ é a repulsão de Coulomb internuclear. A função de onda nuclear $\phi(R)$ considera, por via reflexa, que núcleos interagem com elétrons por meio de um potencial de campo médio, sob esse entendimento, o núcleo interagiria com uma nuvem eletrônica e se moveria no potencial efetivo $\epsilon(R)$:

$$[\hat{T}_N + \epsilon(R)]\phi(R) = E_T(R)\phi(R) \quad (1)$$

onde E_T é a energia total do átomo. Essa é a equação de Born-Oppenheimer. Como quase toda a massa do átomo está concentrada no núcleo, essa equação de Schrödinger efetiva do núcleo determina a posição do átomo como um todo.

Dinâmica Molecular Clássica

A equação de Born-Oppenheimer (Eq. 1) permite que os graus de liberdade eletrônicos possam ser embutidos em um potencial efetivo e a dinâmica dos átomos pode ser reduzida para a dinâmica clássica do núcleo neste potencial. Então, um sistema de N partículas pode ser descrito pela Hamiltoniana clássica:

$$H = \sum_{i=1}^N \frac{\mathbf{p}_i^2}{2m_i} + U(x_1, \dots, x_N), \quad (2)$$

com massas m_i , posições $x_i(t)$ e momentos \mathbf{p}_i . U é escolhido tal que $U(x_1, \dots, x_N) \approx \epsilon(R)$. A formulação Newtoniana da equação acima dá as equações de movimento de Newton:

$$\ddot{x}_i = \frac{d^2 x_i}{dt^2} = \frac{\mathbf{F}_i}{m_i}, \quad (3)$$

onde \ddot{x}_i é a aceleração. A força \mathbf{F}_i na i -ésima partícula é derivada do potencial U ,

$$\mathbf{F}_i = -\nabla_i U(x_1, \dots, x_N), \quad (4)$$

que depende das posições de todas as N partículas. Uma trajetória de dinâmica molecular clássica $\mathbf{x}^N(t) := (x_1(t), \dots, x_N(t))$ é obtida integrando a eq. (3) com (4). A parametrização de U é chamada campo de forças.

As deduções, equações e conceitos oriundos da Mecânica-Quântica apresentados foram baseados no estudo das seguintes fontes (entre outras) e das quais podem ser obtidos mais detalhes: Tully (2000), Doltsinis (2006) e Leach (2001).

Descrição das moléculas: função potencial

A função potencial $U(\{x_j\})$ deveria, a princípio, ser um potencial de muitos corpos, porém sua forma geral é uma versão simplificada criada a partir da adição de potenciais de pares para interações entre átomos não-ligados covalentemente e potenciais de interação de 2, 3 e 4-corpos para descrever interações entre átomos ligados. Uma forma tipicamente encontrada é (usada no GROMOS-96 e Martini):

$$U = U_{NB} + U_B \quad (5)$$

onde no primeiro termo temos:

$$U_{NB} = U_{LJ}(r_{ij}) + U_{Coul}(r_{ij}) = 4\varepsilon_{ij} \left\{ \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right\} + \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 \varepsilon_{rel} r_{ij}} \quad (6)$$

onde $r_{ij} = x_i - x_j$, σ_{ij} é a distância na qual o potencial de LJ vai a zero e a energia ε_{ij} é a profundidade do poço em uma separação de equilíbrio $2^{1/6}\sigma$. ε_{rel} é a constante dielétrica relativa. No nível clássico de descrição, os átomos não-ligados interagem via potencial eletrostático (Coulomb) e Van der Waals. O potencial de LJ foi usado para descrever as interações de VdW, pois além de considerar a atração dipolo induzido-dipolo induzido entre dois átomos neutros por meio de um termo atrativo $-r^{-6}$, ainda embuti princípios oriundos da mecânica-quântica, tal como o princípio de exclusão de Pauli (Leach 2001). O efeito da exclusão entre elétrons de valência de dois átomos a uma distância r_{ij} é modelado por um potencial repulsivo de curto alcance $\propto r^{-n}$, $n = 12$.

No segundo termo da Eq. 5 temos: $U_B = U_b + U_a + U_d + U_{di} =$

$$\frac{1}{2}K_b (r_{ij} - r_{ij}^0)^2 + \frac{1}{2}K_a [\cos(\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)]^2 + K_d [1 + \cos(n\delta_{ijkl} - \delta_{ijkl}^0)] + K_{di} (\xi_{ijkl} - \xi_{ijkl}^0)^2 \quad (7)$$

onde:

U_b é o potencial harmônico que representa ligações covalentes, tendo r_{ij}^0 como a distância de equilíbrio;

U_a , o potencial angular que incorpora vibrações angulares harmônicas, sendo o ângulo de equilíbrio θ_{ijk}^0 e $\theta_{ijk} = \arccos \frac{x_{ji} \cdot x_{jk}}{x_{ji} x_{jk}}$. O campo de forças GROMOS-87 foi modelado usando

um potencial harmônico mais simples: $U_a = \frac{1}{2}K_a (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2$.

U_d , potencial diedral, descreve as vibrações torsionais entre os planos (i, j, k) e (j, k, l) , onde

$\delta_{ijkl} = \arccos \frac{(x_{ji} \times x_{jk}) \cdot (x_{kl} \times x_{jk})}{|x_{ji} \times x_{jk}| \cdot |x_{kl} \times x_{jk}|}$, tal que $\delta_{ijkl} = 0$, quando i e l estão na conformação cis e

δ_{ijkl}^0 é o parâmetro que limita a torção e é usado para restringir a estrutura secundária do *backbone* de proteínas;

U_{di} é o potencial usado para manter anéis aromáticos e a estrutura $C\alpha CONHC\alpha$ planos, ξ_{ijkl}^0 é o ângulo de equilíbrio;

K_b, K_a, K_d, K_{di} : são constantes de força.

Uma outra forma para o potencial diedral é a função de Ryckaert-Bellemans, geralmente

empregada em alcanos: $U_d(\phi_{ijkl}) = \sum_{n=0}^5 C_n \cos^n(\delta_{ijkl} - \pi)$. (8)

Campo de forças

A função potencial (Eq. 5) requer um grande número de parâmetros para cargas parciais, Lennard Jones, valores de equilíbrio para ligações químicas, ângulos, diedrais e constantes de força. Muitos desses valores são obtidos experimentalmente ou por cálculos de mecânica-quântica. Em uma simulação, o conjunto de parâmetros escolhidos para proteínas, lipídeos, água e íons devem ser compatíveis e cuidado deve ser tomado quando se combina diferentes conjuntos de parâmetros.

Proteínas

Um dos campos de forças usado para descrever as interações de peptídeos foi o GROMOS-87 (van Gunsteren e Berendsen 1987). Este é um campo de forças átomo-unido, isto é, trata os átomos de hidrogênio não-polares como parte de um átomo maior; hidrogênios em anéis aromáticos e hidrogênios polares são tratados explicitamente. Nesse padrão de representação cada peptídeo MP1 foi modelado com 152 átomos (Figura 2A). GROMOS-87 usa os potenciais descritos acima (Eq. 6 e 7) e é otimizado com modelo de água SPC.

O segundo campo de forças usado foi o MARTINI com parâmetros para proteínas (Monticelli et al. 2008). Este campo é baseado na filosofia de moléculas *coarse-grained* (granuladas) e segue um mapeamento 4:1, isso significa que quatro átomos pesados são representados por um simples sítio de interação, com exceção dos anéis aromáticos, pois seguem o mapeamento 2:1 e 3:1 para preservar suas especificidades. Na representação granulada, os peptídeos tinham 31-35 sítios (Figura 2B). Nesse campo de forças são consideradas apenas quatro principais tipos de sítios de interação: carregado (Q), polar (P), não-polar (N) e apolar (C). Para representar de maneira mais acurada a natureza química das estruturas atômicas correspondentes no mapeamento, tais subtipos também são considerados:

i) com capacidade de ligação de hidrogênio: d (doador), a (aceitador), da (doador-aceitador) e 0 (nenhuma);

ii) de 1 (baixa polaridade) até 5 (alta polaridade);

todas as combinações (P1,...,P5, C1,...,C5, N0,Na,Nd,Nda, Q0,Qa,Qd,Qda) rendem 18 diferentes tipos de sítio de interação, portanto a matriz de interação tem 18x18 diferentes combinações. O potencial de LJ é o mesmo que o descrito na Eq. 6 (1º termo), exceto a aplicação de uma função *shift* que suaviza a convergência da energia a zero entre $r_1=0,9$ e $r_c=1,2$ nm, para que sejam evitados efeitos de raio de corte em $r = r_c$. A cada par de sítios são

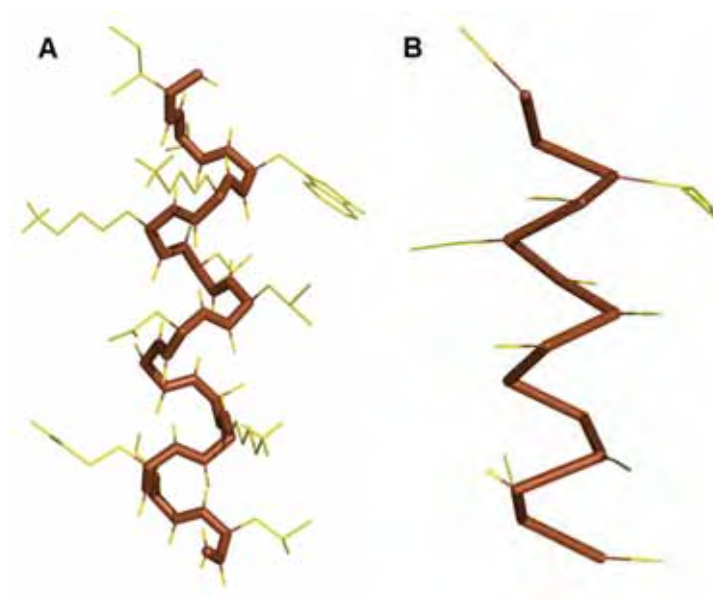


Figura 2. Representação gráfica do peptídeo MP1. **A)** modelagem *fine-grained* de 152 átomos; **B)** *coarse-grained* de 32 sítios.

assinalados, portanto, dois parâmetros: σ e ϵ . A distância atribuída foi de 0,47 nm para todas as combinações, exceto para aquelas que envolvem sítios do tipo Q (carregado) e C1/C2 (hidrofóbicos), para os quais $\sigma=0,62$ nm. Para ϵ temos uma variação que vai de 2,0 kJ/mol para interações entre sítios polares e apolares imitando o efeito hidrofóbico, até 5,6 kJ/mol para interações entre grupos carregados. A matriz completa é encontrada em Marrink et al. (2007). Do lado eletrostático, a modelagem granulada transformou o que seria um grupo de carga na representação fina, cujos átomos constituintes tinham assinaladas cargas parciais, tal que a soma é um número inteiro, em um único sítio de carga 0, 1 ou -1. Concernente ao potencial de Coulomb, resta determinar a constante dielétrica relativa, que será discutida adiante em *Água e íons*.

Lipídeos

Nas simulações *fine-grained* de lipídeos, usamos o campo de forças de Berger et al. (1997) que é baseado nos campos de forças OPLS e GROMOS-87. Aquele também é um campo de forças átomo-unido; nessa representação, o número de átomos em cada lipídeo POPC é reduzido de 130 para 52 átomos, comparado a um modelo *all-atoms* (Figura 3A). O campo de forças de Berger emprega os parâmetros de ligações químicas, ângulos, diedrais e diedrais impróprios para os átomos da região da cabeça polar obtidos do GROMOS-87. Os

Tabela 1. Parâmetros de LJ e Coulomb presentes no campo de forças Berger para simular lipídeos.

átomo	atomtype	Berger		
		σ (nm)	ϵ (kJ/mol)	q/e^1
N	LNL	0,325	0,7113	-0,5
P	LP	0,374	0,8368	1,7
O	LO	0,296	0,8786	-0,6/-0,7
O	LOM	0,296	0,8786	-0,8
O	LOS	0,3	0,87914	-0,7/-0,8
C	LC	0,375	0,4393	0,7/0,8
CH	LH1	0,38	0,3347	0/0,3
CH ₂	LH2	0,3905	0,4937	0,3
CH ₂	LC2	0,38	0,4937	0,4/0,5
CH ₃	LC3	0,396	0,6067	0,4
*CH ₂	LP2	0,396	0,3808	0
*CH ₃	LP3	0,396	0,56895	0

* Valores ajustados para reproduzir o volume por lipídeo e calor de vaporização de pentadecanos (Berger et al 1997). Todos os outros parâmetros foram retirados do OPLS.

¹ Cargas determinadas por cálculos de mecânica-quântica *ab-initio* por Chiu et al. (1995).

diedrais das cadeias hidrocarbônicas são ajustados pelo potencial de Ryckaert-Bellemans (Eq. 8). Os parâmetros de LJ e cargas parciais estão na Tabela 1. Os parâmetros que descrevem as interações entre peptídeos e lipídeos (combinações entre GROMOS-87 e Berger ff) foram tomadas de derivações de Tieleman DP (disponível em <http://moose.bio.ucalgary.ca/files/lipid.itp>).

Na representação granulada, os lipídeos tinham 11 sítios, o que representa uma redução por um fator de ~5 para o número de átomos comparado ao modelo átomo-unido (Figura 3B). Lipídeo POPC foi modelado com sítio do tipo Q0 para o grupo colina; Qa para o grupo fosfato; Na, grupos éster-glicerol e C1 para as cadeias hidrofóbicas. No modelo de POPG, o grupo glicol teve assinalado um sítio do tipo P4; o resto da molécula é análogo ao POPC. Os detalhes para ligações, ângulos, diedrais estão na topologia disponível no site oficial Martini (http://md.chem.rug.nl/cgmartini/images/parameters/martini_v2.0_lipids.itp).

Água e íons

O modelo fino de água SPC consiste de um átomo de oxigênio com uma carga parcial negativa e um potencial de LJ e dois átomos de hidrogênios que interagem somente por meio de suas cargas parciais positivas. O ângulo HOH e comprimentos de ligação são rígidos e a

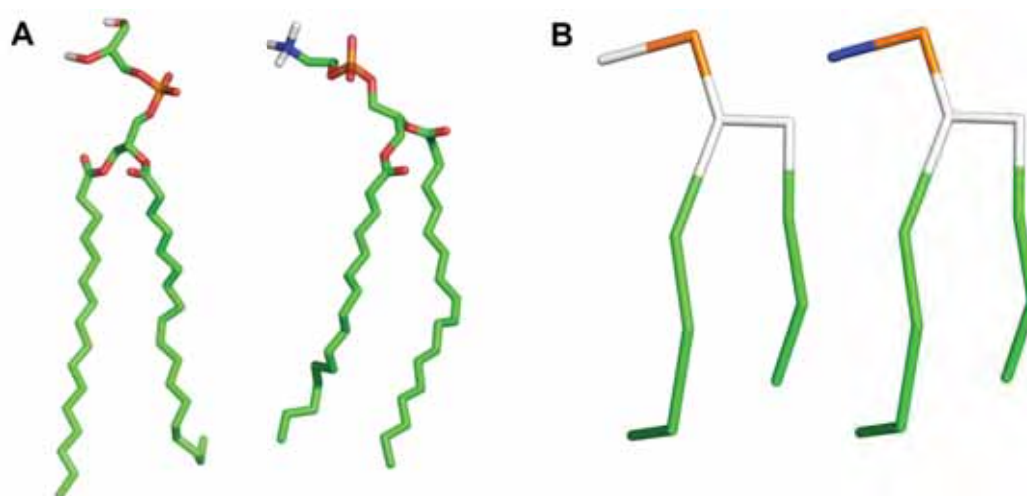


Figura 3. Representação gráfica dos lipídeos POPG e POPE. **A)** *Fine-grained*; **B)** *coarse-grained*.

falta de polarizabilidade é compensada por um momento de dipolo maior do que o real. O modelo granuloso de água corresponde ao centro de massa de quatro moléculas de água reais. Isto é assinalado como um sítio de tipo P4. Em temperatura ambiente a 1 bar de pressão, este modelo reproduz a densidade de 1g/cm^3 . Os parâmetros do íon sódio empregados nas simulações com modelos *fine-grained* também são provenientes do GROMOS-87. Esses parâmetros foram herdados pelo sucessor GROMOS-96. Em simulações *coarse-grained*, o íon sódio foi modelado pelo tipo Qd (+1) e cloro por Qa (-1). Cada tipo de sítio carregado (Q) foi parametrizado de forma a ter uma camada de hidratação implícita, tendo em mente, por exemplo, íons em solução. Como o modelo de água granuloso não tem carga, nem dipolo, a blindagem eletrostática dos sítios carregados se dá explicitamente através da constante dielétrica relativa. Para isso, é apontado $\epsilon_{rel} = 15$.

Algoritmos

Para integrar as equações de movimento (Eq. 3), as forças precisam ser calculadas como gradiente do campo de forças (Eq. 4). Na formulação do campo de forças (Eq. 6 e 7) as derivadas são calculadas analiticamente.

Integração das equações de movimento

O algoritmo Verlet (Verlet 1967) é um esquema simples e robusto para integrar as equações de movimento de Newton

$$x(t + \Delta t) \approx 2x(t) - x(t - \Delta t) + \frac{F}{m} \Delta t^2. \quad (8)$$

Isso é derivado da expansão de Taylor de $x(t + \Delta t) + x(t - \Delta t)$. O erro nas posições é da ordem de Δt^4 ; velocidades $\mathbf{v}(t) = \frac{1}{2\Delta t}(x(t + \Delta t) - x(t - \Delta t)) + \mathcal{O}(\Delta t^2)$ são menos acurados, mas são necessárias somente para calcular a energia cinética e portanto a temperatura. Este algoritmo tem boa estabilidade temporal e conservação de energia (Leach 2001).

Integrador Leap-frog

Uma variante do integrador Verlet aplicada é o algoritmo leap-frog (Hockney et al 1974), que define as velocidades em tempos na metade dos passos:

$$v\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = \frac{x(t+\Delta t) - x(t)}{\Delta t} \quad \text{e} \quad v\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) = \frac{x(t) - x(t-\Delta t)}{\Delta t}.$$

Isto fornece a atualização das posições

$$x(t + \Delta t) \approx x(t) + v\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right)\Delta t$$

e a atualização das velocidades é tomada do esquema Verlet (Eq. 8)

$$v\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) \approx v\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + \frac{F}{m}\Delta t.$$

Esta forma é equivalente ao esquema de Verlet e compartilha sua simplicidade e ainda tem a vantagem de exibir menores erros nas velocidades (Leach 2001).

Constraints em ligações químicas

O passo temporal Δt no esquema de integração depende dos movimentos mais rápidos do sistema. Para líquidos e biomoléculas em temperaturas biologicamente relevantes, estes movimentos advém das vibrações de ligações químicas. Se tratarmos ligações harmônicas como rígidas, o passo de integração pode ser aumentada por um fator 4 (Hess et al 1997). Ligações rígidas são implementadas com *constraints*, pois são forçadas após cada passo retornar o comprimento ao valor fixado. Para ligações em proteínas, o algoritmo LINCS (Hess et al 1997) foi aplicado, enquanto para o modelo de água rígida SPC foi utilizado o algoritmo SETTLE (Miyamoto e Kollman 1992).

Eletrostática em condições periódicas de contorno

O tamanho dos sistemas que são simulados com Dinâmica Molecular é ainda tão pequeno que a superfície de fronteira (parede ou simplesmente fronteira) é grande comparada

ao volume. Como estamos interessados no comportamento do volume, a superfície é eliminada pela repetição periódica da célula de simulação, conhecida como condições periódicas de contorno. Uma partícula que sai de um lado da célula entra pela face oposta com a mesma velocidade. Cuidado deve ser tomado quando interações não-ligadas são calculadas. Para interações de curto-alcance, que decaem mais rapidamente que r^{-3} um esquema de raio-de-corte é suficiente, onde as interações entre as partículas i e j são calculadas dentro de um raio R_{cut} quando $r_{ij} \leq R_{cut}$. O raio-de-corte não pode ser maior que a metade da menor dimensão da célula de simulação. A interação de Coulomb (Eq. 5), de qualquer modo, tem longo alcance e em um arranjo periódico, contribuições de um infinito número de imagens de células vizinhas precisam ser consideradas. Seguindo as descrições de Deserno e Holm (1998), a energia eletrostática de um sistema periódico (caixa de comprimento L , periódica nas três dimensões $\mathbf{n}=(n_1, n_2, n_3)$) podem ser reescritas como

$$U_{Coul} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^N \sum'_{\mathbf{n} \in \mathbb{Z}^3} \frac{q_i q_j}{|r_{ij} + \mathbf{n}L|} \quad (9)$$

onde a soma \sum' indica que para $i = j$ o termo $\mathbf{n} = 0$ deve ser omitido. A Eq. 9 é condicionalmente convergente, então seu valor depende do procedimento aplicado. A soma de convergência lenta pode ser dividida em duas de convergência rápida com base na identidade

$$\frac{1}{r} = \frac{f(r)}{r} + \frac{1-f(r)}{r},$$

o primeiro termo da soma coleciona as interações de curtas distâncias com rápido decaimento, tal que os valores para um $r > r_{max}$ deve ser zero ou negligenciável, portanto o uso de raio-de-corte introduz erros extremamente marginais; o segundo, tem lento decaimento em grandes separações. A escolha de Ewald para o fator de convergência foi

$$f(r) = \text{erfc}(r) := \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_r^{+\infty} \exp(-t^2) dt \quad (10)$$

que transforma as cargas pontuais em densidades de carga gaussianas, o que faz suas interações decaírem rapidamente com a distância. A energia eletrostática fica

$$U_{Coul} = U^{(r)} + U^{(K)} + U^{(s)} + U^{(d)}$$

onde a contribuição do espaço real é

$$U^{(r)} = \frac{1}{2} \sum_{i,j} \sum'_{\mathbf{m} \in \mathbb{Z}^3} q_i q_j \frac{\text{erfc}(\alpha |r_{ij} + \mathbf{m}L|)}{|r_{ij} + \mathbf{m}L|}, \quad (11)$$

do espaço recíproco

$$U^{(K)} = \frac{1}{2L^3} \sum_{k \neq 0} \frac{4\pi}{k^2} \exp\left(\frac{-k^2}{4\alpha^2}\right) |\tilde{\rho}(k)|^2, \quad (12)$$

da auto-energia

$$U^{(s)} = -\frac{\alpha}{\sqrt{\pi}} \sum_i q_i^2, \quad (13)$$

e a correção de dipolo

$$U^{(d)} = \frac{2\pi}{(1 + 2\epsilon')L^3} \left(\sum_i q_i r_i \right)^2.$$

Onde $\tilde{\rho}(k)$ é a transformada de Fourier da densidade de carga $\rho(r)$

$$\tilde{\rho}(k) = \int d^3r \rho(r) e^{-ik \cdot r} = \sum_{j=1}^N q_j e^{-ik \cdot r_j}. \quad (14)$$

A distribuição gaussiana de cargas da parte recíproca é avaliada em um espaço discreto a partir da localização das cargas em um *grid* regular (essa é a parte *mesh* do algoritmo PME conhecida como espalhamento de cargas). A densidade de cargas espalhadas (*mesh density*) sofre a transformação rápida de Fourier - FFT, equivalente à Eq. 14, e a energia $U^{(K)}$ do espaço recíproco é calculada (Eq. 12). Isso equivale a resolução da equação de Poisson naquele espaço. Então as forças provenientes das cargas espalhadas no espaço recíproco são calculadas e re-transformadas às posições das partículas originais para render a contribuição de Coulomb para a força total em uma partícula.

Shan et al. (2005) enfatiza que o espalhamento de cargas não deve ser feito de modo a tentar reproduzir a distribuição de cargas original (aquela que existia antes de ser suavizada pela aplicação do fator de convergência gaussiano), mas sim para obtermos uma função de distribuição bem comportada, de modo que os cálculos sucessivos de energias e forças convirjam acuradamente. Aqueles autores fazem uma derivação detalhada da operação de espalhamento de cargas e entre as variáveis apontadas está a distância entre cada ponto da rede (*grid-spacing*; no Gromacs esse parâmetro recebe o nome de *fourierspacing*). Para que as cargas sejam assinaladas em um ponto da rede, geralmente são realizadas interpolações polinomiais; a mais empregada delas (e também no Gromacs) é a *B-spline* (a ordem do polinômio é determinada manualmente). Estas duas variáveis estão intrinsecamente relacionadas com α (Eq. 11-13), que é um parâmetro que ajusta as contribuições dos espaços real e recíproco. Na prática, a dominância das contribuições entre espaços real e recíproco pode ser feita variando o raio-de-corte (R_C), já que $\alpha = \frac{\sqrt{p}}{R_C}$ e $p=10^{-5}$ (tolerância ao erro, em

Gromacs: ewald_rtol (determinado manualmente)). Aumentando R_C , deixamos a maior contribuição no espaço real, diminuindo-o torna o espaço recíproco dominante. Para o pacote de simulação computacional Gromacs v. 4.5 foi observado que o desempenho em simulações paralelizadas é otimizado quando o custo dos cálculos no espaço recíproco é de 25 a 33% do tempo total gasto com o PME. Significa dizer que a maior contribuição para a energia eletrostática total é tomada do espaço real, para que isso seja alcançado, devemos aumentar o raio-de-corte ($r_c > 0,9$ nm). Simultaneamente, podemos aumentar o grid-spacing, acelerando, dessa forma, os cálculos no espaço recíproco; quando isso é feito é recomendável aumentar a ordem de interpolação B-spline para não haver perda de acurácia.

Os detalhes e maiores explicações sobre o método PME podem ser encontrados, por exemplo, em Deserno e Holm (1998), Gibbon e Sutmann (2002) e Shan et al. (2005).

Temperatura e pressão constantes

Os métodos de acoplamento conhecidos como esquemas de acoplamento fraco são conceitualmente simples e permitem fazer simulações em temperatura e pressão constantes, de forma que as trajetórias obtidas do Hamiltoniano (Eq. 2) conservem energia e o sistema possa ser descrito por uma amostragem NpT.

Acoplamento de temperatura

A temperatura T é calculada a partir das velocidades através da energia cinética do sistema inteiro:

$$\frac{1}{2}\eta kT = E_{cin} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m_i v_i^2, \text{ com } \eta = 3N - N_{constraints} - \eta_{com}.$$

onde η é o número de graus de liberdade, isto é, todos os graus de translação de átomos esféricos menos o número de *constraints* (ex: comprimentos de ligações limitados (*constrained*)) aplicados aos átomos e $\eta_{com} = 3$ para remover o momento do centro de massa.

Como descrito em van der Spoel et al. (2010), o algoritmo de acoplamento fraco de Berendsen (Berendsen et al. 1984) imita o acoplamento do sistema a um banho térmico com uma temperatura de referência T_0 . O efeito é uma lenta relaxação da temperatura do sistema de T para T_0 , de acordo com

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T}{\tau}.$$

Os desvios iniciais decairão exponencialmente com τ . O algoritmo muda a velocidade de partículas em cada passo por um fator λ , que é calculada como

$$\lambda = \sqrt{1 + \frac{\Delta t}{\tau_T} \left(\frac{T_0}{T(t - \frac{1}{2}\Delta t)} - 1 \right)} \text{ onde } \tau = \tau_T \frac{2C_V}{kv}, \quad (15)$$

C_V é a capacidade calorífica em volume constante. No Gromacs τ_T e T_0 são determinados manualmente. τ/τ_0 varia entre 1 (gás ideal, $C_V = \frac{3}{2}Nk$) e ~ 3 para água. Por exemplo, nas simulações *fine-grained*, um tempo de decaimento de $\tau_T = 0,1$ ps foi escolhido para influenciar minimamente a dinâmica do sistema ($\tau_T/\Delta t = 0,1/0,002 = 50$ passos).

Acoplamento de pressão

O acoplamento fraco de pressão reescala as coordenadas das partículas x_i e os vetores da célula de simulação a cada passo (ou a cada n_p passos) com uma matriz de escalonamento

$$\mu_{ij} = \delta_{ij} - \frac{n_p \Delta t}{3\tau_p} \beta_{ij} (p_{ij}^0 - p_{ij}(t)). \quad (16)$$

τ_p é a constante de acoplamento e β é uma estimativa para a compressibilidade isotérmica do sistema (é suficiente assumirmos $\beta = 4,5 \cdot 10^{-5} \text{bar}^{-1}$ que é o valor calculado para a água).

Este esquema guia a uma relaxação exponencial

$$\frac{dp}{dt} = \frac{p_0 - p}{\tau_p}.$$

Todas as simulações foram feitas com $p_0 = 1$ bar. Nas simulações *fine-grained*, foi determinado $\tau_p = 1$ ps ($\tau_p/\Delta t = 500$ passos).

O algoritmo de atualização das posições

Conforme van der Spoel et al. (2010) p. 39, temos o seguinte algoritmo de atualização com o integrador *leap-frog* (desconsiderando o uso de restrições ou *constraints*).

Dado:

Posições r de todos os átomos no instante t

velocidades v de todos os átomos no instante $t - \frac{1}{2}\Delta t$

Acelerações F/m em todos os átomos no instante t (onde $F = -\nabla U$)

Energia cinética e virial em $t - \Delta t$

1. calcula os fatores λ e μ de acordo com (15) e (16)
 2. atualiza e reescala as novas velocidades $v' = \lambda(v + a\Delta t)$
 3. calcula novas coordenadas $x' = x + v'\Delta t$
 4. reescala as coordenadas e a caixa: $x'' = \mu x'$; $b' = \mu b$.
-

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Selectivity and Membrane Thinning as the Effects of Interaction
Between the Antimicrobial Mastoparan Peptide Polybia-MP1
and Phosphatidylglycerol or Phosphatidylcholine membranes

**Selectivity and Membrane Thinning as the Effects of Interaction
Between the Antimicrobial Mastoparan Peptide Polybia-MP1
and Phosphatidylglycerol or Phosphatidylcholine Membranes**

Fernando César Lopes Filho and José Roberto Ruggiero

UNESP - São Paulo State University, Department of Physics, 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. Corresponding author: José R. Ruggiero (Tel 55 17 3221.2239, Fax 55 17 3221.2247, e-mail: zerug@ibilce.unesp.br)

Abstract

Mastoparans are membrane-active peptides extracted from the social wasp venom which exhibit mast cell degranulation and hemolytic activities and are especially interesting due to their strong antimicrobial action. Relatively few simulations and structural information of experimental sources are reported for these peptides. In order to investigate its impact on membranes, the first molecular dynamics simulations of the antimicrobial peptide Polybia-MP1 (IDWKKLLDAAKQIL-NH₂), a cationic mastoparan highly selective for bacterial cells, interacting with anionic palmitoyl-oleoyl-phosphatidylglycerol (POPG) and neutral palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC) bilayers are reported here. A membrane thinning was observed in the region where the interactions between the peptide MP1 and the POPG membrane led to the formation of a peptide-perturbed lipid cluster. The thinning and perturbation of the lipidic packing are the effects of electrostatic interactions and dynamics. In contrast, these effects drove to structural changes much smaller on the POPC membrane. The peptide's ability due to its cationic residues to coordinate and perturb larger number of lipids, and hence to cause larger structural changes in the POPG membrane in comparison to POPC, suggest that its selective feature is a result of charge effects and it is correlated to the intramolecular interactions in its N-terminal (IDWKK). Since the thinning membrane, a result of lipid interdigitation, is the precursor step to the pore formation, the simulations also indicate which is the mechanism of action of the peptide Polybia-MP1, because thinning events fit the toroidal pore model and experimental observations.

Keywords: selectivity; cationic antimicrobial peptide; wasp venom mastoparan; peptide-membrane interactions; conformational analysis; molecular dynamics simulations.

Introduction

The search for alternative antibiotics has been a slow answer to the explosion in the prevalence of drug-resistant pathogens, which have created an emergency situation in health care throughout the world (Alanis 2005). In this sense, natural molecules produced by many tissues and cell types responsible for the innate immune defense system in a variety of invertebrate, plant and animal species as bioactive peptides, which display strong antimicrobial activity (Brogden 2005), have been extensively investigated for being good templates for the design of new antibiotics (Spratt 1994; Marr et al. 2006). These peptides interact with the cellular membrane in two ways: by disrupting the phospholipid arrangement and/or by target site mechanisms (Yeaman and Yount 2003; Papo and Shai 2003). Thus, in order to comprehend their mechanisms of action, one needs to understand how peptides interact with anionic lipids present in a large proportion in the outer layer of bacterial membranes. Several works discuss the interactions between peptides and membranes from a low peptide/lipid (P/L) ratio (e.g. 1/128), where no effect or the membrane thinning can be observed (Jang et al. 2006; Hsu and Yip 2007), up to high P/L ratios, where leakage or disruption of membranes or vesicles is observed and discussed according to barrel-stave, toroidal-pore, carpet, and detergent-like models (Bechinger 2004). Data obtained from dye leakage experiments and subsequent analyses of the flow-rate constant, apparent average pore number and P/L molar ratio allowed to conclude that the peptide Polybia-MP1, above the threshold P/L, lyses vesicles by the mechanism of pore formation and, different from other mastoparans, displayed a high selectivity for bacterial membranes, another desired characteristic for new antibiotics (dos Santos Cabrera et al. 2008).

Thus, in order to enlighten our understanding about the impact and selective feature of action of the peptide MP1, we performed molecular dynamics simulations with neutral (POPC) or anionic (POPG) lipids. The self-assembling simulations of the lipid/water/peptide mixture provided the unbiased insertion mode of the peptide into the membranes (Esteban-Martín and Salgado 2007). After the formation and equilibration of the peptide/membrane complex, we evaluated by statistical analyses the numbers of lipids coordinated and perturbed

by the peptide, and through the analyses of order parameters, we obtained the radius of perturbation around the peptide. The results obtained from both environments are compared. Inside the area of perturbation the membrane thinning occurrence was verified in the POPG membrane; in contrast, in the POPC it was not possible to distinguish an area of perturbation, nor was the membrane thinning observed. Membrane thinning is the precursor step to the pore formation (Chen et al. 2003), which fits the toroidal pore model of the mechanism of action of antimicrobial peptides proposed by Matsuzaki, Shai and Huang (Matsuzaki et al. 1994; Gazit et al. 1996; Ludtke et al. 1996). This peptide's ability to induce larger structural changes in model anionic membranes, model for the bacterial ones, as well as the characteristics of this peptide-induced structure provide a plausible explanation about its selective feature and mechanism of action of the antimicrobial mastoparan peptide Polybia-MP1.

Computational methods

In the center of an 8 nm cubic box one peptide was placed with its axis aligned to z-axis and 128 POPC or POPG lipids were randomly distributed around it. A pool of eight different conformations of lipids was used and care was taken with an equal distribution of D and L chiralities in POPG lipids. Moreover, in POPG simulations, 126 Na⁺ counterions were introduced and initially distributed at distances of, at least, 0.4 nm of the oxygen atoms belonging to ester groups of the lipids. The addition of this amount of counterions was sufficient to ensure a null net charge of the system, as the peptide has a +2 charge. In POPC simulations, only 2 Cl⁻ counterions were introduced. In addition, each box was filled with ~7,000 water molecules. After the construction of the unit cell of simulation, the energy system was minimized by the steepest descent method. A simulation of 50 ps with a restraining position of the peptide atoms and isotropic pressure coupling was performed. Finally, the system was submitted to production run with anisotropic pressure coupling.

The POPG and POPC lipid topologies followed the models proposed by Zhao et al (2007), with the L and D chiralities discriminated in the case of POPG. The peptide Polybia-MP1 coordinates (IDWKKLLDAAKQIL-NH₂) were generated in an alpha-helix conformation using RIBOSOME V1.0 program. The N-terminus and lysine side chains were protonated, carrying a NH₃⁺ charged group, as well as the aspartate aminoacid residues were treated in their acid form with a COO⁻ group, yielding a peptide net charge equal to +2. We

have used GROMOS87 force field (van Gunsteren and Berendsen 1987) for the peptide, SPC water molecules and Na^+/Cl^- counterions. The lipid parameters were taken from the OPLS-based force field of Berger et al. (1997). And the combinations between both force fields were considered using parameters from the lipid.itp file available at <http://moose.bio.ucalgary.ca/files/>. Bond lengths were constrained using the LINCS algorithm (Hess et al. 1997), and the SETTLE algorithm (Miyamoto and Kollman 1992) was used for SPC water molecules allowing a 2 fs integration time step. Lennard-Jones interactions were cut off at 1.0 nm and electrostatic interactions were evaluated using the smooth particle mesh Ewald method (Darden et al. 1993), with a real space cut off of 1.0 nm, grid spacing of 0.12 nm, and a fourth-order spline interpolation. The neighbor-list was updated every 10 steps. The system was maintained at constant temperature of 310 K, and lipids, solvent (water and ions), and peptide were separately coupled with a coupling constant of 0.1 ps. The pressure was kept constant at 1 bar and a coupling constant of 1 ps was applied. Temperature and pressure were controlled using Berendsen coupling algorithms (Berendsen et al. 1984).

All simulations and most of the analyses were performed using GROMACS suite of programs, version 3.3.3 (Lindahl et al. 2001). Averages are followed by standard deviations. Deuterium order parameters (S_{CD}) were calculated for saturated *sn*-1 lipid chains. Trajectories were visualized and figures were rendered using the VMD program (Humphrey et al. 1996).

Results and Discussion

We have applied the self-aggregation strategy known as the minimum bias method to obtain the insertion mode of the peptide inside the membrane (Esteban-Martín and Salgado 2007). This method was applied instead of molecular diffusion simulations of peptides in preformed membranes, as this occurs in nature, because the interactions among model POPG lipids via lipid-ion bridges has a high free-energy barrier (Zhao et al. 2007), which hinders an appropriated partitioning of the peptide in the lipid headgroups, in time scales less than 1 μs , as observations of our own initial simulations. The time scales of the simulations according to the alternative approach are less than a factor of four of that. A total of five independent simulations of self-assembling of POPG lipids, water molecules, and counterions were performed, one simulation without and four others containing one peptide, all with different lipid atomic positions to the initial configuration. To clarify the descriptions, this POPG case

will be characterized by the s1 simulation, because it presented representative characteristics about the insertion mode of the peptide and its interactions with the membrane (Table 1). To complete this study, one additional self-aggregation simulation with POPC lipids was performed to represent the POPC case. To know the details of the self-aggregation process of POPG lipids into bilayers, see the descriptions and figures of the Electronic Supplementary Material.

Insertion mode of the peptide into the membrane: surface adsorbed peptide

In both POPC and POPG cases the peptide/membrane complex was formed and equilibrated up to 120 ns, with the peptide adsorbed into lipid acyl chains lying parallel to the bilayer interface as shown in Figure 1. In both cases, the hydrophobic face of the amphipathic α -helix peptide remained in close contact with lipid acyl tails, while longer hydrophilic side-chains of the lysines interacted with oxygen atoms of both the ester and phosphate groups, in the POPC and POPG cases, and with, oxygen atoms belonging to glycol groups, in the case of POPG. In contrast, in the latter case, the counterions showed a preferential interaction with ester groups as observed here and elsewhere (Böckmann and Grubmüller 2004; Zhao et al. 2007).

Bechinger and Lohner (2006) and others have discussed from a more general point of view that linear amphipathic cationic antimicrobial peptides act on membranes essentially as detergents, therefore adsorbing in parallel orientation to the membrane surface, and the analysis from circular dichroism spectra along with the primary sequence indicates that the Polybia-MP1 is a perfect example of a peptide with those structural characteristics. In this context, experimental observations from different short cationic antimicrobial peptides support the toroidal pore model to which the peptides accumulate parallel to the membrane surface up to reach the threshold peptide/lipid (P/L) ratio driving a transition of part of the peptides for transmembrane orientation, thus exerting the biological activity by the pore formation. Specifically, Polybia-MP1 exhibits sigmoidal concentration dependence, which indicates that the accumulation of surface adsorbed peptide up to the threshold P/L ratio is required, when in a cooperative manner, it triggers the releasing of vesicles contents (dos Santos Cabrera et al. 2008). The study of the interaction of other mastoparan with membranes using solid-state ^{15}N -NMR spectroscopy investigated the insertion and orientation of labeled peptides interacting with macroscopically oriented samples of DMPC/DMPG bilayers, and

observed that most of the peptides (90%) are oriented with their helix axis parallel to the membrane surface (Hori et al. 2001). Thus, the parallel orientation observed in the final configurations of the self-assembled complexes is consistent with available experimental data and theoretical models proposed to amphipathic cationic antimicrobial peptides.

Charge interactions and conformational analysis

The antimicrobial mastoparan peptide Polybia-MP1 is not hemolytic, but its analogue with aspartate 2 to asparagine substitution has shown high hemolytic activity (Souza et al. 2005; Leite et al. 2011). To explain the absence of the hemolytic activity, dos Santos Cabrera et al. (2008) have suggested the high-charge density (6 charges) and low hydrophobicity (-0.108) have an interrelated role for the selective interaction of the peptide for the bacterial membranes, a discussion based on a theoretical model by Taheri-Araghi and Ha (2007). From an electrostatic and structural point of view, dos Santos Cabrera et al. have suggested the position of the Lys 4, Lys 5 and N-terminus charged groups in the helical structure would form a triangular arrangement with the Asp 2 approximately in the circumcenter, as observed in peptide-TFE/water simulations, which would create an electrostatic equilibrium. This arrangement would contribute to a partial neutralization of the charges and hence would cause a smaller screening and perturbation of the lipid headgroups on zwitterionic membranes. In model membranes with POPC, we observed the peptide's charged residues were dispersed in the interfacial environment, and it was possible to observe that the interactions in which the Asp 2 and Asp 8 residues were involved formed nets of intermittent interactions with the nearest cationic residues in the form of triangles (Fig. 3A). On the other hand, in the case of POPG, the spatial dispersion of the charges in the environment was able to induce only a persistent bond, a salt bridge between Asp 2 and Lys 5 (Fig. 3B), allowing the other cationic residues free to interact with the bilayer.

To study the impact of the intramolecular interactions in the peptide on the intermolecular interactions of the peptide with the membranes, we calculated the radial distribution functions (RDF) of the electronegative polar groups of the lipids around the cationic groups of the peptide (Fig. 2). In the case of POPG, the plot revealed a peak at $r=0.257$ nm indicating the formation of hydrogen bonds, and $r=0.4$ nm is the radius of the first interaction shell. Inside this shell, the peptide coordinated 22.7 ± 1.3 oxygen atoms belonging to seven lipids (average obtained between 200 and 250 ns). Moreover, it was found that the

charged groups of the N-terminus and lysines 4 and 11 coordinated, respectively, 4.8 ± 0.5 , 8.9 ± 0.7 , and 6.5 ± 0.7 oxygen atoms, while this number is only 2.5 ± 0.6 for the lysine 5, consequence of the salt bridge formation with Asp 2. The analysis of the RDF plot in the case of POPC showed that the charged groups of the N-terminus, lysines 4, 5, and 11 coordinated, respectively, 3.1 ± 0.2 , 3.1 ± 0.4 , 3.3 ± 0.7 , and 5.8 ± 0.6 lipid oxygen atoms inside a shell of radius equal to 0.35 nm. It added 15.3 ± 1.1 oxygen atoms coordinated by the peptide belonging to five lipids. These numbers revealed that the peptide interacted electrostatically with 32.6% less oxygen atoms in a zwitterionic membrane in relation to an anionic one, which corresponds to a decrease of 28.6% of coordinated lipids. The explanation for this observation of the decrease of the screening by the POPC lipid headgroups must consider two components. The first one is related to the nature of the interactions, because charge-dipole interactions between the peptide and this environment are weaker than charge-charge interactions present in anionic membranes. The second and more important one is the role that the aspartates 2 and 8 have minimizing the electrical field due to the cationic charges in the N-terminal. According to the coordination numbers, it should be noticed that the averages obtained from the N-terminal, lysines 4 and 5, in the case of POPC, are equivalent statistically to the value obtained for Lys 5, which formed a salt bridge with Asp 2 in the case of POPG, evidencing the importance of the strategic position of those acidic residues for that minimization. With the substitution of the aspartate residue in the position 2 for an asparagine, a neutral amino-acid, it could not participate of those interactions, thus the peptide would be able to screen more oxygen atoms in the zwitterionic membrane starting to present hemolytic activity, which is in line with the experimental observations obtained from the analogue peptide.

Simultaneously, the intra-side-chains and intermolecular interactions in the POPC membrane did not disturb the n-n+4 hydrogen bonds in the main chain, which stabilized the helical structure, as can be seen in Figure 4A. The high helical content observed is in agreement with previous membrane-mimicking TFE/water simulations (dos Santos Cabrera et al. 2008), as TFE/water solvent is a good mimicking of a zwitterionic membrane. In TFE/water solvent as well as in a model POPC membrane, it was found that the peptide was folded from the 3rd to the 13th residue; in the other membrane, the α -helix was stable from the 3rd to the 12th residue (Fig. 4B). This ordered structure is required for lytic activity (dos Santos Cabrera et al. 2008; Leite et al. 2011).

Order parameters and membrane thinning

Order parameters for *sn*-1 chains were calculated considering the lipids inside a circle of radius r measured from the peptide's center of mass. For the POPG case, it should be noticed that the order parameters increase with the increasing radius (Fig. 5A). This means the ordering of the lipid chains near the peptide are more perturbed. Only for distances larger than 2.2 nm, the values of the order parameters converge to those obtained in the peptide-free simulation (s5). In the POPC membrane was not possible to observe a significant radial variation of the order parameter around the peptide, because the lipid tail anisotropy was almost uniform, therefore we could not distinguish an area of perturbation (Figure S4).

The value of 2.2 nm for the radius of perturbation is in good agreement with the value of 2.0 nm obtained by Zemel et al. (2005) in simulations applying mean-field and chain-packing theories. The reference configuration studied by them is very similar to ours: an amphipathic cylinder represented the adsorbed peptide with its axes parallel to the membrane. Moreover, these authors described that the thinning is restricted to the peptide-free leaflet. In our results, however, the thinning is verified for both leaflets. This difference in results is possibly due to the absence of lipid correlations in the work of Zemel et al. Furthermore, a radius equal to 2.2 nm is also comparable to the value of 1.5 nm, measured from the peptide's backbone, obtained from the interactions between 13-residue Indolicidin and pure DOPG membranes (Hsu and Yip 2007). Although this peptide being short and having four cationic residues as well as the Polybia-MP1, this comparison had to be made ignoring the disordered structure and the excess of tryptophans.

Inside the 2.2 nm radius there were 25 lipids, evidencing that the peptide did not only perturb the ordering of the lipids inside the coordination shell (which contained seven lipids), but also lipids in layers beyond. Because the POPG lipids form a network through the hydrogen bonds and lipid-ion-lipid bridges, the orientational disordering of the lipids inside the coordination shell propagates throughout the net to the lipids non-coordinated by the peptide, an effect of lipid chain correlations. It indicates a large contribution of dynamic effects in addition to the electrostatic effects, which is in good agreement with experimental observations obtained by Hori et al (2001). Through NMR spectroscopy experiments with oriented lipid bilayers, these authors reported that the addition of mastoparan peptides lead to an increased motional averaging of the lipid headgroups, even of the acyl chains, turning the bilayer more fluid. In our data this increase of fluidity is revealed by the lower values of the

order parameters calculated over all lipids of the peptide-containing simulation (s1) in comparison to the peptide-free simulation (s5, Fig. 5B).

In the region where the orientational disorder of lipid acyl chains in POPG bilayer was observed, it was also possible to notice the thinning of the membrane. Both leaflets showed a peptide-induced negative curvature (Fig. 1). In order to quantify the thinning, we plotted the electronic densities of the phosphorous atoms as a function of the distance of the center of the membrane for peptide-containing and peptide-free simulations (Fig. 6). From the peptide-free simulation (control simulation-s5), we obtained a membrane thickness of 4.4 nm, while from the peptide-containing simulation (s1), we obtained a value of 4.06 nm. Thus, the overall thinning was of 0.34 nm, comparable to the value of 0.41 nm observed of the Indolicidin peptide interacting with pure DOPG bilayers (Hsu and Yip 2007). Nevertheless, a little more pronounced displacement can be observed in the peptide-containing leaflet; compared to the control simulation s5, the peak of that leaflet shifted by 0.22 nm, while the other leaflet shifted by 0.12 nm. The disordered lipid tails near the peptide occupied the space below it and were interdigitated by the lipid tails of the other leaflet, being this conformation change the putative cause for the membrane thinning. The observation of the interdigitation of lipids and the consequent membrane thinning in the peptide-perturbed region has also been done by other previous experimental and computational studies (Ludtke et al. 1995; Mecke et al. 2005; Jang et al. 2006; Hsu and Yip 2007).

Conclusions

The similarity of the results from independent simulations with POPG lipids indicates the results are reproducible, because all bilayers obtained from the self-assembling method are well equilibrated and the binding mode of the peptide into the complex is in agreement with experimental and theoretical descriptions. The insertion mode of the peptide inside the POPC membrane is consistent to POPG simulations, however the analyses of order parameters did not evidence a distinguishable radial variation from the peptide's center of mass, nor was the membrane thinning observed. By contrast, in the anionic membrane, we demonstrated that dynamics and electrostatic interactions led to the formation of a peptide-perturbed lipid cluster revealed by the disordering of the acyl chains of the nearest lipids of the peptide, when compared to order parameters obtained from the peptide-free simulation. Moreover, in the

peptide-perturbed region, we observed the interdigitation of lipids between both leaflets and the membrane thinning. Others previous studies also observed the lipid interdigitation in the region influenced by the peptide and suggested that this is the cause for the thinning; our data can support the same conclusion. Experimentally, it had already been demonstrated that the single change of the aspartate for the asparagine in that position turned the hemolytic analogue, therefore eliminating its selectivity. We then mined statistical information about the molecular interactions and obtained evidences which allow us to attribute the different results between the POPG and POPC membranes to the peptide's ability to coordinate and perturb a larger number of lipids in anionic membrane than in the zwitterionic one and to correlate these charge effects to the intramolecular interactions in the peptide's N-terminal (IDWKK), especially with the role that aspartate 2 exercises reducing the electrical field of the neighboring lysines. As dye leakage experiments support the thesis of MP1 lyses vesicles as the toroidal pore model, and in this model the membrane thinning is the step that precedes the pore formation events involved in the lytic activity, our simulations provide, therefore, details at atomic level of the impact of the antimicrobial mastoparan peptide Polybia-MP1 on anionic membranes.

Acknowledgments

This study was supported by grants provided by the Brazilian agencies São Paulo State Research Foundation-FAPESP (BIOprospecTA program 2006/57122-7) and the National Council of Technological and Scientific Development - CNPq (to JRR and fellowship to FCLF).

Tables**Table 1.** List of the simulations.

Simula- -tion	lipid	Number of peptide	Simulation time (ns)	Final orientation of the peptide	Lipids per leaflet (With/no peptide)
s1	POPG	1	250	parallel	66/62
s2	POPG	1	250	parallel	66/62
s3	POPG	1	250	parallel	67/61
s4	POPG	1	250	parallel	67/61
s5	POPG	0	200	-	66/62
s6	POPC	1	250	parallel	61/67

Figures

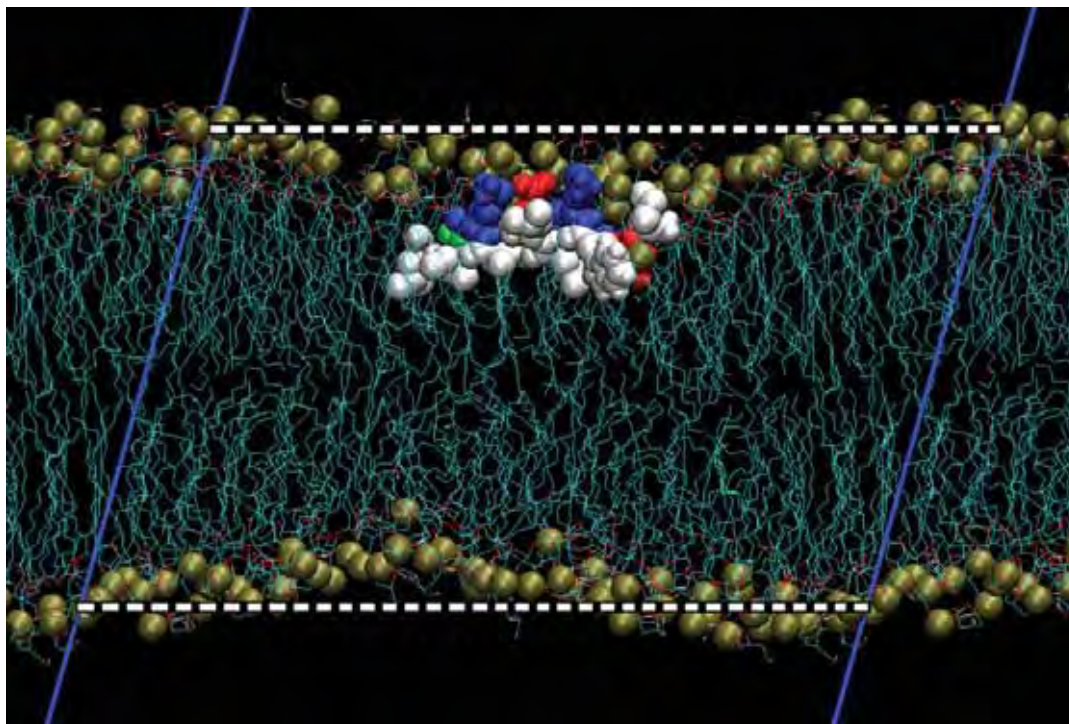


Fig. 1 Final configuration obtained after 250 ns of simulation. This frame was taken from the POPG simulation s1; the insertion mode and orientation of the peptide is also representative for POPC simulation. White spheres in the peptide represent the hydrophobic residues; blue spheres, cationic residues; red spheres, anionic residues; and green spheres, polar residues. Brown spheres in the lipids represent phosphorous atoms and cyan lines represent lipid acyl chains. The white dashed lines are shown to guide the eyes along the membrane thinning. Parallel blue lines show the boundaries of the box simulation.

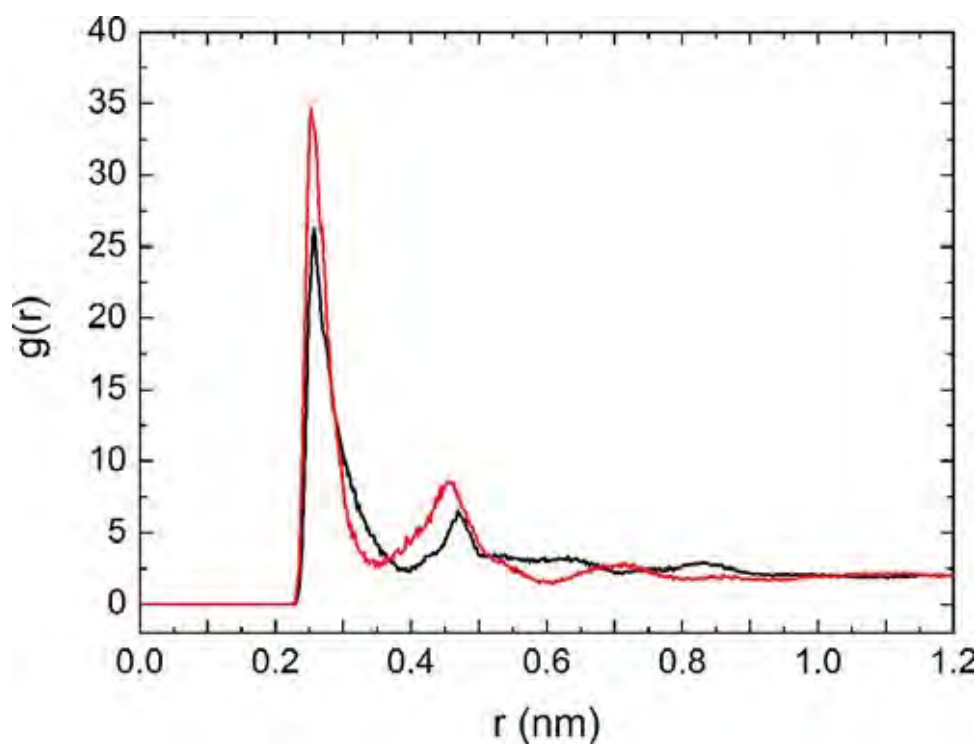


Fig. 2 Radial distribution functions (RDF) of all lipid oxygen atoms around the cationic groups of the peptide (charges of the N-terminal and side-chains of the lysines 4, 5 and 11). RDF calculated for the POPG and POPC cases (black and red lines, respectively).

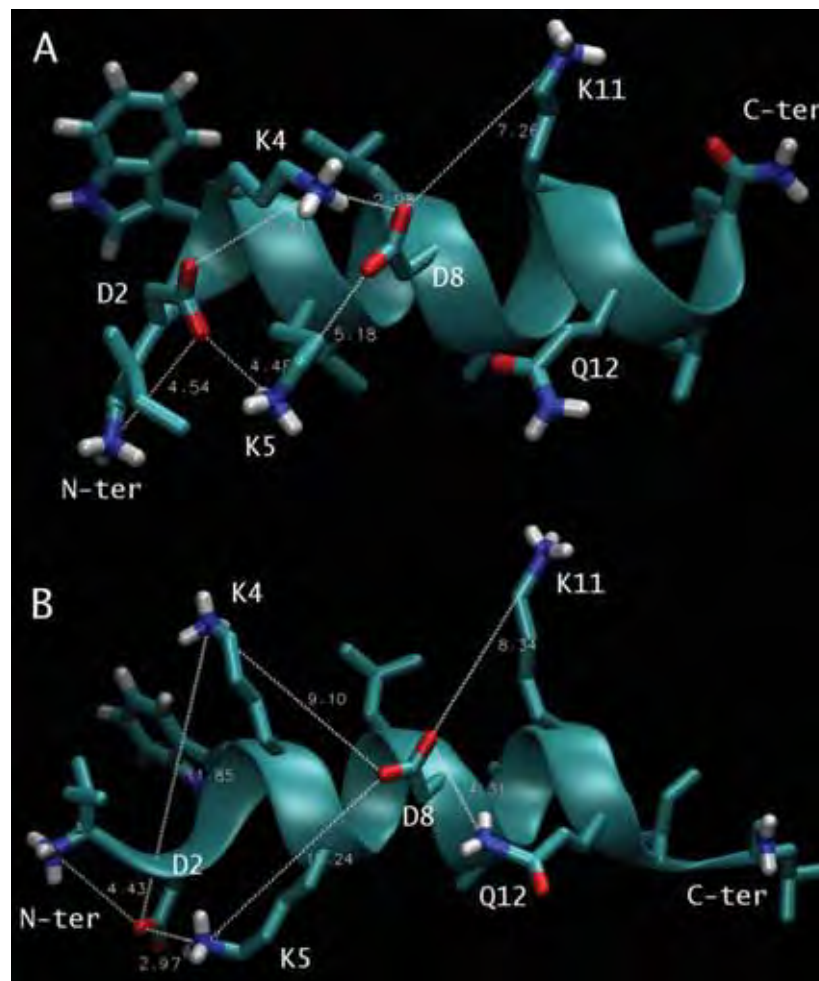


Fig. 3 Projections of peptide MP1 obtained from the simulations. A) For the POPC simulation, it is possible to verify the formation of intermittent interactions between aspartates and lysines in the N-terminal region. B) For the POPG simulation, only a salt bridge formation between the Asp2 and Lys5 residues is verified.

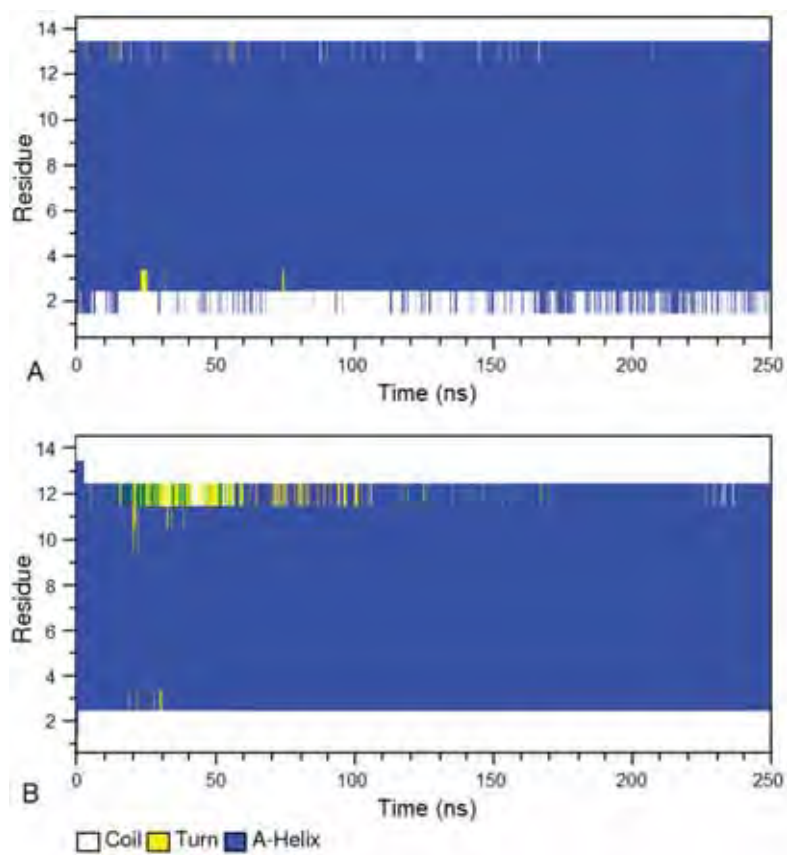


Fig. 4 Analysis of the secondary structure of the peptide in time for the A) POPC and B) POPG simulations.

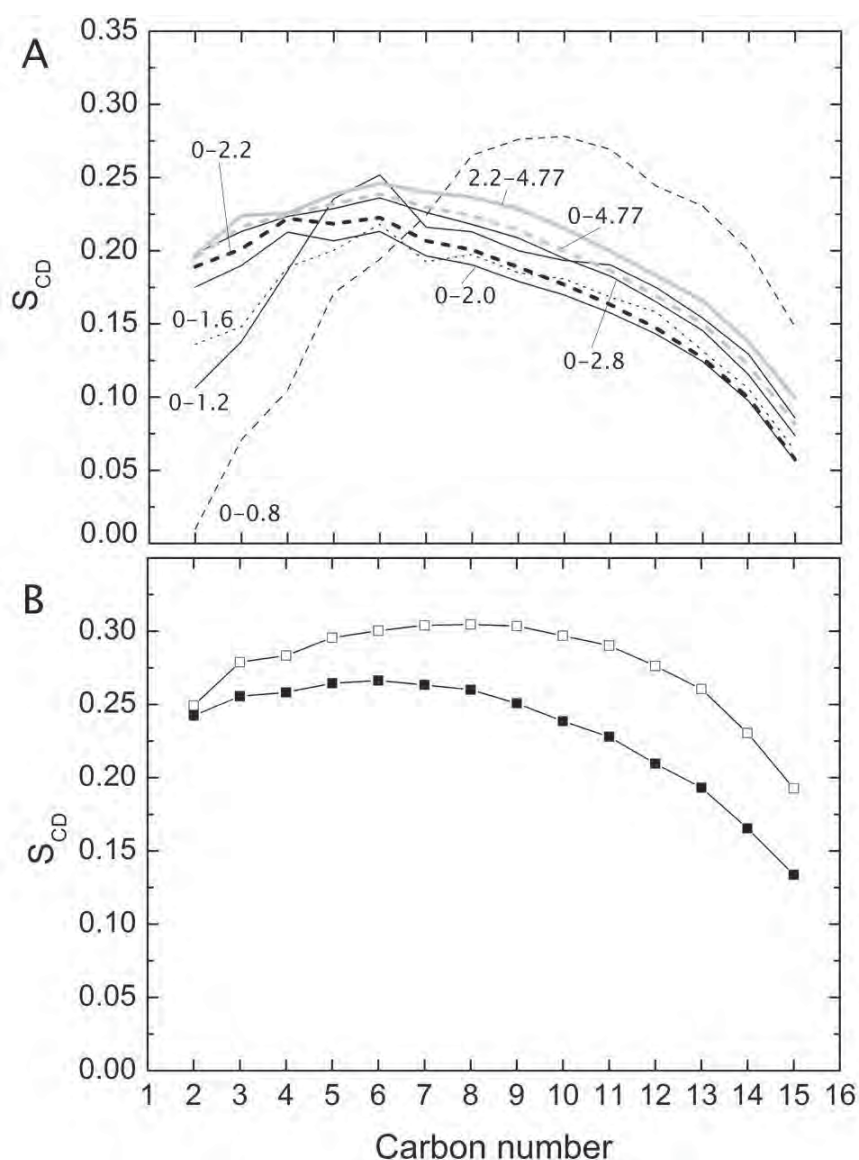


Fig. 5 Lipid order parameters as a function of the distance from the peptide's center of mass for the POPG simulation; for the POPC case it is not shown, because no significant variation of the order parameter of the lipids coordinated by the peptide in relation to farthest lipids was verified (See Figure S4 in the supplementary material). **(A)** For the peptide-containing leaflet, order parameters are presented for distances from 0 to 0.8; 0 to 1.2; 0 to 1.6; 0 to 2.0; 0 to 2.2; 0 to 2.8; 0 to 4.77; and 2.2 to 4.77 nm. **(B)** Comparison of the lipid order parameters between peptide-free (empty squares) and peptide-containing simulations (filled squares). Such order parameters were calculated over all lipids.

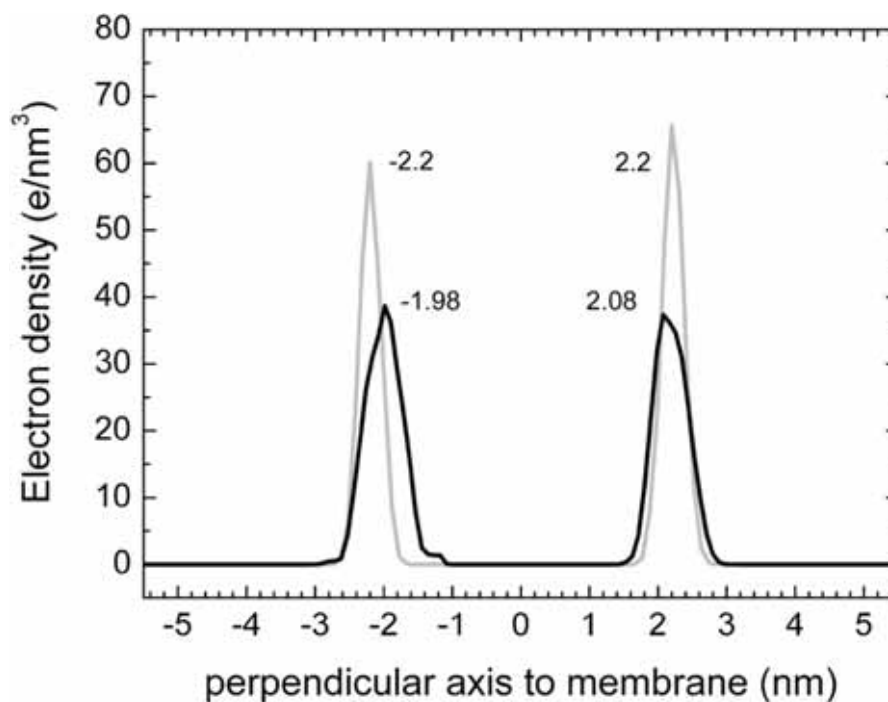


Fig. 6 Electron density of the phosphorous atoms as a function of the distance from the center of the membrane ($x=0$). Grey line represents the density from the peptide-free simulation (s5). Black line represents the peptide-containing simulation (s1); the leaflet with the adsorbed peptide is represented on the left peak of this graph. As declared previously, a thinning on the POPC membrane was not visualized, therefore we did not include its density for comparison (See Fig. S5).

References

Alanis AJ (2005) Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res* 36: 697-705. doi: 10.1016/j.arcmed.2005.06.009

Bechinger B (2004) Structure and function of membrane-lytic peptides. *Crit Rev Plant Sci* 23: 271-292. doi: 10.1080/07352680490452825

Bechinger B, Lohner K (2006) Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 1758: 1529-1539. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.07.001

Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, DiNola A, Haak JR (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* 81: 3684–3690. doi: 10.1063/1.448118

Berger O, Edholm O, Jahnig F (1997) Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophys J* 72: 2002-2013. doi: 10.1016/S0006-3495(97)78845-3

Böckmann RA, Grubmüller H (2004) Multistep binding of divalent cations to phospholipid bilayers: a molecular dynamics study. *Angew Chem Int Ed* 43: 1021-1024. doi: 10.1002/anie.200490018

Brogden KA (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Rev* 3: 238-250. doi: 10.1038/nrmicro1098

Chen FY, Lee MT, Huang HW (2003) Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation. *Biophys J* 84:3751-3758. doi: 10.1016/S0006-3495(03)75103-0

Darden T, York D, Pedersen L (1993) Particle mesh Ewald: an N-log(N) method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys* 98: 10089–10092. doi: 10.1063/1.464397

dos Santos Cabrera MP, Broggio Costa, ST, de Souza BM, Palma MS, Ruggiero JR, Ruggiero Neto J (2008) Selectivity in the mechanism of action of antimicrobial mastoparan peptide Polybia-MP1. *Eur Biophys J* 37: 879-891. doi: 10.1007/s00249-008-0299-7

Esteban-Martín S, Salgado J (2007) Self-assembling of peptide/membrane complexes by atomistic molecular dynamics simulations. *Biophys J* 92: 903-912. doi: 10.1529/biophysj.106.093013

Gazit E, Miller IR, Biggin PC, Sansom MS, Shai Y (1996) Structure and orientation of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 within phospholipid membranes. *J Mol Biol* 258: 860-870. doi: 10.1006/jmbi.1996.0293

Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije JGEM (1997) LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J Comp Chem* 18: 1463-1472. doi: 10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H

Hori Y, Demura M, Iwadate M, Ulrich AS, Niidome T, Aoyagi H, Asakura T (2001) Interaction of mastoparan with membranes studied by ¹H-NMR spectroscopy in detergent micelles and by solid-state ²H-NMR and ¹⁵N-NMR spectroscopy in oriented lipid bilayers. *Eur J Biochem* 268: 302-309. doi: 10.1046/j.1432-1033.2001.01880.x

Hsu JCY, Yip CM (2007) Molecular dynamics simulations of indolicidin association with model lipid bilayers. *Biophys J* L100-L102. doi: 10.1529/biophysj.107.108050

Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14: 33–38. doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5

Jang H, Ma B, Woolf TB, Nussinov R (2006) Interaction of Protegrin-1 with lipid bilayers: membrane thinning effect. *Biophys J* 91: 2848-2859. doi: 10.1529/biophysj.106.084046

Leite NB, da Costa LC, dos Santos Alvares D, dos Santos Cabrera MP, de Souza BM, Palma MS, Ruggiero Neto J (2011) The effect of acidic residues and amphipathicity on the lytic activities of mastoparan peptides studied by fluorescence and CD spectroscopy. *Amino Acids* 40: 91-100. doi: 10.1007/s00726-010-0511-9

Lindahl E, Hess B, van der Spoel, D (2001) GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *J Mol Model* 7: 306–317. doi: 10.1007/s008940100045

Ludtke S, He K, Huang H (1995) Membrane thinning caused by magainin 2. *Biochemistry* 34: 16764-16769. doi: 10.1021/bi00051a026

Ludtke SJ, He K, Heller WT, Harroun TA, Yang L, Huang HW (1996) Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry* 35: 13723-13728. doi: 10.1021/bi9620621

Marr AK, Gooderham WJ, Hancock REW (2006) Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realist outlook. *Curr Opin Pharmacol* 6: 468-472. doi: 10.1016/j.coph.2006.04.006

Matsuzaki K, Murase O, Tokuda H, Funakoshi S, Fujii N, Miyajima K (1994) Orientational and aggregational states of magainin 2 in phospholipid bilayers. *Biochemistry* 33: 3342-3349. doi: 10.1021/bi00177a027

Mecke A, Lee DK, Ramamoorthy A, Orr BG, Banaszak Holl MM (2005) Membrane thinning due to antimicrobial peptide binding: an atomic force microscopy study of MSI-78 in lipid bilayers. *Biophys J* 89: 4043-4050. doi: 10.1529/biophysj.105.062596

Miyamoto S, Kollman PA (1992) SETTLE: an analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithms for rigid water models. *J Comp Chem* 13: 952-962. doi: 10.1002/jcc.540130805

-
- Papo N, Shai Y (2003) Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model membranes? *Peptides* 24: 1693-1703. doi: 10.1016/j.peptides.2003.09.013
- Souza BM, Mendes MA, Santos LD, Marques MR, Cesar LM, Almeida RN, Pagnocca FC, Konno K, Palma MS (2005) Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides* 26: 2157-2164. doi: 10.1016/j.peptides.2005.04.026
- Spratt BG (1994) Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* 264: 388-393. doi: 10.1126/science.8153626
- Srinivasan R. RIBOSOME - program to build coordinates for peptides from sequence. Johns Hopkins University Medical School, Baltimore, MD 21205.
- Taheri-Araghi S, Ha B-Y (2007) Physical basis for membrane-charge selectivity of cationic antimicrobial peptides. *Phys Rev Lett* 98:168101.1-168101.4. doi: 10.1103/PhysRevLett.98.168101
- van Gunsteren WF, Berendsen HJC (1987) Gromos-87 manual. Biomos BV, Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands.
- Yeaman MR, Yount NY (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* 55: 27-55. doi: 10.1124/pr.55.1.2
- Zemel A, Ben-Shaul A, May S (2005) Perturbation of a lipid membrane by amphipathic peptides and its role in pore formation. *Eur Biophys J* 34: 230-242. doi: 10.1007/s00249-004-0445-9
- Zhao W, Tomasz R, Gurtovenko AA, Vattulainen I, Karttunen M (2007) Atomic-scale structure and electrostatics of anionic palmitoyloleoylophosphatidylglycerol lipid bilayers with Na⁺ counterions. *Biophys J* 92: 1114-1124. doi: 10.1529/biophysj.106.086272
-

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Selectivity and Membrane Thinning as the Effects of Interaction Between the Antimicrobial Mastoparan Peptide Polybia-MP1 and Phosphatidylglycerol or Phosphatidylcholine Membranes

Fernando César Lopes Filho and José Roberto Ruggiero

UNESP - São Paulo State University, Department of Physics, 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. Corresponding author: José R. Ruggiero (Tel 55 17 3221.2239, Fax 55 17 3221.2247, e-mail: zerug@ibilce.unesp.br)

In the following section is presented the POPG membrane formation process and, for clarity of the descriptions, the main details are presented for the peptide-free simulation (s5) and other relevant details are also presented for the peptide-containing simulation (s1) (See Table 1 in the main text).

1 Membrane formation process

All simulations (s1-s5) showed a similar process of aggregation and can be described in terms of the same stages described by Marrink et al (2001) and Esteban-Martín and Salgado (2007) for DPPC lipids and Bocchini et al (2009) for POPC lipids, as is illustrated in Figure S1. Even the time scales of the events of the anionic POPG membrane formation are comparable to ones reported previously for zwitterionic membranes. In agreement with those previous studies, a rapid lipid aggregation and exclusion of the water molecules due to thermodynamics forces drove the formation of small lipid clusters (Fig. S1-A); and the subsequent fusion of these clusters into larger aggregates, reaching a lipid distribution in less than 10 clusters (Fig. S1-B), occurred within times of 200 ps and 3 ns, respectively. The fusion of the large aggregates or micelle-like groups into a bilayer-like structure, containing a large lipid pore filled with waters and ions, occurred after 10 ns of simulation. Within 15 ns the structure relaxed to contain 9-14 lipids, which is the minimum number of lipids which stabilized the pore (Fig. S1-C). After 85 ns that number decreased, when the pore closed

rapidly and spontaneously (Fig. S1-D). Subsequently, the number of connective interactions in the membrane plane increased (Fig. S2) and the area per lipid decreased smoothly until 120 ns (Fig. S3), when the bilayer was equilibrated and the thinning of the membrane is easily noticed by visual inspection of the trajectory (Fig. 1 in the main text). The equilibration times for the bilayers with peptide are equal or slightly smaller, as the peptide worked as a nucleation point for the lipids which composed the peptide-containing leaflet, accelerating the aggregation process, an event also described by another *in silico* study (Esteban-Martín and Salgado 2007). The pore lifetime of 60 ns is within of the range of 40-100 ns reported by Esteban-Martín and Salgado (2007) for DPPC bilayers. On the other hand, for the POPC ones, Bocchinfuso et al observed that in two of the three self-assembling simulations with trichogin GA IV peptide, the pore did not close spontaneously even after 100 ns, therefore they had to use an annealing protocol to eliminate it. However, in all our simulations the pore closed due to natural forces acting within each system, including the POPC simulation (s6).

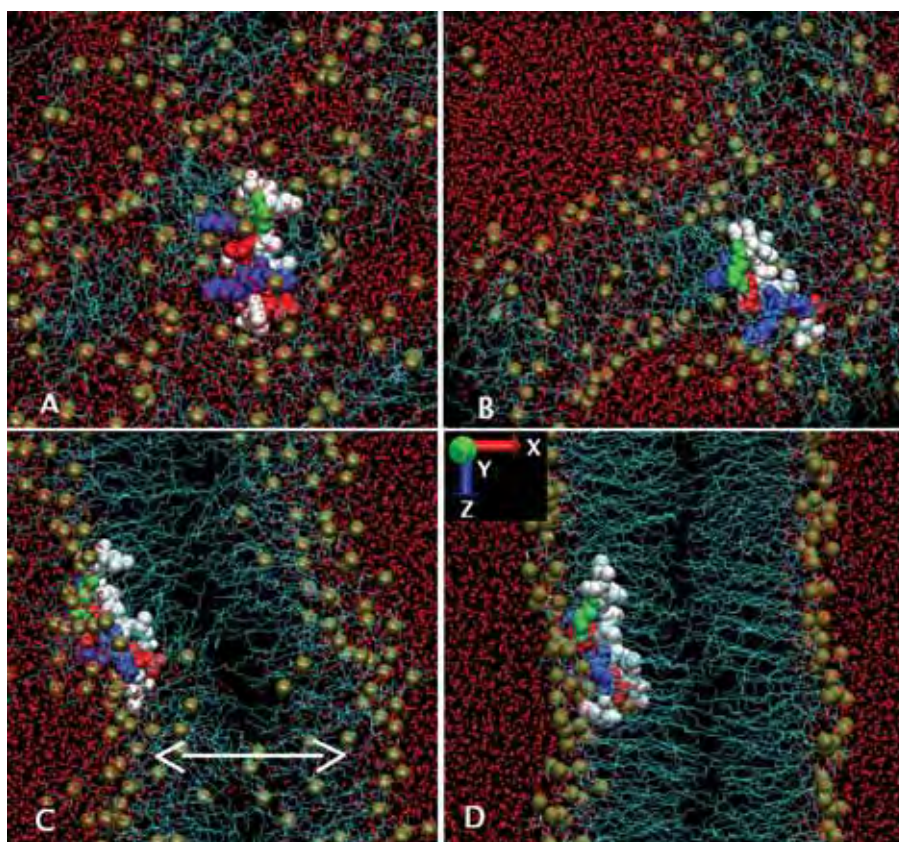


Fig. S1 POPG membrane formation process. The simulation started with an aleatory mixture of lipids, waters and ions and in the center of the unit cell of simulation the peptide MP1 was placed. A) $t=200$ ps; B) 3 ns; C) 25 ns; D) 85 ns. The double arrow indicates the lipid pore filled with waters. Peptide is represented by blue (lysines), red (aspartates), green (glutamine), and white (hydrophobic residues) spheres. Brown spheres represent the lipid phosphorous atoms and cyan lines, the lipid acyl chains. Small red balls represent the oxygen atoms in the water molecules. The 126 Na^+ counterions were omitted.

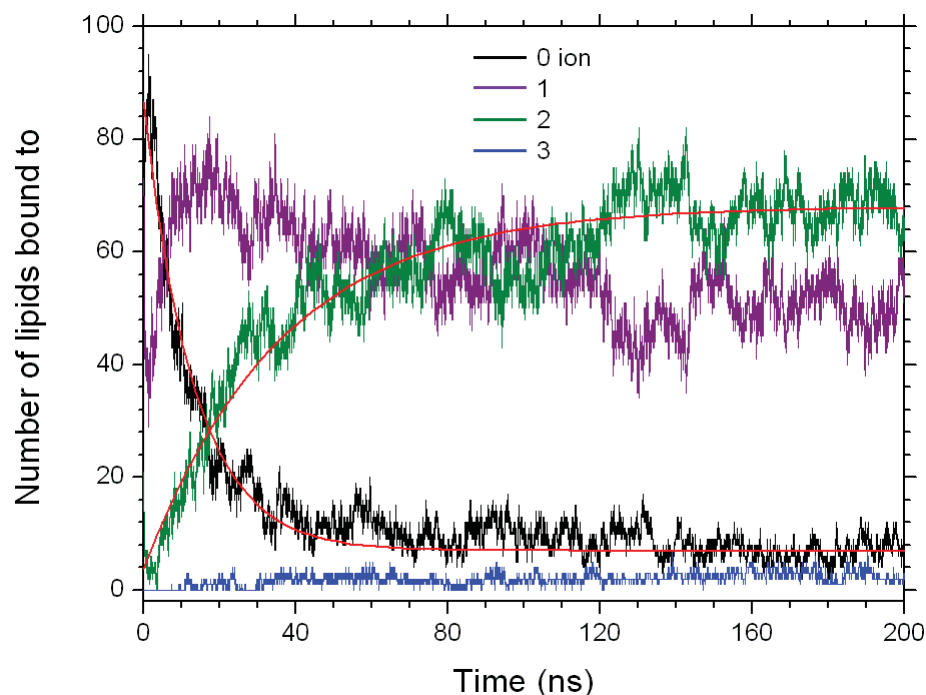


Fig. S2 Number of lipids bound to zero, one, two and three ions as a function of time. The numbers of lipids bound to zero and two lipids were fitted by exponential equations (red lines) with $\tau(0 \text{ ion})= 13 \text{ ns}$ ($R^2=0.93$) and $\tau(2 \text{ ions})=35.6 \text{ ns}$ ($R^2=0.90$), respectively. The bilayer reached the liquid-crystalline organization when a threshold number of connective interactions in the membrane plane were formed and the value incremented mainly when the number of lipids bound to two ions converged to the asymptotic value, which took place after 36 ns, including 68 (53%) of all lipids. As each lipid has two binding sites of ions (one ester group in each tail) and each ion often binds to more than one lipid, a large net of connected lipids through the ions was formed, and an average of 194 ± 5 connections between lipids and ions occurred per frame. These descriptions are in good agreement with those done by Zhao et al (2007) for a preformed pure POPG membrane.

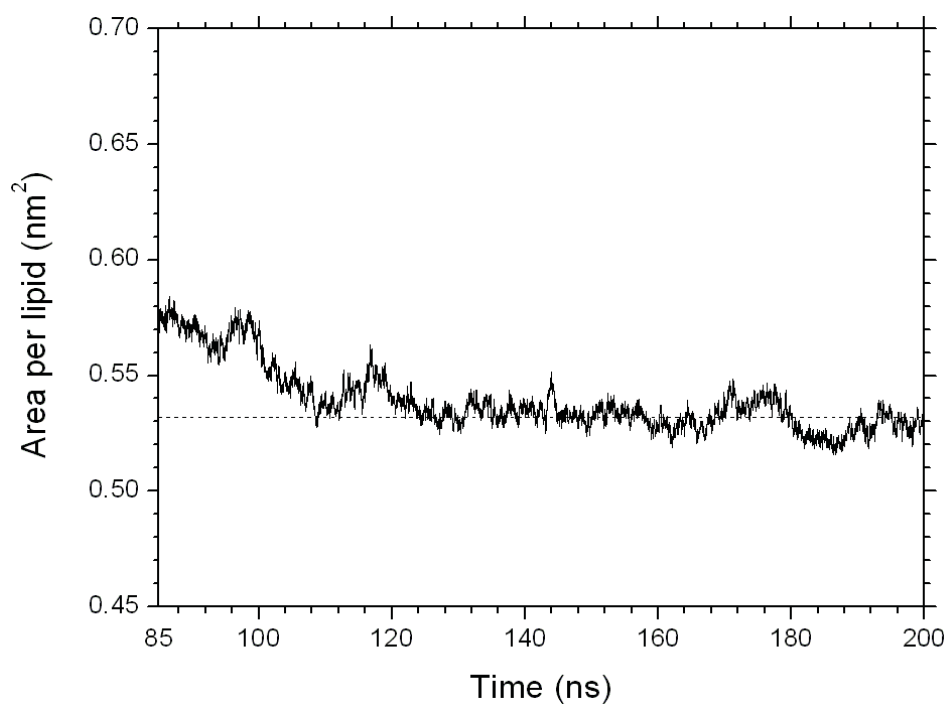


Fig. S3 Area per lipid as a function of time for the POPG bilayer. An average taken from 120 ns showed the self-assembled membrane had the area per lipid stabilized at 0.531 nm^2 .

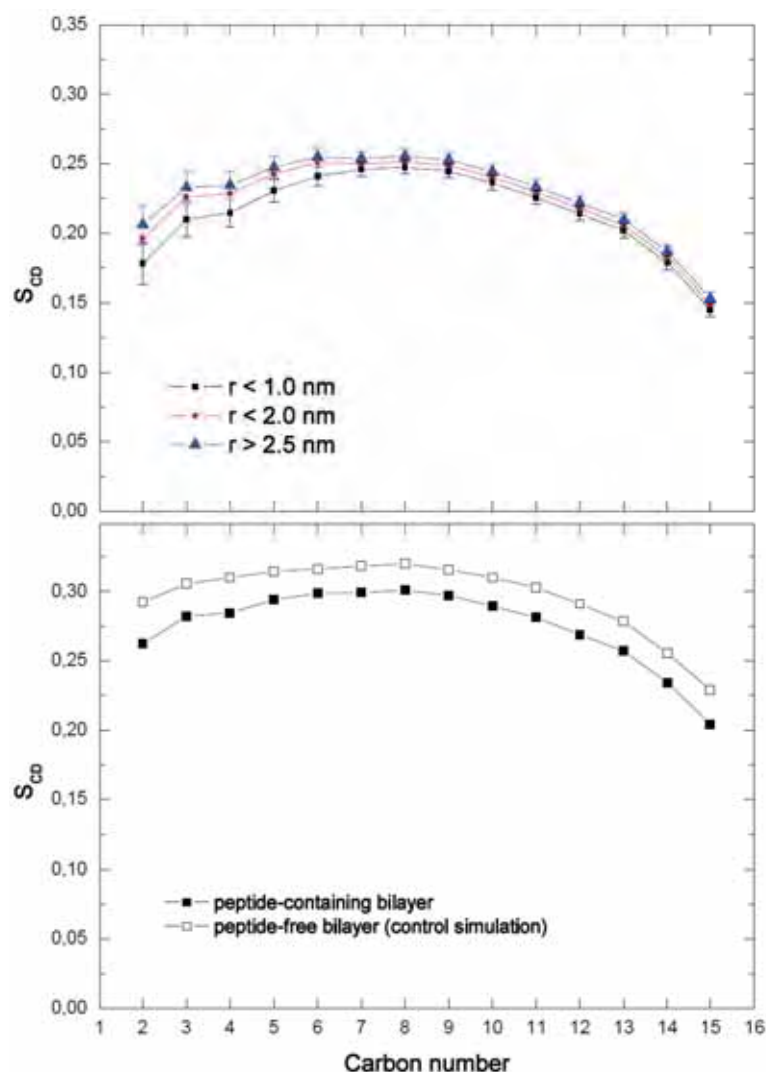


Figure S4. Lipid order parameters as a function of the distance from the peptide's center of mass for the POPC simulation. **(A)** For the peptide-containing leaflet, order parameters are presented for distances from 0 to 1.0; 0 to 2.0; and 2.5 to 4.8 nm. It should be noticed that the errors for the parameters for $r < 1.0$ nm are within the margin of error for $r > 2.5$ nm, which makes it difficult to distinguish an area of perturbation. **(B)** Comparison of the lipid order parameters between peptide-free (empty squares) and peptide-containing simulations (filled squares). Such order parameters were calculated over all lipids.

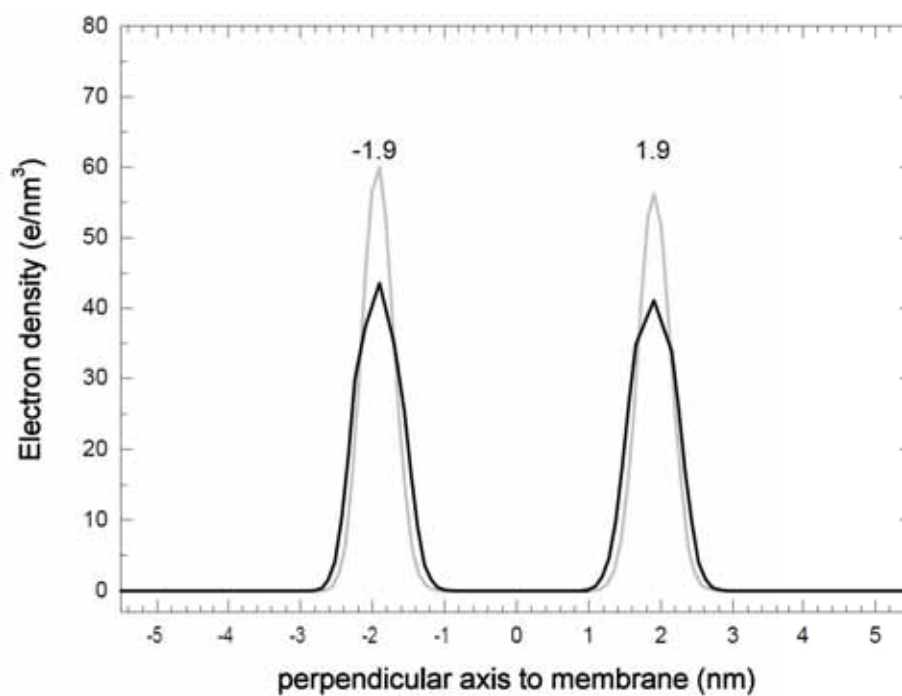


Figure S5. Electron density of the phosphorous atoms as a function of the distance from the center of the POPC membrane ($x=0$). Grey line represents the density from the peptide-free simulation (control simulation). Black line represents the peptide-containing simulation (s6). The position of the peaks indicate that there was virtually no thinning of the membrane.

2 References

Bocchinfuso G, Palleschi A, Orioni B, Grande G, Formaggio F, Toniolo C, Park Y, Hahm K-S, Stella L (2009) Different mechanism of action of antimicrobial peptides: insights from fluorescence spectroscopy experiments and molecular dynamics simulations. *J Pept Sci* 15: 550-558. doi: 10.1002/psc.1144

Esteban-Martín S, Salgado J (2007) Self-assembling of peptide/membrane complexes by atomistic molecular dynamics simulations. *Biophys J* 92: 903-912. doi: 10.1529/biophysj.106.093013

Marrink SJ, Lindahl E, Edholm O, Mark AE (2001) Simulation of the spontaneous aggregation of phospholipids into bilayers. *J Am Chem Soc* 123: 8638-8639. doi: 10.1021/ja0159618

Zhao W, Tomasz R, Gurtovenko AA, Vattulainen I, Karttunen M (2007) Atomic-scale structure and electrostatics of anionic palmitoyloleoylophosphatidylglycerol lipid bilayers with Na⁺ counterions. *Biophys J* 92: 1114-1124. doi: 10.1529/biophysj.106.086272

Indução de separação local de lipídeos por peptídeos antimicrobianos catiônicos em membranas compostas por lipídeos zwitteriônicos e aniônicos facilita a formação de defeitos e poros transmembrânicos

Indução de separação local de lipídeos por peptídeos antimicrobianos catiônicos em membranas compostas por lipídeos zwitteriônicos e aniônicos facilita a formação de defeitos e poros transmembrânicos

Fernando César Lopes Filho e José Roberto Ruggiero

UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Departamento de Física, 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

Resumo Simulações computacionais de diferentes peptídeos mastoparanos, MP1, seu análogo N2-MP1, o desenhado MK-578 e MP-B contendo cargas líquidas +2, +3, +4, +5, respectivamente, foram estudados interagindo com uma membrana mista zwitteriônica/aniônica (1:1) de 128 lipídeos. A partir de uma configuração inicial específica de seis cópias de uma espécie de peptídeo, verificamos para dois dos quatro peptídeos, o MP-1 e seu análogo, a formação de poro transmembrânico. Tomando a simulação do MP1 como caso paradigmático, as análises dela permitem sugerir que a formação do poro foi facilitada pela atração de lipídeos aniônicos pelos peptídeos catiônicos agregados. Notamos que essa separação local de lipídeos, que deu origem a domínios de lipídeos aniônicos que interagem com o agregado, facilitou o afinamento local da membrana em 10 Å, enquanto o afinamento global dela foi de apenas 1 Å. A facilitação do afinamento local da membrana e consequente formação do poro pela formação de microdomínios de lipídeos aniônicos traz à tona um importante aspecto da seletividade e ajudam a explicar o mecanismo de ação de peptídeos catiônicos, especialmente os curtos como o MP1.

Introdução

Interações eletrostáticas dirigem a atração e adsorção de peptídeos catiônicos em membranas biológicas. Devido à natureza aniônica de membranas de bactérias e catiônica por parte de muitos peptídeos, a seletividade de interação tem sido explicada como um efeito de cargas. Investigações experimentais mostram que a seletividade, geralmente entendida como

uma maior afinidade de interação de peptídeos catiônicos por membranas aniônicas que por zwitteriônicas, não pode ser explicada somente com base nesse efeito, sendo que outras características das membranas deveriam ser consideradas, tal como sua capacidade de afinamento, que é influenciada pela organização de lipídeos PG e cardiolipinas (dos Santos Cabrera et al. 2008; Epanand et al. 2008; Epanand e Epanand 2009). Adicionalmente, estudos experimentais e computacionais tem mostrado que peptídeos catiônicos adsorvidos são capazes de induzir em membranas mistas de lipídeos fosfatidil-colina/fosfatidil-glicerol (PC/PG) a formação de microdomínios de lipídeos aniônicos, que seria resultado de uma separação local de fase (Oreopoulos et al. 2010; Polyansky et al. 2010). Tal efeito também foi descrito por Hori et al. (2001) a partir de ensaios de RMN com o peptídeo Mastoparano (MP) e membranas PC/PG.

Os estudos computacionais disponíveis sobre peptídeos antimicrobianos e membranas modelo desprezam o papel das interações carga-carga para a formação do poro com o uso de membranas neutras PC, pois hipotetizam que são os contatos hidrofóbicos que dirigem a inserção dos peptídeos na membrana e abertura do poro (Hallock et al. 2003; Leontiadou et al. 2006). Neste estudo, fazemos simulações a partir de uma configuração onde peptídeos estão inicialmente inseridos na região hidrofóbica de uma membrana POPC/POPG (1:1), para investigarmos o mecanismo de formação de poro e entendermos o papel das interações eletrostáticas nesse processo. A escolha de uma membrana mista POPC/POPG é uma melhor opção de modelo do que uma membrana pura PC quando se quer imitar membranas de bactérias, como por exemplo de *Escherichia coli*, pois estas são constituídas por lipídeos PC/PE e PG (Murzyn et al. 2005). A seleção de quatro peptídeos da família mastoparano para este trabalho foi propositadamente feita para termos peptídeos com cargas diferentes (diferentes números de resíduos de lisina) e com resíduos de lisina em diferentes posições ao longo da cadeia, para investigarmos também o efeito da variação dessas características na sua capacidade de perturbar a membrana, assim como feito por De Souza et al (2011). Mastoparanos são alvos deste estudo, pois apresentam potente ação antibiótica e anticancerígena (Wang et al. 2009; De Souza et al. 2011), e apesar da alta homologia de suas estruturas primárias entre os componentes dessa família, verifica-se que apresentam variado espectro de atividades biológicas. O entendimento dos mecanismos de ação dessas moléculas e a relação com suas estruturas pode contribuir para o desenvolvimento de novas moléculas

úteis em terapias alternativas, já que as atuais não estão contendo o avanço de patógenos resistentes.

Métodos

Parâmetros de simulação

As simulações por Dinâmica Molecular e a maioria das análises foram produzidas pelo pacote de simulação GROMACS versão 4.5.4 (Hess et al. 2008). Em todas as simulações, o sistema foi acoplado a um banho de temperatura constante de 315 K pela aplicação do algoritmo V-Rescale (Bussi et al. 2007); lipídeos, peptídeos e solvente (água e contra-íons) foram separadamente acoplados com um tempo de relaxação de 0,3 ps. A pressão foi mantida constante em 1 bar com um tempo de relaxação de 3 ps, para isso o algoritmo de acoplamento de Berendsen (Berendsen et al. 1984) foi utilizado. Condições periódicas de contorno foram aplicadas para simular uma configuração de *bulk*. O passo de integração usado nas simulações foi de 30 fs, que corresponde a um tempo efetivo de 120 fs. Para interpretar os resultados obtidos com modelo *coarse-grained*, um fator padrão 4 é usado, pois corresponde ao fator de aceleração efetivo da difusão de um *bead* água comparado a água real (*fine grained*). O método *Particle Mesh Ewald* (PME, Darden et al. 1993) foi aplicado para considerar as interações eletrostáticas de longo alcance, com constante dielétrica relativa $\epsilon_{rel}=15$ e raio de corte do espaço real de 1,2 nm, *grid spacing* de 0,12 nm e interpolação *spline* de 4ª ordem. Um raio de 1,2 nm foi usado para se determinar a lista de vizinhos, que foi atualizada a cada 10 passos. As interações de Van der Waals foram calculadas usando a função *Shift*, com suave convergência da energia a zero entre os raios de 0,9 e 1,2 nm. Trajetórias foram visualizadas e figuras foram renderizadas usando o programa VMD (Humphrey et al. 1996).

Construção da célula unitária de simulação

Uma bicamada PC/PG (1:1) com 128 lipídeos foi montada a partir da replicação de dois lipídeos, um POPC e outro POPG, no plano x/y até que uma monocamada quadrada de 64 lipídeos com 5,12 nm de aresta fosse obtida. Uma réplica dessa monocamada foi apropriadamente rotacionada e transladada, assim compondo a bicamada contendo uma distribuição homogênea de lipídeos neutros e aniônicos. Em uma célula unitária de simulação, a bicamada foi solvatada por ~2270 *beads* W, o que corresponde a 9080 moléculas de água e

~70 moléculas de água por lipídeo. Contra-íons foram adicionados para anular a rede de cargas do sistema (64 Na⁺ para anular as cargas dos 64 lipídeos PG e mais tantos Cl⁻ e Na⁺ quantos foram os números de resíduos de lisina e aspartatos que os seis peptídeos possuíam). Uma simulação de 400 ns foi produzida para que esse sistema contendo apenas a bicamada fosse equilibrada. Após a equilibrção, usando o *Perl-script* InflateGRO (Kandt et al. 2006) em um protocolo de 28 *loops* de aproximação dos lipídeos e peptídeos e minimização de energia, seis cópias de uma espécie de peptídeo foram espaçadamente inseridos, com os eixos das hélices alinhados ao eixo z, dentro da região hidrofóbica da membrana. Os peptídeos foram mutuamente dispostos de forma antiparalela. Com essa configuração, foi feita uma minimização de energia usando o método *steepest-descent* com uma iteração do método gradiente conjugado a cada 10 passos. Finalmente, o sistema (Fig. 1A) foi submetido a simulações de produção de 2 μ s livres de qualquer restrição.

Modelando os lipídeos e os peptídeos

As topologias dos lipídeos zwitteriônico POPC e aniônico POPG foram tomadas do repositório de topologias do site oficial do campo de forças Martini (<http://md.chem.rug.nl/cgmartini/>). A partir delas, conforme sugestão de Rzepiela et al. (2010), reduzimos em um *bead* as cadeias acíclicas das duas espécies de lipídeo, para assim eliminarmos a superestimação da espessura da membrana que ocorria com os parâmetros originais. A área por lipídeo, espessura da membrana e coeficiente de difusão lateral obtidos da simulação de controle, onde foi aplicada essa modificação, indicam que as propriedades típicas da membrana são preservadas. A estrutura primária dos peptídeos estudados está apresentada na Tabela 1. Todos os peptídeos foram estudados em conformação helicoidal do 3° ao 12° resíduo, conforme estudos de RMN e simulações indicam que os terminais de peptídeos mastoparanos possuem liberdade conformacional em ambientes membranares ou que mimetizam estes. Suas topologias foram obtidas usando o *Perl-script* seq2itp versão 1.1.5 (S. K. Kandasamy e M. J. Louhivuori, em: <http://md.chem.rug.nl/cgmartini/index.php/downloads/tools/62-seq2itp>) com adaptações introduzidas no *backbone*. Partindo do N- para o C-terminal empregamos os seguintes *atomtypes* para os *beads* do *backbone*: Qd P5 Nd Nd N0 N0 N0 N0 N0 Na Na P5 P5. As alterações seguiram a filosofia do campo de forças: *beads* em regiões de estrutura helicoidal foram assinalados como de baixa polaridade, Na, Nd ou

N0; sem estrutura secundária tiveram sua polaridade aumentada para P5 e N-terminal positivamente carregado recebeu o *atomtype* Qd.

Campo de forças

Na primeira série de simulações (s1-4, veja Tabela 2), temos uma simulação para cada um dos quatro peptídeos. Nessas simulações foi usado o campo de forças Martini *coarse-grained model* v2.1 (Monticelli et al. 2008), que descreveu as interações de todas as moléculas do sistema, já que este também contém parâmetros ajustados para a simulação de proteínas. Neste campo de forças, quatro moléculas de água são representadas pelo modelo de um *bead* do tipo (*atomtype*) P4, reduzindo substancialmente o tamanho do sistema, permitindo, portanto, a extensão dos tempos de simulação para 2 μ s. A segunda série de simulações (s5-16) envolveu o estudo de um estado intermediário bem definido observado em duas das quatro simulações do primeiro conjunto. Um *frame* do estado intermediário das simulações s1 e s2, estado em que é observada a formação de poro transmembrânico, foi usado como ponto de partida nestas simulações. Este *frame* foi selecionado entre aqueles que possuíam o maior número de moléculas de água dentro do poro durante seu intervalo de tempo de vida. Para ser possível estudarmos essas estruturas em uma escala de tempo maior que a observada nas simulações s1 e s2, estabilizamos os poros através da restrição de posição dos *beads* do *backbone* dos peptídeos. Os campos de forças Martini e Martini com modelo de água polarizável (Yesylevskyy et al. 2010) foram usados e para cada um foram avaliados três valores para a constante de força de restrição: 50, 100 e 500 $\text{kJmol}^{-1}\text{nm}^{-2}$ (aplicado nas três direções).

Simulações com campo elétrico externo

Para completar o estudo, a configuração de poro obtida para os peptídeos MP1 (s1) e N2-MP1 (s2) e usadas na segunda série de simulações são também estudadas com a aplicação de um campo elétrico externo paralelo ao eixo normal à membrana, em um esquema parecido com um experimento de *patch-clamp* (simulações s17 e s18). Foi aplicada uma constante de força de 100 $\text{kJmol}^{-1}\text{nm}^{-2}$ para estabilizar o *backbone* dos peptídeos e assim verificarmos se a configuração determinada como poro também suporta a passagem de íons, assim como é observado em ensaios de *patch-clamp* durante o estado aberto. O campo de forças Martini

com modelo de água polarizável (Yesylevskyy et al. 2010) foi usado, pois é crucial o efeito de orientabilidade das moléculas de água dentro do poro devido ao campo elétrico.

Análise: parâmetro de ordem orientacional

O estado de organização lipídica como função da distância do centro de massa do poro foi avaliado por um parâmetro de ordem orientacional das cadeias acílicas, $\langle S_{CD} \rangle$, definido como o valor médio do parâmetro de ordem instantâneo de cada lipídeo ($S_{CD,i}$) que ocupa uma posição cuja distância em relação ao ponto de referência seja menor ou igual a r . Por sua vez, $S_{CD,i} = 1/2 \langle 3\cos^2\theta_i - 1 \rangle$, onde θ_i é o ângulo entre o eixo da cadeia S1 do lipídeo i e o eixo z, que é o eixo normal à membrana. O vetor que representa o eixo da cadeia S1 foi determinado pelos *beads* C1A e C3A. $\langle \rangle$ denota uma média obtida para cada *frame* da trajetória.

Resultados

Estados ocupados pelos peptídeos

A primeira série de simulações (s1-4) mostrou que os quatro peptídeos ocuparam estados bem definidos ao longo das simulações. Os peptídeos MP1 e seu análogo N2-MP1 saíram da orientação inicial transmembrânica mutuamente paralelos e rapidamente (cerca de 20 ns) adotaram uma orientação desordenada dentro da membrana, com um peptídeo em orientação paralela a esta. Nessa configuração, observa-se a formação de um poro pelo qual mais de uma centena de moléculas de água passam. Esta estrutura desaparece devido à difusão lateral dos lipídeos e a difusão dos peptídeos para a região das cabeças polares dos lipídeos. Nos dois casos, não houve *flip-flop* de lipídeos e os peptídeos distribuíram-se igualmente entre as monocamadas, conseqüentemente o número de moléculas por monocamada permaneceu equilibrado. Por terem o C-terminal neutro (“amidado”) e três dos seis N-terminais estarem inicialmente dispostos para uma monocamada e os demais para a monocamada oposta, indica que as interações entre os N-terminais e as cabeças polares na região interfacial guiaram o ancoramento inicial dos peptídeos até a difusão para a interface, quando ocuparam o estado paralelo. Portanto, para esses dois peptídeos, fica definido um estado intermediário entre os instantes em que todos os peptídeos estão em orientação perpendicular e todos estão paralelos ao plano da membrana. Dentro dessa janela de tempo, determinamos o intervalo de vida do poro, que começa com o início da passagem de

moléculas de água pela membrana e termina quando o fluxo cessa. Assim, estabelecemos a existência de poro entre 96 e 400 ns de simulação para o caso do peptídeo MP1 e entre 112 e 272 ns, para o análogo N2-MP1.

Na simulação do peptídeo MK-578 não foi observada a formação de poro, apenas a de defeitos pelos quais poucas moléculas de água difundiram. Rápida difusão dos peptídeos ocorreu da orientação transmembrânica para a paralela. Ao final, uma distribuição desequilibrada de peptídeos (4 e 2) entre as monocamadas foi observada, o que reforça a importância do ancoramento do N-terminal para distribuição e difusão equilibrada de peptídeos entre as monocamadas. Como os resíduos de lisina do MK-578 estão localizadas no meio da cadeia, há uma interação fraca entre os N-terminais (com somente uma carga) e as cabeças polares (se comparado aos dois primeiros peptídeos que tinham três cargas positivas), tornando a distribuição um processo estocástico. A aleatoriedade do processo é percebida quando notamos que dois dos quatro peptídeos adsorvidos em uma monocamada estavam com seus N-terminais inicialmente voltados para a outra monocamada.

Com relação ao peptídeo MP-B, apenas um estado é observado. Cinco dos seis peptídeos permanecem na orientação transmembrânica, devido à ancoragem que os quatro resíduos de lisina presentes nos terminais (mais a carga do N-terminal) fazem com as cabeças polares, causando grande perturbação da membrana. Os resíduos de aminoácidos do meio da cadeia peptídica são hidrofóbicos ou têm baixa polaridade, portanto os seus contatos com a região hidrofóbica da membrana são energeticamente favoráveis.

Energias das interações peptídeo-peptídeo e peptídeo-lipídeo

Na Tabela 3 estão apresentados os valores de energia de interação entre peptídeos e lipídeos. Veja que os valores para as interações peptídeo-peptídeo são maiores no estado poro que no paralelo, pois naquele estado os peptídeos estão mais próximos (em ambos os casos MP1 e N2-MP1). Entre as três espécies de peptídeos que ocupam o estado paralelo, os peptídeos MK-578 são os que apresentam a maior energia de interação de LJ (-1.762 kJ/mol) e energia de interação de Coulomb positiva, consequência de possuir somente resíduos carregados positivamente. Note que essa energia positiva (2,3 kJ/mol) foi obtida em um estado em que os peptídeos estão dispersamente distribuídos na região interfacial, onde há uma blindagem eletrostática dos grupos carregados dos peptídeos por parte das cabeças polares dos lipídeos. Isso sugere que em uma hipotética situação de aproximação e agregação

de cinco ou seis peptídeos tornaria a energia de Coulomb ainda maior, indicando que as interações eletrostáticas peptídeo-peptídeo são componentes da *driving force* que impede a agregação e conseqüente formação de poros por esses peptídeos. Mesmo que a resultante entre as interações de cargas e LJ seja atrativa em uma hipotética situação de agregação dos peptídeos (agregação que não foi observada na simulação), o agregado não teria ponto de contato com as interfaces, e a repulsão entre as cadeias laterais carregadas dos peptídeos e as cadeias hidrofóbicas dos lipídeos seria uma *driving force* para a interface carregada. Essas interpretações podem explicar a ausência de estado intermediário em nossa simulação. Diferentemente, cinco dos seis peptídeos MP-B permanecem na orientação transmembrânica, formando grupos de dois e três peptídeos, todavia nenhum poro é formado. Também nesse caso temos uma energia de Coulomb positiva, porém há um grande desbalanço atrativo a partir das interações de LJ.

Energias de interação peptídeo-lipídeo e efeito de cargas: mecanismo de separação de fases em microdomínios lipídicos ("demixing mechanism")

Em nossas simulações, a configuração inicial tinha uma distribuição homogênea de lipídeos neutros e negativamente carregados. Ao longo do tempo, a presença dos peptídeos interfere nessa distribuição provocando uma aglomeração maior de lipídeos carregados em um raio de 5Å. Na Figura 2, verificamos isso a partir da distribuição radial de pares dos lipídeos aniônicos e zwitteriônicos (considerando como grupo de referência o *bead* PO4 negativamente carregado) em torno dos grupos básicos dos peptídeos (*beads* carregados dos N-terminais e cadeias laterais dos resíduos de lisina). Veja que a atração de maior número de lipídeos aniônicos que de zwitteriônicos está diretamente relacionada com a quantidade de resíduos de lisina presentes nas cadeias peptídicas, ou seja, com a sua carga líquida. Comparando a altura dos picos relacionados aos lipídeos negativamente carregados, é perceptível que o MP-B (+5) é o peptídeo que mais atrai esses lipídeos, seguido por MK-578 (+4), N2-MP1 (+3) e MP1 (+2). A análise das energias das interações entre os peptídeos e os lipídeos também indicam uma maior atração dos lipídeos PG pelos peptídeos (Tabela 3). Observe que a energia de interação entre o peptídeo MP-B e os lipídeos PG é 3,7 vezes maior comparada a dos lipídeos PC. Tomando o peptídeo MK-578, temos a mesma tendência com um fator 2; com o peptídeo MP1 e seu análogo, considerando o estado paralelo, temos fatores 1,7 e 2, respectivamente. Considerando o estado poro dos peptídeos MP1 e N2-MP1, a

energia de interação com os lipídeos PG é 1,8 e 2,5 vezes maior que a com os lipídeos PC, respectivamente. A passagem espontânea dos sistemas do estado poro para o paralelo acontece com diminuição da energia potencial. Basta ver que a energia de interação peptídeo-lipídeos PC aumentou 59,5%, peptídeo-PG, ~11%, no caso MP1. Para seu análogo temos aumentos de 72 e ~9%, respectivamente. As interações dos peptídeos com lipídeos aniônicos aumentaram levemente no estado paralelo, por outro lado, ocorreu um aumento significativo por parte das interações com POPC. Essas variações estão refletidas no RDF dessas moléculas (Fig 2). Houve um ligeiro aumento na altura dos picos relativos aos lipídeos PG e comparado com este, houve um aumento maior nos picos dos lipídeos PC ao redor dos grupos catiônicos dos peptídeos. Isso indica um efeito de separação dos lipídeos neutros e carregados mais acentuado no poro que no estado paralelo, quando os peptídeos estão dispersos pela interface membrana-solução. A explicação para isso tem base na densidade de cargas. No poro, a aglomeração dos peptídeos conduz ao aumento da densidade de cargas devido aos N-terminais e resíduos de lisina, o que provoca um aumento considerável do campo elétrico na região hidrofóbica da membrana (0,9 V/nm no estado poro, enquanto temos 0,12 V/nm no estado paralelo), que conseqüentemente atrai mais lipídeos aniônicos que zwitteriônicos, pois as interações carga-carga têm maior alcance que carga-dipolo.

Densidade de massa

A observação de maior efeito de separação de lipídeos PC/PG também pode ser investigada pelas densidades de massa das cabeças polares dos lipídeos POPC e POPG (Fig. 3). Observe que para a simulação de controle (Fig. 3A), temos uma espessura de membrana de 3,8 nm e a região hidrofóbica apresenta uma espessura de 2,1 nm, esses valores convergem para aqueles obtidos com modelos *fine-grained*. Os picos têm base estreita e alcançam densidades maiores (se comparadas as das outras simulações) indicando que os *beads* PO4 apresentam uma distribuição confinada em uma pequena margem em relação ao eixo z, que é uma das propriedades que caracterizam uma membrana equilibrada. Além disso, as densidades se sobrepõem indicando uma distribuição homogênea. Note que para todas as simulações em que os peptídeos adotam a orientação paralela, as espessuras da membrana e região hidrofóbica ficam em torno dos valores obtidos para a simulação de controle. No estado poro dos peptídeos MP1 e seu análogo N2-MP1 e para o peptídeo MP-B que permanece na orientação transmembrânica (porém não forma um poro), temos que a

espessura da membrana, tomando como referência a distância entre os picos relativos às densidades de PC, é de 3,7 ou 3,8 nm, valores que também convergem para aquele da simulação de controle. Entretanto, temos um alargamento da base dos picos relativos às densidades dos lipídeos PG. Vemos, nesse estado, uma diminuição da espessura da região hidrofóbica devido à difusão de lipídeos para as proximidades do poro, especialmente para as vizinhanças das cadeias laterais expostas dos resíduos de lisina. Essa é outra maneira de se observar a separação dos lipídeos neutros e carregados, que nessa maneira de avaliação fica especialmente evidente para o estado poro. Veja também as densidades no caso do peptídeo MP-B. Conforme a análise do RDF (Fig. 2 F), sabemos que este é o peptídeo que provoca a maior atração de lipídeos PG. A densidade dos *beads* PO4 dos lipídeos PG evidenciam uma grande perturbação, haja vista o deslocamento da posição dos picos e a diminuição da espessura da região hidrofóbica.

Parâmetros de ordem orientacional

Estes parâmetros calculados como função do raio fornecem informação sobre a extensão da perturbação da orientação dos lipídeos provocada pelas interações com o poro (Fig. 4). Nos dois casos, MP1 e N2-MP1, verificamos que os lipídeos mais próximos ao poro têm a orientação de suas cadeias hidrofóbicas fortemente perturbadas, haja vista os menores valores para o parâmetro de ordem. Nota-se que o raio de perturbação é de 4 nm, pois para distâncias maiores o parâmetro converge para o valor médio obtido a partir de uma membrana equilibrada sem peptídeo. Em uma configuração de um peptídeo MP1 adsorvido na superfície de uma membrana de 128 lipídeos POPG, Lopes Filho e Ruggiero (artigo em preparação final, Cap. IV.1) mostraram que o peptídeo coordenava eletrostaticamente sete lipídeos e o raio de perturbação de 2,2 nm encerrava uma área contendo 25 lipídeos. Os autores explicaram que sendo a membrana uma grande rede formada por lipídeos conectados por ligações de hidrogênio e pontes lipídeo-íon-lipídeo, o desordenamento orientacional dos lipídeos coordenados propagava aos não-ligados por efeitos dinâmicos de correlação de cadeias. Essa explicação pode ser aplicada para as observações deste estudo. A observação de raios de perturbação de 2,2 nm para um peptídeo adsorvido e 4 nm para um poro formado por cinco peptídeos enterrados pode ser racionalizada com apoio da teoria de elasticidade de bicamadas lipídicas (Huang 2000; Lee et al 2004). De acordo com ela, a adsorção de um peptídeo afina a membrana localmente, no entanto essa distorção custa energia. O custo de

deformação da membrana aumenta conforme peptídeos dispersamente adsorvidos agregam, aumentando conseqüentemente a tensão interna na membrana. Uma membrana suporta o aumento de tensão até certo limite (o limite depende da natureza dos lipídeos que a constitui), que ultrapassado culmina na transição de parte dos peptídeos paralelamente adsorvidos para uma orientação transmembrânica, como forma de relaxar a tensão (esse é um dos modelos de mecanismo de formação de poros transmembrânicos). Como consequência da redução da tensão interna, temos uma redução do raio de perturbação. Sob esse ponto de vista, faz sentido cinco peptídeos enterrados em orientação (aproximadamente) perpendicular perturbarem uma área cujo raio é apenas o dobro do raio de perturbação de um único peptídeo adsorvido. Tal diferença nos raios de perturbação deve ainda considerar outro importante aspecto: a diferença na composição das membranas consideradas. Como vemos pela Figura 4, os lipídeos zwitteriônicos são relativamente menos perturbados pelos peptídeos que os aniônicos. Por efeitos dinâmicos, a propagação da perturbação dos lipídeos PG deve ter sido influenciada pelos lipídeos PC. Naquele estudo citado, tal influência não é considerada, já que a membrana aniônica era pura.

Discussão

Ensaio de cinética de vazamento de vesículas unilamelares PCPG (7030) e dose-resposta forneceram a fração crítica peptídeo/lipídeo (P/L) 0,025 para MP1 (Dos Santos Cabrera et al 2008); 0,079 para seu análogo N2-MP1 (Leite et al 2011); 0,1 para MP-B (Park et al 1995) e para o peptídeo MK-578 não temos conhecimento do valor. A concentração P/L abordada neste estudo para todos os peptídeos foi igual a 0,046 (~1/21), que é o dobro da concentração crítica requerida para que o MP1 exiba atividade lítica, portanto, em tese, uma simulação computacional desse peptídeo deveria produzir a formação de poro transmembrânico. O mesmo não se poderia esperar para o peptídeo N2-MP1, já a que fração estudada é menor. Entretanto, para ambos os peptídeos observamos a formação de poro. Por outro lado, nossa simulação não observou a formação de poro pelo peptídeo MP-B, o dímero e trímero formados apenas facilitaram a formação de defeitos na membrana, pelos quais dezenas de moléculas de água difundiram (veja Tabela 2, s4). E o quarto peptídeo estudado não formou poro nem facilitou o surgimento de defeitos. Neste contexto, podemos verificar que a formação de poro é facilitada simultaneamente por duas condições: concentração P/L

crítica e agregação dos peptídeos. A simulação do MP1 capturou as duas condições e consequentemente observamos o poro (Fig. 1B). Sua estrutura com peptídeos em diferentes orientações (com um deles paralelo à membrana, localizado na entrada do poro) difere muito do tradicional modelo de poro toroidal idealizado por Matsuzaki, Shai e Huang (Matsuzaki et al 1994; Gazit et al 1996; Ludtke et al 1996) para o qual os peptídeos se alinham ao interior do poro, porém em concordância com o modelo de poro toroidal desordenado (Leontiadou et al 2006). A simulação do peptídeo N2-MP1 capturou somente a questão da agregação, que ocorreu logo nos primeiros instantes. O poro formado apresentou características semelhantes ao do MP1 (Fig 1C), entretanto com um tempo de vida que corresponde à metade do que foi observado para o seu peptídeo-pai. Certamente, isso foi influenciado pela concentração abaixo da concentração P/L crítica. Provavelmente, se aumentarmos a concentração para algum valor maior que o valor crítico, teremos poros estáveis por um intervalo de tempo maior. O peptídeo de maior carga líquida, o MP-B, não formou um agregado maior que três peptídeos e a concentração simulada foi menor que a crítica. Simulações com concentrações mais elevadas deverão ser implementadas para assim alcançarmos o estado poro desse peptídeo. Todavia, é interessante termos observado como sua capacidade de perturbar a membrana é tão alta (Fig. 1E, 2F e 3) que até em baixas concentrações este consegue induzir a formação de defeitos na bicamada (Tabela 2). Por sua vez, os peptídeos MK-578 saíram da orientação inicial transmembrânica e rapidamente foram para o estado paralelo perturbando somente os lipídeos ligados a estes. Apesar de não conhecermos a concentração P/L crítica, estudos de concentração inibitória mínima realizados por De Souza et al. (2011) mostram que este peptídeo tem atividade antimicrobiana muito reduzida, comparado aos outros mastoparanos alvos daquele estudo. Veja que os resultados de nossa simulação estão em boa concordância com aquele achado experimental, mesmo comparando-os de forma indireta, já que foram obtidos de sistemas pequenos em que foram usadas condições periódicas de contorno.

Nossos resultados parecem suportar a conclusão de que peptídeos com resíduos de lisina dispostos no meio da cadeia, tal como o MK-578, tem atividade lítica muito baixa (ao menos na concentração testada), enquanto aqueles com resíduos localizados nos terminais mostraram atividade por meio da formação de poro, perturbando sobremaneira a integridade das membranas (Figuras 1, 2, 3 e 4). A partir de um arranjo específico dos peptídeos no início das simulações pudemos notar a alta capacidade lítica destes, mesmo em concentração abaixo da crítica, como foi o caso do N2-MP1. Simulações e análises adicionais são necessárias para

que possamos refinar nossas análises a ponto de podermos comparar a influência dos resíduos de lisina nas posições 2/4 contra 4/5, onde MP-B e MP1 seriam os respectivos peptídeos representantes (veja Tabela 1). Nossos resultados prévios indicam que o MP-B tem grande facilidade de se manter ancorado nas cabeças polares lipídicas em orientação transmembrânica, entretanto, não conseguimos visualizar a formação de poro, provavelmente pela simulação não ter varrido suficientemente o espaço de configurações a ponto do dímero e trímero se ligarem em uma configuração energeticamente favorável. Souza et al. (2011) qualifica a disposição de resíduos de lisina nas posições 4/5 e 11-13 como estratégica para potencializar a atividade lítica, pois por meio de interações eletrostáticas com resíduos vizinhos, estes contribuem para a estabilidade da conformação helicoidal, que por sua vez maximiza a eficiência antibiótica dos mastoparanos. Aqueles autores sugerem, portanto, uma forte correlação entre eficiência e anfipaticidade. Eles notaram que o MK-578, o peptídeo que exibia uma atividade antibiótica muito reduzida em ensaios de concentração mínima inibitória, era também o peptídeo que em simulações computacionais exibia o menor ângulo polar, ou seja, era o que tinha uma estrutura menos anfipática.

A seletividade de peptídeos por células bacterianas é entendida em termos gerais como uma preferência de interação determinada pelas diferenças na composição de membranas de mamíferos e bactérias. Nestas, as membranas são constituídas por lipídeos zwitteriônicos, PC ou PE, e aniônicos, PG ou PS, para os quais peptídeos antimicrobianos catiônicos (todos os mastoparanos são catiônicos) têm alta afinidade; naquelas as membranas são constituídas predominantemente por lipídeos zwitteriônicos e ainda são ricas em esteróis, tais como colesteróis, que diminuem a capacidade de curvatura de membranas inibindo a formação de poros pela diminuição do efeito de afinamento causado pela adsorção de peptídeos (Zaslhoff 2002; Yeaman, Yount, 2003). Quando peptídeos catiônicos estão ligados à superfície de membranas de bactérias, tem sido observado a formação de domínios de lipídeos aniônicos por meio de reorganização lateral (Epanand e Epanand 2009). Epanand e Epanand apontam que esse efeito pode ter uma importância variada ao mecanismo de ação no vasto espectro de peptídeos caracterizados. Em nossas simulações, ficou claro o efeito de separação de fase local devido à presença dos peptídeos, seja dentro, no estado poro, ou ligados às interfaces das membranas, no estado paralelo (Figura 2). No estado paralelo, os peptídeos permanecem adsorvidos dispersamente nas interfaces e nessa orientação estes ligam-se aos lipídeos aniônicos vizinhos. Lopes Filho e Ruggiero (artigo em preparação final, Cap. IV.1) notaram que um

peptídeo MP1 paralelamente adsorvido na membrana liga-se a sete lipídeos POPG. Considerando esse número de coordenação médio na simulação s1 do peptídeo MP1, podemos ter 42 lipídeos segregados em seis domínios contendo um peptídeo, o que corresponderia a 65% dos lipídeos aniônicos presentes no sistema. De qualquer forma, neste estado a reorganização lateral dos lipídeos parece ter um impacto muito limitado, pois não facilitou a ocorrência de defeitos conhecidos como defeitos na fronteira de fases entre domínios lipídicos (Epanand et al 2006; Epanand e Epanand 2009) por onde *beads* de água poderiam difundir. O mesmo pode ser dito para os peptídeos N2-MP1 e MK-578. Por outro lado, no estado poro, a separação de fase local parece ter uma importante participação no afinamento da membrana. Na Figura 1 B (MP1) e C (N2-MP1), vemos como os lipídeos aniônicos atraídos pelos peptídeos afinam a membrana. Essa atração dos lipídeos PG para o interior da membrana causando seu afinamento é também visualizado nos gráficos de densidade de massa (Fig. 3).

Huang (2006) investigou por meio de difração de raios-X o efeito de afinamento de membranas como resposta ao aumento da concentração P/L de Alameticina e Melitina em bicamadas PC. Ele observou uma relação linear entre aumento da fração P/L e aumento do afinamento da membrana até $P/L \sim P/L^*$; para $P/L > P/L^*$, a espessura das membranas manteve-se constante. O afinamento observado foi de 1,2 Å para o caso Alameticina/DPhPC e de 1,6 Å para Melitina interagindo com bicamada DOPC. Tomando a simulação s1 do peptídeo MP1 como caso paradigmático (pois $P/L > P/L^*$), também observamos um reduzido afinamento da membrana de 1 Å (Fig. 3B MP1-poro). Em contrapartida, a região hidrofóbica afinou 10 Å devido a atração dos *beads* fosfatos dos lipídeos PG para as proximidades do poro. Note que a separação local de lipídeos toma um papel importante para o afinamento local da membrana e a formação de poro por peptídeos catiônicos, especialmente os curtos. Como as interações carga-dipolo (peptídeo-lipídeo POPC) tem menor alcance, pois decaem com r^{-2} , o custo de energia livre para uma membrana PC pura afinar localmente é maior se comparado ao custo de alguns lipídeos PG dentro do domínio de interação do agregado peptídico deslocarem até este afinando localmente as monocamadas (as interações carga-carga, peptídeo-lipídeo POPG, tem longo alcance, com decaimento de r^{-1}). Isso foi confirmado pela simulação de seis peptídeos MP1 interagindo com uma membrana POPC pura (Fig. 3F). O afinamento da região hidrofóbica observado nessa simulação foi de apenas 4 Å, como consequência, não observamos a formação de poro. O peptídeo MP-B por ter a

maior rede de cargas (+5) entre os peptídeos estudados foi o que atraiu maior número de lipídeos carregados (Fig. 2F). Para esse peptídeo provavelmente faça sentido em se falar em defeitos na fronteira de fases. Como não observamos a formação de poro por onde ocorreria a maior parte das difusões de água de um lado a outro da bicamada, fica claro que as moléculas de água que difundem, atravessam a bicamada por defeitos induzidos.

Conclusões

A principal contribuição deste trabalho é a de estabelecer em nível molecular de detalhamento outro importante aspecto sobre a cationicidade de peptídeos antimicrobianos para a sua atividade lítica, entendida neste trabalho como a formação de poro transmembrânico. Geralmente, a cationicidade é discutida em termos de preferência de interação com membranas predominantemente aniônicas, ou seja, de seletividade. Essas interações são importantes para a atração eletrostática e adsorção de peptídeos (estado paralelo). Aqui, sugerimos que as interações são importantes em outro estado em que peptídeos estão ligados à membrana. A simulação do peptídeo MP1 pode ser considerada um caso paradigmático, pois deixa evidente que a cationicidade governa o mecanismo de separação local de lipídeos em microdomínios favorecendo a formação de poro. Paralelamente, observamos que a localização de resíduos de lisina no meio da cadeia resulta em um peptídeo com capacidade lítica nula, ao menos na concentração estudada. Esse achado está em concordância com o trabalho experimental De Souza et al. (2011), que foram os primeiros a investigar o efeito do diferente posicionamento de resíduos de lisina em mastoparanos. Os resultados obtidos também sugerem que os estados intermediários observados não foram efeitos de um viés imposto pela orientação e localização inicial dos peptídeos dentro da membrana, haja vista que as simulações exibiram resultados que capturaram efeitos de concentração P/L e agregação de peptídeos. Basta notar que MK-578 e MP-B exibiram comportamentos distintos aos observados pelo MP1 e seu análogo N2-MP1, e também notar a diferença no tempo de vida do poro formado por estes últimos peptídeos. Este estudo computacional merece ser levado adiante com um maior número de simulações, dentre outras razões, para tentarmos entender o mecanismo de ação do peptídeo MP-B, no qual os resíduos de lisina estão em posições mais extremas que no MP1, o que é incomum em mastoparanos. Apesar dos esforços, permanece pouco clara essa questão.

Perspectivas

Essa metodologia de simulação computacional aliada às facilidades oferecidas atualmente pelo *grid* computacional GridUNESP pode ser empregada como ferramenta para análise em larga escala da atividade lítica de muitos peptídeos antimicrobianos. Simulações em diferentes concentrações P/L, modificações na estrutura primária entre outras diferentes situações poderão ser tratadas em uma escala de tempo efetivo de microssegundos e, finalmente, seria possível gerar uma coleção de informações que efetivamente contribuirão para o entendimento em nível molecular dos diferentes mecanismos de ação da vasta variedade de mastoparanos e de outras famílias e classes de peptídeos antimicrobianos.

Agradecimentos

Esta pesquisa tornou-se possível graças aos recursos computacionais disponibilizados pelo Núcleo de Computação Científica (NCC/GridUNESP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Tabela 1. Características da estrutura primária dos peptídeos alvo deste estudo.

+2	MP1	I	D	W	K	K	L	L	D	A	A	K	Q	I	L
+3	N2-MP1	I	N	W	K	K	L	L	D	A	A	K	Q	I	L
+4	MK-578	I	N	W	L	K	A	K	K	V	A	G	M	I	L
+5	MP-B	L	K	L	K	S	I	V	S	W	A	K	K	V	L

Tabela 2. Lista das simulações.

Simulação	Peptídeo	Campo de forças ¹	Estado intermediário	Estado Final	Tempo efetivo de vida do poro (μs)	Constante de força (kJmol ⁻¹ nm ⁻²)	E _z (V/nm)	<D> (nm) ²	Fluxo de mol. de água ³ /Na ⁺ /Cl ⁻ pelo poro ⁴	Nº. médio de mol. de água dentro do poro ³	Nº. máximo de mol. de água dentro do poro ³	Tempo efetivo de simulação (μs)
s1	MP1	Martini	poro	paralelo	0,304	-	-	-	+80-44/0/0	9,6±5,6	56	2
s2	N2-MP1	Martini	poro	paralelo	0,160	-	-	-	+52-16/0/0	8,4±6,0	44	2
s3	MK-578	Martini	-	paralelo	-	-	-	-	-	-	-	2
s4	MP-B	Martini	-	transmemb.	-	-	-	-	+24-36/0/0*	-	-	2
s5	MP1	Martini	-	poro	2	500	-	0,08±0	+296-236/0/0	36,8±6,8	60	2
s6	MP1	Martini	-	poro	2	100	-	0,14±0	+276-276/0/0	36,8±8,0	60	2
s7	MP1	Martini	-	poro	2	50	-	0,17±0,01	+376-256/0/0	40,8±7,6	68	2
s8	MP1	Martini P.	-	poro	2	500	-	0,08±0	+436-216/0/0	54,8±10,0	84	2
s9	MP1	Martini P.	-	poro	2	100	-	0,14±0	+436-236/0/0	56,6±11,2	84	2
s10	MP1	Martini P.	-	poro	2	50	-	0,17±0,03	+456-356/0/0	58,2±11,2	88	2
s11	N2-MP1	Martini	-	poro	2	500	-	0,08±0	+272-124/0/0	24,0±6,0	44	2
s12	N2-MP1	Martini	-	poro	2	100	-	0,15±0	+256-180/0/0	24,8±6,0	44	2
s13	N2-MP1	Martini	-	poro	2	50	-	0,18±0,02	+336-260/0/0	26,6±6,4	48	2
s14	N2-MP1	Martini P.	-	poro	2	500	-	0,08±0	+368-68/0/0	38,4±8,0	64	2
s15	N2-MP1	Martini P.	-	poro	2	100	-	0,15±0,01	+420-96/0/0	38,8±9,8	64	2
s16	N2-MP1	Martini P.	-	poro	2	50	-	0,19±0,03	+416-160/0/0	40,8±8,0	72	2
s17	MP1	Martini P.	-	poro	1	100	0,1	0,19±0,02	+272-146/-6/+1	64,2±13,6	104	1
s18	N2-MP1	Martini P.	-	poro	1	100	0,1	0,20±0,02	+276-64/-3/+1	50,8±9,5	84	1

¹ Martini P.: campo de forças com água polarizável.² Deslocamento médio do *backbone* dos peptídeos em relação a posição inicial.³ Este número é resultado da multiplicação do número de *beads* W por 4, pois este modelo *coarse-grained* de água corresponde a quatro moléculas de água *fine-grained*.⁴ + e - denotam o número de moléculas que atravessam o poro em sentidos opostos.* Os *beads* água difundiram pela membrana através de defeitos.

Tabela 3. Valores de energias das interações peptídeo-peptídeo e peptídeo-membrana (os valores estão em kJ/mol).

		MP1		N2-MP1		MK-578	MP-B
		Paralelo ¹	Poros ²	Paralelo ³	Poros ⁴	Paralelo ⁵	Transm. ⁶
Pept-Pept	Coul	-25,8±0,2	-25,2±0,2	-13,1±1,8	-10,6±0,2	2,3±0,2	9,9±0,3
	LJ	-1950±34	-2524±13	-2003±50	-2557±23	-1762±36	-2125±9
total (1)		-1975,8	-2549,2	-2016,1	-2567,6	-1759,7	-2115,1
Pept-PC	Coul	-15,7±1,4	-9,1±2,7	-13,4±6,0	-8,2±3,5	-15,6±3,5	-14,5±2,4
	LJ	-1390±155	-872±150	-1277±154	-742±131	-1357±76	-918±110
total (2)		-1405,7	-881,1	-1290,4	-750,2	-1372,6	-932,5
Pept-PG	Coul	-31,2±0,9	-29,6±2,7	-41,1±1,6	-40,0±2,9	-48,9±5,0	-78,5±4,6
	LJ	-2457±101	-2218±161	-2510±62	-2308±83	-2755±138	-3373±122
total (3)		-2488,2	-2247,6	-2551,1	-2348,0	-2803,9	-3451,5
total (1+2+3)		-5869,7	-5677,9	-5857,6	-5665,8	-5936,2	-6499,1

¹ Valores médios obtidos pela análise da simulação s1 partir de t=600 ns, quando todos os peptídeos já estavam no estado paralelo;

² Valores médios obtidos pela análise da simulação s5 desprezando-se os primeiros 200 ns de simulação.

³ Valores médios obtidos pela análise da simulação s2 partir de t=600 ns, quando todos os peptídeos já estavam no estado paralelo;

⁴ Valores médios obtidos pela análise da simulação s11 desprezando-se os primeiros 200 ns de simulação.

⁵ Valores médios obtidos pela análise da simulação s3 partir de t=600 ns, quando todos os peptídeos já estavam no estado paralelo;

⁶ Valores médios obtidos pela análise da simulação s4 partir de t=600 ns.

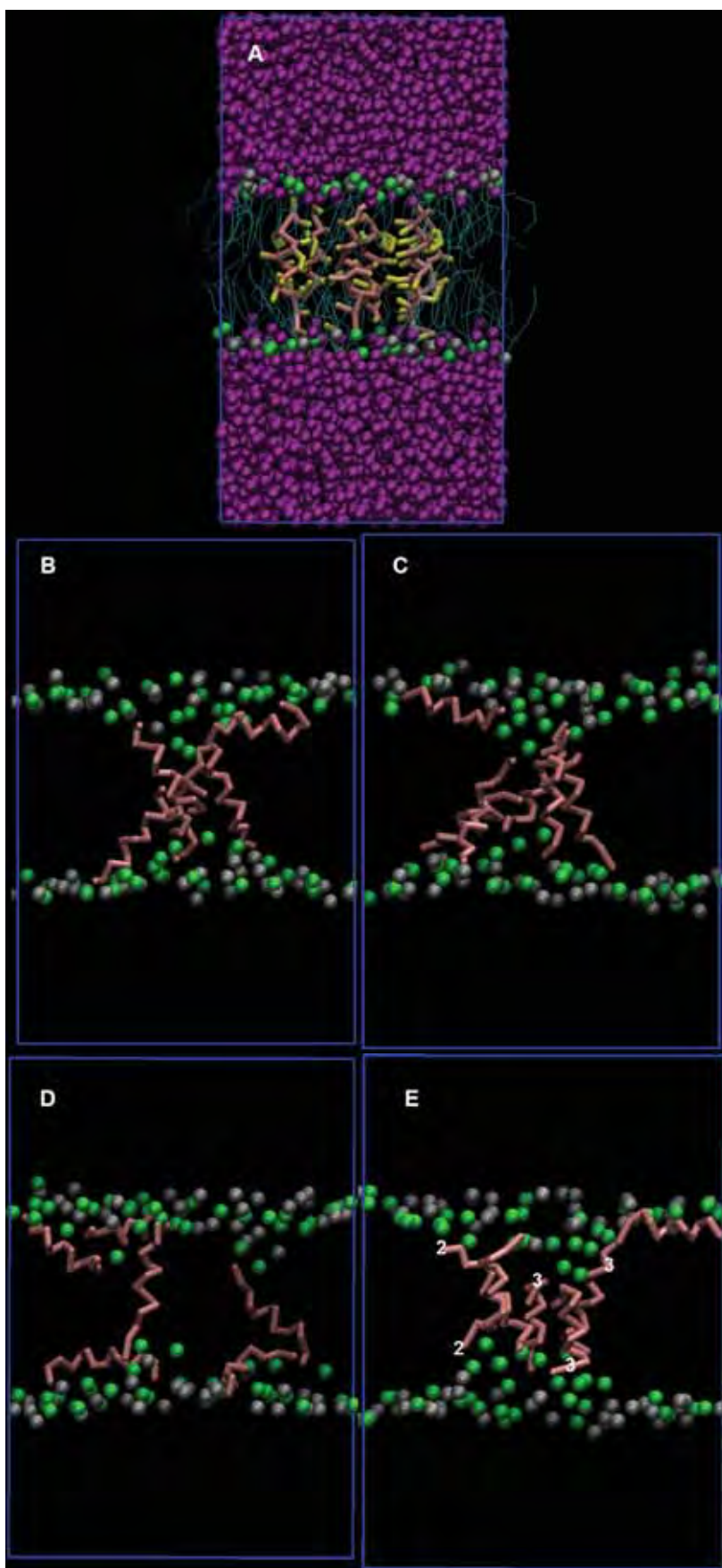


Figura 1. Configurações instantâneas. **A)** Configuração inicial empregada nas simulações s1 a s4. Os peptídeos foram inseridos na região hidrofóbica da membrana (linhas azuis). *Ribbons* beges: cadeia principal dos peptídeos; *ribbons* amarelos: cadeias laterais; esferas verdes: grupos PO4 ("grupo fosfato") dos lipídeos POPG; esferas cinzas: grupos PO4 dos lipídeos POPC; esferas roxas: *bead* W (cada uma corresponde a um grupo de quatro moléculas de água). **B)** Poro formado pelo peptídeo MP1 na simulação s1. Configuração usada como configuração inicial nas simulações s5 a s10 e s17. **C)** Poro formado pelo N2-MP1 na simulação s2. Configuração usada como configuração inicial nas simulações s11 a s16 e s18. **D)** Configuração do peptídeo MK-578 tomada aos 50 ns (s3). Veja que quatro dos seis peptídeos estão em orientação paralela. **E)** Dímero (2) e trímero (3) formados pelo peptídeo MP-B. Cinco dos seis peptídeos estão perpendicularmente enterrados na membrana. Em **B** a **E**, as cadeias laterais foram omitidas para melhorar a clareza.

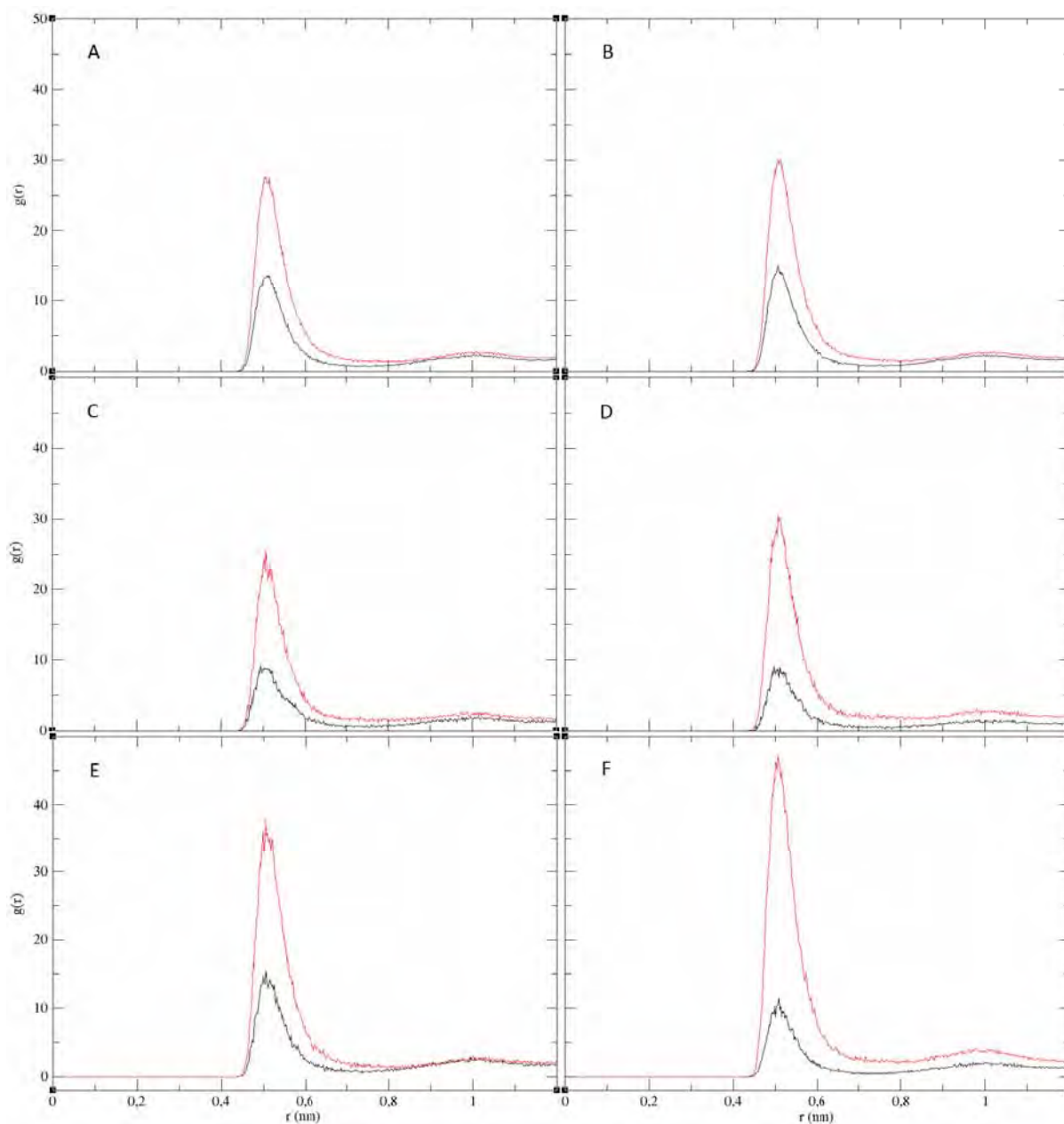


Figura 2. Distribuições radiais de pares dos *beads* PO4 (“grupo fosfato”) em torno dos resíduos básicos dos peptídeos. Curva preta: representa a distribuição de PO4 dos lipídeos POPC; vermelha: PO4 dos lipídeos POPG. **A)** simulação s1, MP1; **B)** simulação s2, N2-MP1. As RDFs foram calculadas no estado paralelo (intervalo de 0,6 a 2 μ s) **C)** simulação s5, MP1; **D)** simulação s11, N2-MP1. Essas RDFs foram obtidas no estado poro sobre todo o intervalo das simulações. **E)** simulação s3, MK-578, estado paralelo; **F)** simulação s4, MP-B, estado perpendicular. As RDFs foram obtidas dos últimos 800 ns das simulações.

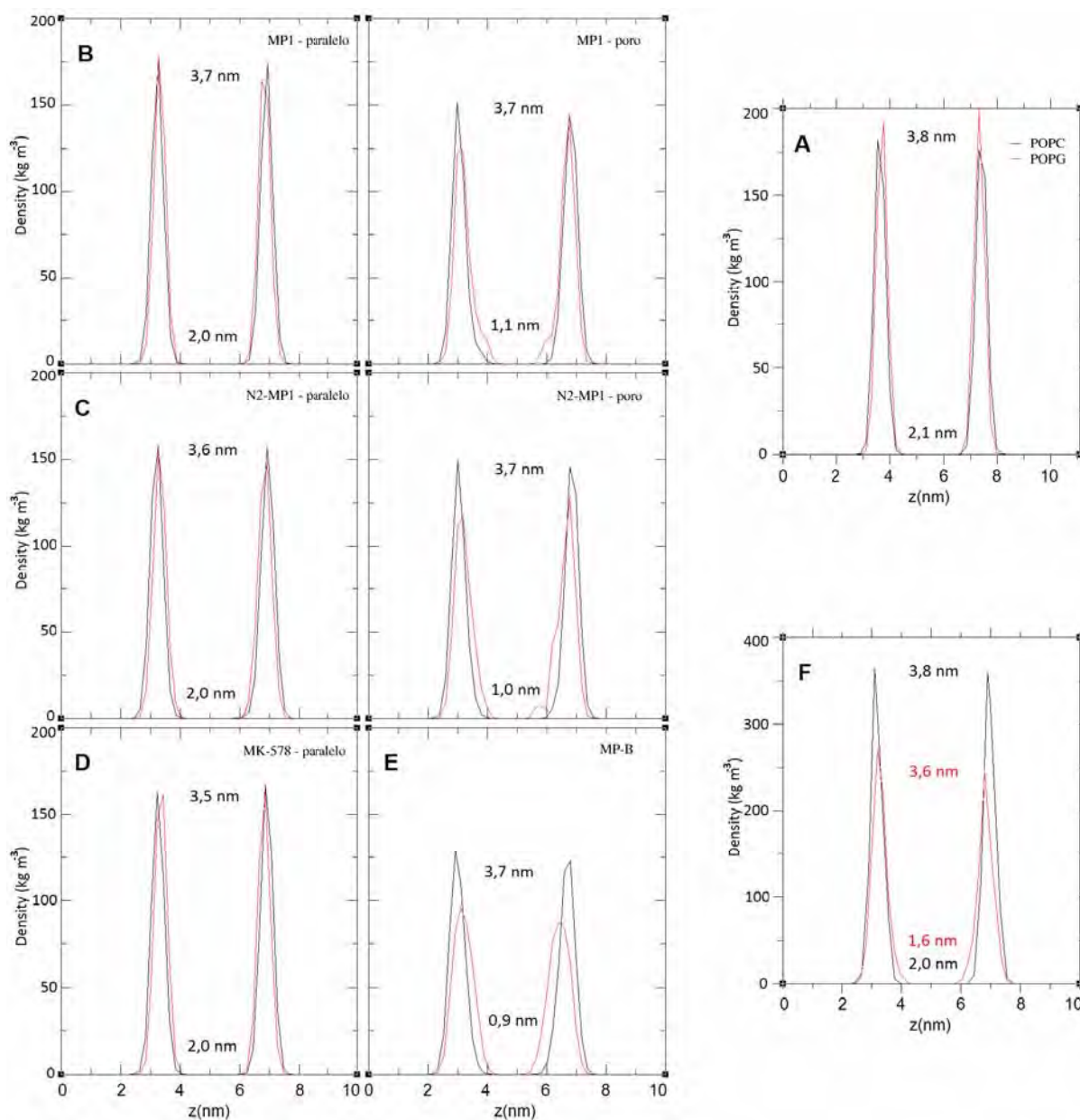


Figura 3. Densidades de massa como função do raio tomado no eixo z normal ao plano da membrana. As densidades correspondem aos sítios PO4 (grupo fosfato). **A)** Densidades tomadas da simulação da membrana PC/PG (1/1) sem peptídeo (simulação de controle). Note que a espessura da membrana é 3,8 nm e a da região hidrofóbica é 2,1 nm. **B)** Densidades tomadas das simulações com o peptídeo MP1 nos estados paralelo e poro. Veja que houve um afinamento de 10 Å na espessura da região hidrofóbica no estado poro. **C)** Peptídeo N2-MP1, estados paralelo e poro. **D)** MK-578, estado paralelo. **E)** MP-B, orientação perpendicular à membrana. Nos quadros **A** até **E**, as distâncias entre os picos POPC (curvas pretas) foram usadas para determinar a espessura das membranas; a espessura da região hidrofóbica foi determinada pelas distâncias entre os limites em que as curvas vermelhas (POPG) encontram o eixo das coordenadas. **F)** Densidade dos grupos fosfato obtida de uma membrana POPC pura sem peptídeo (simulação de controle)(curva preta). Note que a espessura da membrana é

3,8 nm e a da região hidrofóbica é 2,0 nm. Curva vermelha representa a densidade correspondente à simulação de uma membrana PC pura e seis peptídeos MP1. Observe que as interações entre os peptídeos e a membrana provocaram um afinamento da região hidrofóbica de apenas 4 Å, enquanto na membrana PC/PG foi de 10 Å.

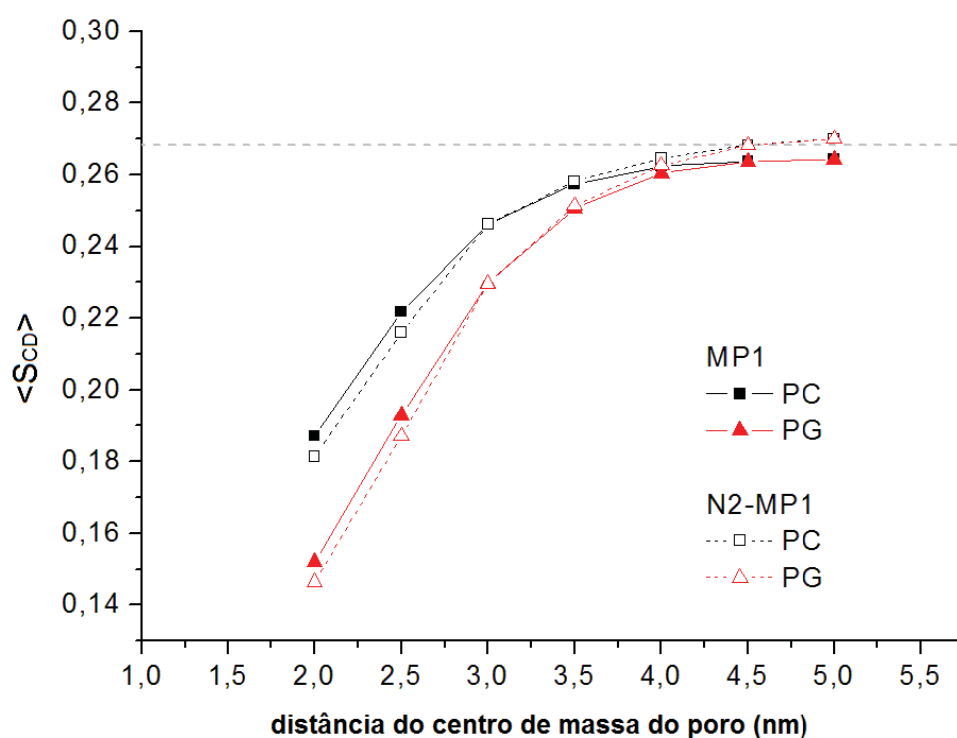


Figura 4. Parâmetros de ordem das cadeias hidrofóbicas dos lipídeos como função da distância do centro de massa do poro. Linha cinza tracejada indica o valor médio obtido na simulação de controle (sem peptídeo).

Referências

Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, DiNola A, Haak JR (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* 81: 3684–3690.

Bussi G, Donadio D, Parrinello M (2007) Canonical sampling through velocity rescaling. *J Chem Phys* 126: 014101/1-014101/7.

Darden T, York D, Pedersen L (1993) Particle mesh Ewald: an N-log(N) method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys* 98: 10089–10092.

De Souza BM, Dos Santos Cabrera MP, Ruggiero Neto J, Palma MS (2011) Investigating the effect of different positioning of lysines residues along the peptide chain of mastoparans for their secondary structures and biological activities. *Amino Acids* 40: 77-90.

Dos Santos Cabrera MP, Broggio Costa ST, de Souza BM, Palma MS, Ruggiero JR, Ruggiero Neto J (2008) Selectivity in the mechanism of action of antimicrobial mastoparan peptide Polybia-MP1. *Eur Biophys J* 37: 879-891.

Epanand RF, Schmitt MA, Gellman SH, Epanand RM (2006) Role of membrane lipids in the mechanism of bacterial species selective toxicity by two alpha/beta antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 1758: 1343–1350.

Epanand RM, Epanand RF (2009) Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. *Biochem et Biophys Acta* 1788: 289-294.

Epanand RM, Rotem S, Mor A, Berno B, Epanand RF (2008) Bacterial Membranes as Predictors of Antimicrobial Potency. *J Am Chem Soc* 130: 14346–14352.

Gazit E, Miller IR, Biggin PC, Sansom MS, Shai Y (1996) Structure and orientation of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 within phospholipid membranes. *J Mol Biol* 258: 860-870.

- Hallock KJ, Lee D-K, Ramamoorthy A (2003) MSI-78, an analogue of the Magainin antimicrobial peptides, disrupts lipid bilayer structure via positive curvature strain. *Biophys J* 84: 3052-3060.
- Hess B, Kutzner C, van der Spoel D, Lindahl E (2008) GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J Chem Theory Comp* v: 435-447.
- Hori Y, Demura M, Iwadate M, Ulrich AS, Niidome T, Aoyagi H, Asakura T (2001) Interaction of mastoparan with membranes studied by ^1H -NMR spectroscopy in detergent micelles and by solid-state ^2H -NMR and ^{15}N -NMR spectroscopy in oriented lipid bilayers. *Eur J Biochem* 268: 302-309.
- Huang HW (2000) Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry* 39: 8347-8352.
- Huang HW (2006) Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity. *Biochem et Biophys Acta* 1758: 1292-1302.
- Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14: 33-38.
- Kandt C, Ash WL, Tieleman DP (2006) Setting up and running molecular dynamics simulations of membrane proteins. *Methods* 41: 475-488.
- Lee M-T, Chen F-Y, Huang HW (2004) Energetics of pore formation induced by membrane active peptides. *Biochemistry* 43: 3590-3599.
- Leontiadou H, Mark AE, Marrink SJ (2006) Antimicrobial peptides in action. *J Am Chem Soc* 128: 12156-12161.
- Leite NB, da Costa LC, dos Santos Alvares D, dos Santos Cabrera MP, de Souza MP, Palma MS, Ruggiero Neto J (2011) The effect of acidic residues and amphipathicity on the lytic
-

activities of mastoparan peptides studied by fluorescence and CD spectroscopy. *Amino Acids* 40:91-100.

Lopes Filho FC, Ruggiero JR. Selectivity and membrane thinning as the effects of interaction between antimicrobial mastoparan peptide Polybia-MP1 and phosphatidylglycerol or phosphatidylcholines membranes. Artigo em preparação final (Capítulo IV.1).

Ludtke SJ, He K, Heller WT, Harroun TA, Yang L, Huang HW (1996) Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry* 35: 13723-13728.

Matsuzaki K, Murase O, Tokuda H, Funakoshi S, Fujii N, Miyajima K (1994) Orientational and aggregational states of magainin 2 in phospholipid bilayers. *Biochemistry* 33: 3342-3349.

Murzyn K, Róg T, Pasenkiewicz-Gierula M (2005) Phosphatidyl-ethanolamine-phosphatidyl-glycerol Bilayer as a Model of the Inner Bacterial Membrane. *Biophys J* 88: 1091–1103.

Monticelli L, Kandasamy SK, Periole X, Larson RG, Tieleman DP, Marrink SJ (2008) The MARTINI coarse-grained force field: extension to proteins. *Journal of Chemical Theory and Computational* 4:819-834.

Oreopoulos J, Epand RF, Epand RM, Yip CM (2010) Peptide-induced domain formation in supported lipid bilayers: direct evidence by combined atomic force and polarized total internal reflection fluorescence microscopy. *Biophys J* 98: 815-823.

Park NG, Yamato Y, Lee S, Sugihara G (1995) Interaction of Mastoparan-B from venom of a hornet in Taiwan with phospholipid bilayer and its antimicrobial activity. *Biopolymers* 36: 793-801.

Polyansky AA, Ramaswamy R, Volynsky PE, Sbalzarini IF, Marrink S-J, Efremov RG (2010) Antimicrobial peptides induce growth of phosphatidylglycerol domains in a model bacterial membranes. *J Phys Chem Lett* 1: 3108-3111.

Rzepiela AJ, Sengupta D, Goga N, Marrink SJ (2010) Membrane poration by antimicrobial peptides combining atomistic and coarse-grained descriptions. *Faraday Discuss* 144: 431-443.

Yeaman MR, Yount NY (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* 55: 27-55.

Yesylevskyy SO, Schäfer LV, Sengupta D, Marrink SJ (2010) Polarizable Water Model for the Coarse-Grained MARTINI Force Field. *PLoS Comput Biol* 6(6): e1000810.

Wang K-r, Yan J-x, Zhang B-z, Song J-j, Jia P-f, Wang R (2009) Novel model of action of Polybia-MPI, a novel antimicrobial peptide, in multi-drug resistant leukemic cells. *Cancer Lett* 278: 65-72.

Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389-395.

V. CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu estabelecer as seguintes conclusões:

1. Um peptídeo MP1 é capaz de provocar intensa perturbação em uma membrana POPG pura, como observado pelos números de coordenação de lipídeos, parâmetros de ordem dos lipídeos encerrados na área de perturbação do peptídeo e afinamento da membrana. Por outro lado, em uma membrana POPC pura, tais parâmetros indicaram uma perturbação induzida pelo peptídeo muito reduzida, o que sugere a grande relevância que o efeito de cargas tem para a coordenação e perturbação de lipídeos e, conseqüentemente, para a seletividade de um peptídeo catiônico;
 2. Em membranas mistas, o caráter catiônico dos peptídeos atraiu lipídeos negativamente carregados para as suas vizinhanças, o que guiou a separação local de lipídeos aniônicos, formando-se domínios lipídicos. Notou-se que o número de lipídeos atraídos está diretamente relacionado com a quantidade de lisinas presentes nos peptídeos, ou seja, com sua carga líquida.
 3. A separação local de fase em domínios lipídicos e atração destes para a região dos peptídeos agregados favoreceu o afinamento local da membrana e a formação de poro transmembrânico, o que explica como peptídeos curtos como o MP1 é capaz de formar poros em membranas cujas espessuras são maiores que seu comprimento.
-

VI. REFERÊNCIAS

VI. Referências

Alanis AJ (2005) Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res* 36: 697-705.

Bechinger B (2004) Structure and function of membrane-lytic peptides. *Crit Rev Plant Sci* 23: 271-292.

Bechinger B, Lohner K (2006) Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 1758: 1529-1539.

Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, DiNola A, Haak JR (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* 81: 3684–3690.

Berger O, Edholm O, Jähnig F (1997) Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophys J* 72: 2002-2013.

Brogden KA (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Rev* 3: 238-250.

Chiu S, Clark M, Balaji V, Subramanian S, Scott H, Jakobsson E (1995) Incorporation of surface tension into molecular dynamics simulation of an interphase: a fluid phase lipid bilayer membrane. *Biophys J* 69: 1230-1245.

Dathe M, Schümann M, Wieprecht T, Winkler A, Beyermann M, Krause E, Matsuzaki K, Murase O, Bienert M (1996) Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes. *Biochemistry* 35: 12612-12622.

Deserno M, Holm C (1998) How to mesh up Ewald sums. I. A theoretical and numerical comparison of various particle mesh routines. *J Chem Phys* 109: 7678-7693.

Doltsinis NL (2006) Molecular dynamics beyond the Born-Oppenheimer approximation: mixed quantum-classical approaches. *Comput Nanosci* 31:389-409.

Dos Santos Cabrera MP, Arcisio-Miranda M, Broggio Costa ST, Konno K, Ruggiero JR, Procopio J, Ruggiero Neto J (2008a) Study of the mechanism of action of anoplin, a helical antimicrobial decapeptide with ion channel-like activity, and the role of the amidated C-terminus. *J Pept Sci* 14: 661-669.

Dos Santos Cabrera MP, Broggio Costa, ST, de Souza BM, Palma MS, Ruggiero JR, Ruggiero Neto J (2008b) Selectivity in the mechanism of action of antimicrobial mastoparan peptide Polybia-MP1. *Eur Biophys J* 37: 879-891.

Gibbon P, Sutmann G (2002) Long-range interactions in many-particle simulation. *Quantum simulations of Complex many-body systems: from theory to algorithms (Lecture Notes)* 10:467-506.

Han X, Gross RW (2005) Shotgun lipidomics: electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples. *Mass Spect Rev* 24: 367-412.

Hess B, Bekker H, Berendsen H J C, Fraaije J G E M (1997) LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J Comp Chem* 18: 1463-1472.

Hockney R W, Goel S P e Eastwood J W (1974) Quiet high-resolution computer models of a plasma. *J Comp Phys* 14: 148-158.

Huang HW (2000) Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry* 39: 8347-8352.

Huang HW, Wu Y (1991) Lipid-alamethicin interactions influence alamethicin orientation. *Biophys J* 60: 1079-1087.

Leach AR (2001) *Molecular modelling: principles and applications*, 2nd Edition. Prentice Hall, England.

Ludtke SJ, He K, Heller WT, Harroun TA, Yang L, Huang HW (1996) Membrane pores induced by magainins. *Biochemistry* 35: 13723-13728.

Marrink SJ, Risselada HJ, Yefimov S, Tieleman DP, Vries AH (2007) The MARTINI force field: coarse-grained model for biomolecular simulations. *J Phys Chem B* 111: 7812-7824.

Matsuzaki K, Sugishita K, Harada M, Fujii N, Miyajima K (1997) Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1327: 119-130.

Miyamoto S e Kollman P A (1992) SETTLE: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithms for rigid water models. *J Comp Chem* 13: 952-962.

Monticelli L, Kandasamy SK, Periole X, Larson RG, Tieleman DP, Marrink SJ (2008) The MARTINI coarse-grained force-field: extension to proteins. *J Chem Theory and Compu* 4: 819-834.

Murzyn K, Róg T, Pasenkiewicz-Gierula M (2005) Phosphatidyl-ethanolamine-phosphatidyl-glycerol Bilayer as a Model of the Inner Bacterial Membrane. *Biophys J* 88: 1091-1103.

Papo N, Shai Y (2003) Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model membranes? *Peptides* 24: 1693-1703.

Papo N, Shai Y (2005) A Molecular Mechanism for Lipopolysaccharide Protection of Gram-negative Bacteria from Antimicrobial Peptides. *J Biol Chem* 280: 10378-10387.

Shan Y, Klepeis JL, Eastwood MP, Dror RO, Shaw DE (2005) Gaussian split Ewald: a fast Ewald mesh method for molecular simulation. *J Chem Phys* 122: 054101-1/13.

Tully JC (2000) Perspective on "Zur Quantentheorie der Molekeln". *Theor Chem Acc* 103:173-176.

van der Spoel D, Lindahl E, Hess B, van Buuren AR, Apol E, Meulenhoff PJ, Tieleman DP, Sijbers ALTM, Feenstra KA, van Drunen R, Berendsen HJC (2010) Gromacs User Manual version 4.5, www.gromacs.org.

van Gunsteren WF, Berendsen HJC (1987) Gromos-87 manual. Biomos BV, Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands.

Verlet L (1967) Computer "experiments" on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Phys Rev* 159: 98-103.

Yeaman MR, Yount NY (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* 55: 27-55.

Wade D, Boman A, Wahlin B, Drain CM, Andreu D, Boman HG, Merrifield RB (1990) All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. *Proc Natl Acad Sci* 87: 4761-4765.

Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-395.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, / / .

Assinatura