



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

Gisele Baldissera

**Estudo das Interações de Peptídeos Antimicrobianos e
Sistemas Miméticos de Membrana por Dinâmica Molecular**

São José do Rio Preto

-2014-

Gisele Baldissera

**Estudo das Interações de Peptídeos Antimicrobianos e Sistemas
Miméticos de Membrana por Dinâmica Molecular**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, área de concentração Biofísica Molecular, junto ao programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular do Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Ruggiero

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marcia Perez dos Santos Cabrera

São José do Rio Preto

-2014-

Gisele Baldissera

**Estudo das Interações de Peptídeos Antimicrobianos e Sistemas
Miméticos de Membrana por Dinâmica Molecular**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, área de concentração Biofísica Molecular, junto ao programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular do Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

Comissão Examinadora

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

Prof. Dr. Antonio Caliri
USP – Ribeirão Preto

Prof. Dr. Luis Paulo Barbour Scott
UFABC – Santo André

Prof.^a Dra. Sabrina Thais Broggio Costa
FATEC Catanduva

Prof. Dr. Leandro Cristante de Oliveira
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 29 de agosto de 2014

Baldissera, Gisele.

Estudo das interações de peptídeos antimicrobianos e sistemas miméticos de membrana por dinâmica molecular / Gisele Baldissera. -- São José do Rio Preto, 2014

121 f. : il., tabs.

Orientador: José Roberto Ruggiero

Coorientador: Marcia Perez dos Santos Cabrera

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Biofísica. 3. Dinâmica molecular.
4. Peptídeos antibióticos. 5. Membranas (Biologia) I. Ruggiero, José Roberto. II. Cabrera, Marcia Perez dos Santos. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 577.3

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

“Mesmo as noites totalmente sem estrelas podem anunciar a aurora de uma grande realização”

Martin Luther King

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem sua constante presença em minha vida, nenhuma de minhas conquistas teria sido possível.

Ao Professor Dr. José Roberto Ruggiero, que me orientou durante esses anos, contribuindo para o meu crescimento intelectual e profissional. Agradeço a ele acima de tudo por sua amizade.

A Professora Dr. Márcia dos Santos Peres Cabrera, minha co-orientadora, pela enorme contribuição para o desenvolvimento deste trabalho que se deu através de muitas discussões e valiosas sugestões.

A todos os professores do departamento de física, em especial, ao Prof. Dr. Jorge Chahine e Prof. Dr. Alexandre Sumam de Araújo, que contribuíram para minha formação, através de inúmeras conversas a respeito de resultados e problemas encontrados durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Vitor Barbanti Pereira Leite por permitir a utilização de suas máquinas para a realização de algumas das simulações aqui apresentadas.

A Tamara Rodrigues Valder pela prévia implementação e validação da micela de SDS que foi utilizada também no meu trabalho.

Ao meu esposo Vicente Galori Neto por compreender minha ausência e apoiar minhas escolhas.

Aos meus pais, Geraldo e Terezinha e minha irmã Laura que me deram suporte para que eu tivesse uma boa formação profissional. Por serem o esteio da minha vida, pela educação que recebi e por tudo o que tenho e por quem sou hoje.

As minhas amigas Franciele, Karina, Natália e Mirian e amigos Marcelo e Josimar com os quais não somente dividi a sala de estudos, mas também os melhores e piores momentos dessa jornada, com muito bom humor e cumplicidade.

A todos os colegas de departamento por todo apoio e amizade nas horas alegres e difíceis.

A secretária do departamento Ilva Bernardes por sua valiosa amizade durante todos esses anos.

E finalmente, agradeço a CAPES e a FATEC Catanduva pelo suporte financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

Resumo

Muitos peptídeos extraídos de plantas e secreções de animais exibem um amplo espectro de atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, negativas, fungos e parasitas. Devido a essa característica e ao crescente aumento da resistência dos microrganismos patogênicos às formas de tratamento convencionais, especula-se a utilização destes peptídeos como possíveis novos fármacos. Por isso, várias técnicas experimentais e teóricas que fazem uso de sistemas miméticos do ambiente membranar têm sido utilizadas para se estudar os mecanismos de ação desta classe de peptídeos.

No presente trabalho, utilizam-se simulações por Dinâmica Molecular com o intuito de investigar a influência de algumas características de interação peptídeo-peptídeo e peptídeo-membrana sobre a eficiência biológica de Protonectinas e Jeleínas.

Protonectina e Protonectina 1-6 são peptídeos antimicrobianos, o primeiro apresenta atividade hemolítica, de degranulação de mastócitos e quimiotática, enquanto o segundo apresenta somente a atividade quimiotática. Dados experimentais indicam que a associação destes dois peptídeos (proporção 1:1) gera uma forma de estrutura supramolecular agregada e também aumenta as atividades hemolíticas e de degranulação de mastócitos, enquanto a atividade quimiotática decresce acentuadamente, ou seja, em associação eles apresentam um comportamento mais acentuado de interação com membranas. Tendo em vista estes resultados, especulam-se, neste trabalho, quais as interações entre Protonectina/Protonectina 1-6 (mistura) que estariam associadas à formação de tal estrutura agregada e quais as implicações desta estrutura no mecanismo de interação com membrana. Os resultados das simulações em água e micela de SDS para estes peptídeos indicam que há a tendência de agregação entre Protonectinas puras e Protonectina/Protonectina 1-6, e que esta ocorre por meio de ligações por hidrogênio intermitentes. Além disso, verificou-se que as interações eletrostáticas entre a mistura de peptídeos são menos favoráveis que para a situação de Protonectinas puras, influenciando na distância entre os peptídeos, e favorecendo o aumento da estruturação helicoidal e da anfipaticidade (características de interação com membrana) da Protonectina da mistura em relação à Protonectina isoladamente.

As Jeleínas formam um conjunto de quatro peptídeos antimicrobianos distintos extraídos da geléia real (Jeleína I, II, III e IV), apresentam de 8 a 9 resíduos de aminoácidos e a diferença entre eles ocorre apenas por um destes resíduos. Apesar desta diferença na sequência primária destes peptídeos, ocorrem diferenças significativas em sua eficiência

biológica. Tendo em vista essas características, busca-se através de simulação por Dinâmica Molecular em água, micelas de SDS e bicamada lipídica de POPC: POPG (70:30%) entender como as diferenças na sequência primária destes peptídeos influencia sua interação com miméticos de membrana, como as pequenas cadeias de Jeleína I afetam as bicamadas lipídicas e como o estado de protonação da Histidina pode influenciar o modo de ação dos peptídeos de Jeleína. Os resultados indicaram que a característica hidrofóbica do primeiro resíduo de aminoácido encontrado na Jeleína I é fundamental para melhor interação deste peptídeo com o mimético de membrana. Verificou-se também que as Jeleínas I apresentam tendência de agregação e esta pode estar correlacionada ao seu mecanismo de interação com membranas e que esta interação é melhorada em pH ácido.

PALAVRAS-CHAVE: Dinâmica Molecular. Peptídeos Antimicrobianos. Interação com Membranas.

Abstract

Many peptides extracted from plants and animal secretions exhibit a broad spectrum of antimicrobial activity against bacteria gram-negative, gram-positive, fungi and parasites. Due this characteristic and the increasing resistance of pathogenic microorganisms to conventional forms of treatment, it is speculated the use of these peptides as potential new drugs. Therefore, various experimental and theoretical techniques that make use of membrane mimetic systems have been used to study the mechanisms of action of this class of peptides.

In this work, we use molecular dynamics simulations to understand the influence of some characteristics of interaction peptide-peptide and peptide-membrane on biological efficiency of the Protonectins and Jelleines.

Protonectin and Protonectin 1-6 are antimicrobial peptides, the first shows hemolytic activity, mast cell degranulation and chemotaxis, while the second presents chemotactic activity. Experimental data indicate that the association between those two peptides (1:1) generates a supramolecular aggregate structure and also increases the hemolytic and mast cell degranulation activities, while the chemotactic activity decreases, i.e., in combination they exhibit accentuated behavior of the interaction with membranes. Based on these results in this work, we speculate, which the interactions between Protonectin/Protonectin 1-6 (mixture) that would be associated with the formation of aggregate structure and the implications of this structure in the interaction with membrane mechanism. The results of the simulations in water and SDS micelle for these peptides indicate that there is a tendency of aggregation between pure Protonectins and Protonectin/Protonectin 1-6, and that this occurs through intermittent hydrogen bonds. Furthermore, it was found that the electrostatic interactions between the mixture of peptides is less favorable than for the pure Protonectins, influencing the distance between the peptides and favoring the increase of the helical structure and amphipathicity (characteristics of interaction with membrane) of the Protonectin of the mixture relative to pure Protonectin.

Jelleines form a set of four distinct antimicrobial peptides extracted from royal jelly (Jelleine I, II, III and IV), have 8 to 9 amino acid residues and the difference between them is only one of these residues. Despite this difference in the primary sequence of these peptides, significant differences occur in biological efficiency. Given these characteristics, we investigated through molecular dynamics simulation in water, SDS micelles and lipid bilayer of POPC: POPG (70:30%) elucidate on how the differences in the primary sequence of these

peptides influences their interaction with membrane, how small chains Jelleine I affect the lipid bilayers and how the state of protonation of histidine may influence the mode of action of peptides Jelleine. The results indicated that the hydrophobic characteristic of the first amino acid residue found in Jelleine I is fundamental for better interaction of the peptide with the membrane mimetic. It was also found that Jelleine I have tendency to aggregate and this can be correlated to the mechanism of interaction with membranes and that this interaction is enhanced in acid pH.

KEY WORDS: Molecular Dynamics. Antimicrobial Peptides. Membrane Interaction.

Lista de Figuras

Figura 1.1. Representação dos mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos com membranas...	18
Figura 2.1.1.1. Estrutura tetraédrica do carbono α	26
Figura 2.1.1.2. Rotação em torno da ligação covalente entre dois átomos.	27
Figura 2.1.1.3. Representação do Potencial de Lennard Jones para o Carbono.....	28
Figura 2.1.2.1. Esquema Bidimensional das Condições Periódicas de Contorno.....	29
Figura 3.1.1. Padrões de estrutura secundária para os peptídeos de Protonectina e Protonectina 1-6 nas simulações em água.....	44
Figura 3.1.2. Distâncias entre os centros de massa dos peptídeos de Protonectinas e Protonectina/Protonectina 1-6 em função do tempo de simulação.	45
Figura 3.1.3. Número de ligações por Hidrogênio entre Protonectinas e Protonectina/Protonectina 1-6 em função do tempo de simulação.	45
Figura 3.1.4. Conformações características obtidas para as Protonectinas e Protonectina/Protonectina 1-6 das simulações em água.	46
Figura 3.2.1. Distância entre os centros de massa das Jeleínas I (pH 5.5 e 7.0) em água como função do tempo de simulação.....	48
Figura 3.2.2. Padrões de estrutura secundária das Jeleínas I em pH 5.5 e 7.0 das simulações em água	49
Figura 3.2.3. Número de ligações por hidrogênio entre os peptídeos de Jeleína I (pH 5.5 e 7.0) em água, como função do tempo de simulação.	50
Figura 3.2.4. Conformações características obtidas para os peptídeos de Jeleína I (pH 5.5 e 7.0) para as simulações em água.	51
Figura 3.3.1. Distância entre os centros de massa dos pares de peptídeos de Jeleína I, II, III e IV das simulações em água, como função do tempo de simulação.	53
Figura 3.3.2. Padrões de estrutura secundária para os pares de peptídeos de Jeleína I, II, III e IV das simulações em água.....	54
Figura 3.3.3. Número de ligações por hidrogênio entre os pares de peptídeos de Jeleínas I, II, III e IV das simulações em água como função do tempo de simulação.....	55
Figura 3.3.4. Conformações estruturais iniciais e finais dos peptídeos de Jeleínas I, II, III e IV nas simulações em água.....	56

Figura 4.1.1. Distância entre o centro de massa dos peptídeos de Protonectinas e Protonectina/Protonectina 1-6 e o centro de massa da micela de SDS em função do tempo de simulação.....	60
Figura 4.1.2. Distância entre o centro de massa da mistura de peptídeos e dos peptídeos puros na presença da micela de SDS como função do tempo de simulação	60
Figura 4.1.3. Conformações iniciais e em 25ns de simulação obtidas para as Protonectinas e Protonectina/Protonectina 1-6 das simulações de equilíbrio em micela de SDS.	60
Figura 4.1.4. Número de ligações por hidrogênio entre Protonectinas e Protonectina/Protonectina 1-6 na presença da micela de SDS como função do tempo de simulação.....	61
Figura 4.1.5. Padrões de estrutura secundária para as Protonectinas e Protonectina/Protonectina 1-6 na presença da micela de SDS como função do tempo de simulação.....	62
Figura 4.1.6. Perfil de solvatação ao redor dos átomos de carbono α dos resíduos de aminoácidos dos peptídeos de Protonectina e Protonectina/Protonectina 1-6 das simulações na presença da micela de SDS.	62
Figura 4.1.7. Superfície de energia livre como função do número de resíduos em α -hélice e da distância entre o centro de massa dos peptídeos para as simulações de REMD das Protonectinas e Protonectina/Protonectina 1-6 na presença da micela de SDS	64
Figura 4.1.8. Comparação entre os resultados das simulações de equilíbrio e o REMD.....	65
Figura 4.1.9. Superfície de energia livre para as interações peptídeo-peptídeo para Protonectinas e Protonectina/Protonectina 1-6 na presença da micela de SDS, obtida pelas simulações de REMD	66
Figura 4.1.10. Superfície de energia livre da energia de interação entre os peptídeos e a micela de SDS para as simulações de Protonectinas e Protonectina/Protonectina 1-6 (REMD).	67
Figura 4.2.1. Distância entre o centro de massa dos peptídeos de Jeleína I e o centro de massa da micela de SDS como função do tempo de simulação (pH 5.5 e 7.0).	70
Figura 4.2.2. Distância entre o centro de massa dos peptídeos de Jeleína I (pH 5.5 e 7.0) como função do tempo de simulação.....	70
Figura 4.2.3. Número de ligações por hidrogênio entre os peptídeos de Jeleína I (pH 5.5 e 7.0) como função do tempo de simulação, para as simulações em micela de SDS.....	71
Figura 4.2.4. Soma das energias de interação de Lennard Jones e Coulomb entre os peptídeos de Jeleína I (pH 5.5 e 7.0) na presença da micela de SDS.....	72
Figura 4.2.5. Soma das energias de interação de Lennard Jones e Coulomb entre os peptídeos de Jeleína I e a micela de SDS, para os pHs 5.5 e 7.0.....	72

Figura 4.2.6. Energia de interação de Coulomb entre os aminoácidos carregados dos peptídeos de Jeleína I e a micela de SDS nas simulações em pH 5.5 e 7.0.....	73
Figura 4.2.7. Padrões de estrutura secundária em função do tempo de simulação para os peptídeos de Jeleína I na presença da micela de SDS nas simulações em pH 5.5 e 7.0.....	74
Figura 4.2.8. Função de distribuição radial dos grupos sulfato (SO ₄) das moléculas de SDS em torno dos resíduos de aminoácidos de histidina dos peptídeos de Jeleína I (pH 5.5 e 7.0) que se encontram mais próximos da interface aquosa.	75
Figura 4.2.9. Conformações obtidas após 100ns de simulação dos peptídeos de Jeleína I (pH 5.5 e 7.0) na presença da micela de SDS.....	75
Figura 4.3.1. (a) Distância entre o centro de massa dos peptídeos de Jeleína I, II, III ou IV e o centro de massa da micela de SDS como função do tempo de simulação. (b) Histograma da posição dos peptídeos em relação ao centro de massa da micela.	79
Figura 4.3.2. Distância entre o centro de massa dos pares de peptídeos de Jeleína I, II, III e IV em função do tempo de simulação.....	79
Figura 4.3.3. Número de ligações por hidrogênio entre os pares de peptídeos de Jeleína I, II, III e IV como função do tempo de simulação.....	80
Figura 4.3.4. Contribuição de Lennard Jones e Coulomb para a energia de interação entre os pares de peptídeos de Jeleína I, II, III ou IV em função do tempo de simulação.....	82
Figura 4.3.5. Contribuição de Coulomb e Lennard Jones para a energia de interação entre os peptídeos de Jeleína I, II, III ou IV e a micela de SDS como função do tempo de simulação.....	83
Figura 4.3.6. Contribuição de Coulomb para as energias de interação entre cada um dos aminoácidos carregados dos peptídeos de Jeleína I, II, III ou IV e a micela de SDS como função do tempo de simulação.....	84
Figura 4.3.7. Padrões de estrutura secundária para os pares de peptídeos de Jeleína I, II, III e IV nas simulações na presença da micela de SDS.....	85
Figura 4.3.8. Função de distribuição radial de pares em torno do N-terminal dos peptídeos de Jeleína I, II, III ou IV na presença da micela de SDS..	86
Figura 4.3.9. Conformações obtidas após 100ns de simulação para os pares de Jeleína I, II, III e IV na presença da micela de SDS.	86
Figura 5.1.1. Representação esquemática das moléculas de lipídeo que constituem a bicamada de POPC:POPG (70:30).....	89

Figura 5.1.2. Perfil de densidade média da caixa de simulação contendo a bicamada de POPC:POPG, para os últimos 50 ns de simulação.	90
Figura 5.1.3. Energia potencial total do sistema (bicamada POPC:POPG)..	91
Figura 5.1.4. (a) Variação da temperatura da caixa de simulação como função do tempo. (b) Variação da pressão da caixa de simulação como função do tempo de simulação..	92
Figura 5.1.5. Dimensões da caixa de simulação da bicamada de POPC:POPG em função do tempo..	92
Figura 5.1.6. Área por lipídeo da bicamada POPC:POPG livre de peptídeo como função do tempo de simulação.....	94
Figura 5.1.7. Esquemas da forma de organização das moléculas de fosfolipídio.	94
Figura 5.1.8. Função de distribuição radial de pares.....	96
Figura 5.1.9. Parâmetro de ordem para a cadeia saturada das moléculas de POPC e POPG.....	96
Figura 5.1.10. Representação da bicamada POPC:POPG formada após 300ns de simulação.....	97
Figura 5.2.1. Perfil de densidade média das bicamadas lipídicas livre de peptídeos, na presença de 4 ou 16 peptídeos em pH 5.5 e pH 7.0.	101
Figura 5.2.2. Perfil de densidade média da água, fosfato, e grupos carregados, polares e Fenilalanina dos peptídeos em pH 5.5, pH 7.0 e também para bicamada livre de peptídeo.....	102
Figura 5.2.3. Parâmetro de ordem das caudas saturadas das moléculas de lipídeo POPC e POPG... ..	103
Figura 5.2.4. Contribuição de Coulomb para a energia de interação entre os peptídeos e a bicamada lipídica.....	105
Figura 5.2.5. Barreira de energia livre para passagem de água através da bicamada lipídica.....	106
Figura 5.2.6: Representação da passagem de uma molécula de água através da bicamada lipídica para a simulação com 16 peptídeos em pH 5.5.	107

Lista de Tabelas

TABELA 1.1.1. Sequência primária, Carga líquida <Q> e Hidrofobicidade média <H> da Protonectina e Protonectina 1-6.....	19
Tabela 1.1.2. Propriedades biológicas da protonectina, protonectina 1-6 e associação de ambos os peptídeos na proporção estequiométrica 1:1 de acordo com Saidenberg N. B. B., 2007.....	20
Tabela 1.2.1. Sequência primária dos peptídeos em estudo, suas respectivas cargas líquidas (Q) em pH fisiológico e hidrofobicidade média (<H>), calculadas segundo a escala de Eisenberg et al., 1984.....	22
Tabela 3.1: Simulações que serão apresentadas ao Capítulo 3.....	43
Tabela 3.2.1: Simulações dos peptídeos de Jeleína I representando o pH 5.5 ou 7.0.....	47
Tabela 3.3.1: Simulações dos pares de peptídeos de Jeleína I, II, III ou IV.....	52
Tabela 4.1: Simulações que serão apresentadas ao Capítulo 4.....	57
Tabela 4.1.1: Simulações dos peptídeos de Protonectina e Protonectina/Protonectina 1-6.....	59
Tabela 4.2.1: Simulações dos Peptídeos de Jeleína I em pH 5.5 ou 7.0 na presença da micela de SDS.....	69
Tabela 4.3.1: Simulações dos peptídeos de Jeleína I, II, III e IV, puros na presença da micela de SDS.....	77
Tabela 4.3.2: Ligações por hidrogênio entre os peptídeos de Jeleína I.....	80
Tabela 4.3.3: Ligações por hidrogênio entre os peptídeos de Jeleína II.....	81
Tabela 4.3.4: Ligações por hidrogênio entre os peptídeos de Jeleína III.....	81
Tabela 4.3.5: Ligações por hidrogênio entre os peptídeos de Jeleína IV.....	81
Tabela 5.1: Simulações que serão apresentadas no Capítulo 5.....	88
Tabela 5.1.2: Distribuição dos Lipídeos.....	95
Tabela 5.2.1: Características das simulações apresentadas na seção 5.2.....	99
Tabela 5.2.2: Pontes salinas e ligações por hidrogênio entre peptídeos e grupos de lipídicos.....	105

Lista de Símbolos, Siglas e Abreviaturas

Ala – Alanina
AMBER – “Assisted Model Building with Energy Refinement”
Arg – Arginina
Asn – Asparagina
Asp – Ácido Aspártico
CD – Dicroísmo Circular
CHARMM – “Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics”
CP – Condições Periódicas
Cys – Cisteína
DM – Dinâmica Molecular
FTIR – Infravermelho com Transformada de Fourier
Gln – Glutamina
Glu – Ácido Glutâmico
Gly – Glicina
GROMACS – “GRoningen MACHine for Chemical Simulation”
GROMOS – “GRoningen Molecular Simulation”
His – Histidina
Ile – Isoleucina
LDH - Lactato Dehidrogenase
Leu – Leucina
Lys – Lisina
Met – Metionina
MPX – Mastoparano X
MP1 – Polybia –MP1
Phe – Fenilalanina
PME – Particle Mesh Ewald
POPC – Palmitoil oleil fosfatidilcolina
POPG – Palmitoil oleil fosfatidilglicerol
Pro – Prolina
REMD – Replica Exchange Method Simulations
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RMSD – “Root Mean Square Desviation”
SDS – Dodecil sulfato de sódio
Ser – Serina
SPC – “Simple Point Charge”
TFE – Trifluoretanol
Thr – Treonina
Trp – Triptofano
Tyr – Tirosina
Val – Valina

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Protonectinas	18
1.2. Jeleínas	21
2. MÉTODOS TEÓRICOS	23
2.1 Simulações por Dinâmica Molecular	23
2.1.1 Energia Potencial.....	24
2.1.2 Condições Periódicas	29
2.1.3 Raio de Corte.....	30
2.1.3.1 Tratamento Eletrostático	30
2.1.5 Minimização de Energia.....	31
2.1.6 Restrição de Posição.....	31
2.1.7 Dinâmica Molecular	32
2.2 Método de Troca de Réplicas.....	33
2.3 Simulações deste Trabalho.....	34
2.4. Condições de Simulação	35
2.5. Análises	36
RESULTADOS	42
3. SIMULAÇÕES EM ÁGUA	42
3.1. Peptídeos de Protonectina e Protonectina/Protonectina 1-6.....	43
3.2. Peptídeos de Jeleína I em pH 5.5 e 7.0.....	47
3.3. Peptídeos de Jeleína I, II, III e IV puros.....	52
4. SIMULAÇÕES EM MICELAS DE SDS	57
4.1. Peptídeos de Protonectina e Protonectina/Protonectina 1-6.....	58
Conclusões Preliminares	68
4.2 Peptídeos de Jeleína I em pH 5.5 e 7.0.....	69
Conclusões Preliminares	76
4.3. Peptídeos de Jeleína I, II, III e IV puros.....	77
Conclusões Preliminares	87
5. SIMULAÇÕES EM BICAMADAS LIPÍDICAS	88
5.1. Bicamada Lipídica de POPC: POPG Livre de Peptídeo	89
Conclusões Preliminares	97
5.2. Bicamada de POPC: POPG na presença de peptídeos de Jeleína I em condições de pH 5.5 ou 7.0.	99
Conclusões Preliminares	107
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

1. INTRODUÇÃO

Entender a dinâmica e o mecanismo de enovelamento de proteínas continua sendo problema central da biologia molecular. Por isso, ensaios por Dinâmica Molecular têm se tornado uma prática comum para estudar as propriedades de proteínas, peptídeos e ácidos nucleicos em meio aquoso ou em miméticos de membrana. Além disso, com o rápido aumento da resistência de microrganismos patogênicos aos antibióticos os peptídeos antimicrobianos naturais e sintéticos têm se tornado uma alternativa, pois apresentam ação bactericida e toxicidade negligenciável (LIM et al, 2013).

Muitos peptídeos antimicrobianos, compostos de até 50 resíduos de aminoácidos, têm sido descobertos em uma grande variedade de espécies de plantas, insetos e animais, constituindo o sistema de defesa dessas espécies contra microrganismos patogênicos (MATSUZAKI, 2009). Por exibirem um amplo espectro de atividade antimicrobiana, contra bactérias gram-positivas e negativas, fungos e parasitas, especula-se a utilização destes peptídeos como possíveis novos fármacos (ROMANELLI et al, 2010; TORRENT et al, 2012;).

Os mecanismos de ação destes peptídeos têm sido constantemente estudados utilizando-se sistemas modelos que mimetizam o ambiente de membrana, como por exemplo, arranjos de fosfolipídios de composição diversificada na forma de bicamadas, vesículas, micelas de SDS (dodecilsulfato de sódio) ou em soluções contendo solventes com propriedades anisotrópicas, como por exemplo, soluções água e TFE (trifluoretanol) (ROCATANO et al, 2002; FIORONI et al, 2002; MANNA AND MUKHOPADHYAY, 2011; WANG et al, 2010). Técnicas como microscopia, difração de raios-X, ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopias de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), Raman, de fluorescência e de dicroísmo circular, permitem acessar aspectos ligeiramente diferentes dos mecanismos de ação e, embora, uma técnica individualmente não forneça o mapa completo do problema, no conjunto, elas evidenciam que tanto a composição como a estrutura são fundamentais para a atividade e especificidade da ação biológica destes peptídeos.

Algumas características dos peptídeos antimicrobianos, tais como, o tamanho, a sequência, a carga, a conformação estrutural, a hidrofobicidade, a anfipaticidade e a amidação

do C terminal, estão diretamente relacionadas com a sua atividade e especificidade, e estas têm sido utilizadas para caracterizar a susceptibilidade de microrganismos simples a estes peptídeos (DOS SANTOS CABRERA et al, 2008 e DOS SANTOS CABRERA et al, 2009). A presença de estrutura anfipática é uma característica importante para a adsorção, inserção e a translocação destes peptídeos através da bicamada lipídica das membranas (HORI et al, 2001). A cationicidade dos peptídeos antimicrobianos contribui principalmente para a seletividade celular, devido ao fato das superfícies de membranas apresentarem diferentes composições lipídicas. As membranas bacterianas apresentam bicamadas lipídicas aniônicas, enquanto que as bicamadas de eritrócitos são zwitteriônicas. Alguns estudos mostram que peptídeos catiônicos com alta carga líquida são pouco seletivos. (DATHE et al, 2001; MATSUZAKI, 2009). A hidrofobicidade de um peptídeo é definida como a média de valores numéricos da hidrofobicidade por resíduo e é uma medida da habilidade de um peptídeo em mover-se de uma fase aquosa para uma fase hidrofóbica, correlacionando assim, indiretamente, seu grau de afinidade com as cadeias lipídicas (YEAMAN and YOUNT, 2003). Muitos estudos mostram que o aumento da hidrofobicidade está associado com o aumento da permeabilização de bicamadas zwitteriônicas e/ou aniônicas, ou seja, aumento nas atividades hemolítica e antimicrobiana (ZHAO et al, 2002; DOS SANTOS CABRERA et al, 2008).

Os mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos envolvem etapas como a atração, o ancoramento e a inserção na membrana. Presume-se que a primeira etapa seja comandada pela atração eletrostática entre o peptídeo e os grupos carregados e/ou polares das membranas. Deve-se destacar que muitos peptídeos são desestruturados ou em conformação estendida em solução aquosa. O processo de aproximação com membrana parece induzir uma conformação estruturada, altamente ordenada e quase sempre anfipática. A partir de um mínimo de concentração de moléculas de peptídeo sobre a superfície da membrana ocorre seu ancoramento adequado, com os aminoácidos carregados ou polares interagindo com os grupos carregados e/ou polares da membrana e os aminoácidos hidrofóbicos “enterrados” na membrana, ou seja, na sua fase hidrofóbica. (MATSUZAKI et al, 1997; DATHE et al, 2001). A permeabilização da membrana pode ocorrer através de três possíveis mecanismos (MÁTYUS et al, 2007): (1) *Poro-barril* (figura 1.1a), modelo no qual a face hidrofóbica do peptídeo anfipático interage com a região das caudas alquílicas dos fosfolipídios da membrana, e a face hidrofílica do peptídeo forma um poro aquoso. Neste modelo, as cabeças dos fosfolipídios da membrana permanecem localizadas na interface água-membrana. Uma

condição necessária deste mecanismo é que os peptídeos sejam suficientemente longos para que eles possam atravessar o núcleo hidrofóbico da membrana (YANG et al, 2001); (2) *Poro toroidal* (figura 1.1b), neste modelo o peptídeo se agrega à bicamada e interage com as cabeças dos fosfolipídios da membrana. Esta interação provoca uma curvatura na membrana que dá origem à cavidade chamada de poro toroidal (TOSSI et al, 2000); (3) Mecanismo de *Carpet*, modelo no qual as moléculas de peptídeo se acumulam paralelamente à superfície da membrana causando uma desarrumação em seu interior; a superfície hidrofílica dos peptídeos interage com as cabeças dos grupos fosfolipídicos da membrana e a região hidrofóbica dos peptídeos se orienta para o interior hidrofóbico da membrana. Este é um mecanismo que não necessita que o peptídeo apresente uma estrutura específica, assim como também não é necessário a formação de um canal transmembrânico estruturado (OREN and SHAI, 1998). A inserção do peptídeo na membrana pode ser acompanhada de uma série de eventos que contribuem para a desativação celular, tais como: despolarização da membrana, vazamento de metabólitos essenciais e perda de composições específicas, devido às perturbações nos fosfolipídios (MATSUZAKI et al, 1996).

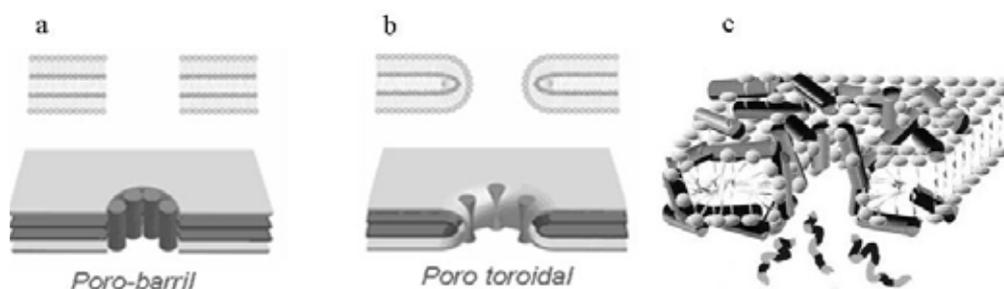


Figura 1.1. Representação dos mecanismos de ação com membranas dos peptídeos antimicrobianos.

A) mecanismo de poro-barril. B) mecanismo de poro toroidal. C) mecanismo de carpet.

(<http://www.ruf.rice.edu/~hwhuang/toroidalmodelvsbarrelstave.html>)

O domínio da compreensão molecular destes mecanismos abre perspectivas otimistas para a projeção e síntese dos futuros peptídeos antimicrobianos com aplicação farmacêutica.

1.1. PROTONECTINAS

MENDES et al, 2004, extraíram um par de peptídeos quimiotáticos do veneno da vespa social *Agelaia pallipes pallipes*. Depois de isolados e purificados eles foram

caracterizados quanto as suas sequências primárias, atividades biológicas e por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) (SAIDEMBERG et al, 2010). Os peptídeos são denominados Protonectina e Protonectina 1-6 e suas sequências primárias, carga líquida e hidrofobicidade média estão apresentadas na tabela 1.1.1.

Tabela 1.1.1. Sequência primária, Carga líquida <Q> e Hidrofobicidade média <H> da Protonectina e Protonectina 1-6.

	Sequência Primária	<Q>	<H>
Protonectina	Ile – Leu – Gly – Thr – Ile – Leu – Gly – Leu – Leu – Lys – Gly – Leu – NH ₂	+2	0,276
Protonectina 1-6	Ile – Leu – Gly – Thr – Ile – Leu – NH ₂	+1	0,417

*em azul resíduos carregados, em preto resíduos apolares e em verde resíduos polares.

Os resultados das análises estruturais e funcionais (SAIDEMBERG et al, 2010) sugerem que a Protonectina deve ser um peptídeo estruturado anfipático, enquanto que Protonectina (1-6) é muito pequeno para assumir estrutura secundária anfipática. Os dados exibidos na Tabela 1.1.2 mostram que Protonectina apresenta atividade hemolítica, degranuladora de mastócito e de liberação de LDH e atividade quimiotática. Enquanto que a Protonectina (1-6) apresenta atividade quimiotática elevada se comparada com a Protonectina e nenhuma atividade hemolítica, degranuladora de mastócito e de liberação de LDH. A mistura de ambos os peptídeos na proporção molar 1:1, resultou na potencialização de aproximadamente 87% da atividade hemolítica, 35% da atividade de degranulação de mastócitos e 60% de liberação de LDH (característica de interação com membranas), se comparada com a Protonectina isolada. Ao mesmo tempo, essa mistura causou uma diminuição significativa na atividade quimiotática, quando comparada com os resultados de cada peptídeo individualmente.

Dados experimentais também indicam que a forma agregada reduz pela metade a concentração inibitória mínima para a interação com bactérias do tipo *E.coli* e *B. subtilis* em relação à Protonectina pura, não havendo sinergia para o caso da *P.aeruginosa* e *S.aureus* (SAIDEMBERG et al, 2010).

Tabela 1.1.2. Propriedades biológicas da protonectina, protonectina 1-6 e associação de ambos os peptídeos na proporção estequiométrica 1:1 de acordo com Saidemberg N. B. B., 2007.

	Protonectina	Protonectina 1-6	Protonectina/Protonectina 1-6 (proporção 1:1)
Peso molecular	1209 Da	628 Da	-----
Atividade hemolítica	$ED_{50}=9,9.10^{-7}$ M	Não apresenta	$ED_{50}= 5,3.10^{-7}$ M
Degranulação de mastócito	$ED_{50}=4,6.10^{-6}$ M	Não apresenta	$ED_{50}= 3,4.10^{-7}$ M
LDH	~ 40%	Não apresenta	~ 100%
Quimiotaxia	8.10^4 células/mL	10.10^4 células/mL	5.10^4 células/mL

Do ponto de vista estrutural, ensaios por dicroísmo circular na presença de TFE 40% (v/v), indicam que cerca de 21,3 % dos resíduos da Protonectina participam de conformação em hélice- α direita e na mistura de ambos os peptídeos na proporção estequiométrica de 1:1, o percentual de resíduos em hélice- α direita sobe para cerca de 24,4 %. Além disso, alguns resultados experimentais sugerem que a interação entre os dois peptídeos é fator responsável pelos efeitos potencializadores e/ou inibidores obtidos. E ainda, levaram os pesquisadores (SAIDEMBERG et al, 2010) a conjecturar que quando associados entre si, estes peptídeos formariam uma estrutura supramolecular estável ao nível de estrutura secundária, a ponto de passar a apresentar fenômenos de interação com membranas das células animais, como por exemplo, hemólise e ruptura de membranas de mastócitos.

Em trabalho anterior Baldissera G., 2010 fez uso da simulação por Dinâmica Molecular associada ao método de Troca de Réplicas para buscar o espaço conformacional do peptídeo de Protonectina em misturas de TFE/água. No mesmo trabalho, simulação de equilíbrio de um par Protonectina com Protonectina 1-6 na presença da mistura TFE/água foi realizada. Observou-se que neste ambiente os peptídeos se aproximam formando um complexo que é mantido através de 1,3 ligações por hidrogênio (em média), que são formadas entre diferentes doadores e aceitadores intermitentemente.

OBJETIVOS. Considerando os resultados do trabalho de 2010, no presente trabalho, simulações adicionais foram realizadas com o objetivo de melhor compreender, do ponto de vista molecular, as interações entre os peptídeos de Protonectina e Protonectina com Protonectina 1-6. Com isso, pretende-se compreender as questões sobre a agregação entre os peptídeos, como ela ocorre e qual a influência do meio sobre ela.

1.2. JELEÍNAS

Um ponto relevante e ainda pouco esclarecido é a possível relação existente entre a estrutura e a função desempenhada pelos peptídeos e proteínas. Por isso, quatro peptídeos diferentes, identificados na geléia real também são objeto de estudo deste trabalho. Eles são denominados Jelleina I (JI), Jelleina II (JII), Jelleina III (JIII) e Jelleina IV (JIV) e de modo geral, eles se mostram ativos contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Das diferenças biológicas entre as quatro Jelleinas pode-se dizer que as JI, JII e JIII apresentam atividades antimicrobianas, sendo JI e JII mais ativas que JIII, enquanto JIV aparentemente não possui efeito antimicrobiológico (FONTANA et al, 2004). O modo como esses peptídeos atuam ainda não é bem compreendido, mas as diferenças entre suas sequências limitam-se a apenas a um resíduo e por isso devem esclarecer a variação de suas atividades biológicas (Tabela 1.2.1). As Jelleinas são peptídeos com características hidrofóbicas e com sequência primária sem similaridade com as outras classes de peptídeos antimicrobianos provenientes do veneno de abelhas *A. mellifera*. O conhecimento da comunidade científica sobre o significado biológico da existência de muitas sequências homólogas em uma única espécie é limitado, mas em alguns poucos casos, já se demonstrou a sinergia de atividades entre peptídeos correlacionados (HANEY et al, 2009; NISHIDA et al, 2007). Essa é também uma interessante área investigativa devido à possibilidade de se reduzir a concentração de peptídeos, de aumentar a eficiência, e reduzir as chances de toxicidade (HANEY et al, 2009). Além disso, novas formas de aplicação como a associação de agentes antibacterianos e superfícies de nano partículas vem sendo produzidos e têm a vantagem de combater eficientemente as formas de resistência ligadas à presença de biofilmes (BOLLA et al, 2011). Outro exemplo são as associações de antibióticos, lipopeptídeos policatiônicos e peptídeos antimicrobianos catiônicos sobre as quais há poucas referências em relação à base molecular dessas combinações, sinergia, razão de concentrações e parâmetros cinéticos (BOLLA et al, 2011).

Outra característica interessante destes peptídeos é a presença de um resíduo de Histidina (His) em suas sequências primárias. Tal fato vem sendo explorado como forma de otimização das atividades antimicrobianas e tumorílicas em outros peptídeos de cadeia mais longa. MASON et al, 2009 mostraram que peptídeos catiônicos anfipáticos, ricos em His, têm propriedades líticas e antibióticas aumentadas quando adotam um alinhamento paralelo à superfície da membrana. Usando a técnica de RMN com lipídeos deuterados na cadeia alquílica, mostraram também que tais peptídeos são capazes de causar rupturas pontuais na membrana, com formação de poros, enquanto o restante da membrana permanece intacto e

que esses efeitos são desencadeados em pH ácido quando os resíduos His estão carregados. MAKOVITZKI et al, 2009 também se valeram de resíduos His, protonáveis no meio ácido criado por tumores sólidos, em substituição a resíduos Lisina (Lys) para desencadear atividades líticas em peptídeos com ação anticâncer. Essa substituição também reduziu a toxicidade sistêmica dos peptídeos em relação ao peptídeo contendo Lys. Outro estudo (TU et al, 2009) revela que os resíduos de His desempenham um importante papel no controle das interações entre peptídeos antimicrobianos e a membrana celular. Peptídeos líticos que contém resíduos de His podem apresentar dependência entre a toxicidade e o pH do meio, tornando-se mais ativos em pHs ácidos, entretanto esta atividade foi observada nos peptídeos PTP-7c e LL-1c que possuem dois resíduos de Histidina cada.

Tabela 1.2.1. Sequência primária dos peptídeos em estudo, suas respectivas cargas líquidas (Q) em pH fisiológico e hidrofobicidade média (<H>), calculadas segundo a escala de Eisenberg et al., 1984.

	Sequência Primária	Q	<H>
Jelleina I	Pro-Phe-Lys-Ile-Ser-Ile-His-Leu-NH ₂	+2,5	0,096
Jelleina II	Thr-Pro-Phe-Lys-Ile-Ser-Ile-His-Leu-NH ₂	+2,5	0,066
Jelleina III	Glu-Pro-Phe-Lys-Ile-Ser-Ile-His-Leu-NH ₂	+1,5	0,017
Jelleina IV	Thr-Pro-Phe-Lys-Ile-Ser-Ile-His-NH ₂	+2,5	0,008

*em azul resíduos carregados positivamente, em vermelho resíduo com uma carga negativa (cadeia lateral) e uma carga positiva, em verde resíduo polar carregado positivamente e em preto resíduos apolares.

De simulações preliminares por dinâmica molecular e de uma revisão da literatura recente sobre as Jeleínas surgiram às questões abaixo, que são parte dos objetivos deste trabalho.

- I) Como as diferenças na sequência primária destes peptídeos influencia sua interação com miméticos de membrana?
- II) Como as pequenas cadeias de Jeleína I afetam as bicamadas lipídicas?
- III) Tendo um meio dependente do valor da carga líquida, a presença da Histidina pode influenciar o modo de ação dos peptídeos de Jeleína?

2. MÉTODOS TEÓRICOS

2.1 SIMULAÇÕES POR DINÂMICA MOLECULAR

Simulação por Dinâmica Molecular (DM) é uma técnica cuja utilização é muito comum no estudo de proteínas, biomoléculas e em ciências dos materiais. Esta técnica computacional fornece informações a nível molecular do sistema em estudo, como se fosse um microscópio virtual com resolução temporal.

Existem vários pacotes computacionais livres ou não que são utilizados para a realização das simulações por Dinâmica Molecular, alguns mais utilizados para Peptídeos e Proteínas em ambientes miméticos de membranas e ricos em Carbono, outros mais indicados para DNAs e RNAs. A escolha do pacote a ser utilizado é feita pelo usuário, considerando sua necessidade e disponibilidade financeira.

Em seu princípio básico, as simulações por Dinâmica Molecular consistem em considerar os átomos e moléculas do sistema estudado como se fossem esferas de van der Waals. Conhecendo as coordenadas das posições (\vec{x}_i) e dos momentos (\vec{p}_i) que especificam cada átomo, pode-se escrever a Hamiltoniana como sendo a soma das energias cinética e potencial do sistema:

$$H = \sum_{i=1}^N \frac{(\vec{p}_i)^2}{2m_i} + V\{\vec{x}_i\}, \quad (2.1.1)$$

Na equação acima, N é o número total de átomos que constituem o sistema e m_i é a massa de cada átomo.

A partir da equação 2.1.1 é possível obter as equações de movimento de Newton que, uma vez resolvidas, fornecem a evolução temporal de cada partícula do sistema:

$$\frac{\partial H}{\partial \vec{x}_i} = - \frac{\partial V\{\vec{x}_i\}}{\partial \vec{x}_i} = \vec{F}_i = m_i \frac{d\vec{v}_i}{dt} \quad (2.1.2)$$

$$\frac{\partial H}{\partial \vec{p}_i} = \frac{\vec{p}_i}{m_i} = \vec{v}_i = \frac{d\vec{x}_i}{dt} \quad (2.1.3)$$

Estas equações são resolvidas para pequenos intervalos de tempo. A partir da razão entre a força \vec{F}_i , que é a força sobre o átomo i no tempo t , e a massa do átomo i , tem-se a aceleração da partícula naquele instante. A razão entre o momento da partícula e sua massa, fornece sua velocidade e posteriormente sua posição. Dessa forma, a evolução temporal do sistema é analisada e as coordenadas de posição e velocidade das partículas são gravadas em intervalos de tempo regular. Estas coordenadas, em função do tempo, representam a trajetória do sistema, que posteriormente é analisada, fornecendo informações sobre as características de natureza estrutural e ou química.

A distinção entre os átomos que constituem o sistema em estudo, assim como a representação do princípio de exclusão de Pauli, e também as formas de interação, seja via ligações químicas ou por interações entre átomos não ligados, são representadas nas simulações por Dinâmica Molecular através de um conjunto de parâmetros denominados Campo de Forças.

Os programas de dinâmica molecular geralmente suportam vários tipos de campos de força que podem diferir entre si pelo fato de terem sido parametrizados para reproduzirem diferentes propriedades da molécula. No entanto, em todos os casos seus parâmetros são ajustados a partir de dados experimentais e de cálculos quânticos. Alguns exemplos de Campo de Forças são AMBER (PEARLMAN et al, 1995), o CHARMM (BROOKS et al, 1983), o GROMOS (VAN GUNSTEREN et al, 1987), o OPLS (KAMINSKI et al, 2001), entre outros.

As simulações apresentadas neste trabalho foram realizadas utilizando o pacote computacional GROMACS, e o campo de Forças do GROMOS96 (van Gunsteren et al., 1996) com os parâmetros 43A1, 45A3 ou 53A6, dependendo da situação estudada. Neste, a função de energia potencial é descrita por quatro termos de potenciais correspondentes às interações entre átomos quimicamente ligados e dois termos que representam as interações entre átomos não ligados, que são os átomos separados por três ou mais ligações químicas.

2.1.1 ENERGIA POTENCIAL

Como já discutido, para a determinação das equações de movimento é essencial conhecer a energia potencial total do sistema como função das posições dos átomos ou grupos de átomos que constituem o mesmo. A melhor maneira de se obter este resultado seria através da resolução quanto-mecânica que determina a energia de menor estado dos elétrons do

sistema, contudo, este método é muito custoso computacionalmente para sistemas que contenham um grande número de átomos. Por isso, são utilizadas funções potenciais clássicas para descrever a energia potencial total do sistema em estudo como a apresentada na equação abaixo:

$$V(\{\vec{x}_i\}) = \sum_{n=1}^{N_b} \frac{1}{4} K_{b_n} (b_n^2 - b_{0_n}^2)^2 + \sum_{n=1}^{N_\theta} \frac{1}{2} K_{\theta_n} (\cos \theta_n - \cos \theta_0)^2 + \sum_{n=1}^{N_\xi} \frac{1}{2} K_{\xi_n} (\xi_n - \xi_0)^2 + \sum_{n=1}^{N_\varphi} K_{\varphi_n} [1 + \cos(n_n \varphi_n - \delta_n)] + \sum_{i<j}^N \left(\frac{C_{12}(i, j)}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_6(i, j)}{r_{ij}^6} \right) + \sum_{i<j}^N f \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (2.1.1.1)$$

Na qual se tem N como sendo o número total de átomos do sistema, \vec{x}_i para $i = 1, 2, 3, \dots, N$ são os vetores correspondentes às posições dos átomos, N_b o número de ligações químicas, N_θ o número de átomos entre os pares de ligações consecutivas, N_ξ o número de ângulos diedrais impróprios e N_φ o número de ângulos diedrais próprios. $C_{12}(i, j)$ e $C_6(i, j)$ são constantes que dependem do tipo de átomo envolvido, q_i a carga parcial de cada átomo e r_{ij} a distância entre os átomos i e j .

Os dois primeiros termos da equação 2.1.1.1 representam os potenciais quarticos, que surgem devido à natureza vibracional das ligações covalentes, que permitem que o comprimento e o tamanho dos ângulos das ligações apresentem flutuações em torno de suas posições de equilíbrio.

O potencial de ligação entre dois átomos covalentemente ligados é descrito em termos do comprimento de equilíbrio da ligação covalente (b_0) e da constante de ligação (K_b) que é obtida através de estudos espectroscópicos

$$V_b = \frac{1}{4} K_b (b^2 - b_0^2)^2. \quad (2.1.1.2)$$

De maneira análoga pode-se representar o potencial angular, responsável por manter o ângulo entre três átomos covalentemente ligados

$$V_\theta = \frac{1}{2} K_\theta (\cos \theta - \cos \theta_0)^2, \quad (2.1.1.3)$$

Na qual, θ é o ângulo entre as ligações num certo instante, θ_0 é o ângulo de equilíbrio entre as ligações e K_θ é a constante de força da ligação, ou seja, a constante que determina o quão difícil é a distorção do ângulo.

O terceiro termo da equação 2.1.1.1 é o potencial torcional impróprio, que é necessário para manter representação da estrutura tridimensional do conjunto dos átomos centrados no átomo de carbono, garantindo assim a estrutura tetraédrica dos átomos de carbono com hibridação sp^3 . Isto é necessário porque somente os átomos de hidrogênio ligados a átomos eletronegativos (oxigênio, nitrogênio) são considerados explicitamente, os átomos de hidrogênio ligados a átomos de carbono são unidos a eles, ou seja, são considerados como um único átomo, essa simplificação é feita com o objetivo de diminuir o custo computacional.

$$V_\xi = \frac{1}{2} K_\xi (\xi - \xi_0)^2 \quad (2.1.1.4)$$

Na equação acima, ξ é o ângulo entre os planos definidos por i-j-k e j-k-l (figura 2.1.1.1), ξ_0 é o ângulo de equilíbrio e K_ξ é a constante elástica de restituição do ângulo de equilíbrio.

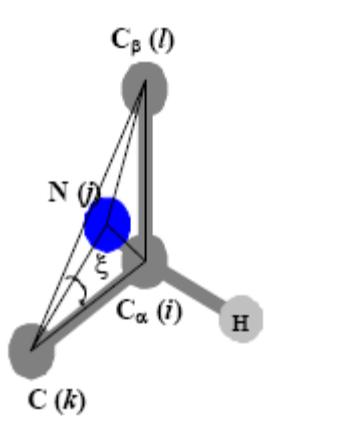


Figura 2.1.1.1. Estrutura tetraédrica do carbono α . Nela ξ é o ângulo entre i-j-k e j-k-l.

O quarto termo na equação 2.1.1.1 representa o potencial torcional próprio, que é uma maneira de considerar a rotação em torno da ligação covalente entre dois átomos. Os ângulos de torção podem ser utilizados para especificar a conformação estrutural da cadeia peptídica. Por exemplo, as principais modificações destes ângulos ocorrem em torno das ligações N – C α (Φ) e C α – C (Ψ) (figura 2.1.1.2). A periodicidade deste potencial é dada por uma função cosseno na qual n é o número de mínimos para a torção de uma ligação química, δ a diferença de fase, que pode adotar valores 0° ou 180° , φ é o ângulo diedral para a ligação central na

série dos quatro átomos e K_φ é a constante que define a barreira de torção (VAN GUNSTEREN et al, 1996)

$$V_\varphi = K_\varphi [1 + \cos(n\varphi - \delta)]. \quad (2.1.1.5)$$

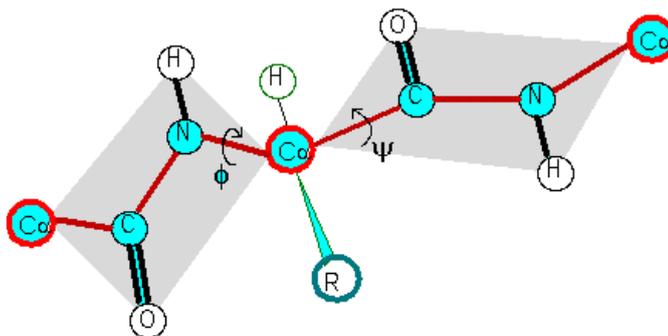


Figura 2.1.1.2. Rotação em torno da ligação covalente entre dois átomos.

O quinto e sexto termos apresentados na equação 2.1.1.1 representam os potenciais para as interações entre átomos não ligados, ou seja pares de átomos separados por três ou mais ligações químicas, mas que de alguma forma interagem com os demais átomos do sistema. Sendo o quinto termo um potencial tipo Lennard-Jones cuja parte atrativa total é computada através da soma das contribuições das interações dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, e de dispersão, que são formadas pelos deslocamentos oscilantes das nuvens eletrônicas. Esta interação varia com o inverso da sexta potência da distância de separação r e é escrita da seguinte maneira:

$$V = -\frac{C_6(i, j)}{r_{ij}^6}, \quad (2.1.1.6)$$

onde $C_6(i, j)$ é um coeficiente que depende da natureza dos átomos i e j e r_{ij} é a distância entre os átomos i e j . O termo repulsivo do potencial de Lennard Jones torna-se importante e passa a dominar as forças quando a distancia entre um par de átomos é da ordem de $r_i + r_j$, onde r_i e r_j são os raios da esfera de Van der Waals correspondentes aos átomos i e j respectivamente. O termo repulsivo é introduzido para impedir a interpenetração das nuvens eletrônicas, respeitando o princípio de exclusão de Pauli, que proíbe que pares de elétrons com os mesmos números quânticos ocupem a mesma região no espaço. A descrição completa da repulsão devido à interpenetração das nuvens eletrônicas requer um tratamento quântico. A

forma usualmente utilizada para representar esse efeito nas interações é pela introdução de um termo empírico de potencial do tipo:

$$V = \frac{C_n(i, j)}{r_{i,j}^n}. \quad (2.1.1.7)$$

Tipicamente, n é fixado em 12, de modo que para distancias pequenas de separação, o termo de repulsão domina o termo de atração, pois $\frac{1}{r^{12}} \gg \frac{1}{r^6}$.

A soma dos termos de interação atrativa e repulsiva é denominada potencial de Lennard Jones, e as constantes C dependem da natureza dos átomos envolvidos e estão associados à profundidade do poço e à distância de separação entre os átomos i e j para a qual o potencial torna-se nulo.

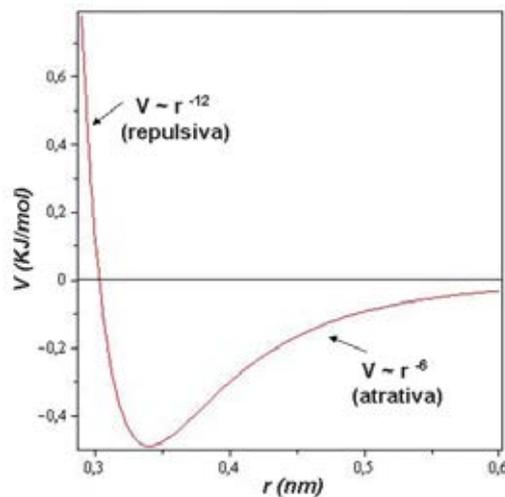


Figura 2.1.1.3. Representação do Potencial de Lennard Jones para o Carbono.

O último termo da equação 2.1.1.1 representa as interações eletrostáticas entre os átomos não ligados. O potencial de Coulomb é um potencial de longo alcance, proporcional ao inverso da distância, que surge devido à distribuição eletrônica dos átomos e é descrito por

$$V = \sum_i \sum_{j>i} f \frac{q_i q_j}{r_{i,j}}. \quad (2.1.1.8)$$

Na expressão acima q_i e q_j são as cargas parciais, que representam a distribuição eletrônica dos átomos i e j , r é a distancia de separação entre eles e f é a relação $\frac{1}{4\pi\epsilon_m}$, na qual ϵ_m é a

permissividade do meio no qual se encontram as cargas. Esta permissividade normalmente é escrita como múltiplo da permissividade do vácuo, ϵ_0 , que é igual a $8.854 \cdot 10^{-12} \text{ J}^{-1} \text{ C}^2 \text{ m}^{-1}$ (SI). Dessa forma $\epsilon_m = \epsilon_r \epsilon_0$, onde ϵ_r é a permissividade relativa ou constante dielétrica. O efeito do meio pode ser muito grande: para a água $\epsilon_r = 78$, assim a energia potencial entre duas cargas separadas pelo volume de água é reduzida em quase duas ordens de grandeza comparada ao valor que teria se as cargas estivessem no vácuo.

2.1.2 CONDIÇÕES PERIÓDICAS

Considerando que uma simulação eficaz deve incorporar todas as características do sistema de interesse e que o objetivo de realizar uma simulação é entender o comportamento de sistemas reais, os quais possuem da ordem de $10^{23} - 10^{25}$ partículas, e que nestes sistemas o efeito da interação das partículas com as paredes do recipiente é desprezível, utiliza-se o que é conhecido como “Condições Periódicas (CP)”, que consiste basicamente em replicar várias vezes o sistema em estudo de forma que não haja espaços não preenchidos entre as junções, ou seja, a caixa original é transladada nas três direções espaciais, formando uma rede, por simplicidade mostrada no plano (figura 2.1.2.1).

Com a utilização desta técnica quando um átomo se move na caixa original suas réplicas se movem igualmente nas caixas imagens, durante o processo de simulação, dessa forma, se um átomo (i) sai da caixa original, uma de suas imagens (i') entram pela face oposta, mantendo assim constante o número de átomos na caixa original.

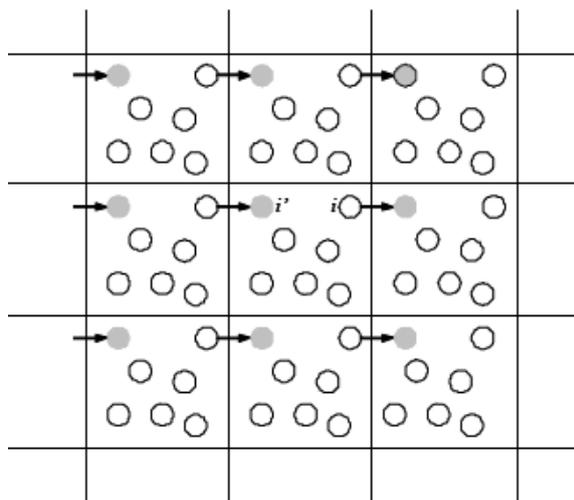


FIGURA 2.1.2.1. Esquema Bidimensional das Condições Periódicas de Contorno.

2.1.3 RAIOS DE CORTE

A utilização das condições periódicas de contorno e o cálculo da energia de interação eletrostática torna necessário o uso de outra técnica chamada de raio de corte, pois, as CPC aumentam significativamente o número de átomos que constituem o sistema em estudo, conseqüentemente, há um aumento no custo computacional para o cálculo das interações para os átomos não ligados do sistema, devido ao grande número de termos que haveria para que este cálculo fosse feito. Para diminuir este custo, usualmente, define-se uma região na qual, essas interações são calculadas diretamente. Essa região é delimitada por uma esfera de raio r_c , denominado **raio de corte**, que em geral é utilizado no cálculo das interações Coulombianas e de Van der Waals. De acordo com ALLEN and TILDESLEY (1987), o raio de corte é definido por: $r_c \leq L/2$, na qual L é o menor comprimento lateral da caixa, assim evita-se a interação do soluto (proteína, peptídeo, carboidrato) com as suas próprias imagens.

2.1.3. TRATAMENTO ELETROSTÁTICO

Como já ressaltado, a utilização das CPC aumenta significativamente o número de átomos do sistema em estudo e conseqüentemente o custo computacional relacionado ao cálculo das interações entre estes átomos. Uma maneira de se corrigir isso é a utilização do raio de corte. Assim, os cálculos diretos das energias eletrostáticas (equação 2.1.1.8) e das interações de van der Waals são realizados apenas para o conjunto de átomos que se encontram dentro da esfera determinada a partir do raio de corte. Para a região externa a esta esfera, as interações de van der Waals não são consideradas e as interações eletrostáticas recebem um tratamento eletrostático diferenciado que pode ser do tipo PME (DARDEN et al, 1993 e Essmann U. et. al, 1995), que é a correção utilizada neste trabalho, Reaction Field (TIRONI et al, 1995), Cutoff (PÁLL; HESS, 2013), entre outros.

PME (Particle Mesh Ewald) é um método proposto para permitir o cálculo da interação eletrostática de uma carga com todas as partículas carregadas que se encontram fora do raio de corte, inclusive suas imagens. Em resumo, o método, ao invés de somar o potencial de Coulomb entre a carga que se encontra no centro da esfera de raio de corte (r_c) com todas as outras partículas carregadas que se encontram fora desta esfera de corte, no espaço real, o faz no espaço dos momentos, fazendo uso de uma transformada de Fourier. O resultado encontrado é retransformado para o espaço real.

2.1.5 MINIMIZAÇÃO DE ENERGIA

O primeiro passo para a realização de uma simulação por Dinâmica Molecular é a montagem da caixa de simulação. Para o caso de simulações de peptídeos em água ou miméticos de membrana, é necessário, como já observado, um arquivo de entrada que contenha as posições atômicas do (s) peptídeo (s). A caixa é montada com os componentes de interesse e para se ajustar as posições atômicas, relaxando os conflitos estéricos nos ângulos, entre as ligações químicas e nos contatos de van der Waals, utiliza-se o processo de minimização de energia.

A função de energia potencial total de um sistema molecular (equação 2.1.1.1) é muito complexa. Ela possui um ponto de mínimo global e vários pontos de mínimos locais, nos quais todas as derivadas da função de energia potencial são zero e todas as segundas derivadas são positivas. Devido ao elevado número de graus de liberdade das macromoléculas biológicas, uma exploração completa da superfície multidimensional de energia é praticamente impossível. Uma maneira de explorar esta superfície se dá pelo método de minimização da energia potencial deste sistema, que consiste basicamente em caminhar pela superfície em estudo na direção em que a energia decresce, de maneira que o sistema é levado para um ponto de mínimo local. Este processo é realizado utilizando-se algoritmos de otimização clássicos (tal como o Steepest Descent e o Gradiente Conjugado) que, simplesmente, consistem na comparação do valor da função de energia potencial em dois vetores posição consecutivos. O vetor posição para o passo seguinte é dado por:

$$\vec{x}_{t+1} = \vec{x}_t + \Delta \vec{x}_t. \quad (2.1.5.1)$$

Na qual, t é o passo em análise e $\Delta \vec{x}_t$ é, inicialmente, uma perturbação aleatória nas coordenadas que estão sendo otimizadas. Há varias maneiras de se determinar o incremento $\Delta \vec{x}_t$, uma delas é o emprego da primeira derivada da função de energia potencial. Outra maneira, mais sofisticada, emprega também a segunda derivada da função de energia potencial, que melhora bastante a taxa de convergência.

2.1.6 RESTRIÇÃO DE POSIÇÃO

Após a minimização de energia é realizado um procedimento chamado de “Restrição de Posição”, neste, as moléculas de soluto que constituem o sistema têm suas posições fixas

através da aplicação de constantes de forças muito altas sobre cada um de seus átomos. Tal procedimento é utilizado para relaxação do solvente, evitando conflitos estéricos entre solvente e soluto e melhorando a distribuição orientacional do solvente.

2.1.7 DINÂMICA MOLECULAR

Finalmente a Dinâmica pode ser realizada, no entanto para que tenha a evolução temporal do sistema em estudo é necessário realizar a integração das equações de movimento representadas inicialmente pela Hamiltoniana do sistema. Para isso uma simples técnica numérica é utilizada, o método de “Summed Verlet” ou “Leap Frog” (VERLET, 1967), que é um método de baixa ordem e possui excelentes propriedades de conservação de energia (em sua forma, o método gera coordenadas que são precisas até a terceira ordem em Δt), e quando potenciais do tipo de Lennard Jones estão envolvidos, tende a ser considerado melhor que outros métodos de ordem superior.

Assim, como em outros métodos de integração numérica, no algoritmo de “Summed Verlet” as equações de movimento de Newton para cada átomo em cada passo de integração são resolvidas. O processo que mais consome tempo computacional é o cálculo das forças para a obtenção das acelerações, este tempo depende de quão complexa é a função para a energia potencial.

A fórmula de Verlet é obtida a partir da expansão de Taylor da coordenada variável, em torno de $\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right)$ e $\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right)$,

$$\vec{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \vec{v}_i(t) + \frac{d\vec{v}_i(t)}{dt}\left(\frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{d^2\vec{v}_i(t)}{dt^2}\left(\frac{\Delta t}{2}\right)^2 \frac{1}{2!} . \quad (2.1.7.1)$$

Fazendo a expansão de $\vec{v}_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right)$ e subtraindo-a da equação 2.1.7.1, tem-se:

$$\vec{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \vec{v}_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{d\vec{v}_i(t)}{dt} \Delta t . \quad (2.1.7.2)$$

Sabe-se que $\frac{d\vec{v}_i(t)}{dt} = \frac{\vec{F}_i(\vec{x}_i)}{m_i}$, e fazendo a devida substituição na equação 2.1.7.2:

$$\vec{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \vec{v}_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{\vec{F}_i(\vec{x}_i)}{m_i} \Delta t. \quad (2.1.7.3)$$

Fazendo a expansão de $\vec{x}_i(t + \Delta t)$

$$\vec{x}_i(t + \Delta t) = \vec{x}_i(t) + \frac{d\vec{x}_i(t)}{dt} \Delta t + \frac{d^2\vec{x}_i(t)}{dt^2} \frac{(\Delta t)^2}{2!}. \quad (2.1.7.4)$$

E substituindo a equação 2.1.7.1 na equação 2.1.7.4 e desconsiderando os termos de ordem superior, tem-se:

$$\vec{x}_i(t + \Delta t) = \vec{x}_i(t) + \vec{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) \Delta t. \quad (2.1.7.8)$$

As equações 2.1.7.3 e 2.1.7.8 são calculadas de forma iterativa. No entanto, as velocidades e as posições não podem ser calculadas ao mesmo tempo, como consequência, as energias cinética e potencial não podem ser calculadas no mesmo instante. Esse problema pode ser contornado calculando-se a velocidade no instante t como a média das velocidades nos instantes $\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right)$ e $\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right)$.

2.2 MÉTODO DE TROCA DE RÉPLICAS

Dinâmica molecular com troca de réplicas (SUGITA et al, 1999; RHEE et al, 2003) é um método usado para varrer o espaço conformacional de forma mais ampla, especialmente se as possíveis conformações do sistema estiverem separadas por barreiras de energia, pois o método evita que o sistema fique preso em mínimos locais.

Neste método, M copias (réplicas) do sistema, que não interagem entre si, são simuladas de forma mais ou menos independente usando Dinâmica Molecular ou Monte Carlo, em diferentes temperaturas. Numa dada frequência durante a simulação, trocas entre os pares de réplicas são realizadas obedecendo a uma probabilidade de transição específica. Considere dois sistemas vizinhos i e j , com temperaturas T_i e T_j respectivamente, este método permite que estes sistemas mudem de configuração de tal maneira que o sistema i muda para a temperatura T_j , e o sistema j para a temperatura T_i , de acordo com a probabilidade de transição:

$$P(i \leftrightarrow j) = \min \left(1, \exp \left[\left(\frac{1}{K_B T_i} - \frac{1}{K_B T_j} \right) (U_i - U_j) \right] \right), \quad (2.2.1)$$

onde U_i e U_j são as energias potenciais instantâneas das réplicas i e j antes da troca. São testadas apenas as trocas de réplicas entre temperaturas vizinhas devido ao fato da razão de aceitação diminuir exponencialmente com a diferença entre as duas temperaturas (T) (SUGITA et al, 1999).

Após a troca, as velocidades dos átomos do sistema são recalculadas a partir do reescalonamento de seus momentos:

$$p_j = \sqrt{\frac{T_i}{T_j}} p_i \quad (2.2.2)$$

$$p_i = \sqrt{\frac{T_j}{T_i}} p_j \quad (2.2.3)$$

A tentativa de troca com todos pares possíveis em um passo não é permitida. Se, por um instante, as réplicas 1 e 2 trocarem, a chance de troca para as réplicas 2 e 3 não depende apenas das energias delas, mas também da energia da réplica 1. No GROMACS isto é resolvido tentando permutar todos os pares ‘ímpares’ em tentativas ‘ímpares’ e todos os pares ‘pares’ em tentativas ‘pares’. Se tivermos quatro réplicas: 0, 1, 2 e 3, ordenados por temperatura e tentarmos trocas a cada 3000 passos de dinâmica molecular (caso deste trabalho), os pares 0-1 e 2-3 serão examinados a cada 3000, 9000, etc. e o par 1-2 a cada 6000, 12000, etc.

2.3 SIMULAÇÕES DESTES TRABALHOS

Neste trabalho foram realizadas simulações dos peptídeos de Protonectinas e Jeleínas em diferentes ambientes, entre eles, água, micelas SDS e/ou bicamada lipídica.

As simulações em água, apresentadas no Capítulo 3 são realizadas como um passo preliminar para as simulações em ambientes miméticos de membrana, com o intuito de investigar a formação de agregados entre os peptídeos e obter uma estrutura que pode ser utilizada como ponto de partida para as outras simulações.

As conformações obtidas para os peptídeos em água foram utilizadas para se montar as caixas de simulação destes na presença da micela de SDS. Para estas simulações (Capítulo

4), caixas cúbicas com aproximadamente 7nm de aresta contendo uma micela de SDS previamente formada (VALDER, 2010), os pares de peptídeos, água e contra íons foram montadas. A vantagem de se usar a micela de SDS como mimético de membrana consiste no fato de se trabalhar com sistemas razoavelmente pequenos, que por sua vez devem ser menos custosos computacionalmente. No entanto, são comuns questões sobre como a micela se assemelha ao meio de uma bicamada lipídica e como o estudo de peptídeos no ambiente micelar é relevante para a compreensão das atividades biológicas. Apesar de as micelas apresentarem um alto grau de curvatura, consistirem de curtas e simples cadeias e deformarem-se com maior facilidade, uma propriedade essencial da micela é que ela fornece um núcleo hidrofóbico e uma casca esférica hidrofílica que pode ter semelhança química com lipídios comuns.

A bicamada lipídica utilizada neste trabalho foi obtida através do processo de auto arranjo, no qual uma caixa cúbica com aproximadamente 10 nm de aresta foi montada, contendo 90 moléculas de POPC, 38 de POPG, 38 íons Na e aproximadamente 4500 moléculas de água, todas colocadas aleatoriamente na caixa. Os arquivos de topologia para os lipídios foram obtidos no site do grupo do Tieleman (<http://www.ucalgary.ca/tieleman/>). O sistema foi equilibrado de acordo com o tutorial disponibilizado por **Justin Lemkul** em (www.bevanlab.biochem.vt.edu/Pages/Personal/justin/gmx-tutorials/membrane_protein/index.html). Após 250ns, observou-se que o sistema apresentava-se em condições de equilíbrio e, por segurança, a simulação foi estendida por mais 50ns.

As simulações dos peptídeos na presença da bicamada foram realizadas utilizando-se esta membrana. Nestes sistemas, verificou-se apenas a influencia do pH do meio, da concentração de peptídeos.

2.4. CONDIÇÕES DE SIMULAÇÃO

Neste trabalho, foram realizadas simulações por Dinâmica Molecular de peptídeos de Protonectinas e Jeleínas na presença de água, micelas de SDS e bicamadas lipídicas. Em todos os casos, o modelo utilizado para representar as moléculas de água foi o “Simple Point Charge (SPC)” (BERENDSEN, 1981), que é um modelo muito simples no qual a molécula de água é representada por três centros pontuais de carga concentrada com predominância de carga positiva sobre os átomos de hidrogênio e de carga negativa sobre os átomos de oxigênio. Todas as simulações foram realizadas no ensemble (N, P, T), no qual o número de

partículas, pressão e temperatura foram mantidos constantes, o primeiro através das condições periódicas de contorno e os dois últimos utilizando-se das técnicas de acoplamento de Berendsen (BERENDSEN et al, 1984). Os algoritmos LINCS (HESS et al, 1997) e SETTLE (MIYAMOTO et al, 1992) foram usados para restringir os comprimentos das ligações químicas existentes nos sistemas e a geometria apropriada da molécula de água, respectivamente.

Para diminuir o custo computacional envolvido no cálculo das interações entre os átomos que constituem o sistema de interesse, utilizou-se a representação de átomo unido. Nesta, apenas os átomos de hidrogênio ligados a átomos eletronegativos, tal como o nitrogênio ou oxigênio são considerados explicitamente. Os demais são tratados como unidos aos átomos não polares. É importante ressaltar que, os hidrogênios unidos aos átomos não polares não são desconsiderados do sistema, pois sua massa é acrescida no átomo não polar ao qual este está unido. Por exemplo, um grupo CH_2 é representado por uma única esfera de van der Waals, cuja massa é igual à soma de seus componentes e seu raio é otimizado para considerar todo o volume que deveria ser ocupado pelo grupo.

Em todas as simulações realizadas neste trabalho o N-terminal dos peptídeos em estudo foi tratado como um grupo carregado positivamente (NH_3^+) e o C-terminal foi amidado. O campo de forças utilizado nos cálculos de DM é o GROMOS 96 (VAN GUNSTEREN et al, 1996) com parâmetros 43A1 para as simulações em água, o 45A3 (SCHULER et al, 2001; SOARES et al, 2004) modificado por SAMMALKORPI et al, 2007 para as moléculas de SDS e sem modificações para os peptídeos e o 53A6 com modificações propostas por BERGER et al, 1997 para a bicamada lipídica de POPC e POPG sem alterações para os peptídeos. A restrição de posição foi realizada para 1ns de simulação. O passo de integração para as equações de movimento foi de 2 fs. Condições periódicas de contorno foram impostas nas simulações com um raio de corte de 1,4 nm e a lista de vizinhos foi atualizada a cada 5 passos de simulação.

2.5. ANÁLISES

Para se obter as informações desejadas das simulações por Dinâmica Molecular é necessário realizar a análise dos sistemas simulados. São várias as opções de análise oferecidas pelo pacote utilizado, no entanto, precisa-se avaliar quais as questões a serem respondidas e a partir delas buscar as melhores condições para respondê-las.

No presente trabalho, foram realizadas simulações na presença de várias moléculas de peptídeos, às vezes idênticas e outras vezes distintas. Tais simulações tinham como objetivo identificar as possíveis interações entre moléculas nos diferentes meios (no caso, água, SDS ou bicamada lipídica). Para tal verificação, a primeira análise a ser realizada é a medida da distância entre o centro de massa dos peptídeos envolvidos que fornece dados que indicam se há a aproximação destes durante as simulações. A função utilizado para tal análise é o `g_dist`. A análise da distância também é utilizada para identificar se há a interação entre os peptídeos e a micela de SDS, para isso a distância entre o centro de massa destes grupos é calculada. Para saber se os peptídeos estão inseridos na micela, analisa-se em conjunto com a distância o raio de giro da micela, que é uma medida da distância média entre o centro de massa da micela e os átomos de enxofre que constituem sua cabeça polar e pode ser obtida utilizando-se a função `g_gyrate`. Na situação em que se tem a bicamada lipídica, utiliza-se a o perfil de densidade média da caixa para se obter as informações sobre a posição dos peptídeos em relação às cabeças polares dos lipídeos. Nesta análise, computa-se a densidade de massa através de um eixo escolhido da caixa com a função `g_density`.

A informação sobre as distâncias indica a proximidade ou não entre os peptídeos ou entre os peptídeos e os miméticos de membrana, por isso, para avaliar as interações entre estes são necessárias outras análises, tal como as interações via ligações por hidrogênio ou pontes salinas. As ligações por hidrogênio são calculadas pelo pacote, utilizando-se a função `g_hbond` que obedece dois critérios. O primeiro é que a distância entre o átomo doador e o aceitador seja menor ou igual a 0,35nm e o segundo é que o ângulo formado entre eles seja menor ou igual a 30°. Para as pontes salinas, a função utilizado é o `g_saltbr`, que depende apenas da distância entre um grupo carregado positivamente e um grupo carregado negativamente, que deve ser menor ou igual a 0,3nm. Outra forma de identificar as interações entre dois grupos do sistema é através do cálculo das energias de Lennard Jones e Coulomb (`g_energy`), as quais representam as interações de van der Waals e eletrostáticas, respectivamente. Nas simulações das bicamadas lipídicas pode-se utilizar o cálculo do parâmetro de ordem para investigar se a presença dos peptídeos perturba de alguma maneira, a ordem dos carbonos que constituem as cadeias acílicas dos lipídeos, para isso, utiliza-se a função `g_order`. Ainda para as bicamadas lipídicas, pode-se calcular a área ocupada por cada fosfolipídio, que para bicamadas compostas por um único tipo de lipídio e sem a presença dos peptídeos pode ser obtida simplesmente pelo cálculo das dimensões do plano perpendicular ao eixo da bicamada e dividindo estas dimensões pelo número de fosfolipídios encontrados na

monocamada. Para o caso das simulações apresentadas neste trabalho, cuja bicamada lipídica é formada por POPC e POPG, na proporção de 70:30 em volume, e peptídeos foram simulados na presença desta, utilizou-se o método proposto por HOFSSASS et al, 2003, que considera as equações 2.4.1 e 2.4.2 para o cálculo desta área.

$$A_{POPC} = \frac{2A_{cx}}{V_{cx}-V_{H_2O}} \left(\frac{V_{cx}-V_{H_2O}-V_{POPG}-V_{pep}}{N^{\circ} \text{ de moléculas de POPC}} \right) \quad 2.4.1$$

$$A_{POPG} = \frac{2A_{cx}}{V_{cx}-V_{H_2O}} \left(\frac{V_{cx}-V_{H_2O}-V_{POPC}-V_{pep}}{N^{\circ} \text{ de moléculas de POPG}} \right) \quad 2.4.2$$

Nas equações acima, A_{cx} significa a área do plano da caixa perpendicular ao eixo da membrana e pode ser obtida facilmente através das dimensões dos eixos calculadas utilizando-se a função `g_energy` no pacote. O mesmo ocorre para V_{cx} que é o volume da caixa. V_{H_2O} é o volume que a água ocupa na caixa de simulação e pode ser obtido pela simples multiplicação do número de moléculas de água que constituem o sistema pelo fator $0,0312\text{nm}^3$ que é o volume ocupado por uma molécula de água do tipo SPC. O V_{pep} (volume dos peptídeos) é obtido através das simulações dos peptídeos em água, assim como os volumes do POPC (V_{POPC}) ou POPG (V_{POPG}) que são obtidos através da simulação da bicamada livre de peptídeos.

Além das análises que nos permitem verificar se há e como se manifestam as interações entre os peptídeos e entre os peptídeos e os miméticos de membrana, também é possível acompanhar o padrão estrutural dos peptídeos nos diferentes meios. O perfil de estrutura secundária de cada resíduo de aminoácido do peptídeo em função do tempo de simulação pode ser obtido pela função `do_dssp` que é uma interface do GROMACS. Nesta interface, as diferentes estruturas secundárias que podem ser adotadas pelos peptídeos são caracterizadas a partir de distâncias, ângulos, e ligações por hidrogênio formadas entre os átomos envolvidos, para maiores informações, consulte KABSCH and SANDER, 1983.

Outra análise realizada neste trabalho é o cálculo da barreira de energia livre para a passagem de água através da bicamada lipídica. Para o cálculo desta, é utilizada a equação 2.4.3, na qual ΔF representa o valor da energia livre, k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, que neste caso é 300K e ρ é a densidade de moléculas de água através do eixo da membrana normalizada, pois ao normalizar esta densidade, obtém-se uma densidade de estados com valores entre 0 e 1, onde 0 representa que não há probabilidade de se encontrar água na região observada e 1 é o máximo desta probabilidade. O mesmo procedimento foi utilizado por APPELT et al, 2005.

$$\Delta F = -kT \ln(\rho) \quad 2.4.3$$

As simulações utilizando o método de troca de réplicas são eficientes para varrer o espaço conformacional do sistema em estudo, e a partir destas pode-se obter a superfície de energia livre do sistema em função de duas coordenadas de reação. Vários métodos têm sido utilizados para calcular as mudanças na energia livre entre moléculas que interagem entre si e investigar as estabilidades relativas de diferentes estados conformacionais de moléculas. Tais cálculos são especialmente importantes para o entendimento entre as relações estrutura-função nas interações biomoleculares, promovendo a base para a modelagem de novas drogas (KUMAR , 1992). O método dos histogramas consiste em determinar a densidade de estados a partir de vários histogramas, coletados em diferentes temperaturas. O programa que implementa o método de análise dos histogramas ponderados (Kumar, et al. 1995) em uma e duas dimensões é o WHAM. Ele é um código livre e aberto e pode ser encontrado em (<http://dasher.wustl.edu/alan/>). As idéias básicas do método estão descritas abaixo.

A probabilidade $P(E)$ de gerarmos um estado com energia E é dada por:

$$P(E) = \frac{\Omega(E)e^{-\beta E}}{Z}, \quad Z = \sum_E \Omega(E)e^{-\beta E} \quad 2.4.4$$

onde $\Omega(E)$ é a densidade de estados com energia E , que é a grandeza a ser determinada. Uma estimativa para a probabilidade $P(E)$ pode ser obtida através dos dados de uma simulação na qual se armazena o histograma de energias $N(E)$ num total de n medidas da energia E . Assim,

$$P(E) = \frac{N(E)}{n} \quad 2.4.5$$

Considere R simulações feitas em diferentes temperaturas. A simulação i é realizada na temperatura $T_i = 1/\beta_i$. Uma estimativa da densidade de estados, oriunda da simulação i é

$$\Omega_i(E) = \frac{N_i(E)}{n_i} \frac{Z_i}{e^{-\beta_i E}} \quad 2.4.6$$

Um cálculo preciso da densidade de estados, que independesse da temperatura, poderia ser obtido, se fosse possível realizar número extremamente grande de simulações, feitas na temperatura T_i , mas que varresse todo o domínio de energias relevantes do sistema. Tomando a média dos histogramas nas diferentes simulações seria possível obter

$$\Omega(E) = \frac{\overline{N_i(E)}}{n_i} \frac{Z_i}{e^{-\beta E}} \quad 2.4.7$$

Obviamente, esse número de simulações é proibitivo, o que torna $\overline{N_i(E)}$ uma grandeza desconhecida. Então, a estratégia a seguir consiste em realizar um número R , relativamente modesto, de simulações em diferentes temperaturas, que cubram o domínio de energias relevantes para a descrição do sistema. Agora o objetivo é calcular uma média ponderada das R estimativas da densidade de estados, obtidas por (2.4.6). Ou seja, obter os pesos w_i , que permitam calcular a média ponderada abaixo:

$$\Omega(E) = \frac{\sum_{i=1}^R w_i \Omega_i(E)}{\sum_{j=1}^R w_j} \quad 2.4.8$$

Vamos assumir que o erro $\Delta N_i(E)$ relativo ao histograma i seja proporcional a $\sqrt{\overline{N_i(E)}}$, ou seja, que os histogramas sigam, aproximadamente, a distribuição de Poisson, ou mesmo, aproximadamente, que os histogramas sejam gaussianas. Nesse último caso, pode-se mostrar que a média ponderada (com pesos w_i) de uma grandeza, tem sua variância σ_i^2 minimizada se $w_i = 1/\sigma_i^2$. Portanto, os erros relacionados com a densidade de estados $\Omega_i(E)$, devido aos erros $\Delta N_i(E)$ dos histogramas é

$$\sigma_i = \frac{\Delta N_i(E)}{n_i} \frac{Z_i}{e^{-\beta E}} = \frac{\sqrt{\overline{N_i(E)}}}{n_i} \frac{Z_i}{e^{-\beta E}} \quad 2.4.9$$

Agora é possível fazer a média ponderada (2.4.8). Usando $w_i = 1/\sigma_i^2$ e as expressões (2.4.9) e (2.4.6), chegando-se à expressão

$$\Omega(E) = \frac{\sum_i \overline{N_i(E)} [N_i(E)/n_i] [Z_i / e^{-\beta E}]}{\sum_j \overline{N_j(E)}} = \frac{\sum_i N_i(E)}{\sum_j n_j Z_j^{-1} e^{-\beta E}} \quad 2.4.10$$

onde foi usada a expressão (2.4.7) para substituir a grandeza desconhecida $\overline{N_i(E)}$. Deve-se notar que a expressão (2.4.10) ainda não é útil, pois as funções de partição Z_j são desconhecidas. Porém, a função de partição é dada por

$$Z_k = \sum_E \Omega(E) e^{-\beta_k E} \quad 2.4.11$$

Agora, as equações (2.4.10) e (2.4.11) são iteradas de forma autoconsistente. . Ou seja, parte-se de valores arbitrários para as funções de partição Z_k , que, usadas na expressão (2.4.10) permitem obter $\Omega(E)$. Este, por sua vez, inserido em (2.4.11) leva a novos valores para Z_k , e assim sucessivamente até que os valores das funções de partição Z_k , não variem significativamente.

RESULTADOS

3. SIMULAÇÕES EM ÁGUA

Neste trabalho, as simulações em água, constituem um passo preliminar para as simulações em sistemas que mimetizam o ambiente de membrana, tais como, a micela de SDS ou bicamadas lipídicas. Assim, 2 ou 4 peptídeos, em estrutura em alfa hélice ideal, inicialmente separados por aproximadamente 3nm, são colocados na caixa de simulação e solvatados com moléculas de água e contraíons em quantidade suficiente para neutralizar a caixa, o sistema é então submetido à simulação por Dinâmica Molecular. Essas simulações são utilizadas para estudar as configurações dos peptídeos em ambientes hidrofílicos e identificar a possível formação de agregados entre eles. Estas configurações em água serão utilizadas como pontos de partida nas simulações em micelas (Capítulo 4) e bicamadas lipídicas (Capítulo 5).

As simulações em água serão divididas em quatro seções, tal como mostrado na tabela abaixo.

Tabela 3.1: Simulações que serão apresentadas ao Capítulo 3

Seção 3.1	Peptídeos de Protonectina e Protonectina/Protonectina 1-6
Seção 3.2	Peptídeos de Jeleína I mimetizando o pH 5.5 e 7.0
Seção 3.3	Pares de Peptídeos de Jeleína I, II, III e IV, respectivamente.

3.1. PEPTÍDEOS DE PROTONECTINA E PROTONECTINA/PROTONECTINA 1-6

Nesta seção são apresentadas duas simulações em água: a primeira contendo uma molécula de Protonectina e uma de Protonectina 1-6 que representará a mistura destes dois peptídeos. A segunda simulação contendo duas moléculas de Protonectina que representará os peptídeos puros. Para ambas as simulações foi montada uma caixa cúbica de aproximadamente 5.5 nm de aresta, contendo os peptídeos de interesse, água e contra íons em quantidade suficiente para garantir a neutralidade da caixa. A conformação inicial utilizada para os peptídeos de Protonectina foi uma α -hélice ideal obtida utilizando-se o programa RIBOSOME V 1.0 (R. Srinivasan, RIBOSOME – Program to build coordinates for peptides from sequence, Johns Hopkins University, Jenkins Department of Biophysics <http://roselab.jhu.edu/~raj/Manuals/ribosome.html>) e para a Protonectina 1-6 uma conformação aleatória, pois esta é muito pequena para adotar qualquer forma de estrutura secundária. Os resíduos de lisina dos peptídeos foram protonados e os C-terminais foram amidados, o que resultou numa carga líquida de +2 para cada Protonectina e +1 para a Protonectina 1-6. Os peptídeos foram dispostos de forma a estarem separados por aproximadamente 2,5 nm e cada sistema foi simulado por 150ns.

RESULTADOS

A análise do perfil de estrutura secundária dos peptídeos que compõem as simulações em questão é apresentada na figura 3.1.1, dela é possível perceber que em todos os casos os peptídeos deixam a conformação inicial logo nos primeiros nano segundos e passam a assumir conformações aleatórias tal como é esperado para peptídeos curtos e anfipáticos em solução aquosa.

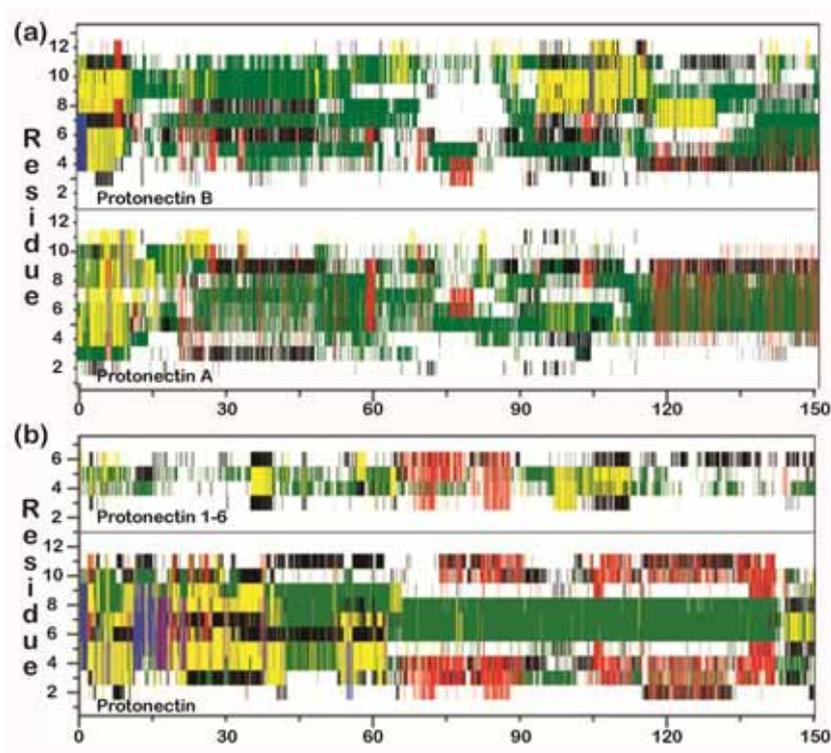


Figura 3.1.1: Padrões de estrutura secundária para os peptídeos nas simulações (a) Protonectinas. (b) Protonectina/Protonectina 1-6. No eixo vertical é apresentado o número de resíduos de aminoácidos presentes na caixa de simulação. Note que este número é contínuo, sendo em (a) de 1 a 12 a representação do peptídeo de Protonectina e de 13 a 18 o peptídeo de Protonectina 1-6, em (b) de 1 a 12 têm se a representação de um dos peptídeos de Protonectina e de 13 a 24 o outro. No eixo x pode-se acompanhar o tempo de evolução das simulações. As cores representam a estrutura secundária adotada pelo resíduo de aminoácido sendo que o **vermelho** representa folha beta, **branco** representa estruturas aleatórias, o **azul** representa alfa hélice, **verde** representa bend que são regiões com alta curvatura, o **preto** representa b-bridge que é representada por um único par de ligação de hidrogênio formador de folha beta e o **amarelo** representa turn que são regiões de aminoácidos separados por até 5 ligações peptídicas e que se curvam permanecendo distantes por até 7Å.

Para ser verificada se há a aproximação entre os peptídeos a distância entre os centros de massa destes em função do tempo de simulação foi calculada e é apresentada na figura 3.1.2 (a). O resultado indica que em ambas as simulações a aproximação dos peptídeos é rápida (aproximadamente 20ns) e a situação na qual se tem duas moléculas idênticas de Protonectina apresenta, em praticamente todo tempo de simulação, as menores distâncias observadas entre os centros de massa dos peptídeos. Além disso, verifica-se que para a simulação da mistura de peptídeos (Protonectina/Protonectina 1-6) há um comportamento oscilatório da distância de separação dos peptídeos, pois ora estes estão próximos e ora apresentam-se distantes.

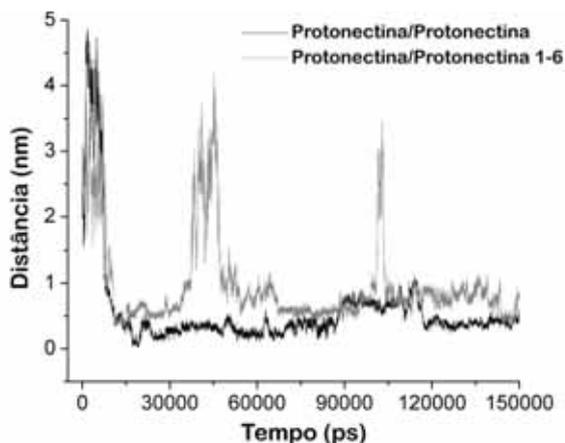


Figura 3.1.2: Distâncias entre os centros de massa dos peptídeos em função do tempo de simulação.

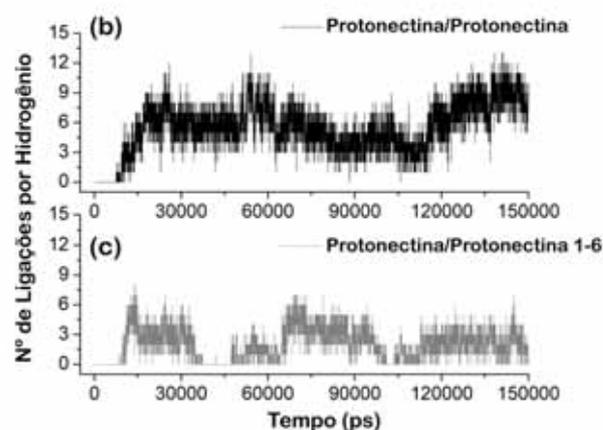


Figura 3.1.3: Número de ligações por Hidrogênio entre os peptídeos em função do tempo de simulação.

A pequena distância entre os centros de massas dos peptídeos em ambas as simulações sugere a possibilidade de ligações por hidrogênio intermoleculares. A figura 3.1.3 mostra que em ambos os casos os peptídeos interagem entre si através de ligações de hidrogênio, e que as interações entre Protonectinas puras (figura 3.1.3 (a)) são mais numerosas que as interações entre Protonectina e Protonectina 1-6 (figura 3.1.3 (b)). O número médio de ligações de hidrogênio entre os pares de peptídeos em função do tempo de simulação é de 5,4 e 2,0, respectivamente. Também foi observado, em ambas as simulações, que os grupos que formam estas ligações não são permanentes, ou seja, ao se investigar quais grupos seriam os envolvidos nas ligações de hidrogênio intermoleculares não se encontrou um mesmo grupo que permanecesse por um período de tempo significativo. Estas ligações por hidrogênio são intermitentes.

A disposição adotada pelos peptídeos (figura 3.1.4), observada no fim das simulações, sugere que além da proximidade entre eles um se curva sobre o outro, provavelmente na tentativa de proteger seus grupos hidrofóbicos. A associação entre os peptídeos minimiza seus contatos com a água. Isto é indicado pela redução da área hidrofóbica acessível ao solvente que é aproximadamente 10% menor para a situação em que são simulados os peptídeos de Protonectina com Protonectina 1-6 e 18% menor para o caso das Protonectinas puras, ambas medidas em relação à situação anterior à agregação. O processo de associação, em ambos os casos, também reduz em aproximadamente 50% o número de moléculas e água que é encontrado na primeira camada de hidratação (aproximadamente 4Å).

Os resultados apresentados sugerem que a associação em água é causada por forças hidrofóbicas, juntamente com ligações por hidrogênio.

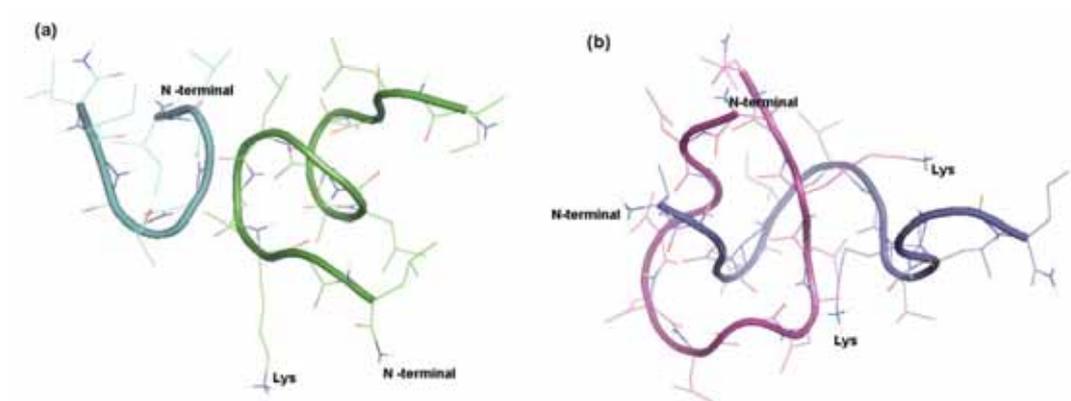


Figura 3.1.4:Conformações finais obtidas para os peptídeos das simulações em água. **(a)** Protonectina (verde) e Protonectina 1-6 (azul). **(b)** Protonectinas puras.

3.2. PEPTÍDEOS DE JELEÍNA I EM PH 5.5 E 7.0

Nesta seção serão apresentadas quatro simulações contendo 2 ou 4 moléculas de Jeleína I e mimetizando o pH 5.5 ou PH 7.0, tal como apresentado na tabela 3.2.1. Para todas as simulações uma caixa cúbica de aproximadamente 5.5 nm de aresta foi construída contendo os peptídeos de interesse inicialmente separados por aproximadamente 3 nm, e em α -hélice ideal (obtida pelo programa RIBOSOME V1.0 – Program to build coordinates for peptides from sequence, Johns Hopkins University, Jenkins Department of Biophysics <http://roselab.jhu.edu/~raj/Manuals/ribosome.html>), água e contra íons. As diferenças de pH são simuladas através da condição de protonação das histidinas presentes nos peptídeos. Sendo que para a situação que representa o pH 5.5 todas as histidinas foram protonadas. Nas simulações que representam o pH 7.0 somente 50% das histidinas presentes foram protonadas. As simulações contendo 2 peptídeos foram rodadas por 100ns. Para as simulações contendo 4 peptídeos o tempo de simulação foi de 100ns (pH 7.0) e 200ns (pH 5.5), nestas simulações, os peptídeos foram sendo acrescentados separadamente, ou seja, tinha-se inicialmente 2 peptídeos na caixa, então um terceiro foi adicionado, e, após se observar a interação do terceiro peptídeo com os demais através de ligações por hidrogênio, o quarto foi adicionado. No caso do pH 5.5 levou-se mais tempo para se observar a interação do quarto peptídeo com os demais, por isso, o tempo mais longo para esta simulação e suas análises serão apresentadas de 100 a 200 ns.

Tabela 3.2.1: Simulações dos peptídeos de Jeleína I representando o pH 5.5 ou 7.0

Nomenclatura da Simulação	Quantidade de moléculas de Jeleína I	Carga líquida de cada peptídeo	Carga líquida total dos peptídeos	pH simulado	Tempo de simulação (ns)
S _{2-pH5.5}	2	+3	+6	5.5	100
S _{4-pH5.5}	4	+3	+12	5.5	200
S _{2-pH7.0}	2	+2,5	+5	7.0	100
S _{4-pH7.0}	4	+2,5	+10	7.0	100

RESULTADOS

A distância entre os centros de massa dos peptídeos como função do tempo de simulação para as simulações com dois peptídeos em pH 5.5 (preto) ou pH 7.0 (vermelho) foi calculada e é apresentada na figura 3.2.1. Sua análise permite verificar que a aproximação das moléculas de Jeleína I é mais rápida na simulação $S_{2-pH7.0}$ que na $S_{2-pH5.5}$, nas quais os peptídeos levam aproximadamente 10 ns e 30ns, respectivamente para se aproximarem. Além disso, após a aproximação, as moléculas se mantêm mais próximas em pH 7.0 se comparadas com os resultados em pH 5.5.

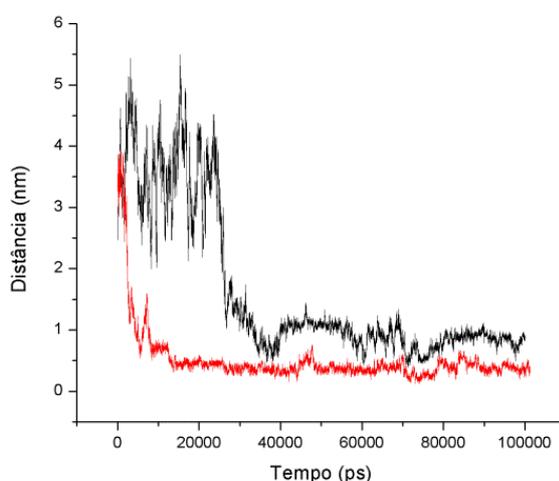


Figura 3.2.1: Distância entre os centros de massa dos peptídeos em função do tempo de simulação. Em preto, simulação $S_{2-pH5.5}$ e em vermelho, simulação $S_{2-pH7.0}$.

O Perfil de Estrutura Secundária adotado pelos peptídeos nas quatro simulações é apresentado na figura 3.2.2. Dela verifica-se que para todas as simulações os peptídeos deixaram rapidamente a conformação em alfa hélice ideal e adotaram conformações aleatórias ou em folhas beta. Percebe-se ainda que em pH 5.5 há uma maior dificuldade para os peptídeos alcançarem alguma outra forma de estrutura secundária em relação ao pH 7.0, que em sua grande maioria apresenta conformações em folha beta. Verifica-se também que em pH 5.5, o aumento na concentração dos peptídeos pode auxiliar a obtenção da estrutura secundária, embora esta em menor quantidade que em pH 7.0.

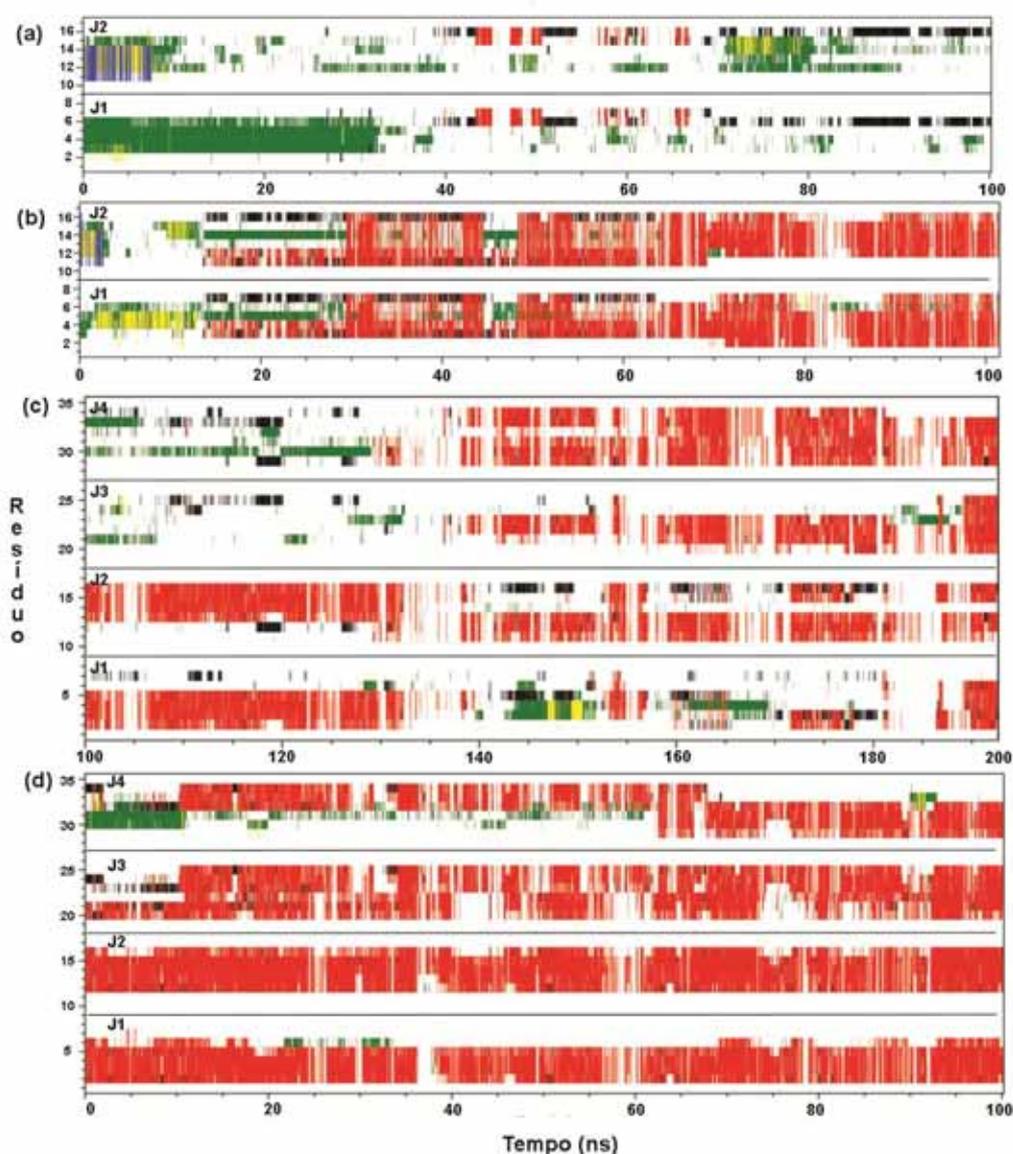


Figura 3.2.2: Padrões de estrutura secundária para os peptídeos nas simulações (a) $S_{2-pH5.5}$. (b) $S_{2-pH7.0}$. (c) $S_{4-pH5.5}$. (d) $S_{4-pH7.0}$. No eixo vertical o número de resíduos de aminoácidos presentes na caixa de simulação, sendo de 1 a 9 o primeiro peptídeo de Jeleína I, de 10 a 18 o segundo, de 19 a 27 o terceiro e de 28 a 36 o quarto. No eixo x pode-se acompanhar o tempo de evolução das simulações. As cores representam a estrutura secundária adotada pelo resíduo de aminoácido, no qual o **vermelho** representa folha beta, **branco** representa estruturas aleatórias, **azul** representa alfa hélice, **verde** representa bend que são regiões com alta curvatura, o **preto** representa b-bridge que é representada por um único par de ligação de hidrogênio formador de folha beta e o **amarelo** representa turn que são regiões de aa separados por até 5 ligações peptídicas e que se curvam permanecendo distantes por até 7Å.

Para identificar a possível interação entre os peptídeos, o número de ligações por hidrogênio entre os pares ou quartetos de moléculas foram calculadas e são apresentadas na figura 3.2.3. Pela figura observa-se que para todas as simulações há a interação entre os peptídeos através de ligações por hidrogênio. Em $S_{2-pH5.5}$ (figura 3.2.3 (a)) a média de Ligações de Hidrogênio entre os peptídeos é de $3,4 \pm 1,5$, em $S_{2-pH7.0}$ (figura 3.2.3 (b)) essa média sobe para $5,1 \pm 1,3$. Ambas obtidas de 30 a 100ns do tempo total de simulação. Na simulação $S_{4-pH5.5}$ (figura 3.2.3 (c)) a média de Ligações de Hidrogênio entre os peptídeos é de $9,6 \pm 2,5$, em $S_{4-pH7.0}$ (figura 3.2.3 (d)) essa média é de $13,3 \pm 2,0$ calculadas sobre todo o período evidenciado na figura. Embora, em média, o número de pontes de hidrogênio entre os peptídeos nas simulações em pH 7.0 seja maior que para simulações em pH 5.5, se seus respectivos erros forem considerados, verifica-se que a interação por ligações de hidrogênio entre os peptídeos é semelhante para ambas as simulações.

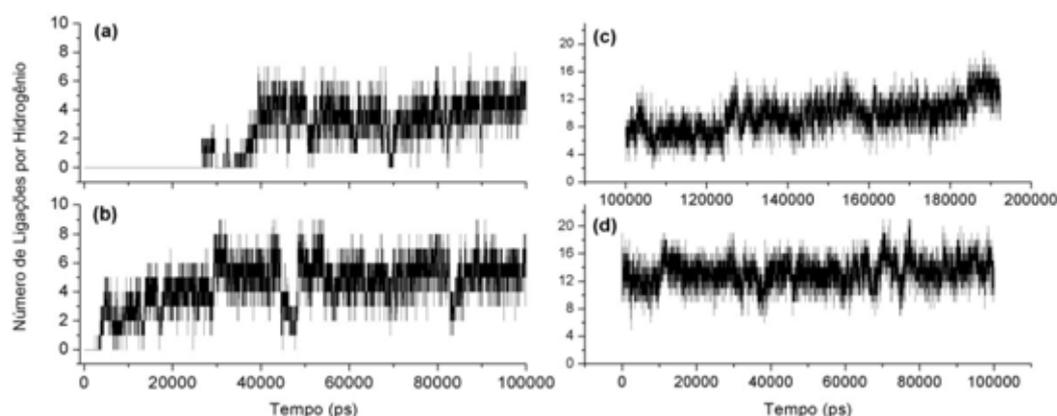


Figura 3.2.3: Número de ligações por hidrogênio entre os peptídeos de Jeleína I como função do tempo de simulação. (a) $S_{2-pH5.5}$. (b) $S_{2-pH7.0}$. (c) $S_{4-pH5.5}$. (d) $S_{4-pH7.0}$.

As conformações finais obtidas de cada uma das simulações são apresentadas na figura 3.2.4 com destaque para os resíduos carregados. As diferentes moléculas de Jeleína são representadas por diferentes cores e nomeadas por J1, J2, J3 e J4. Do lado esquerdo (a, c, e) da figura são apresentados os resultados para as simulações em pH 5.5 e do lado direito (b, d, f) as simulações em pH 7.0. Nota-se pela comparação entre (a) e (b), cujas simulações foram realizadas para dois peptídeos, que em pH 5.5 (a) os peptídeos se associam lateralmente de forma antiparalela, enquanto que para a situação em pH 7.0 (b) a associação também ocorre lateralmente, porém de forma paralela. A distribuição dos 4 peptídeos em pH 5.5 parece formar um aglomerado circular com um núcleo hidrofóbico, a figura (c) mostra a vista

paralela a um eixo perpendicular a este núcleo. Dela pode se observar que os 4 peptídeos se associam de forma a manter as cadeias laterais de seus resíduos carregados expostas ao meio aquoso e tentam proteger seus grupos apolares voltando-os para o núcleo hidrofóbico. A simulação dos 4 peptídeos em pH 7.0 (figura (d)) mostra que eles associam-se dois a dois paralelamente, aparentemente não formam um aglomerado que proteja tão eficientemente seus grupos apolares tão como no caso anterior. As figuras (e) e (f) são a projeção lateral destes aglomerados.

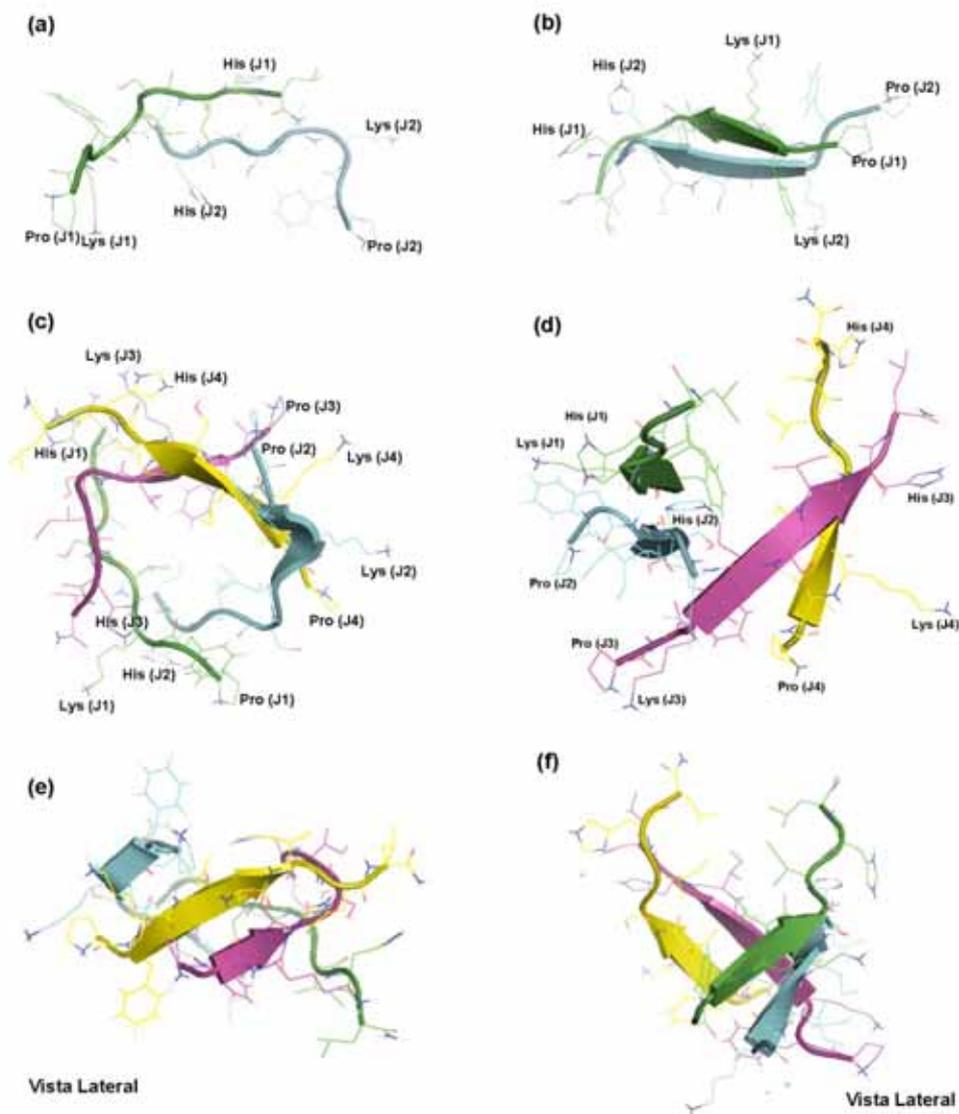


Figura 3.2.4: Conformações finais obtidas para os peptídeos de Jeleína I. À esquerda simulações em pH 5.5 e à direita simulações em pH 7.0. (a) $S_{2-pH5.5}$. (b) $S_{2-pH7.0}$. (c) vista a partir de um plano paralelo ao eixo que corta perpendicularmente o núcleo hidrofóbico de $S_{4-pH5.5}$. (d) o mesmo para $S_{4-pH7.0}$. (e) vista lateral do aglomerado formado pelos peptídeos da simulação $S_{4-pH5.5}$. (f) vista lateral do aglomerado formado pelos peptídeos da simulação $S_{4-pH7.0}$.

3.3. PEPTÍDEOS DE JELEÍNA I, II, III E IV PUROS

Nesta seção serão apresentadas quatro simulações em água (tabela 3.3.1), cada uma contendo duas moléculas idênticas de Jeleína I, II, III ou IV inicialmente em α – hélice ideal, obtidas pelo programa RIBOSOME e protonadas de forma a mimetizar o PH 5.5. Para cada simulação, uma caixa cúbica de aproximadamente 7 nm de aresta contendo as duas moléculas de Jeleína, água e contra íons suficientes para promover a equilibração do sistema foi montada e submetida a 200ns de simulação por Dinâmica Molecular.

Tabela 3.3.1: Simulações dos pares de peptídeos de Jeleína I, II, III ou IV

Simulação	Peptídeo Simulado	Sequência Primária	Número de peptídeos simulados	$\langle Q \rangle$	$\langle H \rangle$	Tempo de Simulação (ns)
SI- w	Jeleína I	PFKISIH _L -NH ₂	2	+3	0,096	200
SII- w	Jeleína II	TPFKISIH _L -NH ₂	2	+3	0,066	200
SIII- w	Jeleína III	EPFKISIH _L -NH ₂	2	+2	0,017	200
SIV- w	Jeleína IV	TPFKISIH-NH ₂	2	+3	0,008	200

RESULTADOS

As simulações em água são utilizadas para verificar se há alguma forma de interação entre as moléculas de peptídeos em ambientes hidrofílicos. Como uma primeira análise de interação, verificou-se a distância entre os centros de massa das moléculas dos peptídeos de Jeleínas (figura 3.3.1). Desta análise pode-se verificar se há a aproximação entre os peptídeos e que os peptídeos de Jeleína II e III levam mais tempo para se aproximarem que os demais. Verifica-se ainda que a partir de aproximadamente 130 ns os peptídeos, em todas as simulações, já estão próximos, por isso algumas análises apresentadas nesta seção são realizadas de 130 a 200ns.

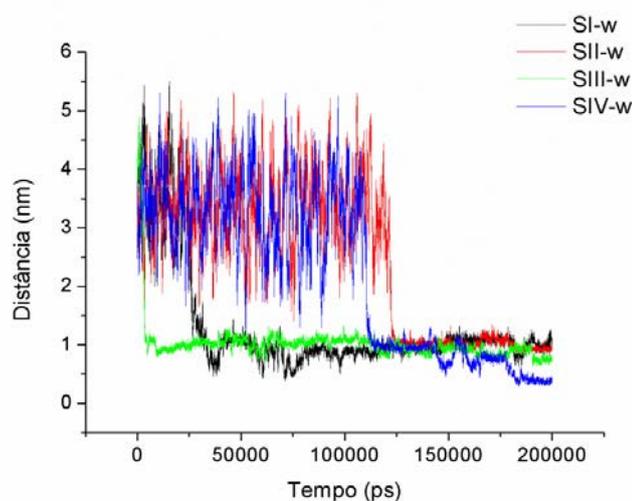


Figura 3.3.1: Distância entre os centros de massa dos peptídeos como função do tempo de simulação. Em preto, distância entre os centros de massa das moléculas de Jeleína I (SI-w), em vermelho a mesma medida para as moléculas de Jeleína II (SII-w), em verde para as moléculas de Jeleína III (SIII-w) e em azul para as moléculas de Jeleína IV (SIV-w).

Por não ser conhecida a estrutura de NMR destes peptídeos, optou-se por partir de alfa hélices ideal no início das simulações. A conformação estrutural adotada pelos peptídeos ao longo das simulações é acompanhada através das análises de padrões de estrutura secundária que são apresentadas na figura 3.3.2. Para as Jeleínas I (a), observa-se que a alfa hélice original é perdida na minimização de energia para um dos peptídeos e antes dos primeiros 20ns de simulação para o outro, em ambas, uma ligeira tendência de formação de folhas beta a partir de 120ns é observada. Para as Jeleínas II (b) observa-se uma maior permanência de estruturas em alfa hélice se comparadas com os resultados para as Jeleínas I (a), estruturas em turn, turn com b-bridge e bends também são observadas com grande frequência para esses peptídeos. As Jeleínas III (c) são os peptídeos que apresentam a maior propensão de alfa hélice em água, com relação aos quatros tipos estudados. Por fim, as Jeleínas IV (d) deixam a conformação em alfa hélice e adotam conformações em bend até o fim da simulação.

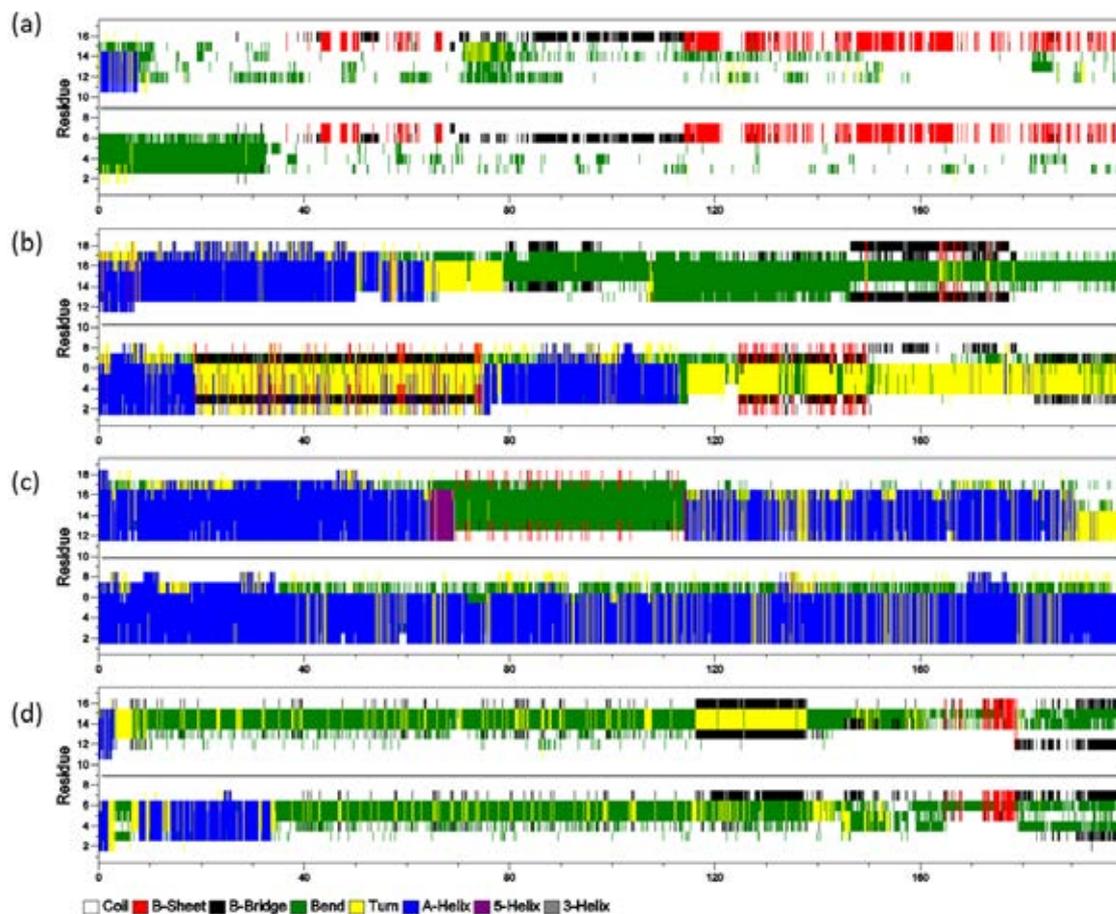


Figura 3.3.2: Padrões de estrutura secundária, como função do tempo de simulação, para as simulações dos diferentes pares de Jeleínas. (a) Jeleínas I (SI-w). (b) Jeleínas II (SII-w). (c) Jeleínas III (SIII-w). (d) Jeleínas IV (SIV-w). No eixo vertical é apresentado o número de resíduos de aminoácidos presentes na caixa de simulação. Note que este número é contínuo sendo em (a) de 1 a 8, um dos peptídeos de Jeleína I e de 9 a 16 o outro. O mesmo ocorre em (d) no qual temos o par de peptídeos de Jeleína IV. Em (b) de 1 a 9 têm-se um dos peptídeos de Jeleína II e de 10 a 18 o outro. O mesmo ocorre para (c) no qual temos o par de peptídeos de Jeleína III. No eixo x pode-se acompanhar o tempo de evolução das simulações.

Para se gerar informações sobre a possível interação entre os peptídeos foi verificado se quando próximos eles formavam pontes de hidrogênio intermoleculares e os resultados são apresentados na figura 3.3.3. Desta figura verifica-se que, após se aproximarem, as Jeleínas interagem entre si através de ligações por Hidrogênio. O número médio de ligações entre os peptídeos, calculado de 130 ns a 200 ns, é de $4,4 \pm 1,1$ para a simulação do par de Jeleínas I (SI-w); $2,2 \pm 1,1$ para a simulação das Jeleínas II (SII-w); $2,1 \pm 1,1$ para a simulação das Jeleínas III (SIII-w) e $3,4 \pm 1,4$ para a simulação do par de Jeleínas IV (SIV-w).

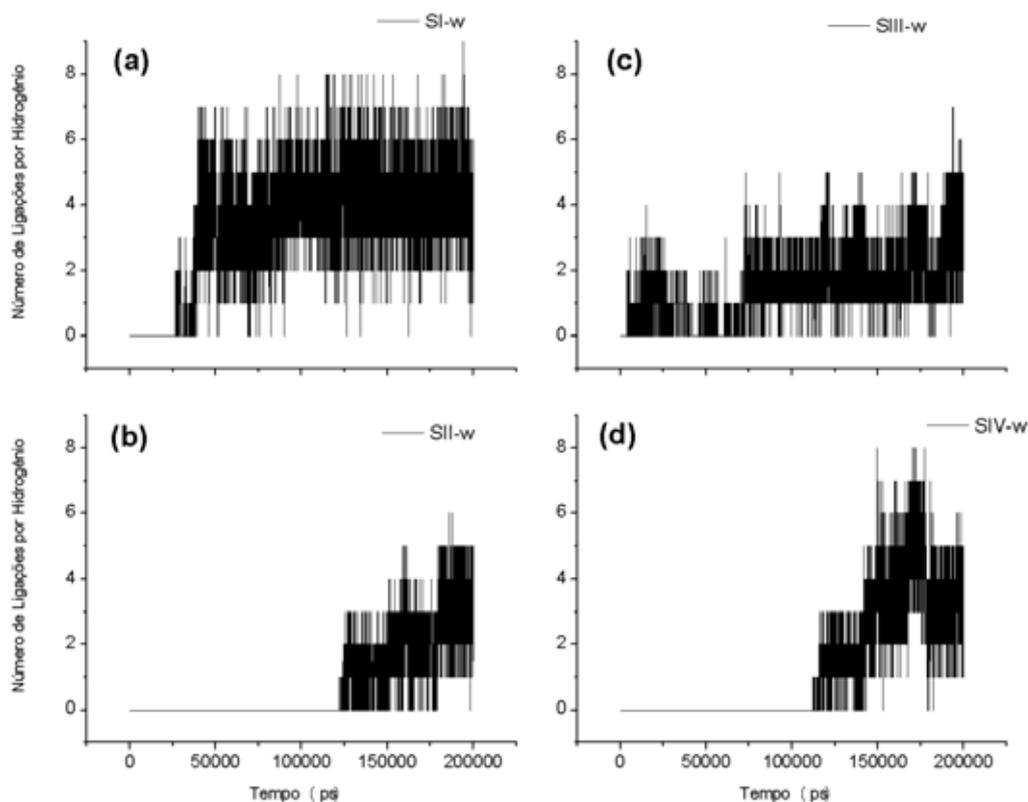


Figura 3.3.3: Número de ligações por hidrogênio entre os pares de peptídeos de Jeleínas como função do tempo de simulação. (a) SI-w. (b) SII-w. (c) SIII-w. (d) SIV-w.

A figura 3.3.4 contém as conformações iniciais e finais das simulações apresentadas nesta seção. Dela verifica-se que os peptídeos de Jeleína I, aparecem individualmente em estrutura aleatória, no entanto, associam-se de forma análoga à formação de uma folha beta antiparalela. Os peptídeos de Jeleína II e III buscam individualmente conformações estruturadas, o que reduz a interação intermolecular entre eles. As Jeleínas IV, também não são capazes de manter uma conformação estruturada, o que permite uma maior associação entre suas moléculas (representada pelo maior número de ligações por hidrogênio intermoleculares em relação às Jeleínas II e III).

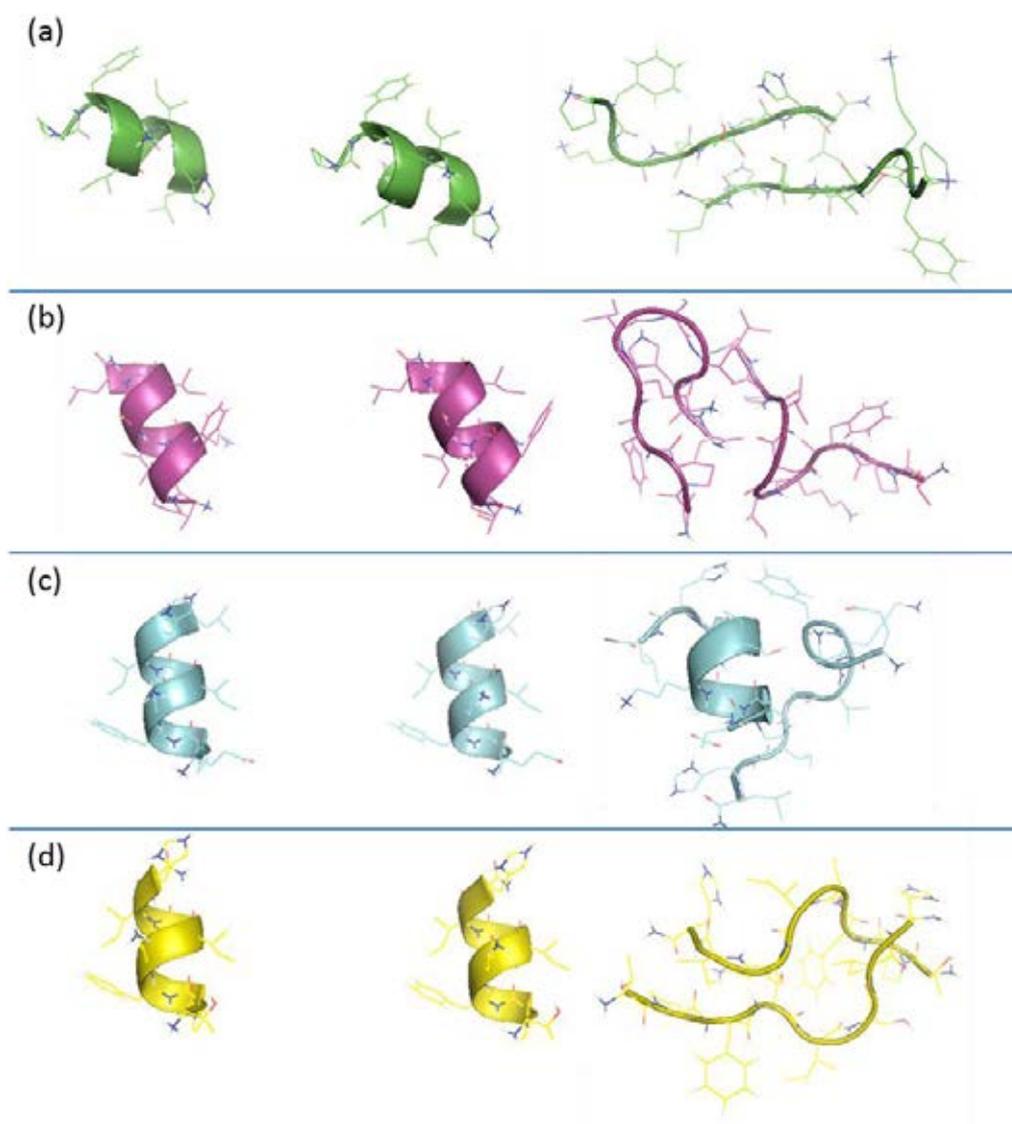


Figura 3.3.4: Conformações estruturais iniciais e finais (200 ns) de cada simulação. **(a)** SI-w. **(b)** SII-w. **(c)** SIII-w. **(d)** SIV-w.

4. SIMULAÇÕES EM MICELAS DE SDS

Moléculas de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) podem formar, em solução aquosa e em condições de concentração, pH, temperatura e força iônica adequados, aglomerados micelares pois possuem características anfipáticas, sendo suas cabeças polares e suas caudas apolares. Essas micelas aniônicas mimetizam o ambiente da membrana de células procariontes e são usadas como modelo no estudo da interação de peptídeos antimicrobianos com membranas de bactérias.

Simulações na presença de micelas de SDS têm alguns benefícios como, por exemplo, o baixo custo computacional se comparado com simulações em bicamadas lipídicas, pois apresentam um número reduzido de átomos. Micelas aniônicas apresentam algumas das características essenciais para a interação com peptídeos, como a região das cadeias hidrofóbicas, a camada hidrofílica composta pelas cabeças polares e a interface entre a superfície e o meio aquoso. No entanto o alto raio de curvatura, as cadeias alquílicas únicas e a facilidade de deformação podem ser levados em conta como limitação do modelo (KHANDELIA et al., 2006; WANG et al., 2010).

Nas simulações apresentadas neste capítulo, caixas cúbicas com arestas entre 6,5 e 8 nm foram montadas, contendo a micela pré-formada com 65 moléculas de SDS tal como foi obtida por VALDER, 2010, moléculas de água do tipo SPC (BERENDSEN et al, 1981) em quantidade suficiente para garantir a densidade da água, um par de peptídeos e contra íons. Este modelo de micela está em boa concordância com os dados da literatura, considerando o número de monômeros de SDS (JUSUFI et al, 2008; QUINA et al., 1995; ZANA, 2005), a excentricidade, o raio micelar e a área (BRUCE et al., 2002; MACKERELL, 1995; RAKITIN and PACK, 2004; SHANG et al., 2008). A conformação inicial do par de peptídeos utilizados foi obtida de frames representativos das simulações em água (capítulo 3) cujos peptídeos apresentavam-se associados através de ligações por hidrogênio. Estes peptídeos foram inicialmente colocados, no meio aquoso, paralelamente à superfície da micela e distantes de aproximadamente 3 nm do centro de massa da mesma.

As simulações apresentadas neste capítulo serão divididas em quatro seções de acordo com o conjunto de peptídeos estudados (tabela 4.1).

Tabela 4.1: Simulações que serão apresentadas ao Capítulo 4

Seção 4.1	Peptídeos de Protonectina e Protonectina/Protonectina 1-6
Seção 4.2	Peptídeos de Jeleína I mimetizando o pH 5.5 e 7.0
Seção 4.3	Pares de Peptídeos de Jeleína I, II, III e IV, respectivamente.

4.1. PEPTÍDEOS DE PROTONECTINA E PROTONECTINA/PROTONECTINA 1-6

Para a análise das interações entre os peptídeos de Protonectinas e Protonectina 1-6 na presença da micela de SDS foram conduzidas quatro simulações distintas, duas delas considerando a mistura de peptídeos (Protonectina/Protonectina 1-6) na proporção 1:1 e as demais considerando os peptídeos de Protonectina puros. Além disso, dois métodos distintos de simulação por dinâmica molecular foram testados para garantir que os resultados finais não estivessem sendo influenciados pelas condições de partida das simulações. Portanto simulações por dinâmica molecular de equilíbrio e utilizando o método de troca de réplicas (REMD) foram realizadas (tabela 4.1.1). Em todas as simulações a conformação inicial para os peptídeos foi obtida através de frames representativos das simulações em água (capítulo 3), nos quais os peptídeos de Protonectina e Protonectina 1-6 ou o par de peptídeos de Protonectina apresentavam-se associados através de ligações de hidrogênio. A mesma configuração inicial do sistema foi utilizada como ponto de partida tanto para as simulações de equilíbrio quanto para as do método de troca de réplicas. Para as simulações que utilizaram o REMD 24 réplicas foram construídas varrendo as temperaturas de 288 a 315.6K com a possibilidade de troca a cada 3000 passos de simulação e porcentagem de aceitação de troca em torno de 40%.

Como já discutido no capítulo 1, estudos experimentais (SAIDEMBERG et al, 2010) indicam que a mistura Protonectina e Protonectina 1-6 apresenta maior eficiência biológica se comparada com a situação da Protonectina pura. Estes estudos sugerem que esta eficiência estaria relacionada à formação de um heterodímero que seria o responsável pela potencialização da ação destes peptídeos contra microrganismos patogênicos. As simulações em água que representam a mistura Protonectina/Protonectina 1-6 e as Protonectinas puras (capítulo 3, seção 3.1) indicam que realmente há a formação de aglomerados entre estes peptídeos, no entanto não justificam a diferença na eficiência biológica observada experimentalmente. Com as simulações em ambiente mimético de membrana, no caso a micelas de SDS, buscam-se fatores que possam contribuir para o entendimento das diferenças observadas para a eficiência biológica da mistura em relação aos peptídeos de Protonectina puros.

Tabela 4.1.1: Simulações dos peptídeos de Protonectina e Protonectina/Protonectina 1-6

Peptídeos Simulados	Representação	Método de Simulação	Tempo de simulação (ns)
2 Protonectinas	Puras	Equilíbrio	100
1 Protonectina e 1 Protonectina 1-6	Mistura	Equilíbrio	100
2 Protonectinas	Puras	REMD	100
1 Protonectina e Protonectina 1-6	Mistura	REMD	100

RESULTADOS

Experimentos por Dicroísmo Circular dos peptídeos em solução de SDS, acima da concentração micelar crítica, demonstraram que a presença do ambiente mimético de membrana induz mudanças conformacionais tanto para a mistura Protonectina/Protonectina 1-6 como para as Protonectinas puras. Esses resultados sugerem que existe uma interação entre os peptídeos e a micela. As simulações desses sistemas corroboram igualmente com a existência da interação dos peptídeos com a micela. A figura 4.1.1 apresenta a distância entre o centro de massa dos peptídeos e o centro de massa da micela de SDS em função do tempo de simulação, obtida para as simulações de equilíbrio. Nela, a reta azul indica o valor do raio de giro da micela que é em torno de 1,9 nm. O raio de giro é a medida da distância média entre o centro de massa da micela e os átomos de enxofre que constituem a cabeça das moléculas de dodecil sulfato de sódio. Por esta figura verifica-se que para ambas as simulações, os peptídeos se inserem rapidamente na micela com seu centro de massa posicionado, na maior parte do tempo, abaixo do raio de giro. Outro ponto a ser verificado é que a situação das Protonectinas puras não apresenta resultado distinto da situação em que se tem a mistura de peptídeos.

Pela figura 4.1.2 verifica-se que a distância entre os centros de massa dos peptídeos Protonectina e Protonectina 1-6 aumenta à medida que a simulação se estende, enquanto que a distância entre os peptídeos de Protonectina permanece, por todo período simulado, em torno do mesmo valor. Tal análise indica que, após a inserção na micela de SDS, ocorre um processo de separação dos peptídeos de Protonectina e Protonectina 1-6.

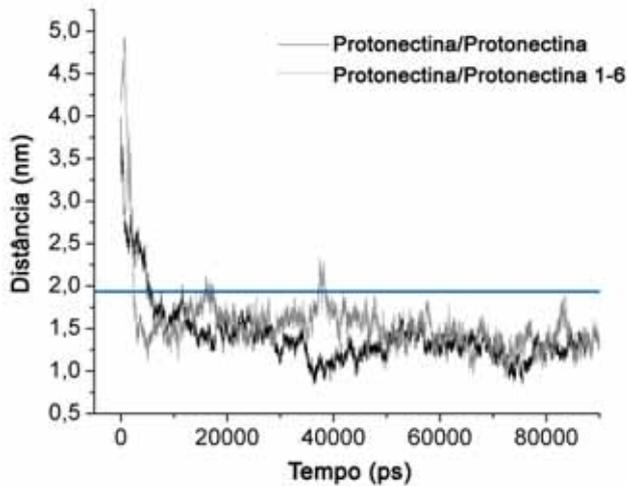


Figura 4.1.1: Distância entre o centro de massa dos peptídeos e o centro de massa da micela de SDS em função do tempo de simulação. Em azul, raio de giro da micela.

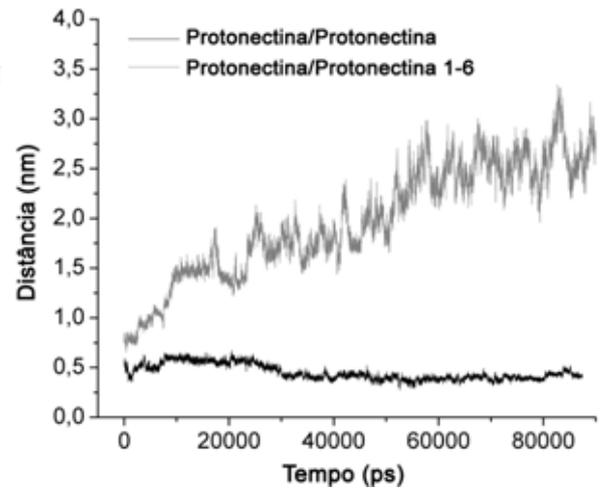


Figura 4.1.2: Distância entre o centro de massa da mistura de peptídeos (cinza) e dos peptídeos puros (preto) em função do tempo de simulação.

A figura 4.1.3 revela instantes importantes das simulações de equilíbrio. Em 25ns de simulação os peptídeos Protonectina/Protonectina 1-6 já haviam se separado, e a Protonectina já havia adotado uma conformação mais anfipática em relação à conformação inicial, na qual seus grupos hidrofílicos estão voltados para o meio aquoso e seus grupos hidrofóbicos estão protegidos no interior da micela, permanecendo assim até o fim da simulação. Já os peptídeos de Protonectina puros não se separam.

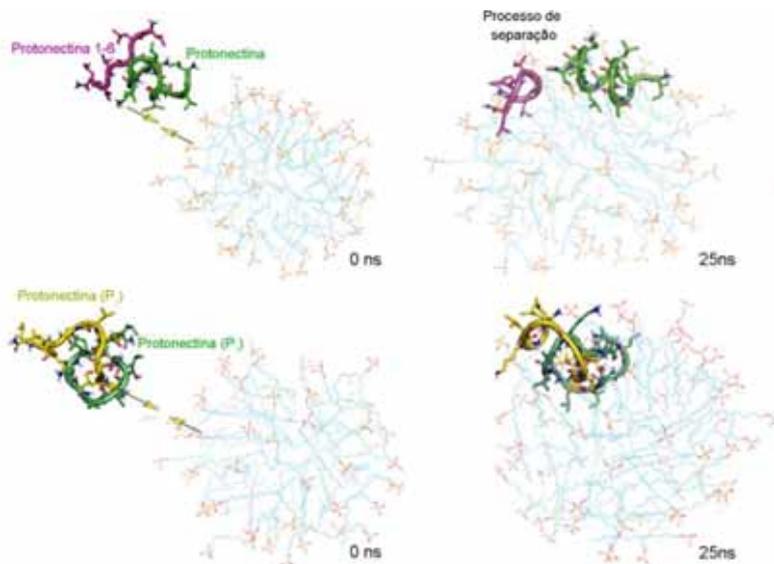


Figura 4.1.3: Conformações iniciais e em 25ns de simulação obtidas para os peptídeos das simulações de equilíbrio em micela de SDS. Acima: Protonectina (verde) e Protonectina 1-6 (magenta). Abaixo: Protonectina puras (verde e amarelo).

Espera-se que o processo de separação entre os peptídeos de Protonectina e Protonectina 1-6 cause o rompimento das ligações por hidrogênio que havia entre os peptídeos. Pela figura 4.1.4 verifica-se que as interações via ligação por hidrogênio para a mistura de peptídeos vão à zero com a sua separação (b), enquanto o número de interações por pontes de hidrogênio entre os peptídeos de Protonectina puros aumentam durante a simulação (a).

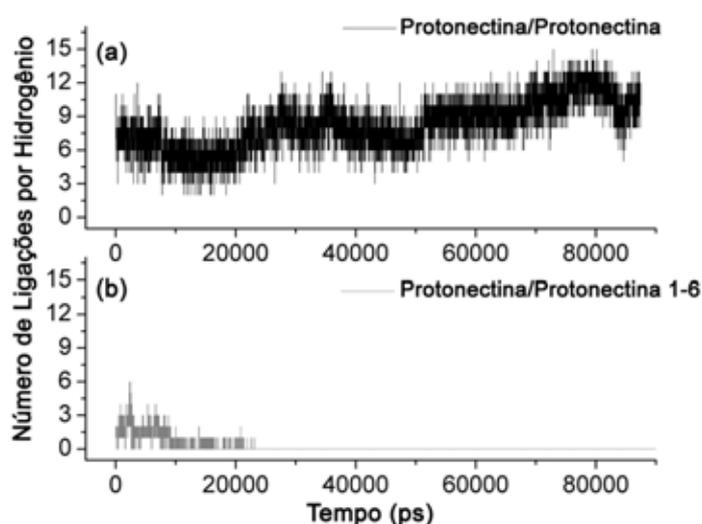


Figura 4.1.4: Número de ligações por hidrogênio entre os peptídeos em função do tempo de simulação. (a) Protonectina puras. (b) Protonectina/Protonectina 1-6.

A partir dos padrões de estrutura secundária adotado pela mistura de peptídeos e pelas Protonectinas puras (figura 4.1.5) verifica-se que a conformação preferencial para as Protonectinas puras são regiões com alta curvatura, denominadas bend. Para a simulação da mistura de peptídeos verificam-se, em boa parte do tempo de simulação, que o peptídeo de Protonectina apresenta-se em hélice- π (roxo) que é um precursor de hélice alfa, e também hélices- α (azul) que são estruturas mais anfipáticas que as observadas para a simulação dos peptídeos puros. Protonectina 1-6 é muito pequena para adotar alguma forma de estrutura secundária, por isso apresenta-se em conformação aleatória. Os dados apresentados corroboram os dados experimentais obtidos por SAIDEMBERG et al, 2010 que verificaram que a presença da Protonectina 1-6 na mistura Protonectina/Protonectina1-6 causa uma maior estruturação nas Protonectinas, quando comparadas com a situação das Protonectinas puras.

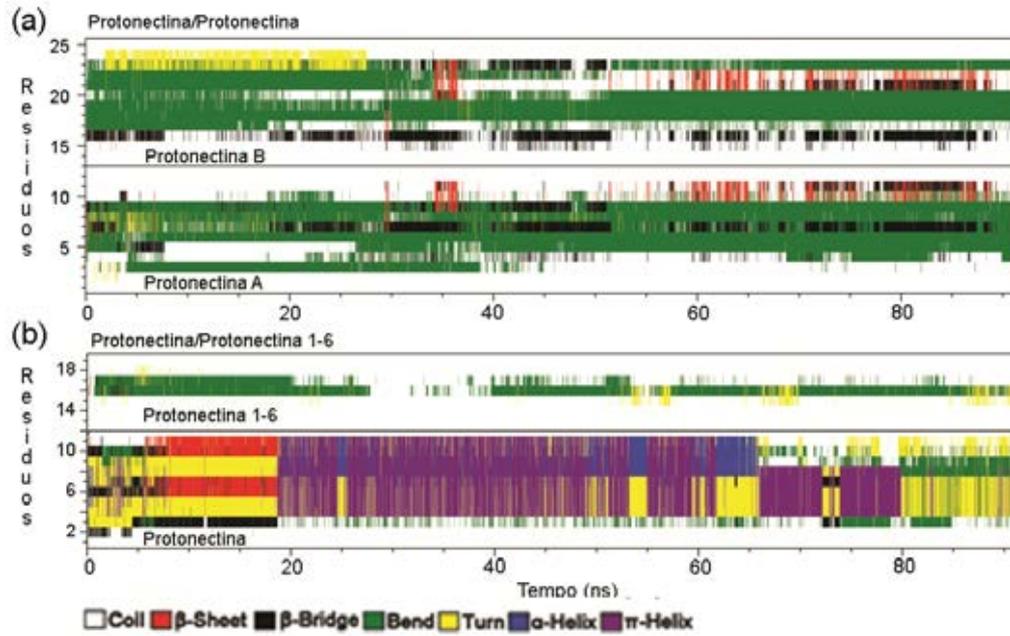


Figura 4.1.5: Padrões de estrutura secundária em função do tempo de simulação. (a) Protonectinas puras. (b) Protonectina/Protonectina 1-6. No eixo vertical é apresentado o número de resíduos de aminoácidos presentes na caixa de simulação.

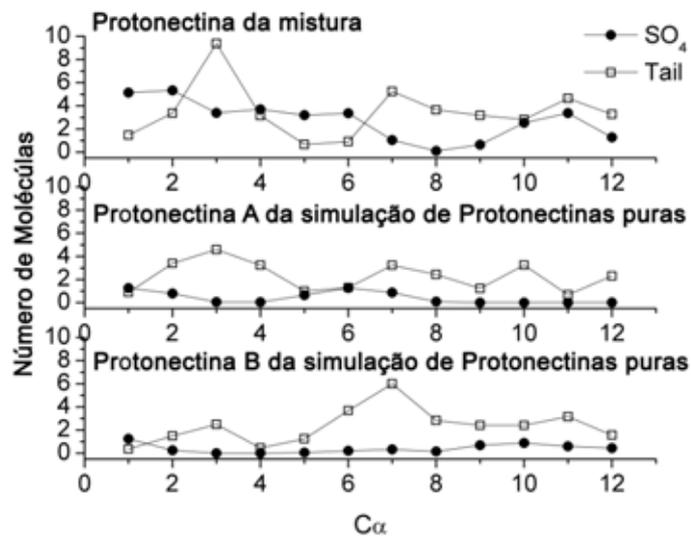


Figura 4.1.6: Perfil de solvatação ao redor dos átomos de carbono α dos resíduos de aminoácidos dos peptídeos. (Acima) para Protonectina da mistura. (Centro e abaixo) para peptídeos das Protonectinas puras. SO₄ corresponde às cabeças polares das moléculas de SDS e tail às caudas alquílicas destas moléculas.

A análise de solvatação do carbono alfa ($C\alpha$) de cada resíduo de aminoácido dos peptídeos, para as simulações de equilíbrio, é apresentada na figura 4.1.6, na qual a figura superior exhibe o perfil de solvatação para estes grupos da Protonectina da mistura Protonectina/Protonectina 1-6, a central e a inferior exibem a mesma análise para cada um dos peptídeos da simulação das Protonectinas puras. Os resultados para a Protonectina da mistura de peptídeos mostram a abundância de grupos SO_4 ao redor dos $C\alpha$ dos resíduos de aminoácidos 1, 2, 5 e 6, enquanto que o $C\alpha$ dos resíduos 3, 7, 8 e 9 está preferencialmente solvatado pelas caudas alquílicas das moléculas de SDS. Os demais resíduos encontram-se na interface entre estas duas regiões. Para as Protonectinas puras (figura central e inferior) verifica-se que ambas as moléculas estão predominantemente solvatadas pelas cadeias alquílicas das moléculas de SDS. Estes dados em associação com os de padrões de estrutura secundária indicam que a Protonectina da mistura de peptídeos assume uma conformação mais anfipática em relação à situação dos peptídeos puros.

Como o método de troca de réplicas é famoso por varrer melhor o espaço conformacional das simulações em relação às simulações de equilíbrio, evitando que o sistema fique aprisionado em mínimos locais de energia, ele foi também utilizado para investigar as interações entre os peptídeos na presença da micela de SDS.

A partir dos arquivos de trajetória das simulações de REMD e da utilização do programa WHAM, a superfície de energia livre como função do número de resíduos em α -hélice (eixo x) e da distância entre o centro de massa dos peptídeos (eixo y) foi obtida (figura 4.1.7). Nela também são apresentados configurações representativas do sistema. Para as Protonectinas puras (figura 4.1.7 (a)) apenas um mínimo é observado, neste os peptídeos estão próximos e o número de resíduos em α -hélice é no máximo igual a um. Para a mistura de peptídeos, três mínimos são observados (figura 4.1.7 (b)). No primeiro mínimo, observa-se uma configuração que também apresenta os peptídeos próximos e com conteúdo helicoidal pobre. No segundo mínimo a distância entre os peptídeos praticamente não sofre variação, no entanto percebe-se um elevado número de resíduos em α -hélice em relação ao mínimo anterior. E no terceiro mínimo, observa-se uma conformação que mantém o conteúdo helicoidal tal como no segundo mínimo, mas que demonstra a propensão de distanciamento dos peptídeos.

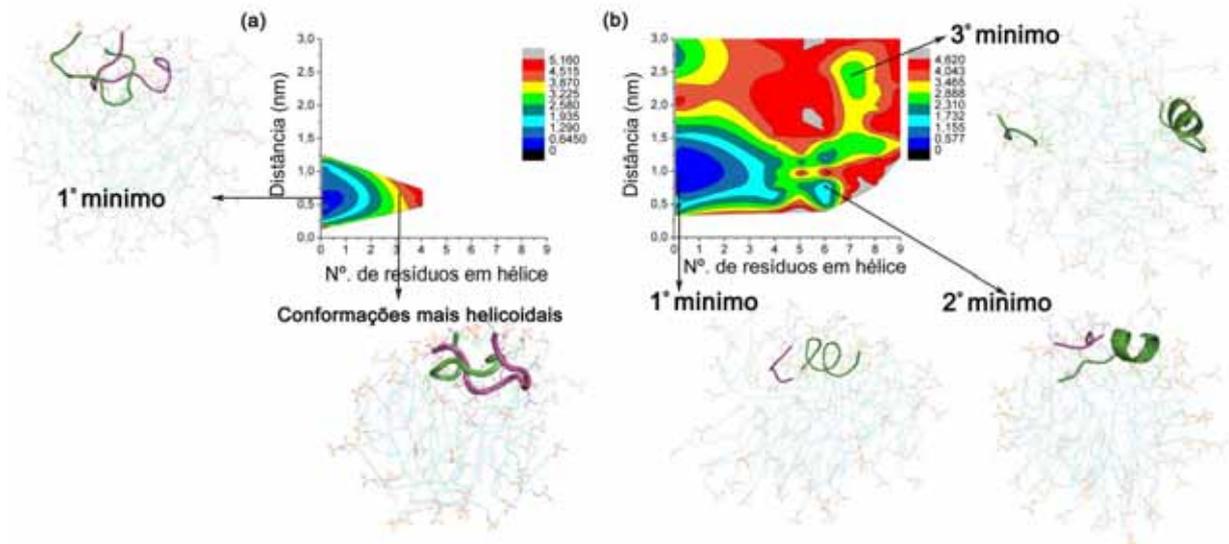


Figura 4.1.7: Superfície de energia livre (kcal.mol^{-1}) como função do número de resíduos em α -hélice e da distância entre o centro de massa dos peptídeos e exibindo conformações características dos pontos destacados. (a) Protonectinas puras. (b) Protonectina/Protonectina 1-6.

Como forma de comparação entre resultados de estrutura separação entre os peptídeos das simulações de equilíbrio e REMD, a figura 4.1.8 foi montada. Nela é apresentado o histograma da distância entre o centro de massa dos peptídeos para as simulações de equilíbrio (figura 4.1.8(a)), no qual é possível verificar que as Protonectinas puras não se afastam durante a simulação, enquanto que a distância entre os centros de massa da Protonectina e da Protonectina 1-6 pode assumir valores que se encontram entre aproximadamente 0,7 e 3,5 nm, implicando no mesmo comportamento observado para as simulações que utilizaram o método de troca de réplicas. Quanto às estruturas, foi montado o histograma do desvio quadrático médio (RMSD) entre as estruturas obtidas em cada frame das simulações de equilíbrio em relação à estrutura representativa obtida pelo método de troca de réplicas. Deste é possível verificar que tanto para as Protonectinas puras quanto para a Protonectina da mistura, a maioria das estruturas que surgiram nas simulações de equilíbrio desvia-se por aproximadamente 0,3 nm da estrutura representativa obtida das REMD. Este resultado indica que há a convergência estrutural entre os dois métodos utilizados.

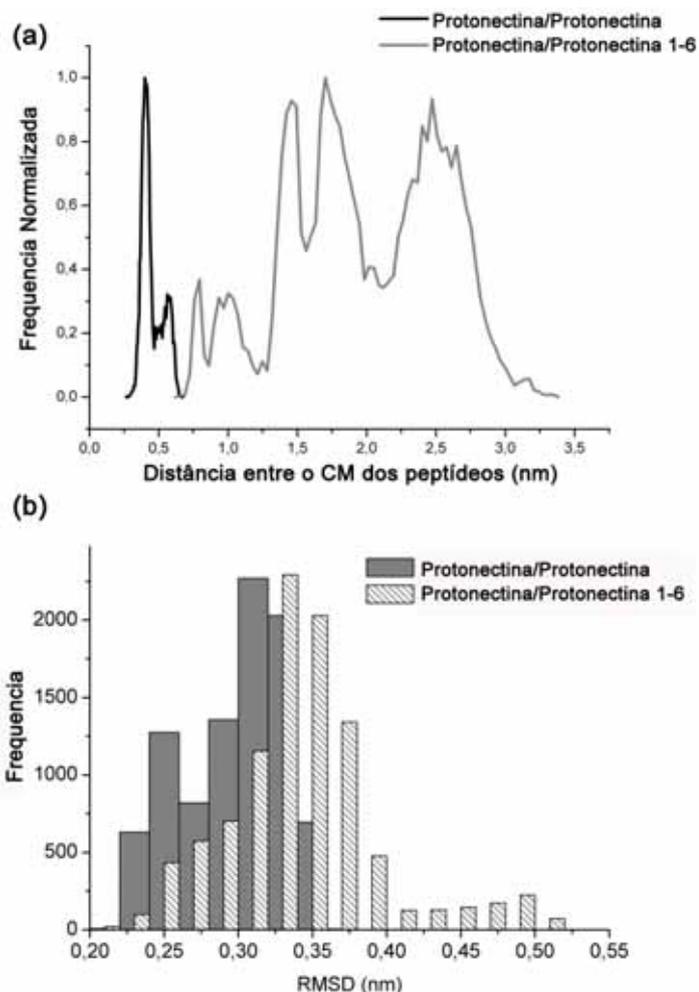


Figura 4.1.8: Comparação entre os resultados das simulações de equilíbrio e o REMD. (a) Histograma da distância entre os centros de massa (CM) dos peptídeos. (b) Histograma do desvio médio quadrático entre as estruturas obtidas em cada frame da simulação de equilíbrio e a de representação do REMD.

Além das interações entre os peptídeos através de ligações por hidrogênio, também foram investigadas as interações energéticas entre eles, para isso as simulações de REMD foram utilizadas. A superfície de energia livre em função da soma da contribuição para a energia de interação de Lennard Jones e Coulomb (medidas por par de interação) para os peptídeos (eixo x) e da distância entre seus centros de massa (eixo y) é apresentada na figura 4.1.9, sendo em (a) para Protonectinas puras e em (b) para a mistura de peptídeos. Dela é possível observar que o mínimo para a energia livre ocorre para a situação em que se têm os peptídeos próximos (ambas as simulações: Protonectinas puras ou mistura) e também, este mínimo ocorre para energia de interação entre os peptídeos mais favorável entre

Protonectinas puras (aproximadamente $-11 \cdot 10^{-3} \text{ kcal.mol}^{-1}$) que Protonectina/Protonectina 1-6 (aproximadamente $-8 \cdot 10^{-3} \text{ kcal.mol}^{-1}$). Como pelas simulações de REMD verificou-se que para o par Protonectina/Protonectina 1-6 há a possibilidade de estes peptídeos estarem próximos e praticamente sem resíduos estruturados em alfa hélice ou com cerca de 6 a 7 sete resíduos estruturados (figura 4.1.7 (b)), buscou-se investigar se o mínimo de energia livre observado na figura 4.1.9 (b) correspondia à situação estruturada ou não. Para isso a figura 4.1.9 (c) foi montada, nela tem-se a superfície de energia livre em função da energia de interação entre os peptídeos (eixo x - tal como explicado acima) e do número de resíduos em α -hélice (eixo y). Por esta figura é possível afirmar que a situação de mínima energia livre para a soma da interação das contribuições de Lennard Jones e Coulomb entre os peptídeos ocorre para o caso em que há maior estruturação do peptídeo de Protonectina da mistura. Além disso as figuras 4.1.9 (d, e, f) mostram que estes mínimos de energia livre ocorrem para situação em que além de próximos, os peptídeos estão interagindo entre si através de ligações por hidrogênio.

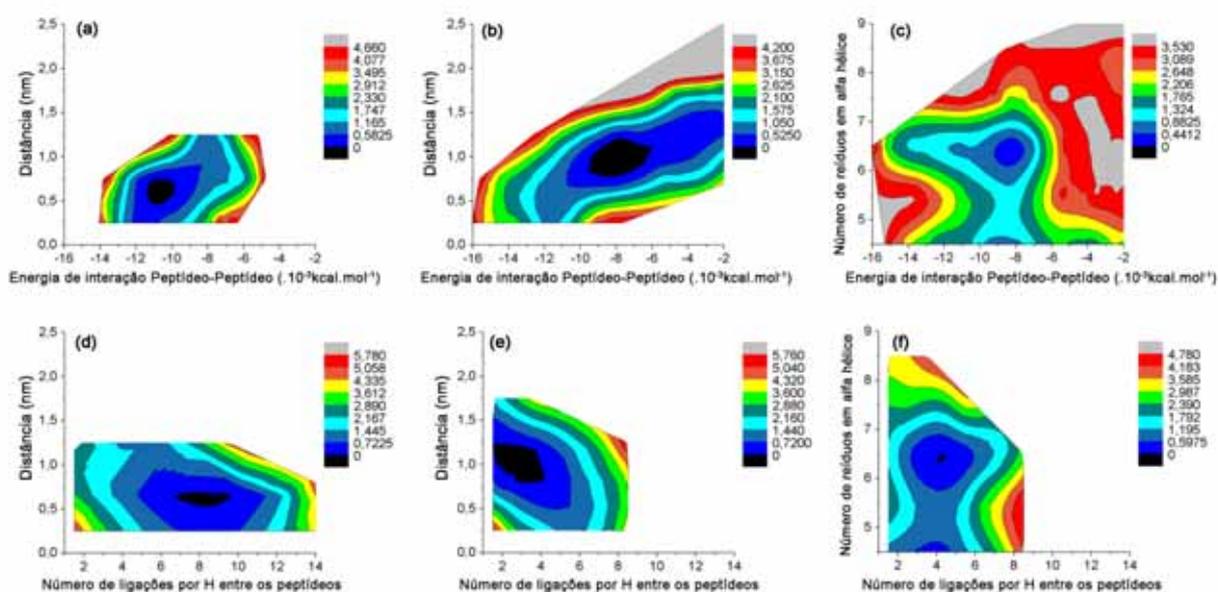


Figura 4.1.9: Superfície de energia livre (kcal.mol^{-1}) para as interações peptídeo-peptídeo. Primeira linha: Soma de Lennard Jones e Coulomb para a contribuição da energia de interação entre os peptídeos como função da distância entre os centros de massa dos peptídeos, em (a) Protonectinas puras e em (b) Protonectina/Protonectina 1-6; e como função do número de resíduos em α -hélice (c) para Protonectina/Protonectina 1-6. Segunda linha: Número de ligações por Hidrogênio entre os peptídeos como função da distância entre seus centros de massa, em (d) Protonectinas puras e em (e) Protonectina/Protonectina 1-6; e como função do número de resíduos em α -hélice (c) para Protonectina/Protonectina 1-6.

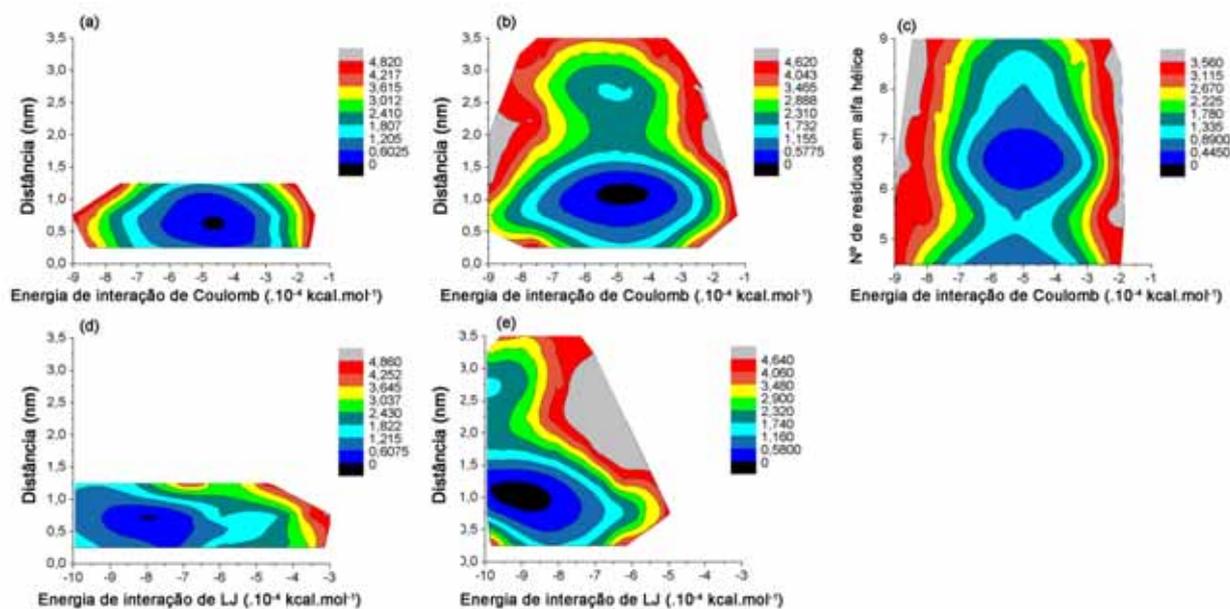


Figura 4.1.10: Superfície de energia livre (kcal.mol^{-1}) da energia de interação entre os peptídeos e a micela de SDS. Primeira linha: Contribuição de Coulomb, medida por par de interação, como função da distância entre os centros de massa dos peptídeos, em (a) Protonectinas puras e em (b) Protonectina/Protonectina 1-6; como função do número de resíduos em alfa hélice (c) para mistura de peptídeos. Segunda linha: Contribuição de Lennard Jones (LJ), medida por par de interação, como função da distância entre os centros de massa dos peptídeos, em (d) Protonectinas puras e em (e) Protonectina/Protonectina 1-6;

As contribuições nas energias de interação de Lennard Jones (LJ) e Coulomb (medidas por par de interação) entre os peptídeos e a micela de SDS também foram investigadas nas simulações de REMD e são apresentadas na superfície de energia livre como função da distância entre os centros de massa dos peptídeos ou do número de resíduos em α -hélice (figura 4.1.10). Para as interações coulombianas (figuras 4.1.10 (a) Protonectinas puras e (b) Protonectina/Protonectina 1-6), verifica-se que um mínimo com características similares é observado para ambas as simulações, a diferença entre os sistemas ocorre no aparecimento do segundo mínimo observado na figura 4.1.10 (b) que apresenta a mesma energia de interação coulombiana, porém ocorre para a distância de aproximadamente 2,5nm entre os peptídeos de Protonectina e Protonectina 1-6. A figura 4.1.10 (c) é utilizada para comprovar que a interação mais favorável ocorre para a situação em que se tem o peptídeo de Protonectina da mistura com 6 a 7 resíduos em α -hélice. Para a interação de Lennard Jones entre os peptídeos e a micela, também é verificada a presença de dois mínimos

na situação da mistura de peptídeos (figura 4.1.10 (d)), enquanto que para as Protonectinas puras (figura 4.1.10 (c)) apenas um mínimo é observado. Além disso, os dois mínimos observados na figura 4.1.10 (d) encontram-se deslocados em relação à posição do mínimo da figura 4.1.10 (c), indicando que a interação de Lennard Jones entre a mistura de peptídeos e a micela é mais favorável se comparada com a situação em que se tem apenas Protonectinas.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos para as simulações das Protonectinas puras e Protonectina/Protonectina 1-6, indicam que as Protonectinas exibem tendência de agregação, que é diminuída pela presença da Protonectina 1-6. As simulações por REMD indicam que a associação das Protonectinas puras é mais favorável, considerando-se ligações por hidrogênio e energias de interação de Lennard Jones e Coulomb. O fato de a associação Protonectina/Protonectina 1-6 ser menos favorável influencia na distância entre os centros de massa destes peptídeos e no número de resíduos em alfa hélice que a Protonectina da mistura apresenta. Dessa forma a Protonectina da mistura de peptídeos exibe um maior conteúdo helicoidal e estruturação mais anfipática que as Protonectinas puras. Além disso, há uma provável interação entre os peptídeos da mistura com a micela de SDS quando estes se encontram dissociados que não é verificada para a situação de Protonectinas puras.

4.2 PEPTÍDEOS DE JELEÍNA I EM PH 5.5 E 7.0

As conformações iniciais colocadas na presença da micela de SDS para os peptídeos de Jeleína I em pH 5.5 ou 7.0 foram obtidas das simulações em água (capítulo 3, seção 3.2), nelas um par dos peptídeos de interesse estavam associados através de ligações por hidrogênio. As diferenças de pH foram produzidas pelas diferenças de protonação das histidinas presentes na Jeleína I, sendo em pH 5.5 todas protonadas e em pH 7.0 apenas 50% do total de histidinas presentes nos peptídeos foram protonadas.

Nesta seção serão apresentadas duas simulações (tabela 4.2.1), que foram realizadas através da montagem de caixas cúbicas contendo a micela de SDS pré-formada, o par de peptídeos de interesse, inseridos na região aquosa, paralelamente à superfície da micela e distantes de aproximadamente 2,5 nm do centro de massa da mesma, água e contra íons em quantidade suficiente. A diferença entre as duas simulações está na representação do pH simulado e seu objetivo consiste em ajudar a elucidar como a diferença no estado de protonação influencia na interação dos peptídeos com o mimético de membrana.

Tabela 4.2.1: Simulações dos Peptídeos de Jeleína I em pH 5.5 ou 7.0 na presença da micela de SDS

	Peptídeos Simulados	Aminoácidos Protonados	Carga líquida	pH representado	Tempo de Simulação (ns)
Simulação I	Jeleína I	N-terminal, Lys e His	+3	5.5	100
	Jeleína I	N-terminal, Lys e His	+3		
Simulação II	Jeleína I	N-terminal, Lys e His	+3	7.0	100
	Jeleína I	N-terminal, Lys	+2		

RESULTADOS

A distância entre o centro de massa dos peptídeos de Jeleína I e o centro de massa da micela de SDS como função do tempo de simulação é apresentada na figura 4.2.1, em (a) tem-se a simulação em pH 5.5 e em (b) pH 7.0. Nelas, a curva em azul exibe o raio de giro da micela, a cinza um dos peptídeos de Jeleína I e em preto o outro peptídeo de Jeleína I de cada simulação. As figuras mostram que em ambas as simulações os peptídeos se inserem na

micela de SDS. Sendo que em pH 5.5 eles permanecem ligeiramente mais próximos da interface com a água e em pH 7.0, aparentemente, se inserem um pouco mais no core hidrofóbico da micela.

A distância entre o centro de massa dos peptídeos em função do tempo de simulação também foi investigada e é apresentada na figura 4.2.2. Dela verifica-se que em pH 7.0 (cinza) a distância entre os centros de massa dos peptídeos é maior em relação ao pH 5.5 (preto).

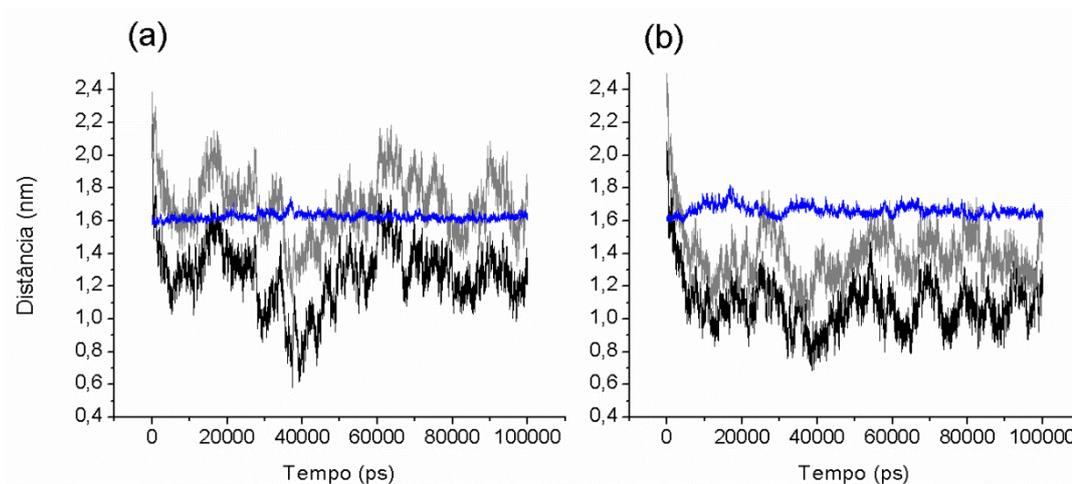


Figura 4.2.1: Distância entre o centro de massa dos peptídeos de Jeleína I e o centro de massa da micela de SDS como função do tempo de simulação. Em azul, raio de giro da micela, em preto um dos peptídeos de Jeleína I e em cinza o outro peptídeo de Jeleína I que constituem caixa de simulação. (a) pH 5.5 (b) pH 7.0.

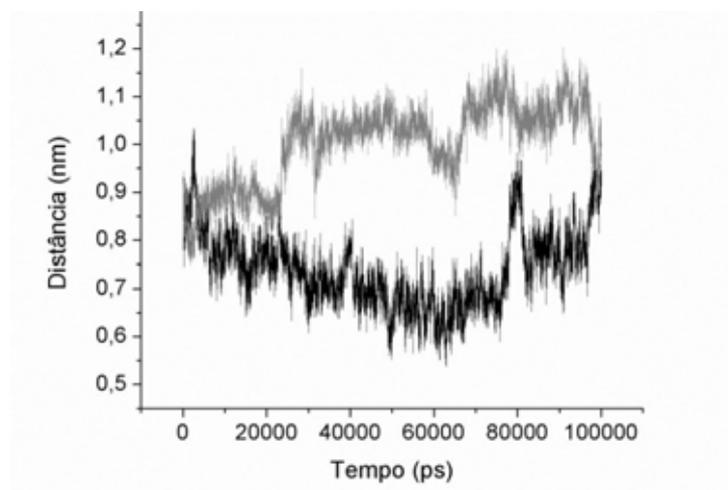


Figura 4.2.2: Distância entre o centro de massa dos peptídeos de Jeleína I como função do tempo de simulação. Em preto, simulação em pH 5.5 e em cinza, simulação em pH 7.0.

A distância máxima verificada entre o centro de massa dos peptídeos de Jeleína I é 1,2 nm para a simulação em pH 7.0, este valor não representa uma grande separação. Por isso ainda não se pode afirmar se os peptídeos permanecem associados ou se separam após a inserção na micela de SDS. As interações via ligações por hidrogênio entre os peptídeos podem auxiliar nesta investigação, por isso são apresentadas na figura 4.2.3. Desta figura verifica-se que não houve diminuição no número de ligações por hidrogênio entre os peptídeos, em ambas as simulações, após a inserção na micela. Além disso, a média temporal de ligações por hidrogênio em pH 5.5 (a) é $3,0 \pm 1,3$ e em pH 7.0 (b) é $3,3 \pm 1,3$, estes resultados indicam que as diferenças no pH não influenciam a interação entre os peptídeos por ligações de hidrogênio, na presença da micela de SDS, diferentemente do que foi observado em água (capítulo 3, seção 3.2).

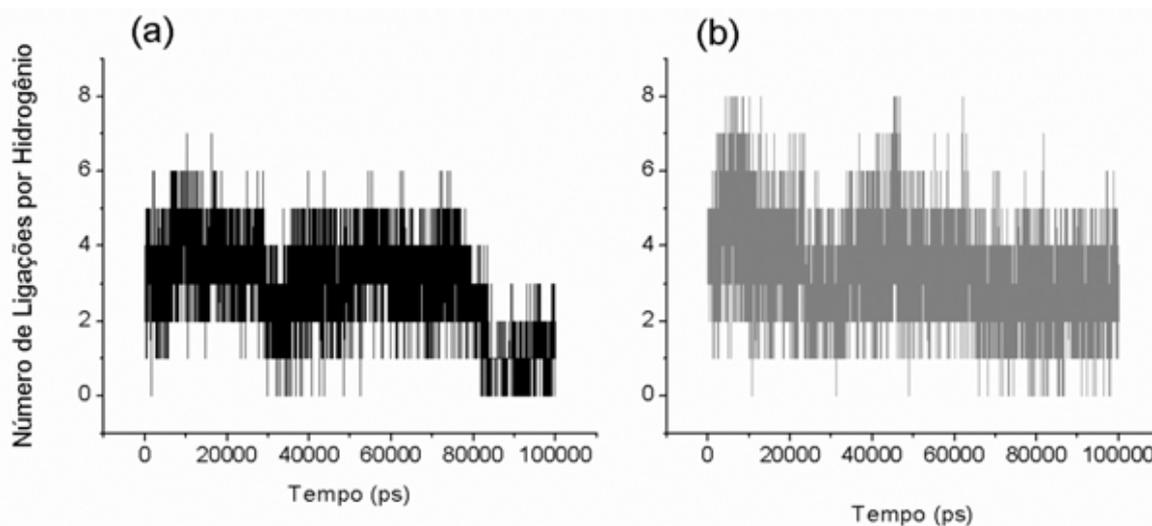


Figura 4.2.3: Número de ligações por hidrogênio em função do tempo de simulação, para as simulações em micela de SDS. (a) pH 5.5. (b) pH 7.0.

A soma das Energias de Interação de Lennard Jones e Coulomb entre os peptídeos de Jeleína I para as simulações em pH 5.5 (preto) e 7.0 (cinza) é apresentada na figura 4.2.4. Dela é possível perceber que as energias de interação entre os peptídeos na simulação em pH 7.0 (cinza) são ligeiramente mais favoráveis que os mesmos termos para a simulação em pH 5.5 (preto), isso pode ser consequência do fato de que em pH 7.0 têm-se uma carga a menos em um dos peptídeos de Jeleína I em relação ao pH 5.5 e essa menor quantidade de carga causa uma menor repulsão eletrostática entre as moléculas de peptídeo, favorecendo ligeiramente as interações de Lennard Jones e Coulomb.

A figura 4.2.5 exibe a soma das Energias de Interação de Lennard Jones e Coulomb entre os peptídeos de Jeleína I e a micela de SDS para as simulações em pH 5.5 (preto) e pH 7.0 (cinza). Não são verificadas diferenças significativas devido as diferenças de pH das simulações. Embora na situação estudada, não se observa grandes alterações nas energias de interação entre peptídeos e micela devido as diferenças de protonação causadas pelo pH do meio, num sistema real, no qual se tem da ordem de 10^{23} moléculas, a interação de Coulomb, responsável pela atração eletrostática entre peptídeo e membrana pode ser afetada resultando numa menor eficiência biológica para o peptídeo.

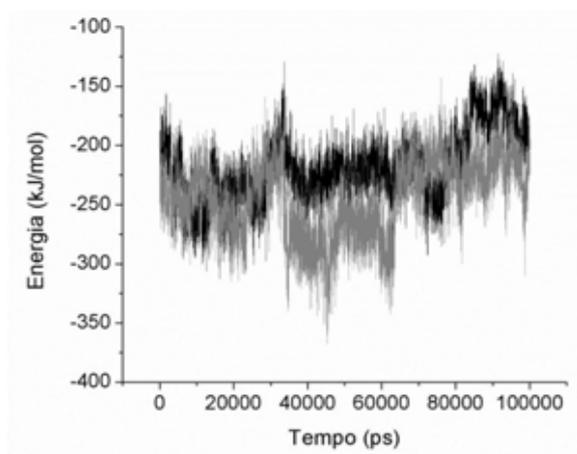


Figura 4.2.4: Soma das energias de interação de Lennard Jones e Coulomb entre os peptídeos de Jeleína I na presença da micela de SDS. Em preto, para peptídeos da simulação em pH 5.5 e em cinza, para peptídeos da simulação em pH 7.0.

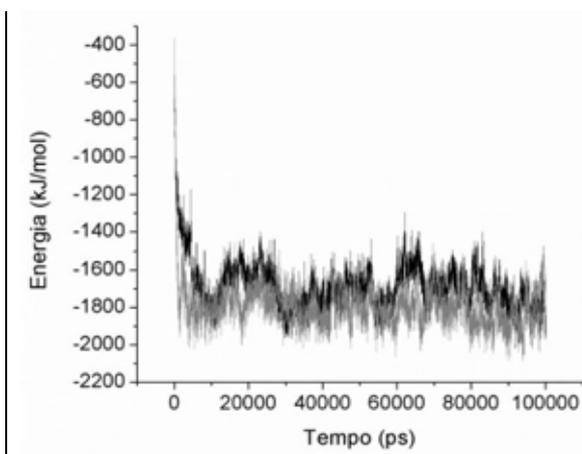


Figura 4.2.5: Soma das energias de interação de Lennard Jones e Coulomb entre os peptídeos de Jeleína I e a micela de SDS. Em preto, para peptídeos da simulação em pH 5.5 e em cinza, para peptídeos da simulação em pH 7.0.

As energias de interação de Coulomb entre os resíduos de aminoácido carregados presentes nos peptídeos de Jeleína I e a micela de SDS foram investigadas e são apresentadas na figura 4.2.6. Análise anterior (figura 4.2.1) exibiu que os peptídeos de Jeleína I se inserem na micela de forma paralela, com um dos peptídeos mais inserido e o outro mais superficialmente (próximo do raio de giro) à micela, por isso o cálculo das Energias de Interação de Coulomb entre os resíduos de aminoácidos carregados e a micela de SDS foi realizado para cada peptídeo separadamente e esta apresentada na figura 4.2.6, sendo (a), (c), (e) para os peptídeos mais inseridos na micela e (b), (d), (f) para os peptídeos mais externos ao centro de massa da micela, e preto representando o pH 5.5 e cinza o pH 7.0. Da figura verifica-se que o pH e a posição dos peptídeos em relação ao centro de massa da micela não

geram diferenças nos valores para as energias de interação de Coulomb das Prolinas e Lisinas, figuras 4.2.6 (a) e (b) e figuras 4.2.6 (c) e (d), respectivamente. Quando se observa a interação entre as Histidinas e a micela de SDS (figuras 4.2.6 (e) e (f)) observa-se que, para o peptídeo mais próximo do centro de massa da micela (figura 4.2.6 (e)) na qual a Histina se encontra protonada em ambas as simulações (pH 5.5 ou 7.0), não há alterações dos valores observados devido as diferenças de pH. Já para a situação da figura 4.2.6 (f) na qual a Histidina do peptídeo de Jeleína I encontra-se protonada em pH 5.5 (preto) e desprotonada em pH 7.0 (cinza) verifica-se que o estado de desprotonação da Histidina desfavorece a energia de interação Coulombiana desta com a micela de SDS. Além disso, se forem comparadas as figuras 4.2.6 (e) e (f) identifica-se que a posição dos peptídeos em relação ao centro de massa da micela também influencia a interação, de forma que as Histidinas dos peptídeos mais distantes do centro de massa da micela (figura 4.2.6 (f)) têm sua Energia de Interação de Coulomb desfavorecida em relação aos peptídeos mais próximos do centro de massa da micela (figura 4.2.6 (e)).

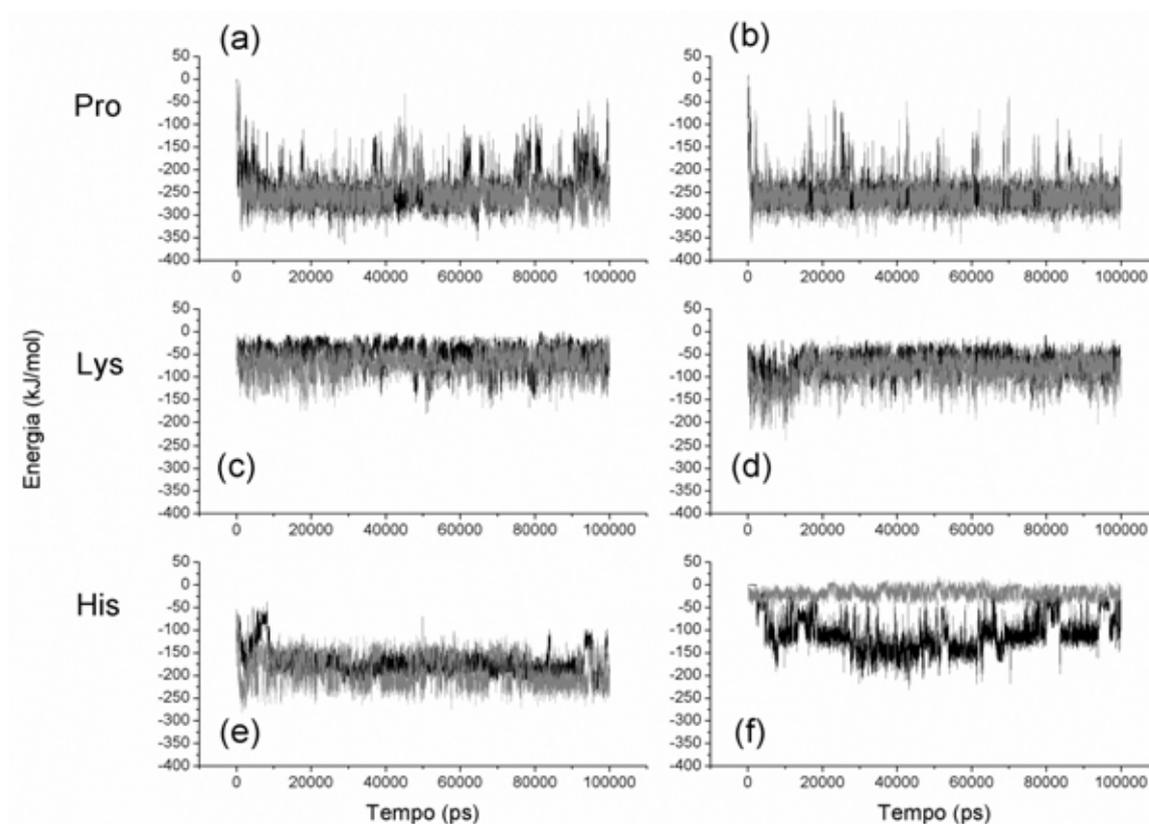


Figura 4.2.6: Energia de interação de Coulomb entre os aminoácidos carregados dos peptídeos de Jeleína I e a micela de SDS nas simulações em pH 5.5 (preto) e 7.0 (cinza). (a) resíduo de Prolina do peptídeo mais próximo do centro de massa da micela. (b) resíduo de Prolina do peptídeo mais distante do centro de massa da micela. (c) resíduo de Lisina do peptídeo mais próximo do centro de

massa da micela. **(d)** o resíduo de Lisina do peptídeo mais distante do centro de massa da micela. **(e)** resíduo de Histidina do peptídeo mais próximo do centro de massa da micela. **(f)** resíduo de histidina do peptídeo mais distante do centro de massa da micela.

O perfil de estrutura secundária em função do tempo de simulação para as simulações em pH 5.5 e 7.0 são apresentados na figura 4.2.7. Dela, observa-se que em pH 7.0 **(a)** os peptídeos se apresentam em conformação aleatória e em pH 5.5 **(b)** os peptídeos apresentam alguns padrões em folha beta. As simulações em água (capítulo 3, seção 3.2) para 2 peptídeos apresentam padrões que são praticamente o contrário do observado nesta situação, pois em água os peptídeos em pH 7.0 organizam-se com um maior número de resíduos em folha beta que os peptídeos em pH 5.5. Na situação em que se tem a presença da micela de SDS, observa-se a organização numa estrutura mais anfipática dos peptídeos em pH 5.5 **(b)**. Estes resultados estão em boa concordância com dados experimentais obtidos através de experimentos de dicroísmo circular (DOS SANTOS CABRERA et al, 2014)

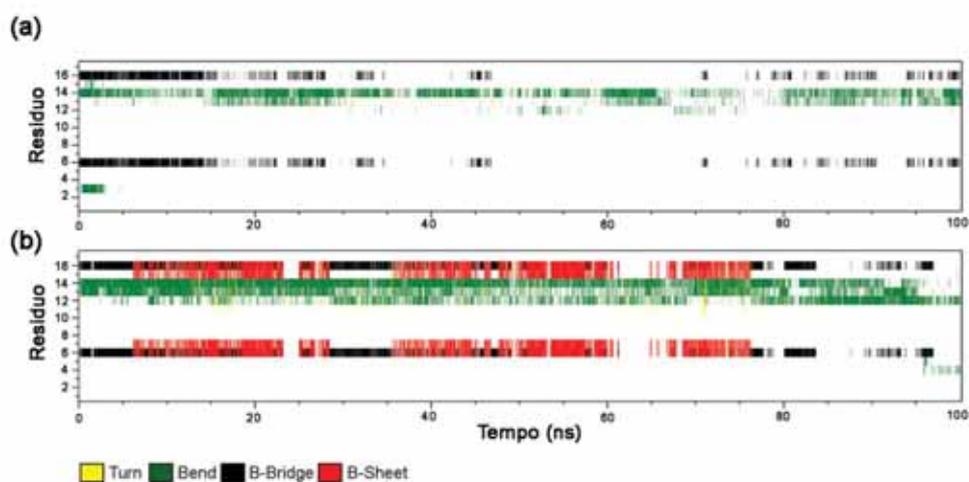


Figura 4.2.7: Padrões de estrutura secundária em função do tempo de simulação para os peptídeos de Jeleína I nas simulações em pH 7.0 **(a)** e 5.5 **(b)**. No eixo vertical é apresentado o número de resíduos de aminoácidos presentes na caixa de simulação. Note que este número é contínuo, sendo que de 1 a 8 têm se a representação de um dos peptídeos de Jeleína I e de 9 a 16 o outro peptídeo. No eixo x pode-se acompanhar o tempo de evolução das simulações.

A distribuição radial de pares dos grupos sulfato das moléculas que compõem a micela de SDS em torno da Histidina presente nos peptídeos de Jeleína I que se encontram mais distantes do centro de massa da micela foi calculada e é apresentada na figura 4.2.8. Dela verifica-se que em pH 5.5 (preto) há uma maior probabilidade de se encontrar as cabeças

polares da micela de SDS em torno da histidina do peptídeo, evidenciando novamente que o pH 7.0 (cinza) desfavorece a interação eletrostática entre o peptídeo e a micela de SDS.

As conformações finais obtidas pelos peptídeos de Jeleína I na presença da micela de SDS após 100ns de simulação são apresentadas na figura 4.2.9. Em magenta são apresentados os peptídeos mais distantes e em verde os peptídeos mais próximos do centro de massa da micela de SDS. Da figura verifica-se que em ambas as simulações os peptídeos se inserem paralelamente à superfície da micela, e que aparentemente os peptídeos em pH 5.5 (b) causam uma maior perturbação na estabilidade da micela, tornando-a menos esférica.

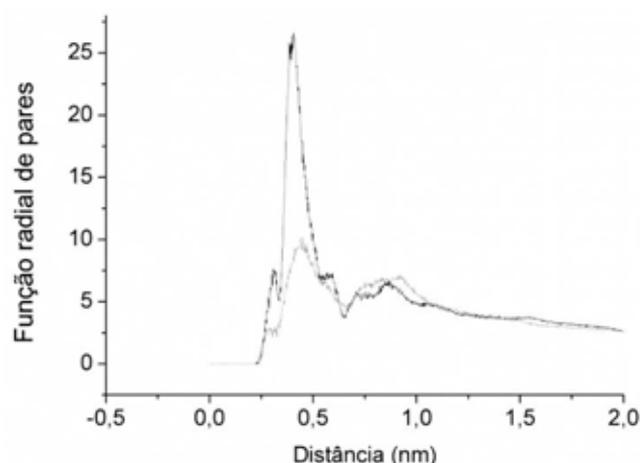


Figura 4.2.8: Função de distribuição radial dos grupos sulfato (SO_4) das moléculas de SDS em torno dos resíduos de aminoácidos de histidina dos peptídeos de Jeleína I que se encontram mais próximos da interface aquosa. pH 5.5 (preto) e pH 7.0 (cinza).

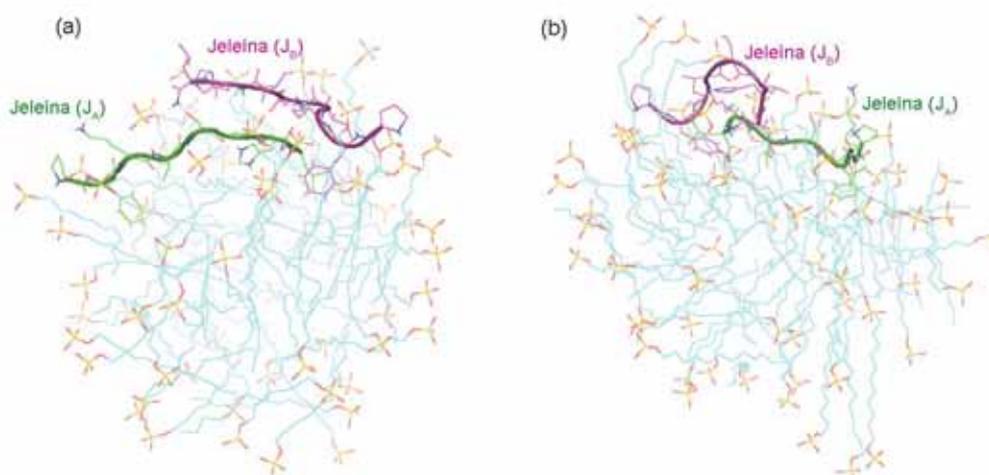


Figura 4.2.9: Conformações obtidas após 100ns de simulação dos peptídeos de Jeleína I na presença da micela de SDS. A cadeia alquílica das moléculas de SDS é apresentada em azul e o grupo sulfato,

que constitui a parte polar destas moléculas, esta representado em tons de laranja e vermelho. Em verde, têm - se a molécula de Jeleína I mais próxima do centro de massa da micela e em magenta a outra, que se encontra mais distante do centro de massa da micela. (a) simulação em pH 7.0. (b) simulação em pH 5.5.

CONCLUSÕES

A inserção dos peptídeos de Jeleína I na micela de SDS parece não atrapalhar as interações intermoleculares entre eles, pois mesmo depois de inseridos na micela os peptídeos permanecem associados através de ligações por hidrogênio. As diferenças no estado de protonação das Histidinas presentes nas moléculas de Jeleína I influenciam nas interações eletrostáticas entre estes aminoácidos e a micela de SDS de forma que o pH 7.0 desfavorece a atração eletrostática entre esse aminoácido e a micela. Os peptídeos que foram simulados em pH 5.5 apresentam, na presença da micela de SDS e no período simulado, conformações estruturais anfipáticas, enquanto que em pH 7.0 os peptídeos não adotam nenhuma forma de estrutura anfipática. Pela figura 4.2.9 verifica-se que, no fim das simulações, os peptídeos da simulação em pH 5.5 causaram um maior desarranjo da micela se comparados com a simulação em pH 7.0, demonstrando maior interação destes com o mimético de membrana.

4.3. PEPTÍDEOS DE JELEÍNA I, II, III E IV PUROS

Para a realização das simulações que serão apresentadas nesta seção, conformações com os pares de peptídeos de Jeleínas I, II, III ou IV puras obtidas de simulações prévias em água (capítulo 3, seção 3.3) foram colocados na presença de micela de SDS, paralelamente á sua superfície e distante de aproximadamente 2,5 nm de seu centro de massa. Águas em quantidade suficiente para garantir a densidade e contra íons para neutralização da caixa foram adicionados. Cada um dos sistemas foi simulado por 100ns e neles, todos os grupos plausíveis de protonação foram protonados (pH 5.5), sendo eles o N-terminal, as lisinas, histidinas e ácido glutâmico. Tais simulações são nomeadas de SI_{SDS} para Jeleínas I, SII_{SDS} para as Jeleínas II, $SIII_{SDS}$ para as Jeleínas III e SIV_{SDS} para as Jeleínas IV (tabela 4.3.1).

O objetivo destas simulações é identificar de que maneira as diferenças sequencias destes peptídeos influenciam nas interações com o meio mimético de membrana, buscando entender as diferenças observadas nas atividades biológicas destes peptídeos (FONTANA et al, 2004).

Tabela 4.3.1: Simulações dos peptídeos de Jeleína I, II, III e IV, puros na presença da micela de SDS

Simulação	Peptídeos simulados	Sequência Primária	Tempo de simulação (ns)
SI_{SDS}	2 moléculas de Jeleína I	Pro-Phe-Lys-Leu-Ser-Leu-His-Leu-NH ₂	100
SII_{SDS}	2 moléculas de Jeleína II	Thr-Pro-Phe-Lys-Leu-Ser-Leu-His-Leu-NH ₂	100
$SIII_{SDS}$	2 moléculas de Jeleína III	Glu-Pro-Phe-Lys-Leu-Ser-Leu-His-Leu-NH ₂	100
SIV_{SDS}	2 moléculas de Jeleína IV	Thr-Pro-Phe-Lys-Leu-Ser-Leu-His-NH ₂	100

RESULTADOS

A primeira análise a ser realizada consiste em identificar se os peptídeos de Jeleína se inserem na micela de SDS. Para isso a distância entre o centro de massa dos peptídeos e o centro de massa da micela em função do tempo de simulação foi calculada e é apresentada na figura 4.3.1 (a), na qual a curva em preto representa a simulação das Jeleínas I, a curva em vermelho as Jeleínas II, a curva em verde as Jeleínas III e a curva em azul as Jeleínas IV. Considerando que o raio de giro da micela de SDS corresponde a aproximadamente 1,9nm,

verifica-se por esta figura que os peptídeos se inserem rapidamente na micela (aproximadamente 5ns) e permanecem inseridos à distância de aproximadamente 1,5nm de seu centro de massa. Pode-se perceber que os peptídeos oscilam em torno da distância de 1,5nm, por isso a distribuição das posições ocupadas pelos peptídeos durante toda a simulação foi calculada e é apresentada na figura 4.3.1 (b). Dela, verifica-se que as Jeleínas II (vermelho) não apresentam uma posição preferencial em relação ao centro de massa da micela de SDS para o período simulado, pois a distribuição não possui um único ponto de máximo bem definido, tal como ocorre para as demais Jeleínas. Ao se observar a distribuição para as Jeleínas I, III e IV percebe-se que I e III apresentam-se mais inseridas na estrutura da micela de SDS se comparadas com a Jeleína IV. No entanto a Jeleína I está um pouco mais próxima do centro de massa da micela do que a Jeleína III, observe que os picos estão ligeiramente deslocados.

Verificou-se das simulações em água (capítulo 3, seção 3.3) que, neste ambiente, os pares de Jeleína se aproximam e associam-se através de ligações por hidrogênio. Para identificar se os diferentes peptídeos de Jeleína permanecem próximos um do outro e mantêm as interações via pontes de Hidrogênio na presença da micela de SDS, as figuras 4.3.2 e 4.3.3 foram plotadas. Na figura 4.3.2 têm-se a distância entre o centro de massa dos peptídeos de Jeleína em função do tempo de simulação, sendo em preto para Jeleína I, em vermelho para Jeleína II, em verde para Jeleína III e em azul para Jeleína IV. Desta figura verifica-se que os peptídeos de Jeleína I (preto) e III (verde) são os que permanecem mais próximos durante toda a simulação, enquanto que os peptídeos de Jeleína II e IV afastam-se logo nos primeiros instantes mantendo-se a distancia de aproximadamente 1,2nm durante todo o resto da simulação.

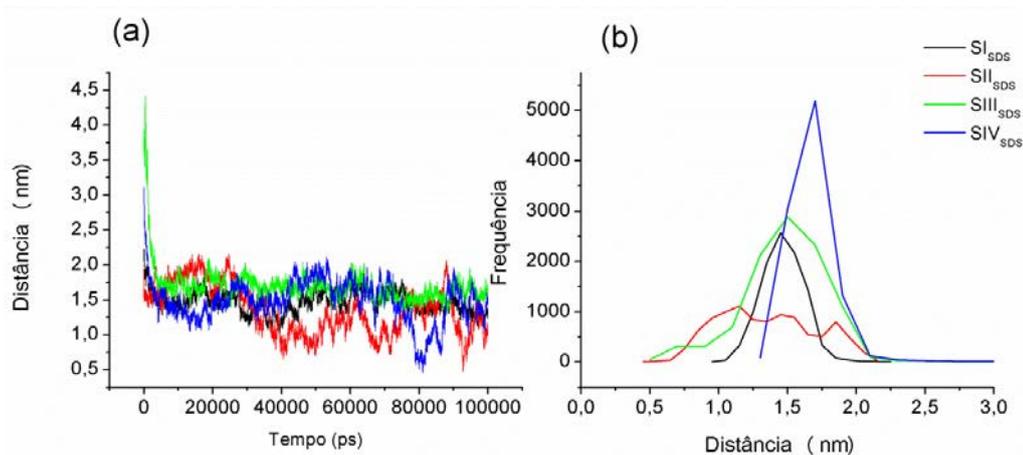


Figura 4.3.1: (a) Distância entre o centro de massa dos peptídeos de Jeleína e o centro de massa da micela de SDS como função do tempo de simulação. (b) Histograma da posição dos peptídeos em relação ao centro de massa da micela. Em preto, simulação do par de Jeleínas I, em vermelho, Jeleínas II, em verde, Jeleínas III e em azul, Jeleínas IV.

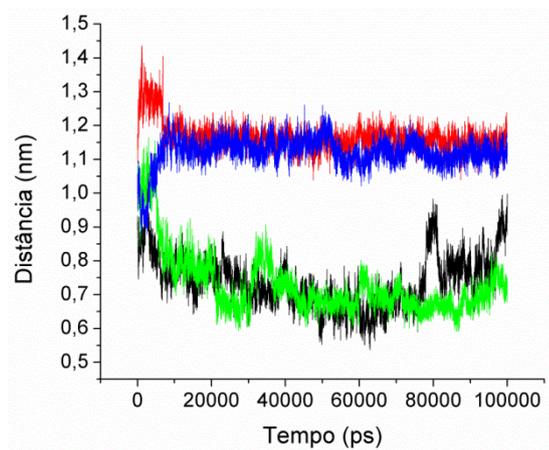


Figura 4.3.2: Distância entre o centro de massa dos peptídeos de Jeleína em função do tempo de simulação. Em preto, simulação das Jeleínas I, em vermelho Jeleínas II, em verde Jeleínas III e em azul Jeleínas IV.

A figura 4.3.3 mostra as ligações por hidrogênio formadas entre os peptídeos de Jeleína em função do tempo de simulação. Dela verifica-se que em todas as situações os peptídeos permanecem associados via ligações por hidrogênio. Os peptídeos de Jeleína I (figura 4.3.3 (a)) associam-se através de um número maior de pontes de hidrogênio (em média 3 ligações) que os demais peptídeos, sendo 1,4 ligações entre as Jeleínas II (b), 1,8 ligações entre as Jeleínas III (c) e 2,2 ligações entre as Jeleínas IV (d).

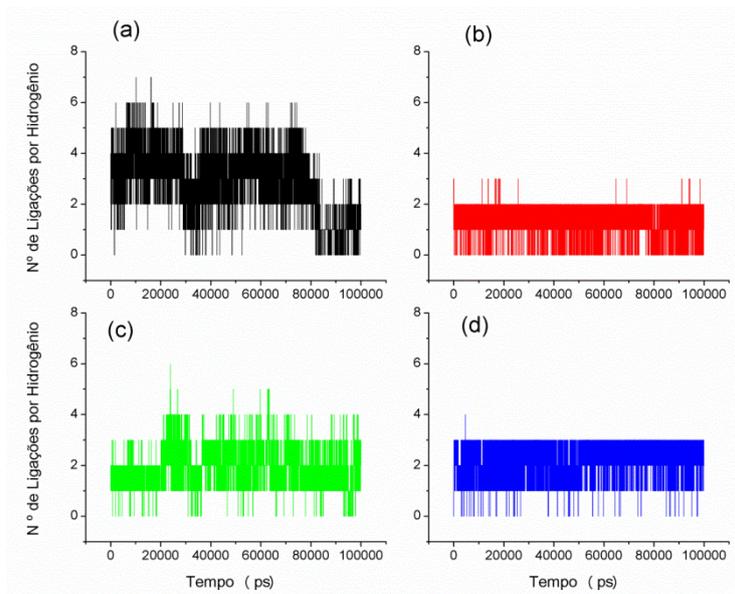


Figura 4.3.3: Número de ligações por hidrogênio entre os peptídeos de Jeleína como função do tempo de simulação. (a) Simulação das Jeleínas I. (b) Jeleínas II. (c) Jeleínas III. (d) Jeleínas IV.

Os grupos que formam as pontes por hidrogênio entre estes peptídeos foram investigados e são apresentados nas tabelas 4.3.2, 4.3.3, 4.3.4 e 4.3.5. Nestas tabelas J_A e J_B representam as duas moléculas de Jeleína presentes em cada simulação. **O** representa o átomo de oxigênio aceitador da cadeia principal do resíduo de aminoácido analisado, **NH** representa o grupo nitrogênio-hidrogênio doador da cadeia principal de um dado resíduo, **ND** e **NE** representam os nitrogênios doadores da cadeia lateral dos resíduos de histidina, **OE1** e **OE2** representam os oxigênios aceitadores da cadeia lateral dos resíduos de Glutamina das Jeleínas III, **OH** representa o oxigênio doador da cadeia lateral do resíduo de Serina e **NZ** representa o nitrogênio doador da cadeia lateral dos resíduos de Lisina. Os resultados mostram que as ligações de hidrogênio que haviam entre as Jeleínas I, III ou IV na água são conservadas na presença da micela de SDS. Para as Jeleínas II, as ligações observadas não estavam presentes em água. Além disso, verifica-se que as ligações de hidrogênio entre as Jeleínas I ocorrem predominantemente entre os resíduos que compõem a cadeia principal destes peptídeos, enquanto que para as Jeleínas II, III e IV algumas das ligações por hidrogênio são formadas entre grupos constituintes das cadeias laterais dos peptídeos.

Tabela 4.3.1: Ligações por hidrogênio entre os peptídeos de Jeleína I

Grupo	Porcentagem de Permanência (%)
O Ile6 (J_A) – NH His7 (J_B)	79
O Ile4 (J_A) – NH C-terminal (J_B)	40
NH Ile 6 (J_A) – O His7 (J_B)	69

Tabela 4.3.2: Ligações por hidrogênio entre os peptídeos de Jeleína II

Grupo	Porcentagem de Permanência (%)
O Ile5 (J _A) – NH His8 (J _B)	54
NE2 His8 (J _A) – O Ser6 (J _B)	80

Tabela 4.3.3: Ligações por hidrogênio entre os peptídeos de Jeleína III

Grupo	Porcentagem de Permanência (%)
OE1 Glu1 (J _B) – NE His8 (J _A)	28%
OE2 Glu1 (J _B) – NE His8 (J _A)	34%
OE2 Glu1 (J _A) – ND His8 (J _B)	26%
OE1 Glu1 (J _A) – ND His8 (J _B)	11%
O Ile7 (J _A) – NE2 His8 (J _B)	13%
OH Ser6 (J _A) – O Ile5 (J _B)	17%

Tabela 4.3.4: Ligações por hidrogênio entre os peptídeos de Jeleína IV

Grupo	Porcentagem de Permanência (%)
O His8 (J _A) – NZ Lys4 (J _B)	18%
O Ser6 (J _A) – NH Ile7 (J _B)	92%
NH His8 (J _A) – O Phe3 (J _B)	80%

As contribuições de Lennard Jones (cinza) e Coulomb (preto) para as energias de interação entre os peptídeos foram investigadas e são apresentadas na figura 4.3.4. Desta figura percebe-se que a energia de interação de Coulomb entre os peptídeos Jeleínas I (-65 ± 20 kJ/mol), Jeleínas II (-33 ± 10 kJ/mol) e Jeleínas IV (-46 ± 11 kJ/mol) são menos favoráveis que para a Jeleínas III (-115 ± 29 kJ/mol). Tal fato, possivelmente é consequência da carga líquida dos peptídeos em estudo, pois cada peptídeo de Jeleína III têm duas cargas positivas e uma negativa, o que favorece a atração eletrostática entre estes peptídeos em relação aos demais que só apresentam cargas positivas. Ainda que com diferença menor, verifica-se que a interação eletrostática entre os peptídeos de Jeleínas I é ligeiramente mais favorável se comparada com os peptídeos de Jeleínas II e IV. Ao analisar os resultados da energia de

interação de Lennard Jones entre os peptídeos, observa-se que a interação entre os peptídeos de Jeleínas I (-153 ± 18 kJ/mol) e Jeleínas III (-133 ± 18 kJ/mol) são mais favoráveis se comparadas com as demais, nas quais se tem -73 ± 7 kJ/mol para as Jeleínas II e -84 ± 9 kJ/mol para as Jeleínas IV, evidenciando, novamente, a estabilidade das ligações por hidrogênio entre as Jeleínas I.

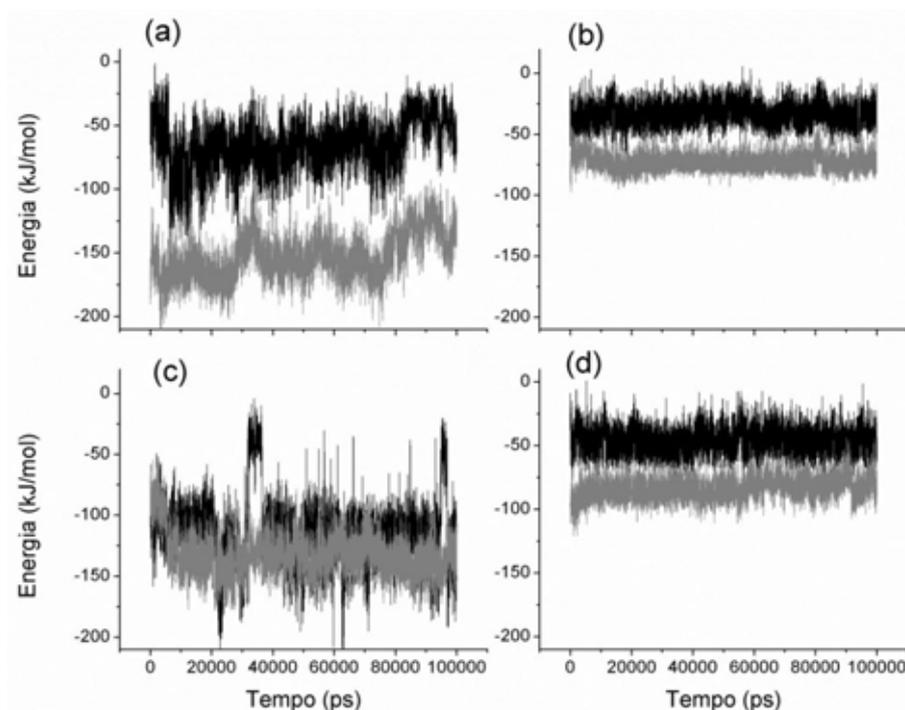


Figura 4.3.4: Contribuição de Lennard Jones (cinza) e Coulomb (preto) para a energia de interação entre os peptídeos de Jeleína em função do tempo de simulação. (a) Jeleínas I. (b) Jeleínas II. (c) Jeleínas III. (d) Jeleínas IV.

As contribuições de Coulomb (preto) e Lennard Jones (cinza) para as energias de interação de entre os peptídeos de Jeleína I, II, III ou IV e a micela de SDS são apresentadas na figura 4.3.5. Dela verifica-se que a interação de Coulomb entre as Jeleínas I e a micela de SDS é a mais favorável (-1029 ± 95 kJ/mol) dentre as interações Coulombianas observadas. As interações de Coulomb entre as Jeleínas II (-801 ± 83 kJ/mol), III (-543 ± 113 kJ/mol) e IV (-683 ± 105 kJ/mol) e a micela de SDS são praticamente iguais, pois a diferença entre seus valores médios encontra-se dentro da faixa de erro. A Jeleína III é a que apresenta a menor atração eletrostática com a micela de SDS, tal fato possivelmente pode ser atribuído à presença do resíduo de Glutamina em sua sequência, pois este apresenta uma carga negativa, o que pode estar causando a diminuição deste termo de atração. Uma vez que este peptídeo apresenta carga negativa esta pode ser repelida pelas cargas negativas das cabeças polares da

micela de SDS, diminuindo a atração eletrostática entre ambos. As energias de interação de Lennard Jones entre os peptídeos estudados e a micela de SDS não apresentam diferenças significativas durante o intervalo de tempo simulado.

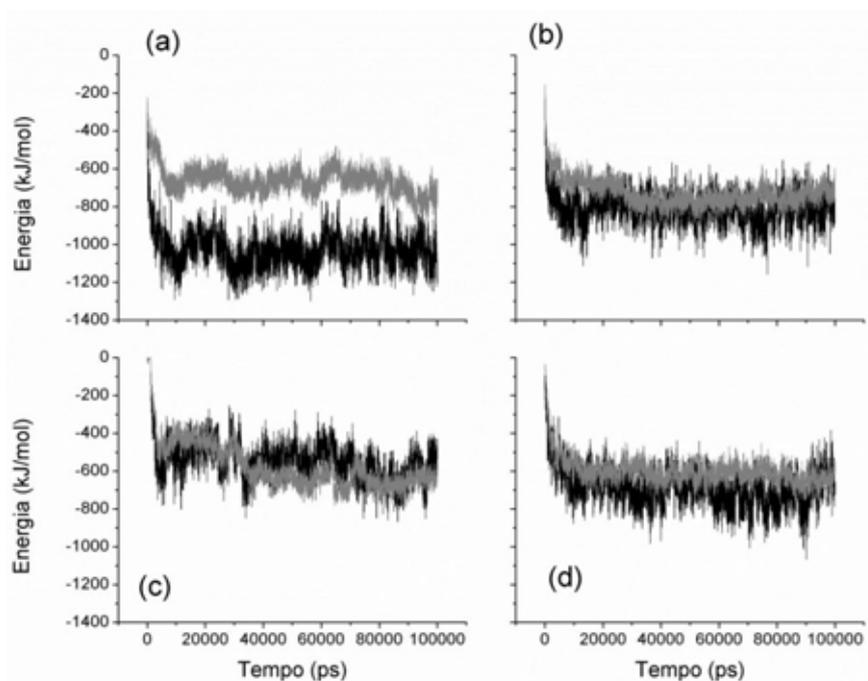


Figura 4.3.5: Contribuição de Coulomb (preto) e Lennard Jones (cinza) para a energia de interação entre os peptídeos de Jeleína e a micela de SDS em função do tempo de simulação. (a) Jeleínas I. (b) Jeleínas II. (c) Jeleínas III. (d) Jeleínas IV.

A contribuição de Coulomb nas energias de interação entre os aminoácidos carregados que constituem cada um dos peptídeos de cada simulação e a micela de SDS foi calculada e o resultado é apresentado na figura 4.3.6. Nela as curvas em preto e cinza têm-se representam os resíduos carregados que se encontram no N-terminal dos peptídeos, as curvas em azul e ciano representam os aminoácidos de Lisina e as curvas em magenta e rosa claro representam os aminoácidos de Histidina. A análise desta figura nos permite verificar que no caso das Jeleínas I (figura 4.3.6 (a)), as interações eletrostáticas entre seus grupos carregados e a micela de SDS apresentam diferenças entre si, sendo as Prolinas (carregadas por se encontrarem no N-terminal) os aminoácidos com as interações eletrostáticas mais favoráveis com a micela, seguidas pelas Histidinas e por fim as Lisinas. Quando as demais Jeleínas são observadas, percebe-se que nesses casos, todos os grupos carregados apresentam praticamente as mesmas energias de interação Coulombiana, que por sua vez são menos atrativas que as

Prolinas das Jeleínas I. Estes resultados indicam que a Prolina na primeira posição do peptídeo de Jeleína é importante para a interação eletrostática entre ele e a micela de SDS, pois torna mais favorável esta interação.

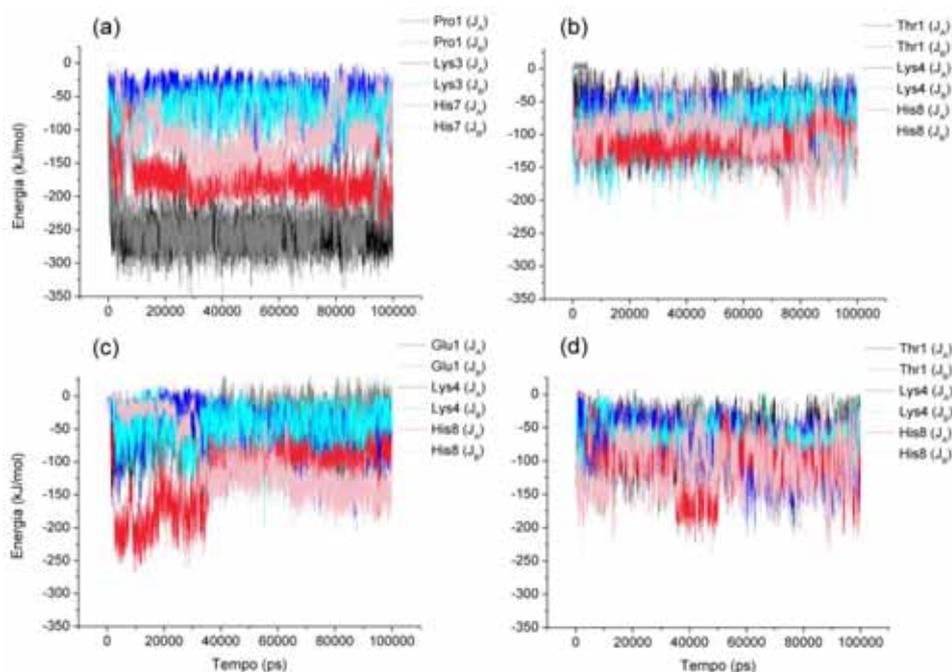


Figura 4.3.6: Contribuição de Coulomb para as energias de interação entre cada um dos aminoácidos carregados dos peptídeos de Jeleína e a micela de SDS em função do tempo de simulação. **(a)** Jeleínas I. **(b)** Jeleínas II. **(c)** Jeleínas III. **(d)** Jeleínas IV.

Os padrões de estrutura secundária adotadas pelos peptídeos na presença da micela de SDS são apresentados na figura 4.3.7. Dela é possível verificar que as Jeleínas I apresentam padrões em folha beta durante a maior parte do tempo de simulação. Um dos peptídeos de Jeleína II e também Jeleína III apresenta-se em alfa hélice durante praticamente toda a simulação, enquanto que os outros assumem conformações em voltas (turns) e aleatórias (coil), respectivamente. As Jeleínas IV, que em água apresentaram-se praticamente em coil, assumem conformações em B-bridge com Turn.

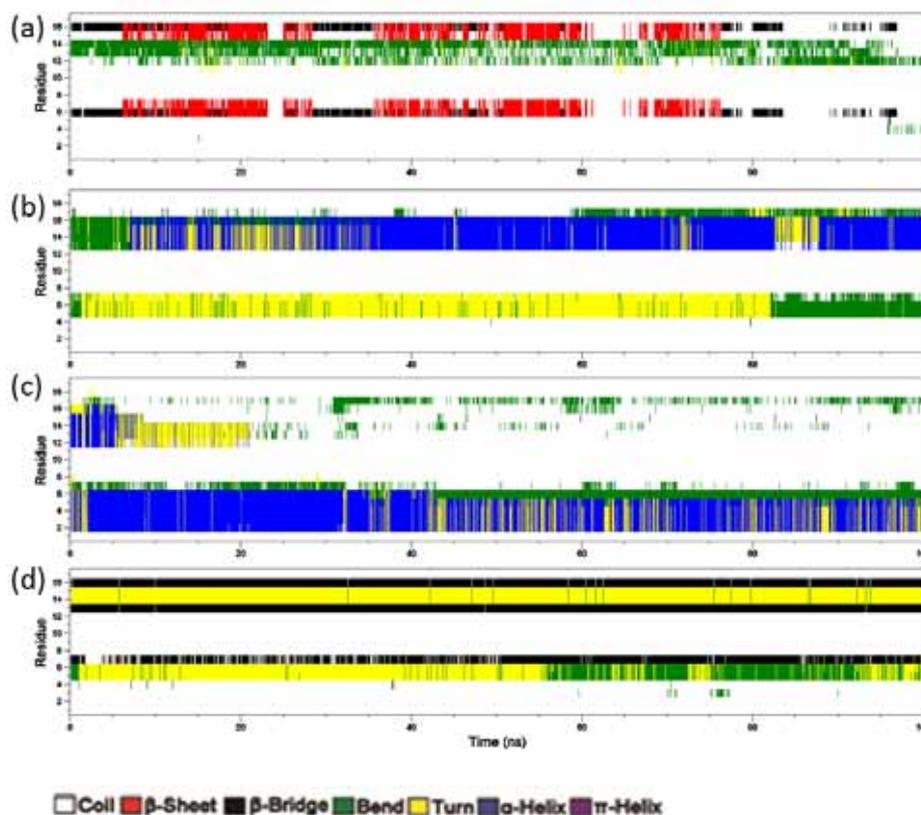


Figura 4.3.7: Padrões de estrutura secundária para os peptídeos nas simulações na presença da micela de SDS. **(a)** Jeleína I. **(b)** Jeleína II. **(c)** Jeleína III. **(d)** Jeleína IV. No eixo vertical é apresentado o número de resíduos de aminoácidos presentes na caixa de simulação. No eixo x pode-se acompanhar o tempo de evolução das simulações.

A função de distribuição radial de pares em torno dos resíduos do N-terminal dos peptídeos de Jeleína em função dos grupos de Sulfato da molécula de SDS e das moléculas de água é apresentada na figura 4.3.8 (a) e (b), respectivamente. Da figura verifica-se que a Prolina (preto) é o resíduo que exhibe a maior probabilidade de apresentar grupos de sulfato ao seu redor, mais um indicativo de que sua interação com a micela de SDS é mais favorável que as interações dos demais resíduos de aminoácidos com a micela. Uma possível explicação para o fato da interação entre a Jeleína I e a micela de SDS ser mais favorável é que a Prolina é um resíduo hidrofóbico, enquanto que a Thr (presente Jeleínas II e IV) é polar e a Glu (presente na Jeleína III) é carregada negativamente, o que causa menor interação de Coulomb com grupos carregados, como por exemplo, as cabeças polares da micela de SDS. Grupos hidrofóbicos tendem a se proteger das moléculas de água, enquanto que os polares e carregados interagem bem com a água, tal fato pode ser confirmado pela distribuição radial de moléculas de água em torno destes resíduos (figura 4.3.8 (b)), na qual se percebe que

praticamente não há água em torno da Prolina (preto), enquanto que para os demais se observa um pico em torno de 0,2 nm.

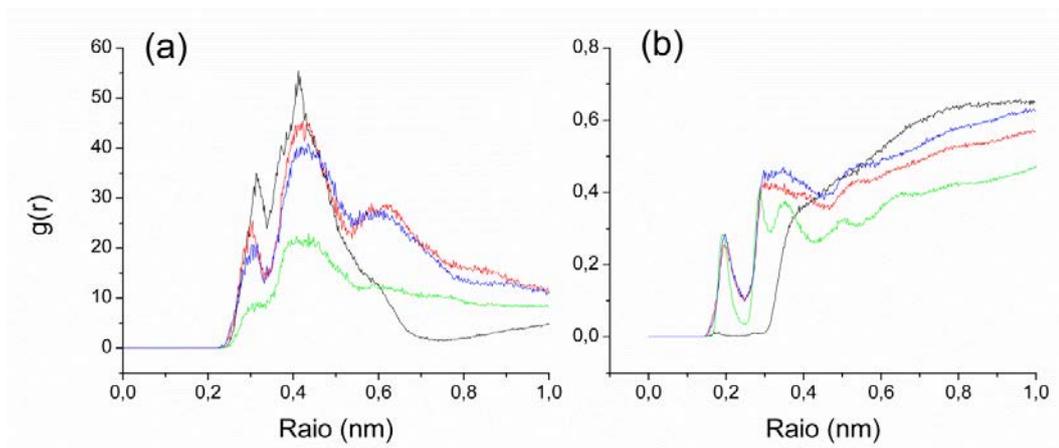


Figura 4.3.8: Função de distribuição radial de pares em torno do N-terminal dos peptídeos de Jeleína. (a) Grupos sulfato. (b) Moléculas de água. Prolina, da Jeleína I em preto, Treonina da Jeleína II em vermelho, Glutamina da Jeleína III em verde e por fim Treonina da Jeleína IV em azul.

A figura 4.3.9 exibe as conformações finais apresentadas pelos peptídeos de Jeleína I, II, III e IV na presença da micela de SDS. Dela verifica-se que, em todos os casos, os peptídeos estão inseridos na micela, no entanto conclusões a respeito da interação com o meio mimético de membrana não podem ser formuladas a partir da figura.

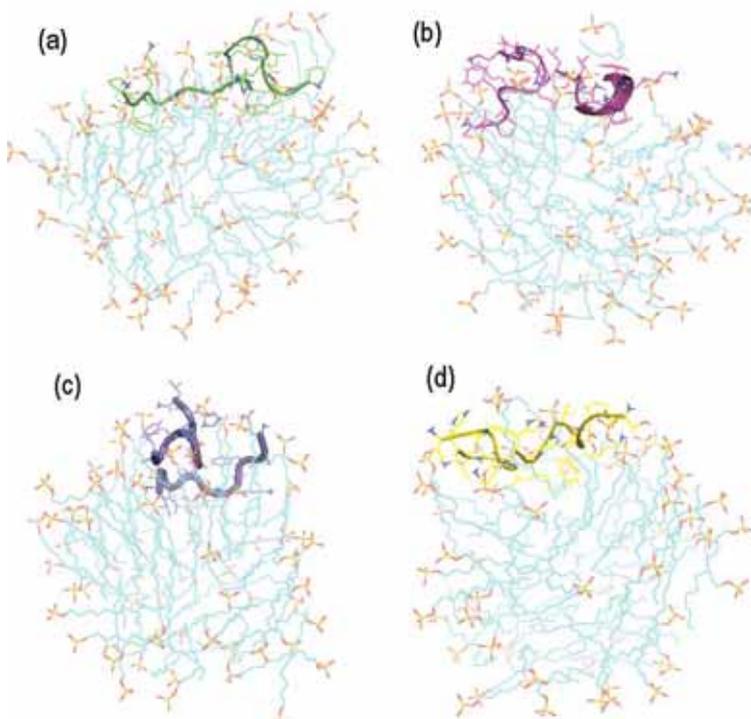


Figura 4.3.9: Conformações obtidas após 100ns de simulação dos peptídeos de Jeleína na presença da micela de SDS. A cadeia alquílica das moléculas de SDS é apresentada em azul e seu grupo sulfato, que constitui a parte polar destas moléculas, esta representado em tons de laranja e vermelho. (a) Jeleínas I. (b) Jeleínas II. (c) Jeleínas III. (d) Jeleínas IV.

CONCLUSÕES

Dos peptídeos estudados nesta seção, verificou-se que o conjunto de Jeleínas I é o que mais se insere na micela de SDS, além disso, a interação entre os peptídeos e entre os peptídeos e a micela é a mais favorável se comparada com as demais sequências. Além disso, Simulações por Dinâmica Molecular sugerem que o resíduo de Pro1 é provavelmente o determinante para mais eficiente atividade antimicrobiana da JI em relação às demais, adicionalmente, foi verificado que a Prolina na primeira posição apresenta uma contribuição mais favorável na energia de interação eletrostática entre o resíduo do N-terminal e a micela de SDS se comparada com a situação em que se tem a Treonina ou a Glutamina. Talvez esta interação seja favorecida devido ao fato de que a Thr (polar) ou a Glu (carregada negativamente) acomodam-se com facilidade no ambiente aquoso, enquanto que a Pro (hidrofóbica) têm a necessidade de proteger seus grupos, inserindo-os mais profundamente na micela de SDS e tornando a interação eletrostática com a mesma mais atrativa. Além disso, considerando-se a conjectura de que a estrutura secundária dos peptídeos e/ou proteínas é condição necessária para a potencialização de suas atividades biológicas, a análise do perfil de estrutura secundária dos peptídeos estudados nesta seção nos permite verificar que, após a inserção na micela, os dois peptídeos de Jeleína I adotam conformação estruturada anfipática em forma de folha beta antiparalela, enquanto que para os demais apenas um dos peptídeos consegue adotar estrutura anfipática e o outro permanece em conformações aleatórias, este pode ser outro fator relacionado à melhor eficiência dos peptídeos de Jeleína I em relação aos demais.

5. SIMULAÇÕES EM BICAMADAS LIPÍDICAS

A membrana celular é a estrutura que delimita todas as células de procariotos e eucariotos, separando o meio intracelular do extracelular e regulando as possíveis trocas de substâncias entre estes meios. É composta basicamente por lipídeos, proteínas e uma pequena fração de açúcares. Existe uma grande variedade de lipídeos, todos compostos por duas cadeias alifáticas que podem ser saturadas ou insaturadas e uma cabeça polar ligada a um glicerol. Os fosfolipídios são moléculas anfipáticas que apresentam uma porção hidrofílica que fica exposta ao solvente aquoso e outra hidrofóbica que fica orientada para o interior da bicamada, o caráter anfipático desta molécula é de suma importância para a formação das bicamadas. A distribuição de cargas que se dá na porção hidrofílica da molécula é a responsável pelo caráter aniônico ou zwitteriônico da mesma.

Considerando que Simulações por Dinâmica Molecular de sistemas modelo constituídos por bicamadas lipídicas têm sido bastante utilizadas para se lançar luz sobre as interações entre peptídeos antimicrobianos e membranas (APPELT et al, 2005; VIVCHRUK and KAZNESSIS, 2010) e que a maioria das membranas sintetizadas para fins experimentais são compostas apenas por lipídeos dispostos na forma de uma bicamada, neste trabalho, fez-se uso de simulações por Dinâmica Molecular para se obter uma bicamada mista de POPC e POPG na proporção de 70:30, em porcentagem. A bicamada foi obtida através do processo de auto arranjo cujos detalhes e parâmetros de simulação estão apresentados na seção de metodologia. A simulação foi corrida por 300 ns, e a bicamada começou a se formar rapidamente (em torno de 5ns), no entanto só por volta de 250 ns todas as moléculas de água existentes em seu interior foram expulsas, então a simulação foi estendida por mais 50 ns para permitir sua total equilíbrio. A bicamada obtida foi base de todas as simulações apresentadas nesta seção (tabela 5.1).

Tabela 5.1: Simulações que serão apresentadas neste Capítulo

Seção 5.1	Bicamada Lipídica de POPC:POPG livre de Peptídeo
Seção 5.2	Bicamada de POPC:POPG na presença de peptídeos de Jeleína I em condições de pH 5.5 ou 7.0.

5.1. BICAMADA LIPÍDICA DE POPC: POPG LIVRE DE PEPTÍDEO

Nesta seção, os resultados obtidos pela formação da bicamada lipídica que contém 90 moléculas de POPC (figura 5.1.1(a)) e 38 moléculas de POPG (figura 5.1.1 (b)), através do processo de auto arranjo, são apresentados.

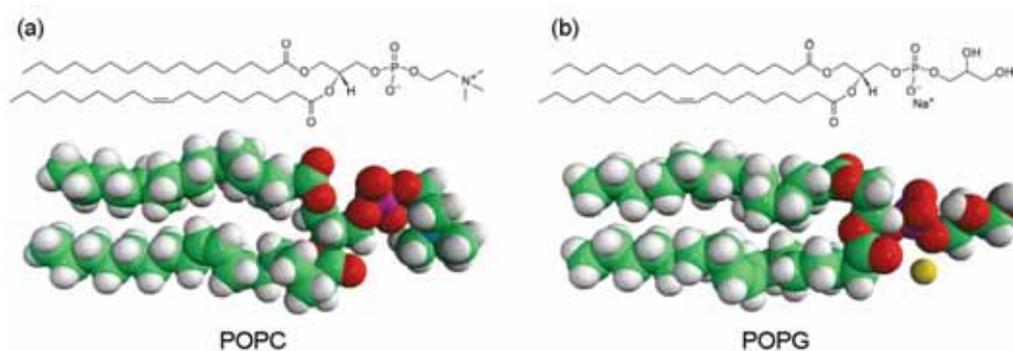


Figura 5.1.1: Representação esquemática das moléculas de lipídeo que constituem a bicamada em estudo. Em verde, estão evidenciados os átomos de carbono que constituem a bicamada, em branco os átomos de hidrogênio, em vermelho os átomos de oxigênio, em azul o nitrogênio e em amarelo o sódio. (a) molécula de POPC. (b) molécula de POPG.

Primeiramente precisam-se obter informações sobre a formação da bicamada lipídica e estes dados podem ser obtidos através da análise da distância de repetição da bicamada, assim como a distribuição das moléculas de fosfolipídio, água e íons ao longo do eixo paralelo às caudas dos lipídeos da caixa (neste caso eixo x). Estes parâmetros podem ser obtidos através da análise do perfil de densidade média (PMD) do sistema, que é apresentada na figura 5.1.2. Nesta figura, em ciano, é apresentado o perfil de densidade média da membrana, que é a soma do perfil de densidade média das moléculas de POPC e POPG, por esta curva, verifica-se o primeiro pico em aproximadamente -1,94 nm e o segundo em 1,77 nm. A soma dos módulos destas posições indica a espessura da bicamada lipídica, que é dada por 37 Å, além disso, observa-se que ambos os picos tem aproximadamente a mesma altura e que são simétricos, indicando que o número de fosfolipídios em cada monocamada é praticamente o mesmo. Quando a curva referente ao PDM das moléculas de POPC (verde) é observada, verifica-se que a posição de seus picos coincide com a posição dos picos da curva em ciano, discutida ainda há pouco. No entanto, observa-se que o pico da esquerda é mais alto que o da direita,

evidenciando um número maior de moléculas de POPC na monocamada da esquerda (49 moléculas) em relação à da direita (41 moléculas). O PDM para as moléculas de POPG (vermelho) têm a posição de seus picos coincidentes com os discutidos até o momento e apresenta o pico da direita maior em relação ao da esquerda, indicando que há um maior número de moléculas de POPG na monocamada da direita (23 moléculas contra 15 à esquerda), contrariamente à curva para o POPC. Entre as posições dos picos para a curva de densidade média da membrana (ciano), verifica-se que os perfis do sódio e da água são nulos, representando que estas moléculas estão ausentes no interior da bicamada. Na região das cabeças polares, onde o perfil de densidade da membrana apresenta seu máximo, começa a aparecer moléculas de água, formando a interface água-membrana, assim como os íons de sódio que se concentram nessa região devido às interações eletrostáticas entre as cabeças polares aniônicas e esses cátions.

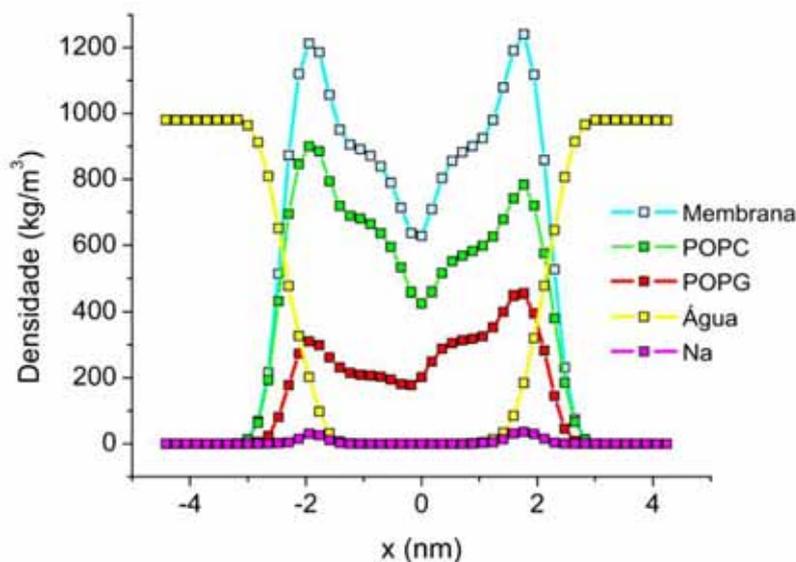


Figura 5.1.2: Perfil de densidade média do sistema, para os últimos 50 ns de simulação. Em ciano, soma das moléculas de POPC e POPG resultando em toda membrana, em verde apenas as moléculas de POPC, em vermelho apenas as moléculas de POPG, em amarelo a distribuição das moléculas de água e em magenta o mesmo para as moléculas de sódio. Os arquivos para a obtenção desta figura foram manipulados para que se evidenciasse a bicamada centralizada no eixo x da caixa de simulação.

Além de se verificar a formação da bicamada lipídica é necessário observar se o sistema está equilibrado. Na figura 5.1.3 é apresentada a Energia Potencial Total do sistema

em função do tempo de simulação; em 5.1.3 (a) têm-se o tempo total de simulação e dela percebe-se claramente que houve uma queda da energia nos primeiros 200ns de simulação a partir do qual, aparentemente, a energia passa a oscilar em torno de um ponto de equilíbrio. Em 5.1.3 (b) apresenta-se a Energia Potencial Total do sistema apenas para os 50ns finais de simulação; desta figura verifica-se que os valores de energia oscilam em torno de um ponto médio que parece não mais cair. No entanto, para que isto seja confirmado é necessário observar o coeficiente angular da curva que é um dos indicativos de equilibração do sistema. Para que o sistema se encontre no equilíbrio, espera-se idealizadamente que o valor deste coeficiente seja zero, o que indicaria que a energia potencial do sistema encontrou o mínimo global. No entanto, nas simulações por Dinâmica Molecular, valores próximos de zero já são resultados significativos e o sistema, do ponto de vista energético, pode ser considerado equilibrado. Para a curva da figura 5.1.3 (b) o valor do coeficiente angular obtido é $2,4 \cdot 10^{-4}$ kJ/mol.s que é suficiente para se considerar o sistema equilibrado.

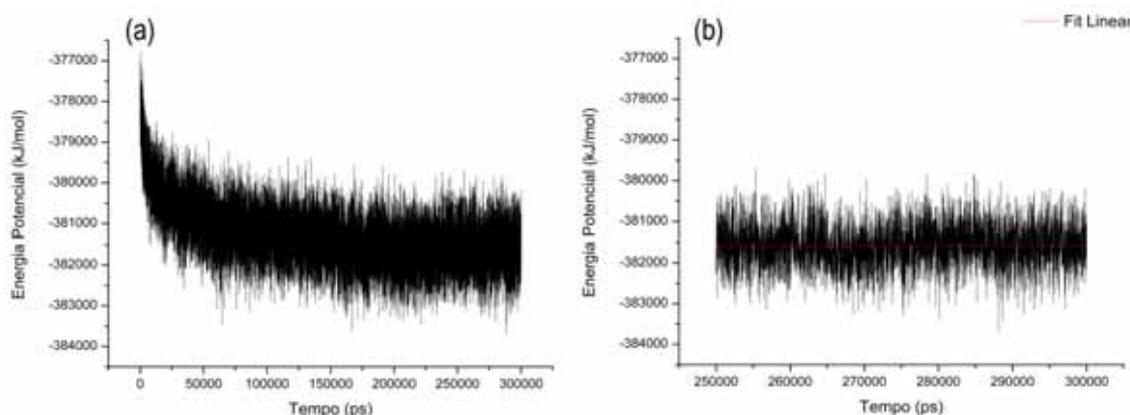


Figura 5.1.3: Energia potencial (kJ/mol) total do sistema. À direita considerando todo o tempo de simulação (300ns); à esquerda considerando apenas os últimos 50 ns de simulação, em vermelho o fit linear da curva, cujo coeficiente angular é $2,44 \cdot 10^{-4}$ kJ/mol.s.

Outras condições consideradas para se verificar se o sistema está em equilíbrio é a temperatura e a pressão serem mantidas, em média, em torno da faixa que se escolheu simular, neste caso 300K e 1bar, respectivamente. Estas grandezas são mostradas na figura 5.1.4, da qual se verifica que ambas oscilam em torno dos valores esperados.

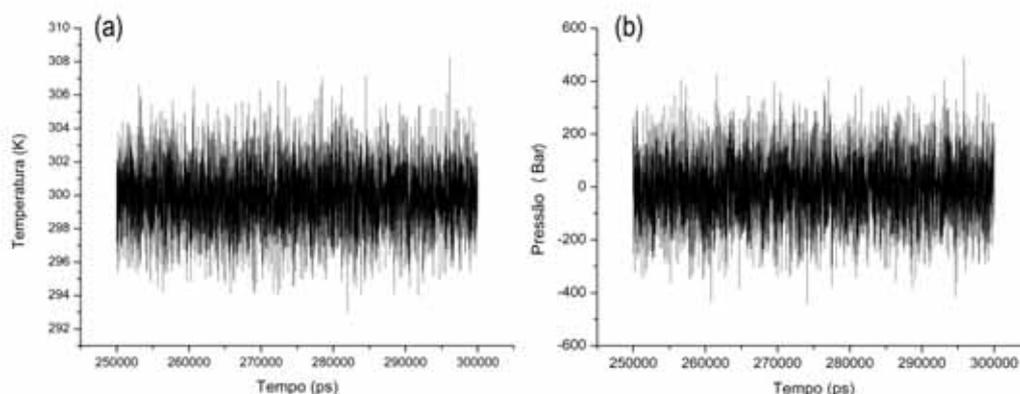


Figura 5.1.4: (a) Variação da temperatura como função do tempo de simulação, cujo valor médio é de 300K. (b) Variação da pressão como função do tempo de simulação, cujo valor médio é igual a 1 bar.

Outro fator utilizado para determinar se o sistema lipídico está em equilíbrio é a verificação das dimensões da caixa de simulação como função do tempo, que é apresentada na figura 5.1.5. Nesta figura, as dimensões x, y e z são apresentadas como função do tempo total de simulação (figura 5.1.5 (a)) e como função dos últimos 50 ns de simulação (figura 5.1.5 (b)). Delas percebe-se que, no início da simulação, há um aumento das dimensões x e y (vermelho) e uma diminuição da dimensão z (preto), já nos últimos 50 ns as dimensões da caixa já estão estabilizadas, sendo as dimensões x e y iguais e oscilam em torno de $8,80 \pm 0,04$ nm (em vermelho) e a dimensão z oscila em torno de $4,00 \pm 0,04$ nm (em preto), indicando que a bicamada se formou de forma que o vetor perpendicular à superfície formada pelas cabeças lipídicas se encontra paralelo ao eixo x, perpendicular ao plano yz.

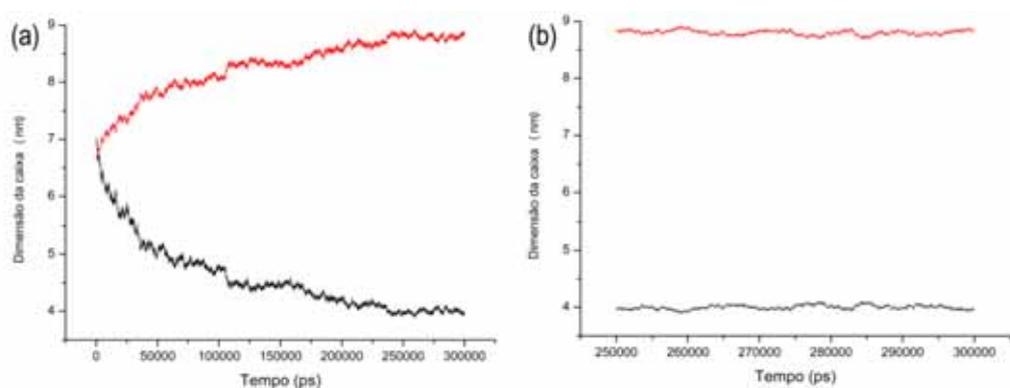


Figura 5.1.5: Dimensões da caixa de simulação em função do tempo. Em vermelho, dimensões x e y e em preto, dimensão z. (a) Sobre todo o tempo de simulação. (b) Apenas nos últimos 50 ns de simulação.

Cada lipídeo tem uma área superficial fixa, determinada principalmente pela cabeça polar. No caso de bicamadas mistas, o valor desta área ainda não é bem conhecido experimentalmente. No entanto este parâmetro tende a ficar constante quando o sistema está equilibrado, por isso sua evolução temporal pode ser utilizada para a análise do tempo necessário para a convergência do sistema. Seu cálculo é efetuado da seguinte maneira: Considere uma bicamada com n lipídeos, composta de duas lâminas, cada uma com $n/2$ lipídeos. A área estimada por fosfolipídio é a área total da membrana dividida pelo número de lipídeos em cada lâmina. Na figura 5.1.6 (a) é apresentada a área por lipídeo como função do tempo total de simulação, pode-se observar desta figura uma diminuição acentuada na área de cada fosfolipídio com o tempo, aparentando começar a se estabilizar a partir de 250 ns de simulação. Como o sistema simulado é constituído de moléculas de POPC e POPG utilizou-se o método apresentado por HOFSSASS et al, 2003 e também utilizado por MARTINS DO CANTO et al, 2011 e JANOSI and GORFE, 2010 para o cálculo da área por lipídeo de cada molécula. Este parâmetro foi medido sobre os últimos 50ns de simulação e os valores obtidos são de $54,8 \pm 0,3 \text{ \AA}^2$ para as moléculas de POPC e $55,6 \pm 0,6 \text{ \AA}^2$ para as moléculas de POPG. Em 5.1.6 (b) plotou-se a mesma curva apresentada em (a) mas apenas de 0 a 120ns tal como mostrado no trabalho de JANOSI and GORFE, 2010 (figura 5.1.6 (c)). O cálculo das áreas por lipídeo considerando-se apenas os 120ns iniciais de simulação (figura 5.1.6 (b)) resulta em áreas de $62 \pm 3 \text{ \AA}^2$ para as moléculas de POPC e $63 \pm 3 \text{ \AA}^2$ para as moléculas de POPG. Estes valores estão condizentes com os observados em outros trabalhos (JANOSI and GORFE, 2010; MURZIN et al, 2005). A diminuição da área por lipídeo observado nos 50ns finais de simulação em relação ao valor calculado para os 120ns iniciais pode ser fruto da maneira como a bicamada foi obtida. No presente trabalho, obteve-se a bicamada a partir do modelo de auto arranjo, enquanto que para os trabalhos citados as bicamadas foram montadas a partir da translação das moléculas de lipídeo até formar cada monocamada e depois a bicamada. Ao se efetuar a translação, as cabeças polares dos fosfolipídios acabam sendo organizadas em linha (ver figura 5.1.7 (a)) resultando numa área ocupada maior em relação ao auto arranjo, no qual as cabeças polares dos lipídeos organizam-se de maneira mais compactada (figura 5.1.7 (b)). Essa ordenação que causa a diminuição da área por lipídeo nas simulações de auto arranjo também reflete numa menor distância entre os átomos de fósforo das monocamadas e um maior ordenamento das cadeias acílicas das moléculas de POPC e POPG em relação às bicamadas pré-formadas.

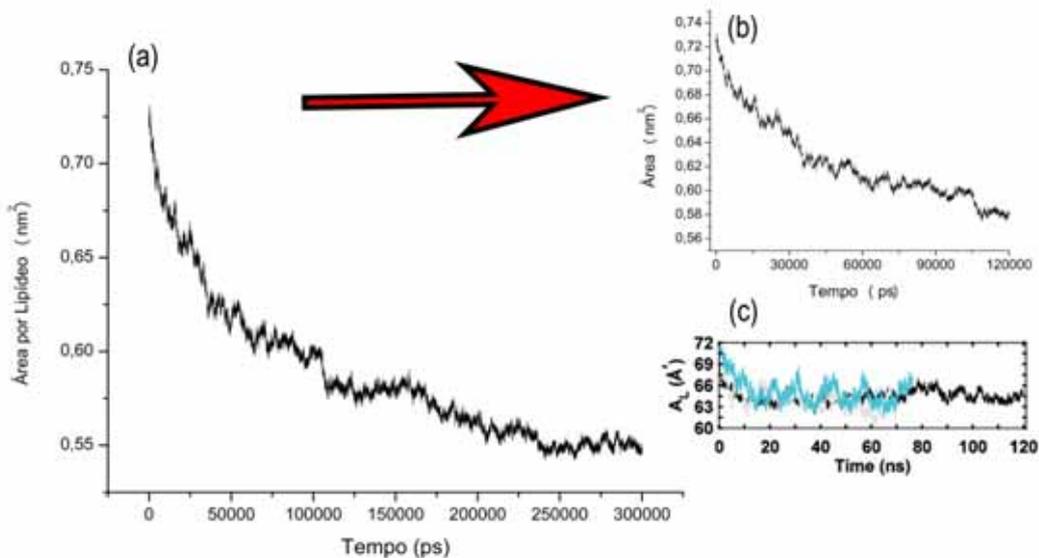


Figura 5.1.6: Área por lipídeo como função do tempo de simulação. (a) Sobre o tempo total. (b) Apenas os 120ns iniciais. (c) Extraído de: JANOSI and GORFE, 2010.

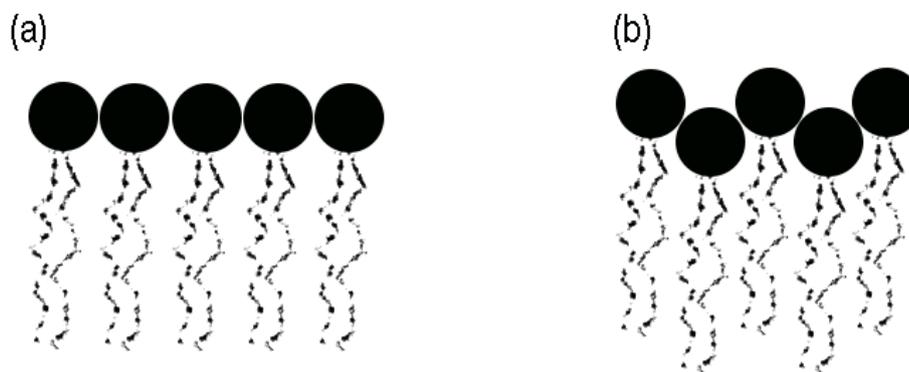


Figura 5.1.7: Esquemas da forma de organização das moléculas de fosfolipídeo. (a) Obtida a partir da translação de uma molécula. (b) Para simulação de auto arranjo.

A função de distribuição radial de pares entre os átomos de fósforo dos lipídeos existentes na bicamada analisada é apresentada na figura 5.1.8. Dela é possível obter alguns parâmetros tais como: a distância mais provável entre dois fosfolipídios vizinhos (D_P), que é a medida da posição do primeiro máximo; o fim da primeira camada de fosfolipídeos (D_{endP}), que é a medida da posição do fim do primeiro máximo; o número de fosfolipídios na primeira camada de hidratação, que é a integral da função $g(r)$ até o fim da primeira camada de hidratação. A distância mais provável de se encontrar uma molécula de água em torno de um

fosfolípido (D_{P-ow}); o final da primeira camada de hidratação (D_{end-ow}); o número de moléculas de água na primeira camada de hidratação (n_{ow}); Estes resultados são apresentados na tabela 5.1.1 e na figura 5.1.8.

Tabela 5.1.1: Distribuição dos Lipídeos

	POPC	POPG	POPC/POPG
PROPRIIDADE	Figura 5.1.8 (a)	Figura 5.1.8 (b)	Figura 5.1.8 (c)
D_p (nm)	0,43	0,48	0,55
D_{endP} (nm)	0,75	0,61	0,65
n_p	1,35	0,19	0,27
D_{P-ow} (nm)	0,29	0,29	-
D_{endow} (nm)	0,33	0,33	-
n_{ow}	3,30	3,10	-

Pela tabela acima é possível perceber que a distância mais provável de se encontrar um fosfolípido de POPC em torno de um POPC é 0,43 nm, para o POPG em torno de si é 0,48 nm e para o POPG em torno do POPC é 0,55 nm. A primeira camada de solvatação para o POPC em torno de si tem um raio de 0,75 nm, maior que para os demais cujos valores são de 0,61 nm para POPG em torno de si e 0,65 nm para o POPG em torno de POPC. O número de fosfolípidos POPC na primeira camada de solvatação em torno do próprio POPC é significativamente maior (1,35) que para os demais: 0,19 (POPG - POPG) e 0,27 (POPG - POPC), isto não é consequência do fato desta camada apresentar um raio maior que as demais, porque foi observado o número de fosfolípido em 0,6 nm para este caso e o valor obtido foi de aproximadamente 0,8 lipídeos, um número já consideravelmente maior que os demais. Tal fato já era esperado, uma vez que o sistema possui aproximadamente 2,4 moléculas de POPC para cada POPG. Quanto a hidratação do sistema, não há diferenças entre a distância mais provável de se encontrar uma molécula de água em torno de um fosfolípido, assim como também não há diferenças entre o tamanho da primeira camada de hidratação e do número de moléculas de água em cada camada.

O Parâmetro de Ordem das cadeias saturadas das moléculas de POPC (verde) e POPG (vermelho) é apresentado na figura 5.1.9. Quanto maior o alinhamento dos carbonos na cadeia

maior é o parâmetro de ordem. Da figura, verifica-se que as curvas para ambas as moléculas são muito parecidas, com exceção dos carbonos mais próximos das cabeças polares que apresentam uma ordenação ligeiramente maior para as moléculas de POPG em relação às de POPC.

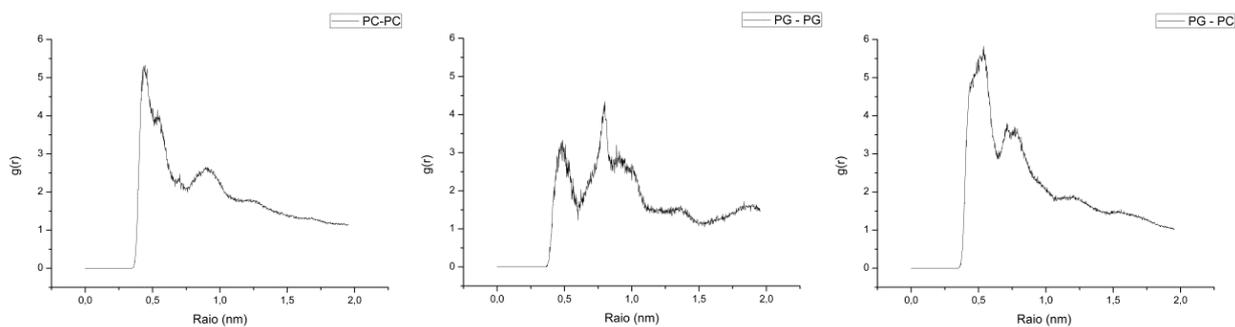


Figura 5.1.8: Função de distribuição radial de pares. (a) Distribuição das moléculas de POPC em torno das moléculas de POPC. (b) Distribuição das moléculas de POPG em torno das moléculas de POPG. (c) Distribuição das moléculas de POPG em torno das moléculas de POPC.

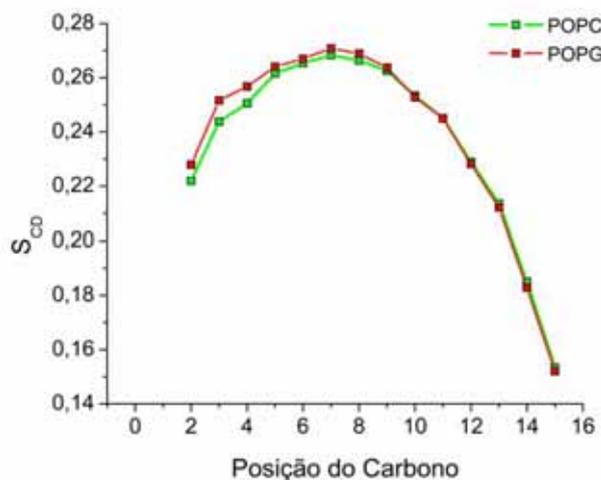


Figura 5.1.9: Parâmetro de ordem para a cadeia saturada das moléculas de POPC (verde) e POPG (vermelho).

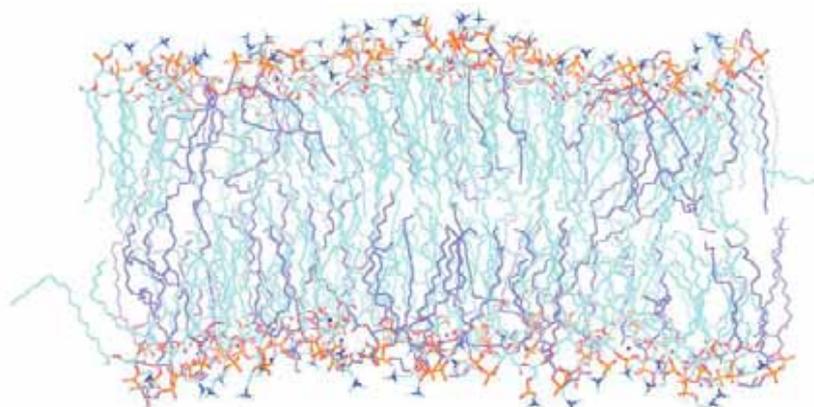


Figura 5.1.10: Representação da bicamada formada após 300ns de simulação. Em azul claro são representadas as moléculas de POPC e em azul escuro as moléculas de POPG, os oxigênios das cabeças polares estão representados em laranja.

A configuração final dos resíduos lipídicos é apresentada na figura 5.1.10, dela é possível verificar a formação da bicamada. As moléculas de água foram removidas da figura para favorecer a visualização. Em azul claro são representadas as moléculas de POPC e em azul escuro as moléculas de POPG.

CONCLUSÕES

Pelas análises de perfil de densidade média apresentadas nesta seção observou-se que a bicamada lipídica é formada com exatamente 64 lipídeos em cada face, no entanto, consistindo de 23 moléculas de POPG e 41 de POPC em uma das faces e 15 POPG e 49 POPC na outra face. Como consequência têm-se uma diferença de 9 cargas negativas entre as faces. As demais análises apresentadas indicam que o sistema equilibrou-se mesmo sob estas condições. Uma análise mais detalhada do número de moléculas de sódio próximas de cada face da bicamada evidencia que se tem 23 destas moléculas na face em que se encontram as 23 moléculas de POPG e as demais 15 moléculas de sódio na outra face (15 POPG), a distribuição das moléculas de sódio pode estar auxiliando na blindagem das cargas dos POPG ajudando assim a manter o sistema em equilíbrio. Embora a bicamada tenha se formado com um número igual de lipídeos em cada monocamada, ou seja 64 em cada face, o número de moléculas de POPC e POPG em cada face são distintos, esta disparidade que surgiu espontaneamente na formação da bicamada lipídica pode ser consequência da área ocupada

pelas cabeças polares destes fosfolipídeos. GURTOVENCO and VATTULAINEN, 2008 e GURTOVENCO and VATTULAINEN, 2009 também trabalharam com bicamadas lipídicas assimétricas produzindo uma diferença de potencial entre as superfícies da membrana, e seus resultados indicam que a utilização das aproximações clássicas para o tratamento da energia potencial eletrostática do sistema em estudo, associado às condições periódicas de contorno que são implementadas no método de PME, balançam a superfície de carregada de um sistema periodicamente replicado. Foi verificado ainda que a distância entre os picos observados para a membrana é de 37 Å, valor próximo dos apresentados no trabalho de JANOSI and GORFE, 2010 que simula a mistura de POPC e POPG na proporção 77:23% obtendo valores próximos de 39 Å. E também no trabalho de MURZYN et al, 2005 que obtém valores de 35.6 Å para bicamada de POPC pura e 35.5 Å para a bicamada de POPG pura.

A área por lipídeo obtida para a simulação apresentada neste trabalho ($54,8 \pm 0,3 \text{ \AA}^2$ para as moléculas de POPC e $55,6 \pm 0,6 \text{ \AA}^2$ para as moléculas de POPG), obtidas nos 50ns finais de 300ns de simulação, mostra valores abaixo ou semelhante aos obtidos em outros trabalhos (JANOSI and GORFE, 2010; MURZYN et al, 2005; MANNA and MUKHOPADHYAY, 2011). No entanto a comparação mostrada na figura 5.1.6 evidencia o papel importante do tempo de simulação nesse parâmetro.

O parâmetro de ordem das cadeias saturadas das moléculas de POPC e POPG foi calculado e apenas uma ligeira diferença nos carbonos de 2 a 9 foi observada entre as curvas, sendo nesta região a molécula de POPG mais ordenada em relação à molécula de POPC. MANNA and MUKHOPADHYA, 2011 realizaram uma simulação de 150ns de duração a partir de uma bicamada lipídica, pré-formada, constituída de 128 moléculas de POPG com parâmetros de simulação e campo de forças idênticos aos que foram utilizados neste trabalho. Se compararmos a curva obtida para o parâmetro de ordem de nossas moléculas de POPG com a obtida nesse trabalho verifica-se uma ligeira diminuição no ordenamento das nossas moléculas de POPG em relação às de Manna, que pode ser fruto do fato de que nosso sistema é constituído da mistura de POPC e POPG (70:30%). No entanto o comportamento da curva é idêntico nos dois trabalhos.

5.2. BICAMADA DE POPC:POPG NA PRESENÇA DE PEPTÍDEOS DE JELEÍNA I EM CONDIÇÕES DE PH 5.5 OU 7.0.

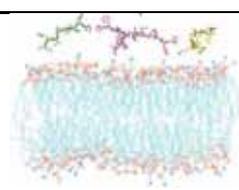
A bicamada de POPC: POPG na proporção 70:30% cujo processo de formação foi apresentado no capítulo 5, seção 5.1 é utilizada nesta seção, na qual algumas simulações da bicamada na presença de peptídeos de Jeleína I foram realizadas, alterando-se o número de peptídeos, a forma como são dispostos no meio aquoso e o pH da simulação.

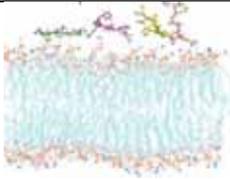
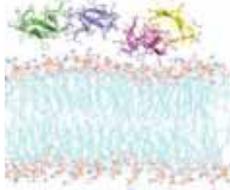
Quatro simulações contendo quatro ou dezesseis peptídeos (em 4 conjuntos de 4 peptídeos cada, obtidos das simulações em água) de Jeleína I inseridos, aleatoriamente, na região aquosa da bicamada lipídica foram realizadas. Em duas das simulações, mimetizou-se o pH 5.5 através da protonação de todos os resíduos de lisina, histidina e N-terminal dos peptídeos, resultando numa carga líquida de +3 para cada um. Nas outras duas simulações, mimetizou-se o pH 7.0 protonando-se todas as lisinas, os N-terminais e apenas 50% das histidinas presentes nos peptídeos, resultando numa carga líquida de +2,5 para cada. Contra íons de Cl⁻ foram adicionados à caixa de simulação para promover sua neutralização e também moléculas água em quantidade suficiente para garantir a densidade de 1g/cm³.

As simulações apresentadas nesta seção foram realizadas com o intuito de se comparar como a concentração de peptídeos influencia a ação destes com miméticos de membrana, por isso foram realizadas simulações com 4 ou 16 peptídeos. E Também identificar as diferenças nas interações peptídeo/membrana causadas pelo pH do meio, por isso as simulações foram realizadas em pH 5.5 e 7.0.

A tabela 5.2.1 abaixo exhibe algumas das características das simulações que serão apresentadas nesta seção.

Tabela 5.2.1: Características das simulações apresentadas na seção 5.2

Simulação	Número de Peptídeos	Carga líquida dos peptídeos	Tempo de Simulação (ns)	* Configuração Inicial dos peptídeos sobre a bicamada
PCPG _{4pH5.5}	4	+ 12	400	

PCPG₄ pH 7.0	4	+ 10	400	
PCPG₁₆ pH 5.5	16	+48	400	
				4 Conjuntos de 4 moléculas de peptídeos cada.
PCPG₁₆ pH 7.0	16	+40	400	
				4 Conjuntos de 4 moléculas de peptídeos cada.

*Na Configuração inicial dos peptídeos sobre a bicamada, os peptídeos ou o conjunto de 4 peptídeos são apresentados em verde, magenta, amarelo e goiaba, suas conformações iniciais foram obtidas da simulação em água apresentadas no capítulo 3, seção 3.2. A bicamada é apresentada em ciano e para melhor visualização, as moléculas de água e íons foram ocultados da figura.

RESULTADOS

O perfil de densidade média das caixas de simulação com 4 ou 16 peptídeos em pH 5.5 ou 7.0 foram comparados com o perfil da bicamada livre de peptídeo e os resultados são apresentados na figura 5.1.1. Na qual, as curvas em verde apresentam os resultados para a bicamada livre de peptídeo, em azul os resultados para as simulações com 4 peptídeos e em vermelho para 16 peptídeos. Em ambas as figuras a região I representa a fase aquosa, região II a interface água/bicamada, região III as caudas ordenadas e região IV representa a as caudas desordenadas. Em (a) encontra-se o perfil de densidade média para a água, (b) para os átomos de fósforo das moléculas de lipídeo, (c), (d), (e), (f) e (g) para os átomos da cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos de Prolina, Lisina, Histidina, Serina e Fenilalanina, respectivamente. A observação das figuras para pH 5.5 e 7.0 nos permite verificar que a presença de 16 peptídeos perturba a região I, pois a presença dos peptídeos implica numa menor quantidade de água nesta região (figura 5.2.1 (a)). Pela figura 5.2.1 (b) vê-se um ligeiro deslocamento dos

picos referentes às simulações com 4 ou 16 peptídeos em relação às bicamada livre. Isto pode ser um indicativo que a presença de peptídeos causa um pequeno aumento na espessura da bicamada. A mesma análise para os grupos glicerol e cadeias acílicas não mostrou diferenças entre as curvas, indicando que os peptídeos não interferem na distribuição destes grupos (dados não mostrados). Observando-se (c), (d), (e), (f) e (g) verifica-se que as cadeias laterais dos peptídeos interagem com a bicamada através dos grupos fosfato. As simulações com 16 peptídeos apresentam mais de um pico nas distribuições enquanto que as simulações com 4 peptídeos apresentam 1 pico. Isso evidencia que na presença de muitos peptídeos, alguns se aproximam da bicamada, enquanto outros não o fazem. Este fato muito possivelmente está relacionado com a formação da estrutura terciária obtida em água, na qual se têm a aglomeração de 4 peptídeos. Esse aglomerado se aproxima da bicamada (caso de 16 peptídeos) e quando não se desfaz, causa a interação de dois dos peptídeos do aglomerado com a bicamada, enquanto os outros dois ficam expostos ao meio aquoso e, portanto mais distantes da interface membrana/água (dando origem aos demais picos da distribuição).

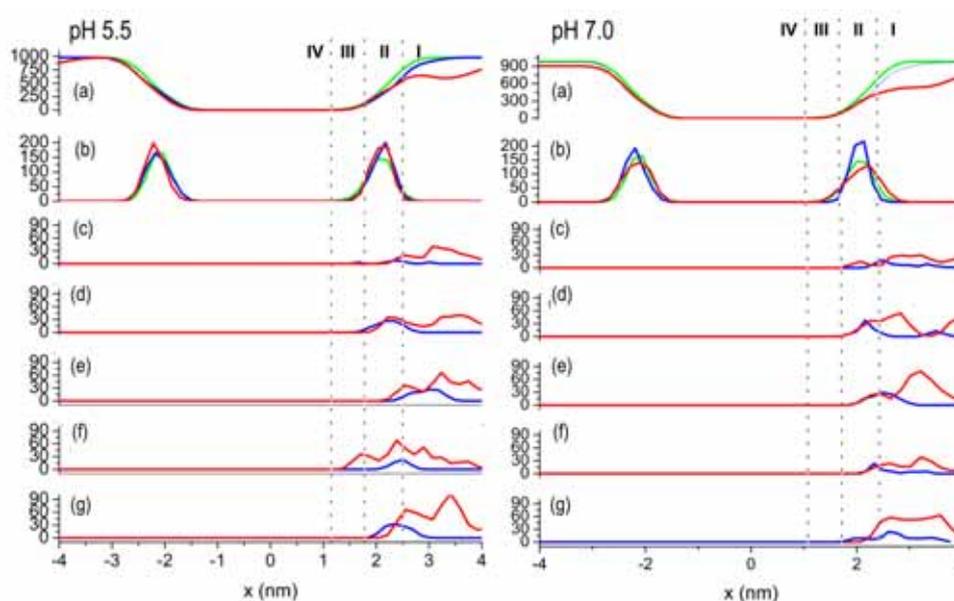


Figura 5.2.1: Perfil de densidade média das bicamadas lipídicas livre de peptídeos (verde), na presença de 4 peptídeos (azul) ou 16 peptídeos (vermelho). pH 5.5 (à esquerda) e pH 7.0 (à direita). Em (a) moléculas de solvente. (b) átomos de fósforo das moléculas de lipídeo. (c), (d), (e), (f) e (g) átomos da cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos de prolina, lisina, histidina, serina e fenilalanina, respectivamente.

Análises da perturbação na bicamada lipídica causada pelos diferentes pH foram realizadas e são apresentadas na figura 5.2.2. A figura reflete como os diferentes grupos estão posicionados em relação à bicamada lipídica, mostrando que os resíduos carregados, polares e a Fenilalanina encontram-se na região das cabeças fosfolipídicas e mais internamente inseridos na micela em pH 5.5 que em pH 7.0.

Experimentos de Anisotropia de Fluorescência de DPH (DOS SANTOS CABRERA et al, 2014) estimam a ordem das cadeias acíclicas dos lipídios e reportam a influência que os peptídeos exercem sobre esta região. Os resultados obtidos através desta técnica mostram que a interação da Jeleína I com a bicamada ocorre na região das cabeças fosfolipídicas. Pela figura 5.2.3 observa-se os parâmetros de ordem das cadeias saturadas das moléculas de POPC e POPG para a bicamada livre de peptídeo (verde), na presença de 16 peptídeos, em pH 5.5 (vermelho) e pH 7.0 (verde). Desta figura verifica-se que a presença dos peptídeos tende a ordenar as cadeias acíclicas das moléculas de lipídeo em relação à situação livre de peptídeos. A presença dos peptídeos em pH 5.5 causa, ligeiramente, uma menor ordenação dos carbonos de 3 a 7 das moléculas de POPC em relação ao pH 7.0, para esta molécula. Os demais carbonos apresentam-se praticamente com o mesmo comportamento para ambos os pH. Quando se observa a ordenação das moléculas de POPG, verifica-se um ligeiro aumento da ordenação de toda a molécula na presença dos peptídeos em pH 5.5 em relação ao pH 7.0. Estes resultados concordam com os obtidos experimentalmente de que os peptídeos interagem preferencialmente com a região próxima às cabeças fosfolipídicas.

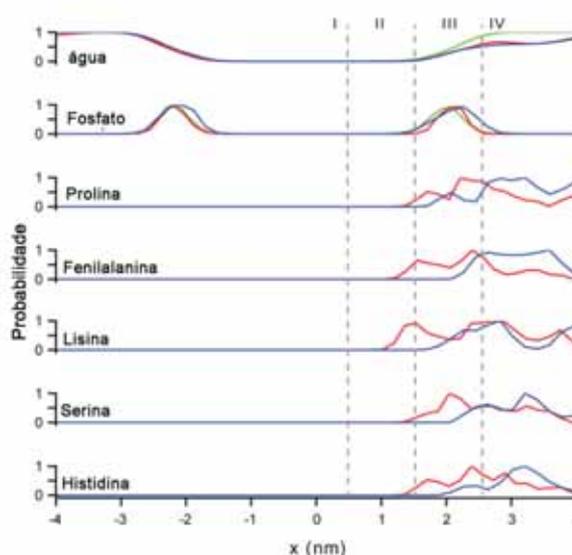


Figura 5.2.2: Perfil de densidade média da água, fosfato, e grupos carregados, polares e Fenilalanina dos peptídeos em pH 5.5 (vermelho), pH 7.0 (azul) e também para bicamada livre de peptídeo (verde). Para claridade a membrana é dividida em regiões: (I) região do carbono-10 ao

carbono-16; (II) região do carbono 2 ao carbono 9; (III) região da interface membrana-água; (IV) região aquosa sobre a influência do peptídeo.

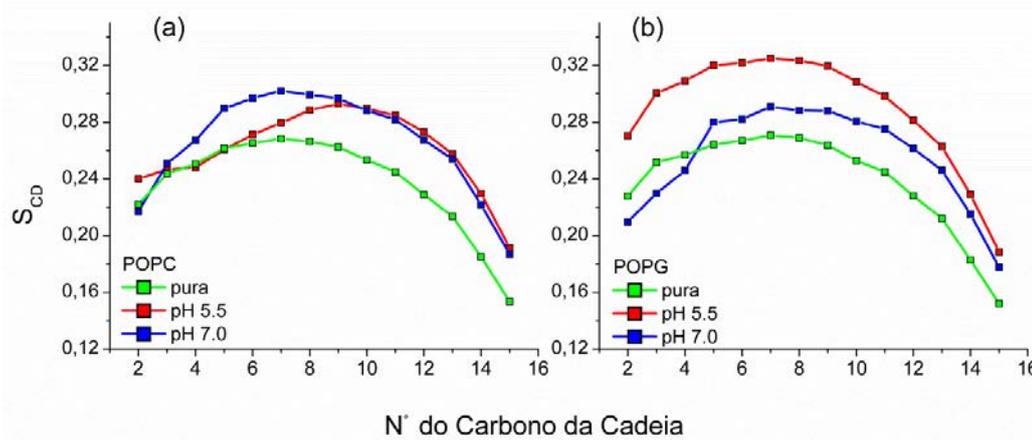


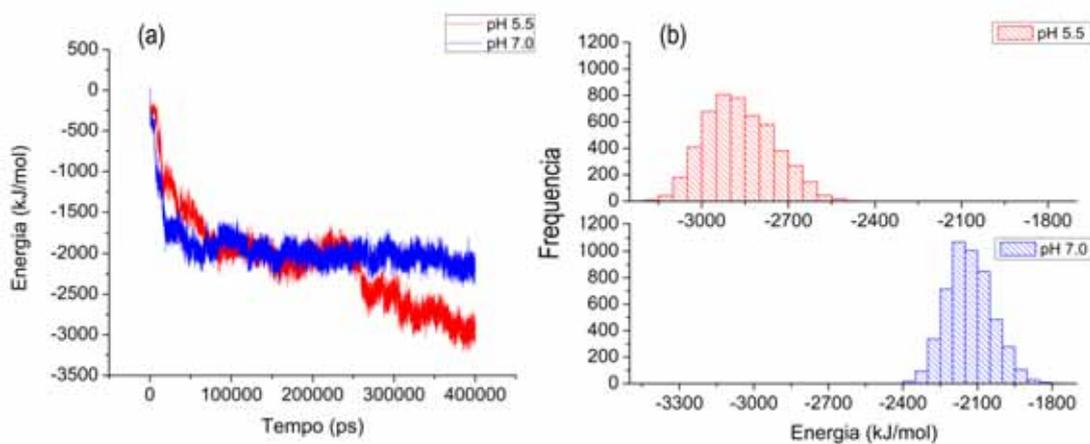
Figura 5.2.3: Parâmetro de ordem das caudas saturadas das moléculas de lipídeo. (a) POPC. (b) POPG. Simulação da bicamada livre de peptídeo (verde), na presença de 16 peptídeos em pH 5.5 (vermelho) e pH 7.0 (azul).

A atividade de formação de poro foi investigada através da influência do pH do meio sobre a condutância em experimentos de single channel (DOS SANTOS CABRERA et al, 2014). Os resultados indicam que um alto número de poros permanecem abertos por mais tempo em pH 5.5 em relação ao pH 7.0. Em adição, a contribuição de Coulomb para a energia de interação de entre os peptídeos e a bicamada lipídica ou apenas entre os peptídeos, para as simulações com 4 moléculas de Jeleína I em pH 5.5 ou 7.0 é apresentada na figura 5.2.4. Este termo de energia em função do tempo de simulação é apresentado na figura 5.2.4 (a), dela é possível verificar que para ambas as simulações o comportamento das curvas são análogos até aproximadamente 300 ns, a partir do qual a simulação com 4 peptídeos em pH 5.5 (vermelho) passa a apresentar interação mais favorável dos peptídeos com a bicamada em relação à situação com 4 peptídeos em pH 7.0 (azul). A figura 5.2.4 (b) explicita o histograma das energias de interação entre peptídeos e bicamada nos últimos 50ns de simulação. Dela verifica-se novamente a favorabilidade da interação em pH 5.5 em relação ao pH 7.0. A contribuição de Coulomb para a energia de interação entre os peptídeos de Jeleína I (figuras 5.2.4 (c) e (d)) indica que a interação entre os peptídeos em pH 7.0 é mais atrativa, portanto mais favorável, que para o pH 5.5, tal fato, provavelmente, é consequência da diferença da carga líquida assumida pelos peptídeos quando em pH 5.5 ou 7.0, tal como discutido na apresentação das simulações. O fato de os peptídeos interagirem melhor entre si em pH 7.0

pode resultar numa menor interação dos mesmos com a bicamada lipídica, como consequência, o menor número de poros formados tal como observado experimentalmente. As energias de interação de Lennard Jones entre os peptídeos e entre os peptídeos e a bicamada lipídica não foram apresentadas, pois não indicam diferenças significativas entre os dois pH observados.

A tabela 5.2.2 evidencia as pontes salinas e as pontes por hidrogênio formadas entre os peptídeos das simulações com 4 peptídeos e os lipídeos que constituem a bicamada, e também as ligações de hidrogênio formadas entre as moléculas de água e os lipídeos. As principais informações obtidas da tabela são: I) a maioria dos contatos eletrostáticos da Jeleína I ocorre com as moléculas de POPC. II) no pH 5.5 observa-se o aumento significativo no número de ligações por hidrogênio dos lipídios com as moléculas de água e o número de pontes salinas entre Pro1 e Lys3 com os lipídios. No pH 7.0 ocorre a redução de 53 e 80% na quantidade total de ligações salinas dos peptídeos com POPC e POPG, respectivamente. E 64% de redução no número de ligações por hidrogênio com POPG.

A área por lipídeo obtida através do modelo utilizado por HOFSSASS et al, 2003, foi calculada para os lipídeos de POPC e POPG das simulações contendo 4 peptídeos em pH 5.5 e 7.0. Os resultados em pH 5.5 são $51,8 \pm 0,3 \text{ \AA}^2$ e $52,6 \pm 0,8 \text{ \AA}^2$, respectivamente. Em pH 7.0, têm-se $52,4 \pm 0,3 \text{ \AA}^2$ para o POPC e $53,3 \pm 0,8 \text{ \AA}^2$ para o POPG. Destes resultados, é possível observar que os valores da área por lipídeo é praticamente o mesmo para as moléculas de POPC e POPG, tanto em pH 5.5 quanto em pH 7.0. No entanto, verifica-se uma diminuição dos valores obtidos em relação à bicamada livre de peptídeo, cujos valores calculados foram $54,8 \pm 0,3 \text{ \AA}^2$ para o POPC e $55,6 \pm 0,6 \text{ \AA}^2$ para o POPG, todos sobre os 50ns finais de simulação.



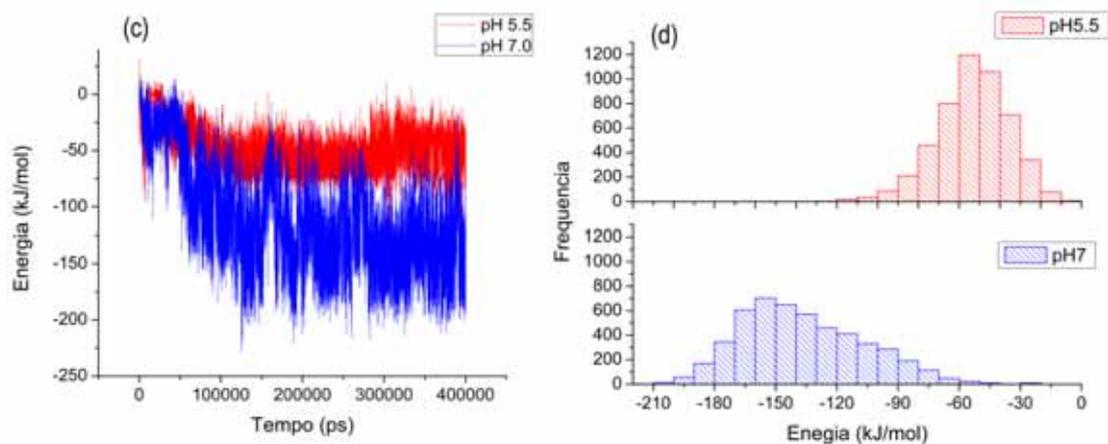


Figura 5.2.4: Contribuição de Coulomb para a Energia de interação entre os peptídeos e a bicamada lipídica. (a) como função do tempo total de simulação. (b) histograma dos últimos 50ns. Contribuição de Coulomb para a energia de interação entre os peptídeos de Jeleína I. (c) Como função do tempo total de simulação. (d) Histogramas dos últimos 50ns de simulação.

Tabela 5.2.2: Pontes salinas e ligações por hidrogênio entre peptídeos e grupos de lipídicos

Razão de Peptídeo: Lipídeo		Pontes Salinas		Ligações por Hidrogênio	
		POPC	POPG	POPC	POPG
0:128	Água *	---	---	5,0	4,6
4:128		pH 5.5			
	Água*	---	---	21,0	10,3
	Prolina†	1,25	0,5	---	0,25
	Lisina†	2,0	0,75	2,2	0,72
	Histidina†	0,5	---	0,25	---
	Serina†	---	---	0,42	---
	Peptídeo†	3,75	1,25	4,4	1,25
4:128		pH 7.0			
	Água*	---	---	4,6	4,1
	Prolina†	0,5	0,25	---	---
	Lisina†	1,25	---	1,9	0,2
	Histidina†	---	---	0,42	---
	Serina†			0,25	---
	Peptídeo†	1,75	0,25	4,6	0,65

† Ligações calculadas por peptídeo; * Ligações calculadas por lipídeo; --- Não há formação de ligações.

As pontes salinas foram computadas individualmente, considerando-se a manutenção da mesma durante o tempo de simulação à existência de uma distância entre doador e aceitador menor que 0,35 nm. As ligações por hidrogênio foram calculadas utilizando o pacote `g_hbond` do Gromacs.

Experimentos de Eletrofisiologia (DOS SANTOS CABRERA et al, 2014) revelam que em pH 5.5 os peptídeos de Jeleína I apresentam maior atividade em bicamadas POPC:POPG 70:30% em relação ao pH 7.0. Por isso, neste trabalho, busca-se investigar quais fatores favorecem a interação destes peptídeos com a bicamada lipídica e porque o pH do meio favorece esta interação. Uma das conjecturas é que a interação dos peptídeos com as bicamadas lipídicas deve causar o vazamento de moléculas do meio intra para o extracelular e vice-versa. Por isso a barreira de energia livre para passagem de água através da bicamada lipídica foi investigada e é apresentada na figura 5.2.5, na qual a curva em verde representa a bicamada livre de peptídeos, em vermelho a bicamada na presença de 16 peptídeos em pH 5.5 e em azul a bicamada na presença de 16 peptídeos em pH 7.0. Desta figura se observa que, na ausência de peptídeo, a barreira de energia livre para passagem de água apresenta seu máximo em 40,2 kJ/mol (verde), enquanto que na presença de 16 peptídeos em pH 5.5 (vermelho), o máximo está em 31,7 kJ/mol e na mesma concentração de peptídeos, porém em pH 7.0 (curva em azul) o máximo encontra-se em 34,9 kJ/mol. Destes dados é possível inferir que a presença dos peptídeos favorece a passagem de água através da bicamada lipídica em relação à condição sem peptídeo, uma vez que a barreira de energia livre decaiu em 8,5 kJ/mol ou 5,3 kJ/mol que é quantidade significativa se considerarmos que kT equivale a 2,5 kJ/mol. Nestes dados, verifica-se ainda a influência do pH do meio, pois em pH 5.5 a barreira de energia livre para passagem de moléculas de água é cerca de 1,3 kT menor que em pH 7.0.

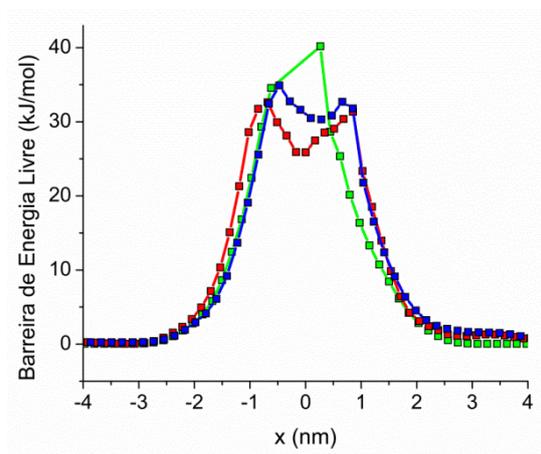


Figura 5.2.5: Barreira de energia livre para passagem de água através da bicamada lipídica. Verde, bicamada livre da presença de peptídeos. Em vermelho e azul, bicamada na presença de 16 peptídeos de Jeleína I em pH 5.5 e 7.0, respectivamente.

A passagem de água através da bicamada lipídica pode ser observada em alguns instantes da simulação. No entanto não é observada a formação de um canal ou poro transmembrânico, fato que já era esperado, pois, de acordo com o trabalho de ZHU et al, 2002, nas simulações por Dinâmica Molecular de equilíbrio, somente um ligeiro fluxo de moléculas através da bicamada pode ser observado, por isso, para o estudo da formação de poros, técnicas que aplicam forças externas às moléculas de água dentro do canal são utilizadas para acelerar o movimento destas através da bicamada. No entanto, investigações, nos últimos 50ns de simulação, sobre a presença de moléculas de água a até 1nm do centro da bicamada lipídica evidenciam que para a simulação da bicamada livre de peptídeo apenas 1 molécula foi encontrada nesta região, enquanto que para a situação com 16 peptídeos foram encontradas 5 e 15 moléculas de água para o pH 7.0 e 5.5, respectivamente.

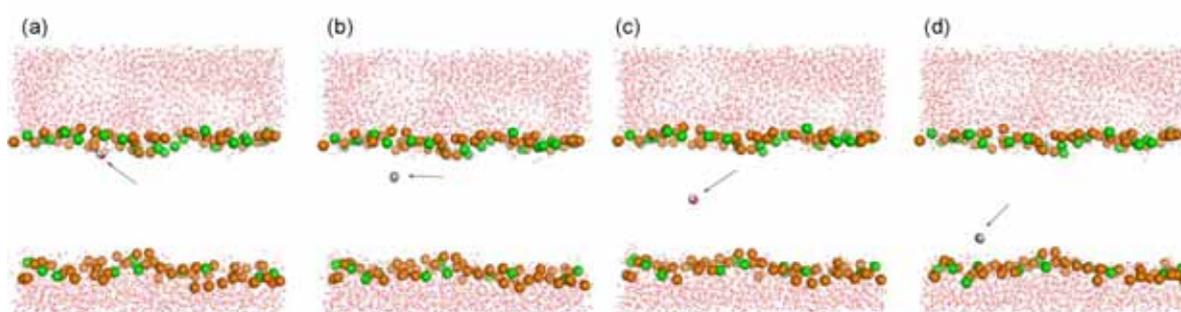


Figura 5.2.6: Representação da passagem de uma molécula de água através da bicamada lipídica para a simulação com 16 peptídeos em pH 5.5. As esferas em verde e laranja representam os átomos de fósforo das cabeças polares dos lipídios POPG e POPC, respectivamente. As caudas acílicas das moléculas de fosfolipídios e os peptídeos foram ocultados para melhor visualização da imagem. As moléculas de água externas à bicamada são evidenciadas como pontos em vermelho. A molécula de água que passa através da bicamada está representada como esferas de van der Waals, com os átomos de hidrogênio em branco e o oxigênio em vermelho.

CONCLUSÕES

Estudos experimentais indicam uma maior eficiência biológica dos peptídeos de Jeleína I contra microrganismos patogênicos em pH 5.5 em relação ao pH 7.0. Pelos dados apresentados nesta seção verifica-se, em ambos os pH, que os peptídeos se inserem na bicamada lipídica, permanecendo na interface com a água. Verificou-se que a energia de interação de Coulomb entre os peptídeos e a bicamada lipídica é mais favorável em pH 5.5 que em pH 7.0, contrariamente, a energia de interação de Coulomb entre os próprios

peptídeos é menos favorável em pH 5.5 que em pH 7.0. Quando as interações via ponte salina ou ligações por hidrogênio entre os peptídeos e os fosfolipídios foram analisadas, observou-se que em pH 5.5 há um número maior destas interações em relação ao pH 7.0. Além disso. Verificou-se também que as ligações por hidrogênio entre as moléculas de água e a bicamada são maior em número em pH 5.5 se comparadas com o pH 7.0 ou com a bicamada livre de peptídeo. A área por lipídeo das moléculas de POPC e POPG apresentam-se menores em pH 5.5 que em pH 7.0, indicando que a interação dos peptídeos com a bicamada em pH 5.5 causa uma aglomeração maior destas moléculas em relação ao pH 7.0. Por fim, a barreira de energia livre para a passagem de água através da bicamada lipídica foi investigada e obteve-se que em pH 5.5 esta é cerca de 1,3 kT menor que em pH 7.0, e cerca de 3,4 kT menor que para a situação da bicamada livre de peptídeo. Todos os fatos relatados, evidenciam maior interação dos peptídeos com os fosfolipídios em pH 5.5 que em pH 7.0, o que provavelmente contribui para a melhor atividade biológica observada nesta condição.

Este estudo aponta para um mecanismo de ação pelo qual as moléculas de JI acumulam-se na região das cabeças fosfolipídicas. Devido à tendência de agregação dos peptídeos, JI exerce pressão sobre a bicamada para acomodar seus grupos polares e apolares. Esta pressão pode abrir poros ou defeitos, causando a perturbação da bicamada e provocando o vazamento de metabólitos essenciais.

A forma agregada pode apresentar vantagens e desvantagens com relação à eficiência antimicrobiana do peptídeo: a forma agregada aumenta a concentração local de peptídeos e pode prejudicar a degradação proteolítica; por outro lado a não agregação pode ser mais eficiente na ligação e neutralização das cargas da membrana.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho duas classes de peptídeos antimicrobianos foram estudadas, as Protonectinas extraídas do veneno da vespa solitária *Agelaia palipes palipes* e as Jeleínas extraídas da geléia real.

Para o caso das Protonectinas propôs-se investigar as interações entre os peptídeos de Protonectina e Protonectina com Protonectina 1-6 para se esclarecer às questões sobre a agregação entre estes peptídeos, buscando entender como ela ocorre e qual a influência do meio sobre ela. Pelas simulações apresentadas neste trabalho, verificou-se que a Protonectina exibe a tendência de agregação que é mantida através de ligações por hidrogênio em água, e o número dessas ligações aumenta para Protonectina pura e diminui para a mistura de peptídeos quando na presença da micela de SDS. As simulações utilizando REMD evidenciaram que os peptídeos de Protonectinas puros têm a contribuição de Coulomb e Lennard Jones para sua energia de interação mais favorável em relação à situação da mistura de peptídeos. Em oposição, a contribuição de Coulomb e Lennard Jones para a energia de interação entre os peptídeos e a micela de SDS é menos favorável para os peptídeos de Protonectina puros que para a mistura. O fato da interação peptídeo-peptídeo ser mais fraca para o caso da mistura Protonectina/Protonectina 1-6 influencia a distância entre os peptídeos e também seu número de resíduos em α -hélice. Assim a Protonectina da mistura apresenta um conteúdo helicoidal e anfipaticidade superiores ao das puras, características de interação com membranas. Por tudo isso, pode-se especular que a perda de resíduos da Protonectina 1-6 diminui as chances de interação peptídeo-peptídeo e torna a Protonectina capaz de interagir melhor com a micela de SDS, permitindo que ela assuma uma estrutura mais helicoidal e anfipática, características essas que podem estar relacionadas ao aumento na eficiência biológica da mistura de peptídeos em relação às Protonectinas puras, tal como observado experimentalmente por SAIDEMBERG et al, 2010.

Para as Jeleínas, havia três questões principais que se esperava responder, a primeira delas a respeito de como as diferenças na sequência primária destes peptídeos influencia sua interação com miméticos de membrana. Das simulações por Dinâmica Molecular apresentadas neste trabalho inferiu-se que o resíduo de Pro1 é provavelmente o determinante para a atividade antimicrobiana da Jeleína I mais eficiente em relação às demais, pois foi verificado que a Prolina na primeira posição apresenta uma contribuição mais favorável na

energia de interação eletrostática entre o resíduo do N-terminal e a micela de SDS se comparada com a situação em que se tem a Treonina ou a Glutamina. Provavelmente esta interação seja favorecida devido ao fato de que a Thr (polar) ou a Glu (carregada negativamente) acomodam-se com facilidade no ambiente aquoso, enquanto que a Pro (hidrofóbica) têm a necessidade de proteger seus grupos, inserindo-os mais profundamente na micela de SDS e tornando a interação eletrostática com a mesma mais atrativa. A segunda questão é sobre como as pequenas cadeias de Jeleína I afetam as bicamadas lipídicas. Através de estudos experimentais (DOS SANTOS CABRERA et al, 2014) e a contribuição das simulações por dinâmica molecular apresentadas neste trabalho pode-se sugerir um possível mecanismo de ação destes peptídeos com a membrana. Pelas simulações verificou-se a tendência de agregação dos peptídeos de Jeleína I, a forma agregada poderia estar se acumulando na região das cabeças fosfolipídicas, exercendo pressão sobre a membrana para acomodar seus grupos polares e apolares, e este fato causaria a perturbação da membrana provocando poros ou defeitos, causando o vazamento de metabolitos essenciais para membrana. Outra questão diz a respeito a influencia do estado de protonação das Histidinas sobre o modo de ação das Jeleínas. As simulações sugerem que a contribuição de Coulomb para a energia de interação entre os peptídeos e o mimético de membrana é mais favorável em pH ácido (situação em que todas as Histidinas presentes nos peptídeos estão protonadas) e que esta condição diminui a barreira de energia livre para a passagem de água através da bicamada em relação à situação em pH 7.0.

Do ponto de vista global, os resultados obtidos para as diferentes classes de peptídeos nas simulações apresentadas neste trabalho indicam mecanismos de interação com membrana aparentemente opostos, mas que estão relacionados à melhoria da eficiência da interação entre peptídeo e membrana. No caso das Protonectinas os dados sugerem que a agregação entre os peptídeos puros é mais intensa que a agregação entre a mistura de peptídeos que podem se apresentar na forma agregada ou não, dependendo das condições hidrofóbico/hidrofílica do meio em que se encontram. A forma desagregada seria o diferencial que causaria uma melhor eficiência biológica deste par de peptídeos com o modelo de membrana. Para as Jeleínas, os estudos por dinâmica molecular mostraram que os peptídeos de Jeleína I tendem a formar agregados que se assemelham a pequenas esferas em grupos de quatro moléculas de peptídeo e que agem dessa forma sobre o mimético de membrana.

Tendo em vista estes resultados, pode-se considerar que novos estudos seriam indispensáveis para se lançar luz a respeito de quais mecanismos estariam envolvidos na

interação peptídeo/membrana a fim de estabelecer em qual ou em quais situações há a necessidade de agregados ou não.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN M. P.; TILDSLEY D. J. *Computer Simulation of Liquids*. Oxford Science Publications, 1987.

APPELT C. et al., Interaction of the Antimicrobial Peptide Cyclo (RRWWRF) with membranes by Molecular Dynamics Simulations, *Biophysical Journal* , v. 89, p. 2296-2306, 2005.

BALDISSERA G. Análise Conformacional dos Peptídeos Protonectina e Protonectina (1-6), Isolados e em Associação, em Mistura TFE-Água. 2010. 90 f. Dissertação de Mestrado – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2010.

BERENDSEN H. J. C. et. al., Interaction models for water in relation to protein hydration, in: *Intermolecular Forces*, Dordrecht, Reidel Publishing, p. 331-342, 1981

BERENDSEN H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; van GUNSTEREN, W. F.; DiNOLA, A.; HAAK, J. R. Molecular Dynamics with coupling to an external bath, *Journal of Chem. Physics*, v. 81, p. 3684-3690, 1984.

BERGER O., EDHOLM O., JÄHNING F. Molecular Dynamics Simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophysical Journal*, v. 72, p. 2002-2013, 1997.

BOLLA, J. M. et al., Strategies for bypassing the membrane barrier in multidrug resistant Gram-negative bacteria. *FEBS Lett.*, v. 585, p. 1682 – 1690, 2011.

BROOKS B. R. et al., A program for macromolecular energy minimization and calculations, *Journal of Computational Chemistry*, Hoboken, v. 4, p. 187-217, 1983.

BRUCE C.D. Molecular Dynamics Simulation of Sodium Dodecyl Sulfate Micelle in Water: Micellar Structural Characteristics and Counterion Distribution. *Journal of Physics Chemistry B*. v. 106, p. 3788-3793, 2002.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSON, L. Particle mesh Ewald: An $W \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.*, v. 98, p. 10089–10092, 1993.

DATHE M. et al., Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge, *Federation of European Biochemical Societies*, Amsterdam, v. 50, p. 146-150, 2001.

DOS SANTOS CABRERA et al., Combining experimental evidences and molecular dynamic simulations to understand the mechanism of action of the antimicrobial octapeptide Jelleine I, *Biochemistry*, 2014.

DOS SANTOS CABRERA et al., Interactions of mast cell degranulating peptides with model membranes: A comparative biophysical study, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, New York, v. 486, p. 1-11, 2009.

DOS SANTOS CABRERA et al., Selectivity in the mechanism of action of antimicrobial mastoparan peptide Polybia-MP1, *European Biophysics Journal*, Berlin, v. 37, p. 879-891, 2008.

EISENBERG D.; SCHWARZ E.; KOMAROMY M.; WALL R. Analysis of membrane and surface protein sequences with hydrophobic moment plot, *Journal of Molecular Biology*, London, v. 179, p. 125-142, 1984.

ESSMANN U. et al. A smooth particle mesh ewald potential. *Journal Chemistry Physics*. v. 103, p. 8577–8592, 1995.

FABBRETTI A. GUALERZI C. O. and BRANDI L. How to cope with the quest for new antibiotics. *FEBS Lett*. v. 8, p. 543-552, 2011.

FIORONI M. et al. A new 2,2,2-trifluoroethanol model for molecular dynamics simulations, *Journal of Physical Chemistry*, Washington, v. 104, p. 12347-12354, 2000.

FONTANA, R. et al. Jelleines: a Family of antimicrobial peptides from Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides*, v. 25, p. 919-928, 2004.

GURTOVENCO A. A. and VATTULAINEN I. Calculation of electrostatic potential of lipid bilayers from molecular dynamics simulations: Methodological issues, *The Journal of Chemical Physics*, v. 130, 2009.

GURTOVENCO A. A. and VATTULAINEN I. Membrane Potential and Electrostatics of Phospholipid Bilayers with Asymmetric Transmembrane Distribution of Anionic Lipids, *Journal of Physical Chemistry*, v. 112, p. 4629-4634, 2008.

HANEY E. F. et al. Solution NMR studies of amphibian antimicrobial peptides: linking structure to function? *Biochemistry Biophysics Acta*, v. 8, p. 1639-1655, 2009.

HESS, B.; BEKKER, H.; BERENDSEN, H. J. C.; FRAAIJE, J. G. E. M. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations, *Journal of Computational Chemistry*, v. 18, p. 1463-1472, 1997.

HOFSSÄSS C., LINDAHL E. and EDHOLM O. Molecular dynamics simulations of phospholipid bilayers with cholesterol. *Biophysics Journal*, v. 4, p. 2192-2206, 2003.

HORI Y. et al. Interaction of mastoparan with membranes studied by H-NMR spectroscopy in detergent micelles and by solid-state H-NMR and N-NMR spectroscopy in oriented bilayers, *European Biophysics Journal*, Berlin, v. 268, p. 302-309, 2001.

JANOSI L. and GORFE A. A. Simulating POPC and POPC/POPG Bilayers: Conserved Packing and Altered Surface Reactivity, *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 6, p. 3267-3273, 2010.

JUSUFI A.; HYNNINEN A.P.; PANAGIOTOPOULOS A.Z. Implicit Solvent Models for Micellization of Ionic Surfactants. *Journal of Physics Chemistry B*. v. 112, p. 13783-13792, 2008.

KABSCH W. and SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*. v. 22, p. 2577–2637, 1983.

KAMINSKI G. A. et al. Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides. *Journal of Physics Chemistry B*, v. 105, p. 6474-6487, 2001.

KHANDELIA H.; LANGHAM A.A.; KAZNESSIS Y.N. Driving engineering of novel antimicrobial peptides from simulations of peptide-micelle interactions. *Biochemistry Biophysics Acta* v. 1758, p.1224-1234, 2006.

KUMAR S. et al. Multidimensional Free-Energy Calculations Using The Weighted Histogram Analysis Method, *Journal of Computational Chemistry*, Hoboken, v. 16, p. 1339-1350, 1995.

KUMAR S. et al. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method, *Journal of Computational Chemistry*, Hoboken, v. 13, p. 1011-1021, 1992.

LIM K. et al. Immobilization Studies of a Engineered Arginine – Tryptophan-Rich Peptide on a Silicone Surface with Antimicrobial and Antibiofilm Activity. *Applied Materials & Interfaces*, v. 5, p. 6412-6422, 2013.

MACKERELL JR. D.A. Molecular Dynamics Simulation of a Sodium Dodecyl Sulfate Micelle in Aqueous Solution Fluidity of the Micelle Hydrocarbon Interior. *Journal of Physics Chemistry*. v. 99, p. 1846-1855, 1995.

MAKOVITZI, A.; FINK, A. and SHAI, Y. Suppression of Human Solid Tumor Growth in Mice by Intratumor and Systemic Inoculation of Histidine-rich and pH-Dependent Host Defense-like Lytic Peptides. *Cancer Res.* v. 69, p. 3458-3463, 2009.

MANNA M. and MUKHOPADHYAY C, Molecular Dynamics Simulations of Interactions of Kinin Peptides with an Anionic POPG Bilayer, *Langmuir*, v. 27, p. 3713-3722, 2011.

MARTINS DO CANTO A. M. T. et al. Molecular dynamics simulations of T-20 HIV fusion inhibitor interacting with model membranes, *Biophysical Chemistry*, v. 159, p. 275-286, 2011.

MASON A. J. et al. Structural Determinants of Antimicrobial and Antiplasmodial Activity and Selectivity in Histidine-rich Amphipathic Cationic Peptides. *Journal Biology Chemistry*, v. 284, p. 119- 133, 2009.

MATSUZAKI K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides, *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 1788, p. 1687-1692, 2009.

MATSUZAKI K.; MURASE, O.; FUJII, N.; MIYAJIMA, K. An Antimicrobial Peptide, Magainin 2, Induced Rapid Flip-Flop of Phospholipids Coupled with Pore Formation and Peptide Translocation, *Biochemistry*, v. 35, p. 11361-11368, 1996.

MATSUZAKI, K.; SUGISHITA, K.; HARADA, M.; FUJII, N.; MIYAJIMA, K.; Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1327, p. 119-130, 1997.

MÁTYUS, E.; KANDT, C.; TIELEMAN, P. D. Computer simulations of antimicrobial peptides, *Curr. Med. Chem.* v. 14, p. 2789–2798, 2007.

MENDES M. A. et al. Structural and biological characterization of two novel peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*, *International Society of Toxicology*, Oxford, v. 44, p. 67-74, 2004.

MIYAMOTO S.; KOLLMAM P. A. SETTLE: an analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models, *Journal of Computational Chemistry*, Hoboken, v. 13, p. 952-962, 1992.

MURZYN K., RÓG T. and PASENKIEWICZ-GIERULA M. Phosphatidylethanolamine – Phosphatidylglycerol bilayer as a Model of Inner Bacterial Membrane, *Biophysical Journal*, v. 88, p. 1091-1103, 2005.

NISHIDA M. et al. Interaction of a magainin-PGLa hybrid peptide with membranes: insight in into the mechanism of synergism, *Biochemistry*, v. 49, p. 14284-14290, 2007.

OREN Z.; SHAI Y. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides, *Biopolymers*, New York, v. 47, p. 451-463, 1998.

PÁLL S; HESS B. A flexible algorithm for calculating pair interactions on SIMD architectures, *Computer Physics Communications*, **84**, 2641-2650, 2013.

PEARLMAN D. A. et al. AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. *Computer Physics Communications*, v. 91, p. 1-41, 1995.

QUINA F.H. et al. Growth of Sodium Dodecyl Sulfate Micelles with Detergent Concentration. *Journal of Physics Chemistry*. v. 99, p. 17028-17031, 1995.

RAKITIN A.R.; PACK G.R. Molecular Dynamics Simulation of Ionic Interactions with Dodecyl Sulfate Micelles. *Journal of Physics Chemistry B*. v. 108, p. 2712-2716, 2004.

RHEE Y. M.; PANDE V. S. Multiplex-Replica Exchange Molecular Dynamics Method for Protein Folding Simulation, *Biophysical Journal*, New York, v. 84, p. 775-786, 2003.

ROCCATANO D. et al. Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: A molecular dynamics study, *Proceedings of the*

national academy of sciences of the United States of America, *Washington*, v. 99, p. 12179–12184, 2002.

ROMANELLI A. et al. Peptides from Royal Jelly: studies on the antimicrobial activity of jelleins, jelleins analogs and synergy with temporins, *Journal of Peptide Science*, v. 17, p. 348 – 352, 2010.

SAIDEMBERG N. B. et al. A novel chemotactic peptide from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. *Toxicon*, v. 56, p. 880-889, 2010.

SAMMALKORPI, M. et al. Structural Properties of Ionic Detergent Aggregates: Large-Scale Molecular Dynamics Study of Sodium Dodecyl Sulfate. *Journal of Physics Chemistry B*, v. 111, p. 11722-11733, 2007.

SCHULER L. D., DAURA X. and VAN GUNSTEREN W. F. An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase. *Journal of Computational Chemistry*, **22**:1205–1218, 2001.

SHANG Z.B.; WANG Z.; LARSON R.G. Molecular Dynamics Simulation of Interaction between a Sodium Dodecyl Sulfate Micelle and Poly(Ethylene Oxide) Polymer. *Journal of Physics Chemistry*. v. 112, p. 2888-2900, 2008.

SOARES T. A. et al. Validation of the GROMOS force-field parameter set 45A3 against nuclear magnetic resonance data of hen egg lysozyme. *Journal of Biomolecular NMR*. v. 30, p. 407-422, 2004.

SUGITA Y.; OKAMOTO Y. Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding, *Chemical physics letters*, Amsterdam, v. 314, p. 141-151, 1999.

TIRONI I. G et al. A generalized reaction field method for molecular dynamics simulations. *Journal of Chemical Physics*, **102**, 5451, 1995.

TORRENT M. et al. Antimicrobial Peptide Action on Parasites, *Current Drug Targets*, v. 13, p. 1138-1147, 2012.

TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, v. 55, p. 4-30, 2000.

TU Z. et al. The pH sensitivity of histidine-containing lytic peptides. *Journal of Peptide Science*, v. 11, p. 790-795, 2009.

VALDER T. R. Interação do Peptídeo MP-I com micela de SDS em Solução Aquosa: Um Estudo por Dinâmica Molecular. 2010. 89 f. Dissertação de Mestrado – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2010.

VAN GUNSTEREN W. F. et al. Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guidem; vdf Hochschulverlag ETH Zürich, Switzerland, 1996.

VAN GUNSTEREN W. F.; BERENDSEN H. J. C. Gromos87 Library Manual *BIOMOS* Groningen, Netherlands, 1987.

VERLET L. Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules, *Physical review letters*, New York, v. 159, p. 98-103, 1967.

VIVCHARUK V. and KAZNESSIS Y. N. Dimerization of Protegrin-1 in Different Environments. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 11, p. 3177-3194, 2010.

WANG Q. et al. Biophysical Properties of Membrane-Active Peptides Based on Micelle Modelling: A Case Study of Cell-Penetrating and Antimicrobial Peptides, *Journal of Physical Chemistry B*, v. 114, p. 13726-13735, 2010.

YANG, L. et al. Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores. *Biophysical Journal*, v. 81, p. 1475-1485, 2001.

YEAMAN M. R.; YOUNT N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance, *American Society of Pharmacology and Experimental Therapeutics British Pharmacological Society*, Baltimore, v. 55, p. 27-55, 2003.

ZANA R. Dynamics of Surfactant Self-Assemblies: Micelles, Microemulsions, Vesicles, and Lyotropic Phases. *Surfac. Sci. Series*: CRC Press: Boca Raton, FL, v. 125, 2005.

ZHAO H. et al. Interactions of the antimicrobial peptides temporins with model biomembranes. Comparasion of temporins B and L, *Biochemistry*, Moscow, v. 41, p. 4425-4436, 2002.

ZHU F., TAJKHORSHID E. and SCHULTEN K. Pressure-Induced Water Transport in Membrane Channels Studied by Molecular Dynamics, *Biophysical Journal*, **83**, 154-160, 2002.