



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

Taisa Giordano Viegas

Interação do peptídeo antimicrobiano L1A com
membrana modelo: Efeito do pH e carga da
vesícula

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2014

Taisa Giordano Viegas

**Interação do peptídeo antimicrobiano L1A com
membrana modelo: Efeito do pH e carga da
vesícula**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Biofísica Molecular junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. João Ruggiero Neto

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2014

Viegas, Taisa Giordano.

Interação do peptídeo antimicrobiano L1A com membrana modelo :
efeito do pH e carga da vesícula / Taisa Giordano Viegas. -- São José do
Rio Preto, 2014

52 f. : il., tabs.

Orientador: João Ruggiero Neto

Dissertação (mestrado)—Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Biofísica. 3. Peptídeos antibióticos.
4. Agentes anti-infecciosos. 5. Membranas (Biologia) 6. Dicroísmo
circular. 7. Energia livre. I. Ruggiero Neto, João. II. Universidade
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.3

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

Taisa Giordano Viegas

**Interação do peptídeo antimicrobiano L1A com
membrana modelo: Efeito do pH e carga da
vesícula**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Biofísica Molecular junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Fernando Luis Barroso da Silva
USP- Ribeirão Preto

Prof. Dr. Alexandre Suman de Araujo
UNESP- São José do Rio Preto

Prof. Dr. João Ruggiero Neto
UNESP- São José do Rio Preto
Orientador

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2014

Agradecimentos

Agradeço a orientação, dedicação, paciência e amizade do professor João Ruggiero Neto.

Aos meus pais, irmão e a toda minha família que, com muito amor e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação.

A todos os funcionários do departamento de física.

Aos amigos pelo companheirismo, tanto nas horas de estudo como nos momentos de distração.

A CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro durante o mestrado.

Resumo

Peptídeos antimicrobianos possuem em geral cadeias curtas, carga líquida positiva devido ao excesso dos resíduos básicos e são ricos em aminoácidos hidrofóbicos. Possuem um grande potencial farmacológico, com atividade antimicrobiana modulada por interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Neste trabalho utilizou-se o peptídeo sintético L1A (*IDGLKAIWKKVADLLKNT* – NH_2), que devido aos resíduos de ácido aspártico e lisinas constituintes de sua cadeia, possui carga líquida +3, em pH neutro. Foram analisadas as influências do pH e da carga de vesículas aniônicas na adsorção do peptídeo. Este estudo utilizou medidas de potencial eletrocinético de vesículas e experimentos de titulação monitorados por dicroísmo circular (CD). A adsorção do L1A a LUVs de POPC e misturas POPC/POPG em diferentes proporções de POPG, foi medida nos pHs 4, 7 e 10. Os espectros de dicroísmo circular dos peptídeos, na presença de vesícula, apresentaram características de estruturas helicoidais, enquanto apresentaram estruturas desordenadas em tampão. As frações de hélices obtidas são maiores quando o peptídeo adsorve em vesículas com maiores quantidades de POPG, indicando forte contribuição eletrostática. As constantes aparentes de adsorção dos peptídeos às membranas modelo foram calculadas através da elipticidade de CD normalizada em 222 nm, obtidas por titulações de peptídeo com vesículas. A afinidade do peptídeo a vesículas aniônicas é significativamente maior do que a vesículas zwitteriônicas, o que reforça a importância das interações eletrostáticas no processo de adsorção do peptídeo na bicamada. O efeito conjunto de carga das vesículas e de pH resultaram em significativa regulação de carga do peptídeo resultando em valores de carga efetiva alta em pH 4,0 devido à protonação dos resíduos de aspártico. Em pH 10,0 a pequena carga efetiva calculada deve-se às desprotonações do N-terminal e das lisinas. A soma das energias livres eletrostática e interfacial, são aditivas em pH 4,0, principalmente nas composições lipídicas mais ricas em lipídios aniônicos, nas quais a regulação de cargas do peptídeo é maior.

Palavras-chave: Peptídeo Antimicrobiano. Vesículas. Dicroísmo Circular. Potencial Eletrocinético. Energia livre.

Abstract

Antimicrobial peptides have in general short chains, positive net charge due to the excess of basic residues and are rich in hydrophobic amino acids. They have pharmacological potential as antimicrobial agents and their activity is modulated by electrostatic and hydrophobic interactions. In this work, we used the synthetic peptide L1A (*IDGLKAIWKKVADLLKNT* – NH_2) that due to its acid and basic residues have an net charge +3, at neutral pH. The effects of the pH and of the charges of anionic vesicles on the adsorption of L1A were analyzed. This study used measurement of electrokinetic potential of vesicles and titration experiments monitored by circular dichroism spectroscopy (CD). Adsorption of L1A to POPC and POPC/POPG LUVs in different POPG contents were assessed in the pH 4.0, 7.0 and 10.0. Circular dichroism spectra of the peptides in the presence of vesicles showed to features of helical structures; while random coil structures were observed at buffer for all the used pHs. The helical content was evaluated and showed to increase when the peptide adsorbs into vesicles with increasing amounts of POPG, indicating that there is a strong electrostatic contribution. Partition coefficients were calculated through the normalized CD ellipticities at 222 nm and showed that the affinity of the peptide for anionic model membranes is effectively higher than those found for zwitterionic ones. It reinforces the importance of the electrostatic contribution to the process of peptide-lipid interaction. The coupled effect of the vesicle charge and pH lead to significant charge regulation of the peptide resulting in high values of effective charge at pH 4.0 due to the deprotonation of aspartic acid residues. At pH 10.0 the estimated effective charge is small as a consequence of the deprotonation of both N-terminus and the lysines. The electrostatic and interfacial free energies seems to be additive only at pH 4.0, especially for the bilayers with higher contents of anionic lipids, to which the charge regulation is higher.

Keywords: Antimicrobial Peptides. Vesicles . Circular Dichroism. Electrokinetic Potential. Free Energy.

Lista de Figuras

1.1	Modelos de mecanismos de ação dos AMPs. a) Modelo carpete: os peptídeos rompem a membrana através da orientação paralela à superfície da bicamada lipídica, formando uma extensa camada. b) Poro Barril: os peptídeos agregados ligam-se à membrana de forma que as regiões hidrofóbicas dos peptídeos possam se alinhar com a região do núcleo lipídico e as regiões hidrofílicas formem o interior do poro. c) Poro toroidal: os peptídeos ligam-se às cabeças polares dos fosfolipídios, induzindo curvatura positiva e consequente aproximação das monocamadas lipídicas resultando na formação de poro. Regiões hidrofílicas do peptídeo são mostradas em vermelho, hidrofóbicas em azul. Figura modificada de [1].	13
1.2	Projeção da sequência dos peptídeos em estudo em estruturas helicoidais ideais. Peptídeo base MP1 e o sintético L1A. Figura extraída de [2].	15
1.3	Valência da carga líquida versus pH, calculada para o peptídeo L1A. Figura extraída de [3]	16
3.1	Estrutura do POPC. Figura retirada de [4].	23
3.2	Estrutura POPG. Figura retirada de [4].	23
3.3	Efeito do dicroísmo circular sobre as componentes circularmente polarizadas E_R (sentido horário e em vermelho) e E_L (sentido anti-horário e em azul). (A) Componentes circularmente polarizadas de mesma amplitude que, quando combinadas, geram radiação plano polarizada (em verde); (B) componentes de magnitude diferente que resultam em uma luz elipticamente polarizada (elipse em verde). (C) Elipicidade θ , tangente obtida pela razão do menor e do maior eixo da elipse. Extraído de [5].	26

3.4	Espectros de dicroísmo circular típicos para peptídeos estruturados. Verde: espectro característico de estrutura randômica; azul: espectro característico de estrutura em folha- β e vermelho: espectro característico de α -hélice. Extraído de [6].	27
3.5	Representação do espalhamento de dinâmico de luz. Figura adaptada de [7].	28
3.6	Configuração do feixe duplo. Adaptada de [8].	30
3.7	Energia livre de transferência por resíduo (kcal/mol) da água para a interface de POPC. Extraído de [9].	32
4.1	Espectro de CD medido em solução tampão em pH 4, 7 e 10. Elipticidade molar versus comprimento de onda de 10 μM de peptídeo L1A.	34
4.2	Espectro de dicroísmo circular de L1A a 10 μM em tampão em pH 7. a) Na presença de vesículas com 20% de POPG, b) 40% de POPG e c) 80% de POPG.	34
4.3	Espectros de CD de 10 μM de L1A titulado com 300 μM de LUVs de POPC em tampão pHs 4,0; 7,0 e 10,0	35
4.4	Isotermas de adsorção: elipticidade molar normalizada em 222 nm em função da concentração de lipídios, a linha tracejada é obtida pelo ajuste da equação não linear 3.6. Titulação de LUVs com proporções de POPC:POPG 80:20, 60:40, 40:60 e 20:80, como mostrado no gráfico, em tampão a)em pH4, b)em pH 7 e c)em pH 10.	36
4.5	Energia livre de adsorção (ΔG_{ads}) em função do potencial na superfície da vesícula, calculado pela equação 1.22, a partir do potencial zeta obtido experimentalmente (símbolos preenchidos) e calculados teoricamente pela equação 4.1 (símbolos aberto). a) pH 4,0; b) pH 7,0 e c) pH 10,0	41
4.6	Energia livre de adsorção (ΔG_{ads}) em função da energia livre hidrofóbica (ΔG_{if}), calculada pelo pacote MPEx, com os valores de frações helicoidais apresentados na tabela 4.1, nos pHs 4 e 10.	42

Lista de Tabelas

3.1	Propriedades estruturais do peptídeo: número de resíduos de aminoácidos (N_{aa}), valência da carga do peptídeo em pH 7 e hidrofobicidade (H) calculada utilizando a sequência consenso de Eisenberg	24
4.1	Constante de partição ($10^3 K_p$ em M^{-1}) e frações máximas de hélices α para o peptídeo L1A	37
4.2	Fração de aminoácidos protonados. Para o ácido aspártico os valores foram calculados em pH 4, o N terminal e a lisina em pH 10. f_{AH}^E correspondem a fração de aminoácidos protonados obtidos pelos dados de potencial de superfície experimentais (Ψ_0^{exp}) e f_{AH}^T pelos potenciais teóricos Ψ_0^t . Os valores de potenciais de superfície estão em mV	39
4.3	Potencial de Superfície (mV), valência efetiva da carga do peptídeo e graus de iônização dos lipídios. Ψ_0^{exp} é calculado pelo valor de potencial zeta, pela equação 1.22 e Ψ_0^t pela equação 4.1	40
4.4	Energias livres de: adsorção (ΔG_{ads}), eletrostática (ΔG_{el}) e interfacial (ΔG_{if}). Energias em kcal/mol.	42

Lista de Símbolos

CD- Dicroísmo Circular

D- Deslocamento dielétrico

e- carga elementar do elétron

E- Campo elétrico

f_{ah} - fração de lipídios protonados

f_h - fração de hélices

HCl- Ácido Clorídrico

HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana (Human Immunodeficiency Virus)

HPLC- Cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance/Pressure Liquid Chromatography)

K- Constante de partição

k_0 - Vetor onda incidente

K_b - constante de Boltzmann

K_p - Constante de partição aparente

k_s - Vetor onda espalhado

LUV- Vesículas unilamelares grandes

MLV- Vesículas multilamelares grandes

n^0 - Concentração de íons na solução

NaOH- Hidróxido de sódio

PAMs- Peptídeos antimicrobianos

POPC- 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina

POPG- 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol

T- Temperatura

TFE- Trifluoroethanol

z- valência da carga

zef- valência da carga efetiva

α - grau de iônização do lipídio

δg - Energia da ligação de hidrogênio

ΔG_{ads} - Energia livre de adsorção

ΔG_{conf} - Energia livre conformacional

ΔG_{el} - Energia livre eletrostática

ΔG_{if} - Energia livre interfacial

$\Delta\nu$ - Deslocamento de frequência

ϵ - Permissividade dielétrica

ζ - Potencial zeta

η - Viscosidade

θ - elipticidade

κ - constante de Debye-Huckel

μ - Mobilidade eletroforética

ρ - Densidade volumétrica de carga

Ψ - Potencial superficial

Sumário

1	Introdução	12
1.1	Modelo de Gouy-Chapman	17
2	Objetivo	22
3	Materiais e Métodos	23
3.1	Materiais	23
3.2	Métodos	25
3.2.1	Preparação de vesículas	25
3.2.2	Dicroísmo Circular	25
3.2.3	Espalhamento de Luz Dinâmico	28
3.2.4	Potencial Zeta	29
3.2.5	Cálculos energéticos	31
4	Resultados	33
4.1	Análise conformacional	33
4.2	Isotermas de adsorção	35
4.3	Potencial zeta e potencial de superfície	37
4.4	Energética	40
5	Discussão	43
6	Conclusões	47

Capítulo 1

Introdução

Os primeiros peptídeos com propriedades antimicrobianas foram encontrados por volta dos anos 60, por Spitznagel e Zeya e em sequência um novo campo de pesquisa foi iniciado. Desde então mais de 1400 peptídeos antimicrobianos (PAMs) tem sido isolados de animais vertebrados e invertebrados, plantas e até de bactérias. Durante os últimos anos, um número crescente de pesquisadores de todo o mundo têm contribuído para uma expansão rápida e contínua da área [10].

Peptídeos antimicrobianos são formados por até 50 resíduos de aminoácidos, sendo que em média são sequências de 12 a 20 resíduos. Foram observadas uma enorme variedade de sequências e estruturas, porém existem certas características comuns a todos, tais como, possuir carga líquida positiva devido ao excesso dos resíduos básicos como lisina e de arginina e conter cerca de 50 % de aminoácidos hidrofóbicos [11].

O estudo desses PAMs mostrou um amplo espectro de atuação. Por possuírem carga positiva são seletivos a membranas aniônicas, que é a principal característica da monocamada externa de bactérias. Em geral, a atividade lítica destes peptídeos é atribuída à desestruturação da bicamada lipídica. Por isso, essa atividade é independente de receptores na membrana dificultando que micro organismos desenvolvam resistência aos PAMs, o que atribui a esses peptídeos um grande potencial farmacológico, sendo eficientes contra bactérias resistentes, Gram-negativas e Gram-positivas, fungos e protozoários e apresentam seletividade a células câncer[11]. Foi observado também que alguns destes peptídeos possuem atividade antiviral com mecanismos que bloqueiam a fusão vírus-célula, sendo eficientes contra os vírus HIV, herpes simples e estomatite vesicular [11].

Há três modelos que descrevem a permeabilização da membrana pelos peptídeos antimicrobianos, sendo estes modelos conhecidos como poro barril, poro toroidal e carpete, representados na figura 1.1 . O modelo poro barril foi proposto pela primeira

vez pelo Ehrenstein e Lecar em 1977 [12], neste mecanismo o peptídeo em estrutura helicoidal interage com as cadeias acíclicas dos fosfolipídios da membrana, gerando um poro aquoso que consiste de, pelo menos, quatro peptídeos. Para este tipo de poro os peptídeos devem possuir um comprimento adequado para atravessar o núcleo hidrofóbico da membrana, fazendo com que os resíduos apolares do peptídeo interagem com a porção hidrofóbica dos fosfolipídios da membrana e a região polar do peptídeo fica voltada para dentro do poro [13].

No modelo denominado poro toroidal os peptídeos interagem com os fosfolipídios da membrana formando um complexo que resulta na formação de um poro por induzir curvatura positiva na membrana. A diferença entre este modelo e o modelo barril é que os peptídeos estão sempre associados com as cabeças polares dos fosfolipídios, mesmo quando inseridos perpendicularmente à bicamada lipídica [14].

O mecanismo carpete se inicia com o peptídeo sendo adsorvido na membrana lipídica. As cargas positivas do peptídeo ligam-se às cargas negativas das cabeças polares dos fosfolipídios, com os peptídeos paralelos na região de interface formando uma extensa camada ou carpete. Quando a concentração de peptídeos adsorvidos na membrana atinge um valor crítico, a membrana pode ser permeada por desbalanço de massa, miscelização ou ruptura [15].

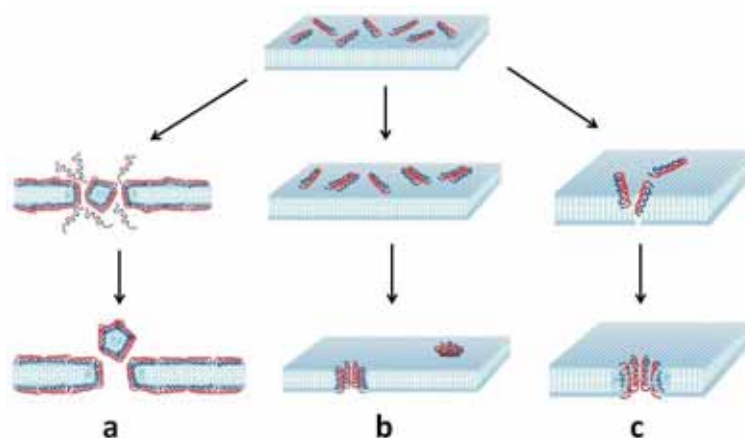


Figura 1.1: Modelos de mecanismos de ação dos AMPs. a) Modelo carpete: os peptídeos rompem a membrana através da orientação paralela à superfície da bicamada lipídica, formando uma extensa camada. b) Poro Barril: os peptídeos agregados ligam-se à membrana de forma que as regiões hidrofóbicas dos peptídeos possam se alinhar com a região do núcleo lipídico e as regiões hidrofílicas formem o interior do poro. c) Poro toroidal: os peptídeos ligam-se às cabeças polares dos fosfolipídios, induzindo curvatura positiva e consequente aproximação das monocamadas lipídicas resultando na formação de poro. Regiões hidrofílicas do peptídeo são mostradas em vermelho, hidrofóbicas em azul. Figura modificada de [1].

Apesar da proposição destes três modelos, o modo de ação dos PAMs ainda não

é muito bem compreendido. Foi observado que alguns peptídeos podem apresentar mais de um mecanismo de ação dependendo da relação peptídeo/lipídio [16]. Estudos recentes têm argumentado que são raros os PAM que podem formar poro estável [16]. Todos os modelos propostos apresentam um aspecto comum: a adsorção do peptídeo na bicamada. Este passo comum tem como força diretora a atração eletrostática entre a região catiônica e os lipídios da membrana. Portanto, pode-se usar a termodinâmica para ajudar nos estudos da interação peptídeo-membrana dividindo essa interação em três passos básicos: O primeiro, é inicializado pela atração eletrostática, sendo este dependente da carga do peptídeo e do potencial na superfície da membrana. O próximo passo é a transferência do peptídeo desestruturado da solução para a interface entre solução e a membrana. Esta transferência é seguida de mudança conformacional que é dependente do balanço hidrofílico e hidrofóbico devido à sequência de aminoácidos do peptídeo e da composição dos fosfolipídios da membrana, resultando no enovelamento do peptídeo em α -hélice ou folhas β [13]. Então, eles se acumulam na superfície celular até atingir uma concentração crítica provocando imersão na bicamada, otimizando a anfipaticidade ao interagir com regiões hidrofóbica e hidrofílica da membrana [17].

Entre as estruturas anfipáticas, a hélice anfipática é a mais frequentemente observada entre as estruturas secundárias formadas pelos peptídeos antimicrobianos [18]. Sua representação mais comum é mostrada, como a projeção de Edmundson ou projeção da hélice em um círculo, com os resíduos polares em uma superfície da hélice e na superfície oposta os não polares. Essa simetria entre a face polar e a não polar é caracterizada pelo momento hidrofóbico, fazendo com que a hélice anfipática seja adequada para ser adsorvida na interface das membranas, com a superfície polar voltada para a fase aquosa e a não polar para o interior da membrana, favorecendo sua estabilidade estrutural [19]. A formação das pontes de hidrogênio entre os grupos amida e carbonilas da cadeia principal (backbone) que estabilizam a conformação helicoidal são energeticamente mais favoráveis quando o peptídeo está imerso em um meio de constante dielétrica mais baixa, como por exemplo, a parte hidrofóbica da membrana. Isto torna também energeticamente favorável a adsorção na membrana. Landokin e White estimaram, baseado neste processo de partição e enovelamento, no qual o custo energético por resíduo para um peptídeo assumir a conformação de α -hélice em uma bicamada zwitteriônica de POPC é $\delta g = -0,41 \pm 0,06$ kcal/mol. Esta energia foi determinada experimentalmente em um estudo de partição do peptídeo melitina em vesículas unilamelares grandes de POPC [20].

O conhecimento das energias envolvidas no processo de interação entre peptídeos e membranas é importante para a compreensão das bases físico-químicas envolvidas na seletividade e especificidade de peptídeos antimicrobianos a membranas modelo e

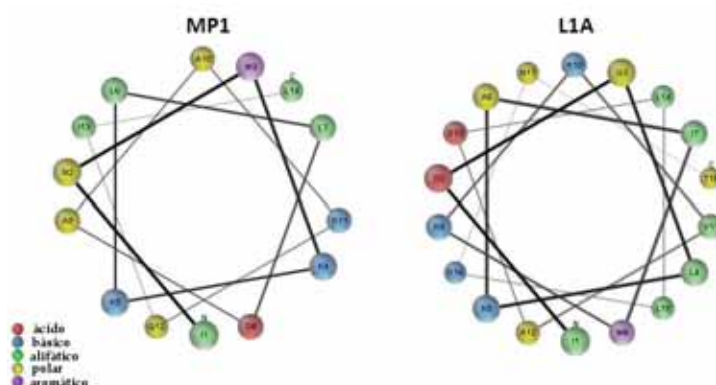


Figura 1.2: Projeção da sequência dos peptídeos em estudo em estruturas helicoidais ideais. Peptídeo base MP1 e o sintético L1A. Figura extraída de [2].

também a membranas biológicas. A energética é também importante para a compreensão de alguns passos envolvidos nos mecanismos de ação destes peptídeos. Enfim, o conhecimento da energética envolvida no processo acoplado de partição e enovelamento, é importante para o desenho de novas sequencias com a atividade antimicrobiana otimizada e baixa citotoxicidade.

Experimentalmente, a energética envolvida na adsorção de peptídeos a bicamadas pode ser explorada, em geral, em experimentos de titulação, nos quais uma solução de peptídeo é titulada com uma solução contendo vesículas lipídicas, ou o oposto. Mudanças em alguma característica espectroscópica ou qualquer outra propriedade física como potencial de superfície, viscosidade etc são utilizadas [21]. Estes dados são em geral dispostos como isotermas de Lagmuir que podem ser analisadas para obter a constante de partição ou constante de adsorção do peptídeo na bicamada: $\Delta G = -RT \ln(55,5K)$, onde RT é a energia térmica e o fator 55,5 é a concentração molar da água que corrige para a contribuições crática do solvente.

Nesse trabalho, a aditividade destas componentes energéticas foi avaliada para o peptídeo sintético L1A (*IDGLKAIWKKVADLLKNT – NH₂*), que foi desenhado pelo grupo e possui algumas características presentes no peptídeo Polybia MP1, ou simplesmente MP1 (*IDWKKLLDAAKQIL – NH₂*), da família dos mastoparanos extraído do veneno da vespa nativa *Polybia paulista* (figura 1.2). O MP1 é um peptídeo com atividade bactericida de amplo espectro contra bactérias Gram positivas e Gram negativas [22] não sendo hemolítico nem citotóxico.

Trabalhos em simulação de dinâmica molecular do MP1 em TFE sugerem um importante papel do resíduo ácido no N-terminal bem como a posição relativa dos resíduos ácidos e básicos ao longo da sequência [22]. Estas simulações mostraram que o posicionamento relativo destes grupos auxilia no balanço das carga, dando origem a um

conjunto de pontes de hidrogênio intracadeia que estabiliza a conformação de hélice anfipática, auxiliando, portanto, no balanço entre carga e hidrofobicidade. As simulações mostraram ainda que o resíduo D2 está posicionado a 0,6 nm da lisina K5, portanto a uma distância mais favorável para formação de ponte salina do que com NH_3^+ do N-terminal. Entretanto, foi observado nestas simulações que o resíduo D2 favorece o equilíbrio de cargas entre estes grupos minimizando o campo elétrico destas cargas positivas. Foi observado também que o outro resíduo de ácido aspártico, D8, está envolvido em pontes salina com duas lisinas K4 e K11. Outra característica estrutural que acredita-se ser responsável pela seletividade é a hidrofobicidade média por resíduo $\langle H \rangle = -0,1$.

O peptídeo L1A foi projetado para preservar estas características do MP1, mas aumentando o comprimento da cadeia em quatro resíduos. A sequência L1A possui quatro lisinas e dois resíduos de ácido aspártico, sendo que em pH 7 possui uma carga igual com valência +3. Entretanto, um simples cálculo da curva de ionização dos grupos em função do pH mostra que as valências da carga líquida deste peptídeo fica próxima de 3,8, 3 e 1,4 em pHs 4, 7 e 10 respectivamente. Esta variação com o pH é devido a protonação dos grupos terminais e/ou das cadeias laterais dos aminoácidos (figura 1.3). Além da mudança na carga líquida do peptídeo, sabe-se que quando as vesículas são carregadas negativamente, elas atraem não somente os peptídeos da solução, mas também os cations, fazendo com que o pH próximo a interface seja mais ácido do que na solução.

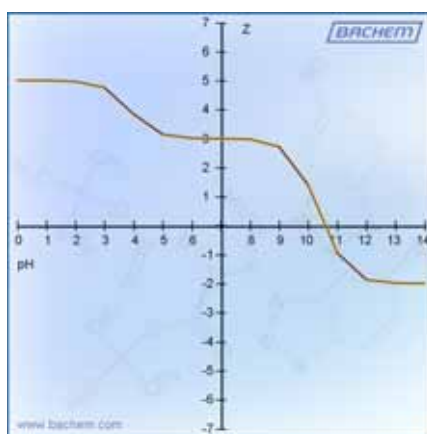


Figura 1.3: Valência da carga líquida versus pH, calculada para o peptídeo L1A. Figura extraída de [3]

1.1 Modelo de Gouy-Chapman

Um modelo que tem sido extensivamente utilizado para analisar isotermas e para determinar as contribuições energéticas na partição de peptídeos a bicamadas aniônicas é o modelo de Gouy Chapman. De acordo com este modelo, uma superfície plana carregada, que possui um potencial de superfície Ψ_0 , é imersa em uma solução contendo eletrólitos. Os íons de compensação são considerados como cargas pontuais imersas em um meio dielétrico contínuo. Então pela equação de Poisson, [23]

$$\nabla \cdot \mathbf{D} = \rho \quad (1.1)$$

Porém $\mathbf{D}$ é o deslocamento dielétrico, logo

$$\mathbf{D} = \epsilon \mathbf{E} \quad (1.2)$$

Onde $\mathbf{E}$ é o campo elétrico e ϵ a permissividade dielétrica e ρ a densidade volumétrica de carga. Logo

$$\nabla \cdot (\epsilon \mathbf{E}) = \nabla \cdot (-\epsilon \nabla \Psi) = \rho \quad (1.3)$$

Portanto

$$\nabla^2 \Psi = -\frac{\rho}{\epsilon} \quad (1.4)$$

A densidade volumétrica de carga é definida em função da concentração (densidade numérica) de íons n_i , de suas valências z_i e da carga elementar e :

$$\rho = \sum_i n_i z_i e \quad (1.5)$$

A concentração local de cada tipo de íon na dupla camada é dada pela equação de Boltzmann

$$n_i = n_i^0 \exp(-z_i e \Psi / k_B T) \quad (1.6)$$

onde n_i^0 é a concentração de íons no "bulk" da solução, k_B é a constante de Boltzmann, T a temperatura e z_i a valência do íon i .

Substituindo a densidade volumétrica de carga e a concentração local de íons na equação (1.4) encontra-se a equação de Poisson-Boltzmann

$$\nabla^2 \Psi = \frac{d^2 \Psi}{dx^2} = -\frac{1}{\epsilon} \sum_i n_i^0 z_i e \exp(-z_i e \Psi / k_B T) \quad (1.7)$$

Para o caso em que tem-se eletrólito 1:1, isso é, $n^0 = n^0_+ = n^0_-$ e $z = z_+ = -z_-$.

$$\frac{d^2\Psi}{dx^2} = -\frac{n^0 ez}{\epsilon} \cdot [\exp(-ze\Psi/k_B T) - \exp(ze\Psi/k_B T)] \quad (1.8)$$

Usando a identidade $\sinh p = (e^p - e^{-p})/2$ a equação acima pode ser reescrita

$$\frac{d^2\Psi}{dx^2} = \frac{2n^0 ez}{\epsilon} \cdot \sinh(ze\Psi/k_B T) \quad (1.9)$$

Multiplicando os dois lados dessa equação por $2d\Psi/dx$ e integrando em x tem-se

$$\int \frac{2d\Psi}{dx} \cdot \frac{d^2\Psi}{dx^2} \cdot dx = \frac{4n^0 ez}{\epsilon} \int \sinh(ze\Psi/k_B T) \cdot \frac{d\Psi}{dx} \cdot dx \quad (1.10)$$

logo

$$\int_{x=0}^{x=\infty} d \left(\frac{d\Psi}{dx} \right)^2 = \frac{4n^0 ez}{\epsilon} \int_{\Psi=0}^{\Psi=\infty} \sinh(ze\Psi/k_B T) \cdot d\Psi \quad (1.11)$$

Resolvendo as integrais

$$\left(\frac{d\Psi}{dx} \right)^2 = \frac{4n^0 k_B T}{\epsilon} [\cosh(ze\Psi/k_B T) - 1] \quad (1.12)$$

Usando a identidade $\cosh(p) = 2\sinh^2(p/2) + 1$, tem-se

$$\frac{d\Psi}{dx} = - \left[\frac{8n^0 k_B T}{\epsilon} \right]^{1/2} \cdot \sinh(ze\Psi/2k_B T) \quad (1.13)$$

sabendo que o parâmetro de Debye-Huckel é dado por [23]

$$\kappa = \left(\frac{e^2 \sum n_i^0 z_i^0}{\epsilon k_B T} \right)^{1/2} \quad (1.14)$$

Substituindo a equação (1.14) na (1.13) tem-se

$$\frac{d\Psi}{dx} = - \frac{2\kappa k_B T}{ze} \cdot \sinh(ze\Psi/2k_B T) \quad (1.15)$$

pode-se reescrever essa equação para

$$\int \frac{ze}{k_B T} \frac{1}{2 \cdot \sinh(ze\Psi/2k_B T)} d\Psi = \int -\kappa dx \quad (1.16)$$

Definindo $\phi = \frac{ze\Psi}{k_B T}$ como o potencial reduzido, resolvendo essas integrais encontra-se

$$\ln \left[\frac{\exp\left(\frac{\phi}{2}\right) - 1}{\exp\left(\frac{\phi}{2}\right) + 1} \right] = -\kappa x + C \quad (1.17)$$

Sendo C a constante de integração, que é determinada ao aplicar a condição que em $x = 0$ o potencial $\Psi(x = 0) = \Psi_0$, que implica em um potencial reduzido $\phi_0 = \frac{ze\Psi_0}{k_B T}$. Então

$$C = \ln \left[\frac{\exp\left(\frac{\phi_0}{2}\right) - 1}{\exp\left(\frac{\phi_0}{2}\right) + 1} \right] \quad (1.18)$$

Aplicando a constante de integração acima na equação (1.17)

$$\ln \left[\frac{\exp\left(\frac{\phi}{2}\right) - 1}{\exp\left(\frac{\phi}{2}\right) + 1} \right] = -\kappa x + \ln \left[\frac{\exp\left(\frac{\phi_0}{2}\right) - 1}{\exp\left(\frac{\phi_0}{2}\right) + 1} \right] \quad (1.19)$$

Sabendo que

$$\sinh\left(\frac{\phi_0}{4}\right) = \frac{\exp\left(\frac{\phi_0}{4}\right) - \exp\left(\frac{-\phi_0}{4}\right)}{2} = \frac{\exp\left(\frac{2\phi_0}{4}\right) - 1}{2.\exp\left(\frac{\phi_0}{4}\right)} \quad (1.20)$$

$$\cosh\left(\frac{\phi_0}{4}\right) = \frac{\exp\left(\frac{\phi_0}{4}\right) + \exp\left(\frac{-\phi_0}{4}\right)}{2} = \frac{\exp\left(\frac{2\phi_0}{4}\right) + 1}{2.\exp\left(\frac{\phi_0}{4}\right)} \quad (1.21)$$

Usando das informações acima a equação 1.19 pode ser reescrita da forma

$$\tanh\left(\frac{z.e.\Psi(x)}{4.k_B.T}\right) = \tanh\left(\frac{z.e.\Psi_0}{4.k_B.T}\right) e^{-\kappa.x} \quad (1.22)$$

O modelo de Gouy Chapman pode ser utilizado para analisar a interação entre peptídeos líticos e membranas modelo [24]. Para uma membrana carregada negativamente e peptídeos carregados positivamente, a concentração de peptídeos, C_P , na interface é consideravelmente maior que na solução [25].

$$C_P = C_P^0 \cdot \exp\left(\frac{-z_{ef} F \Psi_0}{RT}\right) \quad (1.23)$$

onde C_P^0 é a concentração de peptídeos na solução, F a constante de Faraday, Ψ_0 o potencial na superfície da vesícula e z_{ef} a valência efetiva da carga do peptídeo. Essa teoria leva a descrever a adsorção do peptídeo a membrana por um simples equilíbrio

de partição na superfície

$$X_b = K.C_P \quad (1.24)$$

com X_b a fração de peptídeos adsorvidos, K a constante de partição. Para membranas carregadas negativamente a adsorção/partição deve levar em conta a existência da atração eletrostática. A relação entre a constante de partição aparente, K_p , e a constante de partição é dada por:

$$K_p \sim K(C_P/C_P^0) \quad (1.25)$$

O que leva a definir

$$K_p = K \exp(-zF\Psi_0/RT) \quad (1.26)$$

Se a energia livre eletrostática é dada por $\Delta G_{el} = z_{ef}F\Psi_0$, envolvendo a atração entre a carga positiva do peptídeo e as cargas negativas da membrana devido a presença de fosfolípidios negativos, que resultam em um potencial na superfície (Ψ_0) então a equação 1.26 pode ser reescrita como

$$\Delta G_{ads} = \Delta G_{if} + \Delta G_{el} \quad (1.27)$$

Nesta equação, ΔG_{if} é a energia de transferência do peptídeo da água para uma fase não polar, sendo portanto uma componente hidrofóbica, que é determinada pelo efeito hidrofóbico que surge a partir de desolvatação de grupos não polares. Na forma como a equação 1.27 está escrita ela prevê a aditividade entre as componentes energéticas hidrofóbica e eletrostática, entretanto, nem sempre estes termos são aditivos, ou seja, nem sempre pode-se descrever a energia observada na adsorção do peptídeo à bicamada lipídica como a soma destas duas componentes [26]. Assim como em trabalhos do grupo foi mostrado que para o peptídeo MP1, não existe essa aditividade entre as contribuições energéticas [27].

Com o interesse em obter informações sobre a energética envolvida na partição do peptídeo sintético L1A a membranas modelo, este trabalho teve o propósito de avaliar a energia de adsorção do peptídeo a bicamadas zwitteriônica de POPC e aniônicas de POPC:POPG nas quais a fração de lipídio aniônico variou entre 20 e 80% bem como as componentes de energia hidrofóbica e energia eletrostática em três valores de pH 4, 7 e 10. Com a variação do pH pode-se analisar a variação da carga líquida do peptídeo e assim observar a relevância desse fator no balanço de energias e na partição do peptídeo nas bicamadas.

A partição do peptídeo nas bicamadas é acompanhada de sua estruturação na con-

formação helicoidal. Desta forma este processo acoplado de partição e estruturação do peptídeo foi acompanhado observando as mudanças conformacionais induzidas pela interação com as membranas modelo por meio de espectroscopia de dicroísmo circular. Paralelamente o potencial eletrostático das vesículas nas diferentes composições lipídicas e de pH foram monitoradas por medidas de potencial zeta que utiliza velocimetria Doppler.

Capítulo 2

Objetivo

O objetivo deste trabalho é explorar a energética envolvida na partição do peptídeo sintético L1A a membranas modelo, avaliando a energia de partição do peptídeo a bicamadas zwitteriônicas e aniônicas e verificar a aditividade entre as componentes de energia hidrofóbica e eletrostática em três valores de pH 4, 7 e 10, através de medidas de dicroísmo circular e potencial zeta.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Os lipídios utilizados foram 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC) de natureza zwitteriônica e 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol (POPG) de natureza ácida, adquiridos da Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL. USA). As soluções estoques de lipídios em diferentes razões molares foram preparadas em clorofórmio/metanol (2:1). As concentrações de fosfolipídios foram determinadas por pesagem usando uma balança analítica.

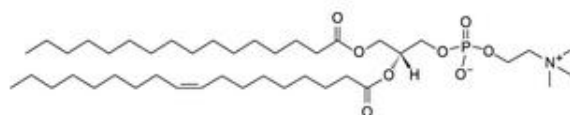


Figura 3.1: Estrutura do POPC. Figura retirada de [4].

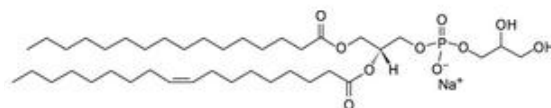


Figura 3.2: Estrutura POPG. Figura retirada de [4].

Para o preparo das vesículas utilizou-se:

- Mini extrusor Avanti Polar Lipids (kit 610000)
- Seringas de Hamilton

Tabela 3.1: Propriedades estruturais do peptídeo: número de resíduos de aminoácidos (N_{aa}), valência da carga do peptídeo em pH 7 e hidrofobicidade (H) calculada utilizando a sequência consenso de Eisenberg

Peptídeo	Sequência	N_{aa}	z_{ef}	H
L1A	(IDGLKAIWKKVADLLKNT-NH ₂)	18	+3	0,11

-Membrana dupla de policarbonato

O diâmetro e o potencial zeta das vesículas foram determinados por espalhamento de luz (Malvern Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, U.K.). Tampão utilizado em todo o trabalho é composto por 1mM citrato de sódio, 1mM de borato de sódio, 1mM fosfato de sódio e 150mM fluoreto de sódio em pHs acertados com HCl e NaOH para 4, 7 e 10.

Peptídeo sintético L1A foi desenhado pelo grupo e sintetizado pela Bio Synthesis (Lewisville-TX-USA), com as características estruturais apresentadas na tabela 3.1.

As soluções estoques de peptídeos foram preparadas com água bi-destilada e mantidas refrigeradas; a concentração final foi determinada espectrocópicamente em 280 nm usando absorvidade molar do triptofano como $5580 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação de vesículas

Inicialmente foi preparado um filme lipídico fino nas paredes de vidro de um tubo de ensaio de fundo arredondado diluindo o fosfolípido em uma solução de clorofórmio/metanol (2:1). Este solvente é então evaporado sob o fluxo de nitrogênio (N_2) e o excesso é retirado a vácuo durante 3 horas no máximo.

Adicionou-se o tampão universal (1mM citrato de sódio, 1mM de borato de sódio, 1mM fosfato de sódio e 150mM fluoreto de sódio) em pHs 4,7 e 10 ao tubo, formando assim vesículas multilamelares (MLVs), então este tubo é agitado em vórtex durante 2 min. e 30 seg. para deslocar as bicamadas empilhadas presas a parede do tubo. A suspensão de MLVs foi submetida a extrusões (usando um extrusor Avanti Mini-Extruder) através de membrana dupla de policarbonato para formar vesículas unilamelares (LUVs), realizou-se 6 extrusões com a membrana de 400nm e 11 com a de 100nm. O tamanho da vesícula foi determinado por espalhamento dinâmico de luz usando Zetasizer Nano ZS90 Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.. encontrando o valor de aproximadamente 130 nm de diâmetro.

3.2.2 Dicroísmo Circular

O dicroísmo circular é uma técnica estrutural que mede a alteração na luz circularmente polarizada, composta por uma componente que gira em sentido anti-horário (L) e outra que gira em sentido horário (R), as duas de mesma magnitude. Moléculas como peptídeos que possuem diversos centros quirais podem interagir com essa luz, fazendo com que quando as componentes R e L são absorvidas igualmente pela amostra não seja detectado nenhum sinal de CD, mas quando existe uma diferença de absorção destas componentes o sinal passa a ser diferente de zero (figura 3.3), assim a técnica faz uso desse efeito para obter informações estruturais, termodinâmicas e cinéticas de macromoléculas, como proteínas e peptídeos. A aplicação mais importante está na análise de estruturas secundárias e como estas estruturas são sensíveis às interações com outras moléculas e às variações no ambiente como: temperatura e pH.

O equipamento usado, Jasco-815 (Tokio, Japan), mede a diferença de absorção entre as duas componentes R e L em função do comprimento de onda (equação 3.1). O sinal de dicroísmo circular pode ser positivo ou negativo dependendo da intensidade

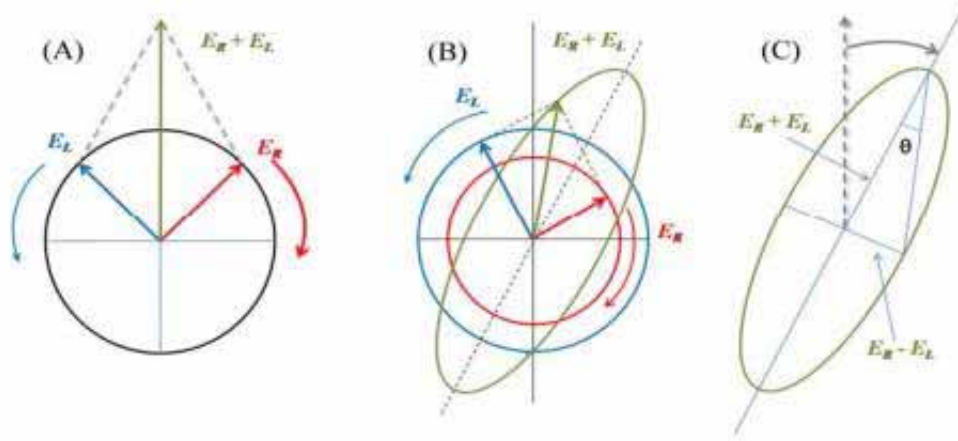


Figura 3.3: Efeito do dicróismo circular sobre as componentes circularmente polarizadas E_R (sentido horário e em vermelho) e E_L (sentido anti-horário e em azul). (A) Componentes circularmente polarizadas de mesma amplitude que, quando combinadas, geram radiação plano polarizada (em verde); (B) componentes de magnitude diferente que resultam em uma luz elipticamente polarizada (elipse em verde). (C) Elipicidade θ , tangente obtida pela razão do menor e do maior eixo da elipse. Extraído de [5].

da luz circularmente polarizada para o sentido horário e para o anti- horário.

$$\Delta E(\lambda) = E_L(\lambda) - E_R(\lambda) \quad (3.1)$$

Normalmente essa diferença é descrita como elipticidade, que é o ângulo, cuja tangente é dada por:

$$\tan\theta = \frac{E_R - E_L}{E_R + E_L} \quad (3.2)$$

É vantajoso utilizar a elipticidade molar média por resíduos (Θ) que é obtida do ângulo θ por meio da equação:

$$\Theta \left(\frac{\text{deg.cm}^2}{\text{dmol}} \right) = \frac{100.\theta}{l.c.N} \quad (3.3)$$

sendo l o caminho óptico em cm, c a concentração em mM e N o número de resíduos.

Os espectros de CD no ultra-violeta distante (abaixo de 260 nm) podem ser usados para estimar a porcentagem de cada elemento estrutural secundário de uma proteína a partir dos padrões espectrais para cada um destes elementos como: hélice α , folha β e estruturas desordenadas, figura 3.4.

Com os valores de elipticidade molar observada em 222 nm (Θ_{obs}), pode-se encontrar

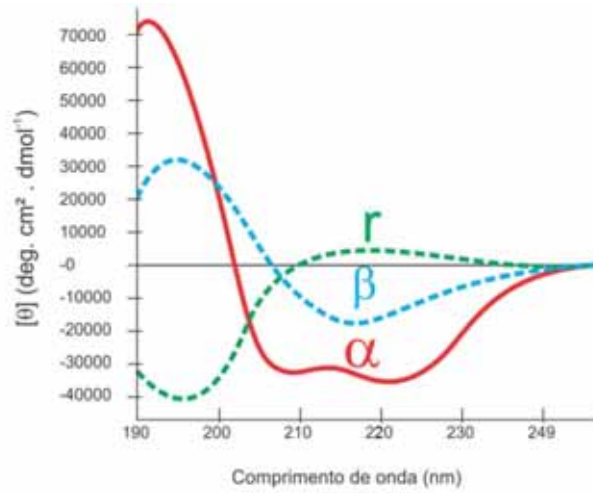


Figura 3.4: Espectros de dicroísmo circular típicos para peptídeos estruturados. Verde: espectro característico de estrutura randômica; azul: espectro característico de estrutura em folha- β e vermelho: espectro característico de α -hélice. Extraído de [6].

a fração helicoidal, f_h , usando a seguinte equação, proposta por Luo e Baldwin [28]:

$$f_h = \frac{\Theta_{obs} - \Theta_c}{\Theta_m - \Theta_c} \quad (3.4)$$

onde Θ_c é a elipticidade molar para o peptídeo em random coil (1500 deg cm²/dmol) e Θ_m é a máxima elipticidade possível, dado por [28]:

$$\Theta_m = (-44000 + 250T) \left(1 - \frac{x}{N}\right) \quad (3.5)$$

onde T é a temperatura em graus Celsius, N o número de aminoácidos e x é o número de grupos carbonila da cadeia peptídica que não estão envolvidos na formação de pontes de hidrogênio, os grupos NH e CO dos resíduos localizados nos extremos da sequência não participam de pontes de hidrogênio e para peptídeos com terminal C amidado o valor de x é 3 [29].

Para este trabalho os espectros de CD foram coletados no intervalo de comprimento de onda de 195 a 260 nm, a 25° C usando um espectropolarímetro Jasco-815 (Tokyo, Japan). Os parâmetros do instrumento foram mantidos em: velocidade (scan speed) 50 nm/min, largura de banda (bandwidth) 1 nm, tempo de resposta (response) 1 s e resolução (resolution) de 0,2 nm.

As medidas foram feitas em um único tampão, citrato, borato e fosfato, 1 mM nos valores de pH 4, 7 e 10. Solução de 10 μ M de L1A foi titulada por adição de alíquotas de LUVs de POPC:POPG até atingir 2,3 mM, para diferentes frações de

POPG, utilizando cubetas de quartzo de 0,2 cm de caminho óptico, tomando-se de 10 a 20 acumulações. Os valores obtidos de elipticidade, θ (deg), foram corrigidos em função da diluição e descontado a respectiva linha de base, convertendo os dados em elipticidade molar média por resíduo, Θ (deg.cm²/dmol), usando a relação 3.3.

Os dados de elipticidade molar, em 222 nm, normalizados pela elipticidade molar do peptídeo em tampão, Θ_0 , foram dispostos em gráficos em função da concentração de lipídio [L]. Estes gráficos foram analisados por isotermas de Lagmuir:

$$\frac{\Theta_{obs}}{\Theta_0} = 1 + \left(\frac{\Theta_\infty}{\Theta_0} - 1 \right) \left(\frac{K_p[L]}{1 + K_p[L]} \right) \quad (3.6)$$

K_p é a constante de partição Θ_∞ a elipticidade molar máxima .

3.2.3 Espalhamento de Luz Dinâmico

Uma técnica muito conhecida para determinar o tamanho de partículas é o DLS, onde um feixe de laser incide sobre as partículas em solução que se encontram em movimento Browniano, fazendo com que a luz espalhada varie a intensidade com o passar do tempo devido a interferências construtivas e destrutivas. Então, com a variação da intensidade dessa luz espalhada em um determinado intervalo de tempo pode-se obter uma relação com o tamanho das partículas, sabendo que suas velocidades depende dos seus tamanhos, ou seja, partículas menores são mais rápidas e as maiores mais lentas (figura 3.5).

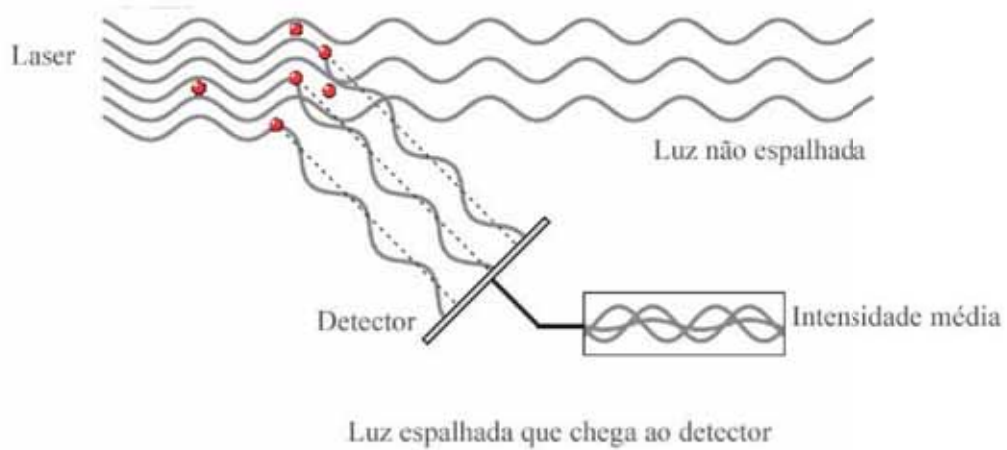


Figura 3.5: Representação do espalhamento de dinâmico de luz. Figura adaptada de [7].

A relação entre o tamanho da partícula e a sua velocidade devido ao movimento Browniano é definido pela equação de Stokes- Einstein, que calcula o diâmetro hi-

hidrodinâmico da partícula pela relação: $D_H = k_B T / 3\pi\eta D$, onde η é a viscosidade do solvente e D o coeficiente de difusão. O diâmetro hidrodinâmico foi determinado para LUVs a $100 \mu M$, por 15 corridas consecutivas de 10 segundos, pelo equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, U.K.

3.2.4 Potencial Zeta

Vesículas lipídicas em suspensão possuem uma carga de superfície devido a grupos ionizáveis nas cabeças polares dos lipídios e/ou a adsorção de contraíons da solução. Cria-se, então, uma camada iônica ao redor da vesícula na qual a concentração de íons é diferente da solução. Sob movimento, parte desta camada se move juntamente com a partícula. O potencial no plano de cisalhamento entre a camada iônica arrastada com a vesícula e o meio é chamado de potencial zeta, que deve ser dependente da concentração de íons na solução e da quantidade de grupos ionizáveis na vesícula.

Um método para determinar o potencial zeta é a partir da medida de mobilidade eletroforética com o uso da velocimetria Doppler. Neste método uma suspensão aquosa de partículas carregadas é sujeita a um campo elétrico, como ocorre em um experimento de eletroforese, o campo elétrico transmite às partículas uma velocidade que será proporcional à intensidade de campo, que em módulo pode ser escrita como:

$$v = \mu \cdot E \quad (3.7)$$

na qual μ é a mobilidade eletroforética cuja unidade de medida é em geral $\mu m cm V^{-1} s^{-1}$ ou $10^{-8} m^2 V^{-1} s^{-1}$. Além da força elétrica a partícula está sujeita também a uma força viscosa dada pela relação de Stokes que depende da viscosidade do meio, do raio da partícula e da temperatura.

Então, um raio de laser, em geral He-Ne, é dividido em dois e cada um destes feixes incide sobre espelhos e são refletidos para a amostra que está em uma cela que possui eletrodos cobertos por ouro. Um destes espelhos é móvel de maneira a modular a frequência do feixe. Ao passar pela cela de medida, que contem a suspensão de partículas que estão em movimento, o feixe é espalhado pelas partículas e devido ao movimento destas a frequência do feixe que era ν_0 é deslocada, devido ao efeito Doppler para ν_s de maneira a ter um deslocamento de frequência $\Delta\nu$. Este deslocamento de frequência depende da velocidade da partícula, do comprimento de onda incidente (λ_0) e do ângulo de espalhamento (θ) (figura 3.6).

Considerando $\vec{k}_0$ e $\vec{k}_s$ os vetores de ondas incidente e espalhada e $\vec{K}$ o vetor de espalhamento ($\vec{K} = \vec{k}_s - \vec{k}_0$) pode-se escrever que a relação entre o deslocamento de

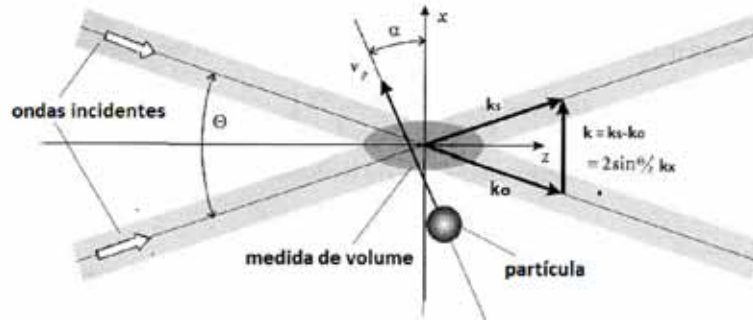


Figura 3.6: Configuração do feixe duplo. Adaptada de [8].

frequência devido ao efeito Doppler e a velocidade é:

$$2\pi\Delta\nu = \vec{K} \cdot \vec{v} \quad (3.8)$$

e definindo n como o índice de refração do meio e λ_0 o comprimento de onda do feixe incidente, o vetor de espalhamento pode ser escrito como:

$$\vec{K} = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2} \quad (3.9)$$

o deslocamento de frequência Doppler pode ser reescrito substituindo o vetor onda na equação 3.8:

$$\Delta\nu = \frac{2nv}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2} \cos \frac{\theta}{2} = \frac{nv}{\lambda_0} \sin \theta \quad (3.10)$$

substituindo a velocidade obtida de 3.10 na equação 3.7 obtêm-se a expressão para a mobilidade eletroforética:

$$\mu = \frac{\lambda_0}{n \sin \theta} \frac{1}{E} \Delta\nu \quad (3.11)$$

No equipamento utilizado Zetasizer Nano ZS90 o ângulo de detecção $\theta = 90^\circ$, $\lambda_0 = 0,6328 \mu\text{m}$ e consideramos $n=1,4$.

O valor de potencial zeta (ζ) é proporcional a mobilidade eletroforética (μ) da partícula, uma relação entre esses parâmetros é dado pela equação da mobilidade de Smoluchowski.

$$\mu = \frac{\epsilon_r \epsilon_0}{\eta} \zeta f(\kappa R) \quad (3.12)$$

onde η é a viscosidade da solução, R é o raio da partícula e f é a função de Henry, dependente de κ , parâmetro de Debye-Huckel, que fornece a espessura da dupla camada de íons ao redor de um macroíon. O equipamento usa dois valores limites para a função

$f = 1$ se $\kappa R \gg 1$ ou seja o raio da partícula é muito maior que a distância de Debye, ou 1,5 se $\kappa R \ll 1$.

Com o valor obtido de potencial zeta, considerando a distância $x=0,2$ nm, como sendo a camada de cisalhamento, pode-se calcular o potencial na superfície da vesícula pela relação apresentada na introdução (equação 1.22)

$$\tanh\left(\frac{z.e.\zeta}{4.k_B.T}\right) = \tanh\left(\frac{z.e.\Psi_0}{4.k_B.T}\right) e^{-\kappa.x} \quad (3.13)$$

As medidas de potencial zeta foram realizadas no Malvern Zetasizer Nano ZS90, utilizando celas capilares em forma de U com eletrodo de ouro com volume de 1,0 mL (DTS1060).

3.2.5 Cálculos energéticos

Para avaliar a aditividade entre as contribuições energéticas hidrofóbicas e eletrostáticas, foram feitos cálculos independentes de cada uma dessas contribuições, considerando a mudança de pH e a composição lipídica da vesícula.

Sabe-se que com a variação do pH o peptídeo pode ganhar ou perder carga devido a protonação grupos terminais N e C e dos resíduos ácidos e básicos, porém essa mudança de carga líquida do peptídeo pode ser calculada a partir dos valores de pKas dos resíduos e do pH.

Com estes valores de carga efetiva do peptídeo e o potencial na superfície (Ψ_0), calculado usando os valores experimentais do potencial zeta na equação 1.22, pode-se obter os valores da energia eletrostática (ΔG_{el}) envolvida na adsorção do peptídeo na bicamada aniônica.

A energia hidrofóbica (ΔG_{if}) pode ser calculada por meio do Java MPEx [30] com a ferramenta totalizer. O MPEx é um programa desenhado para calcular a energia livre para transferir um peptídeo ou proteína não enovelados, da solução para a interface da membranas, na qual o peptídeo ou proteína se enovelam . Este processo corresponde a um ciclo termodinâmico no qual é calculado a diferença de energia livre para transferir o peptídeo não enovelado da solução para a interface e a energia livre para transferir o peptídeo enovelado da solução para a interface . O calculo deste ciclo utiliza a escala hidropática, baseadas na energia livre de partição de aminoácidos entre água e membrana. Esta escala foi determinada experimentalmente por Wimley e White em 1996 [31], por meio de experimentos de dialise e HPLC em fase reversa. Com esses experimentos, eles obtiveram a constante de partição entre o peptídeo e uma membrana

formada por POPC, sendo que o peptídeo estudado foi AcWL-X-LL, com X substituído por todos os 20 aminoácidos naturais. Com essa constante de partição obtiveram a energia livre para cada aminoácido existente, apresentadas na figura 3.7. Portanto, tem-se custo energético somente para o peptídeo sair da solução e se ligar a bicamada, mas quando esse peptídeo assume uma conformação helicoidal, deve ser somado a essa energia um valor correspondente a $\Delta G_{conf} = \delta g \cdot f_h \cdot N$ que relaciona o custo energético para formar ligações de hidrogênio, levando em consideração a fração de hélices (f_h) e o número N de resíduos participando dessa conformação [32].

A energia livre total de adsorção (ΔG_{ads}), pode ser calculada por meio da constante de partição obtida pelo ajuste dos valores experimentais obtidos por medidas de dicroísmo circular, pela equação 3.6.

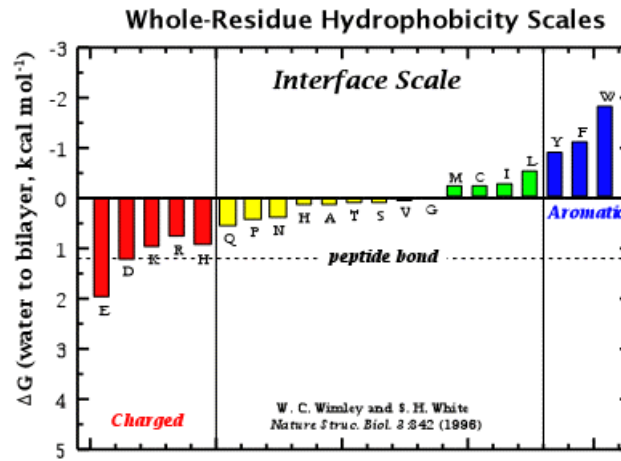


Figura 3.7: Energia livre de transferência por resíduo (kcal/mol) da água para a interface de POPC. Extraído de [9].

Capítulo 4

Resultados

4.1 Análise conformacional

O efeito do pH e das vesículas lipídicas de várias composições na conformação do peptídeo foi investigado usando medidas de dicroísmo circular. Nesses experimentos, o peptídeo em tampão foi titulado com uma solução de vesículas unilamelares grandes (LUVs), com raio em torno de 65 nm, medido por DLS. Todos os espectros de CD foram coletados após 3 minutos da adição de uma nova quantidade de vesículas, garantindo que todas as mudanças possíveis já tenham sido concluídas.

Os valores de elipticidade (θ) obtidos dos espectros de CD foram transformados em elipticidade molar (Θ) por meio da equação 3.3, usando as devidas correções volumétricas a cada nova adição de vesículas e subtraindo a linha de base.

Para peptídeo em tampão, os espectros mostram uma banda de intensidade negativa posicionada em torno de 200 nm, característico de ausência de estrutura secundária. Foi observado que a elipticidade molar é dependente do pH. Em pH 10 a intensidade do espectro em 222 nm é ligeiramente mais intensa, $\Theta_{222} = -5180 \pm 60$, comparado com $\Theta_{222} = -3625 \pm 50$ em pH 7 e $\Theta_{222} = -4084 \pm 100$ em pH 4 (figura 4.1). Esses resultados são consistentes com os obtidos por Marqusee e Baldwin [33] usando peptídeos compostos de alanina, contendo lisina e ácido glutâmico nas posições, (Ac-Y(EAAK)_n-NH₂), eles encontram a mesma ordem de elipticidade molar que é $\Theta_{pH4} \geq \Theta_{pH7} \leq \Theta_{pH10}$.

Nos três pHs estudados, ao se adicionar apenas 0,05 mM de vesículas aniônicas (POPC:POPG) já é possível observar o aparecimento de duas bandas de intensidade negativa em 222 nm e 208 nm características de conformação helicoidal. Com o aumento da concentração de vesículas aniônicas, a intensidade destas bandas aumenta,

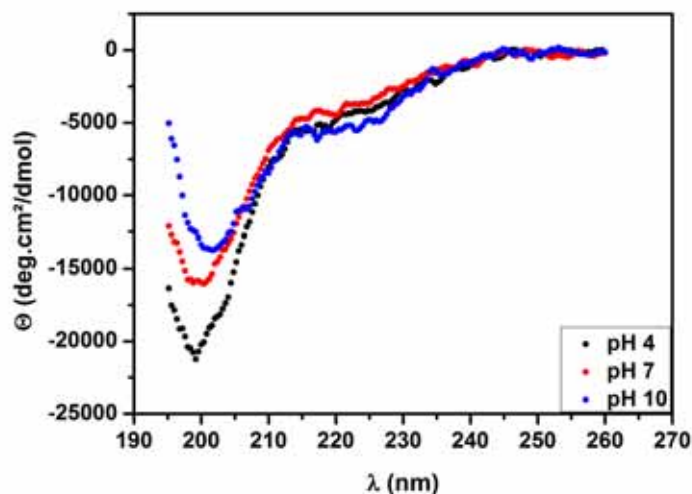


Figura 4.1: Espectro de CD medido em solução tampão em pH 4, 7 e 10. Elipticidade molar versus comprimento de onda de $10 \mu M$ de peptídeo L1A.

evidenciando que o peptídeo se estrutura mais. A intensidade das bandas negativas aumentam com o aumento da concentração total de lipídios até atingir uma estruturação máxima. Ao mesmo tempo, existe um ponto isodicroico em 204 nm, o que indica um processo de dois estados em equilíbrio, um estado onde o peptídeo está desestruturado na solução e o estado em que ele se estrutura em contato com a bicamada.

Ao se comparar a estruturação dependente da carga da vesícula, em pH 7 (figura 4.2 - a,b e c), observa-se que ao aumentar a quantidade de lipídios aniônicos na composição da vesícula a quantidade de hélice aumenta mais rápido, ou seja, é necessário menor quantidade de vesículas aniônicas para alcançar o máximo de hélice. O mesmo comportamento é observado em pH 4 e 10.

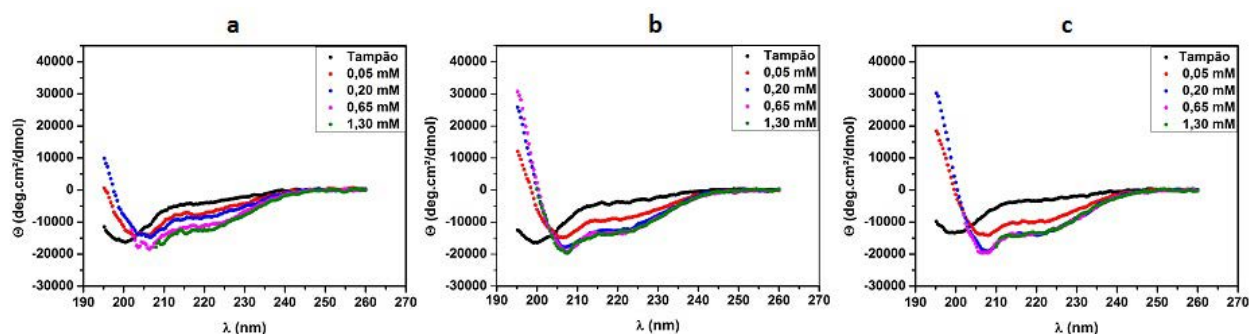


Figura 4.2: Espectro de dicroísmo circular de L1A a $10 \mu M$ em tampão em pH 7. a) Na presença de vesículas com 20% de POPG, b) 40% de POPG e c) 80% de POPG.

Ao titular o peptídeo com vesículas zwitteriônicas (POPC), o espectro muda ligeiramente em relação ao peptídeo em tampão, apresentando dois picos: em 222 nm com uma pequena intensidade negativa e um pico intenso em 205 nm, apresentando uma pequena estruturação, como pode ser observado na figura 4.3, o espectro de 10 μM L1A em 300 μM de LUVs compostas de POPC, em solução tampão nos três pHs estudados.

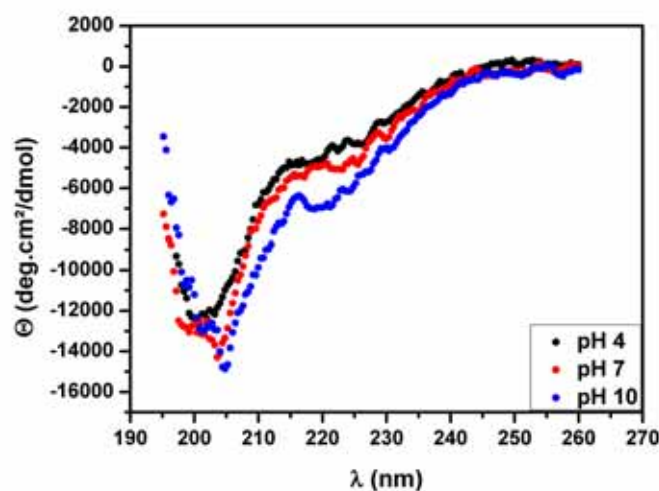


Figura 4.3: Espectros de CD de 10 μM de L1A titulado com 300 μM de LUVs de POPC em tampão pHs 4,0; 7,0 e 10,0

Com o aumento do pH, o peptídeo forma uma estrutura mais organizada, apresentando um ligeiro aumento na intensidade das bandas negativas obtidas pelo CD. Em pH 4 o peptídeo possui sua maior carga, devido a protonação dos resíduos de ácido aspártico, mas ao aumentar o pH da solução essa carga diminui devido a desprotonação do N terminal, o que contribui para uma maior estruturação, com já observado por Marquese e Baldwin, [34]. Comparando os espectros obtidos do peptídeo em vesículas de POPC com os espectros anteriores pode-se observar que o peptídeo assume uma maior estruturação quando interage com vesículas carregadas, confirmando a importância da interação eletrostática na adsorção do peptídeo às bicamadas aniônicas.

4.2 Isotermas de adsorção

Os espectros de CD e a elipticidade molar em 222 nm foram usados para investigar a partição do peptídeo em diferentes bicamadas lipídicas. As isotermas de adsorção, elipticidade molar normalizada em 222 nm (Θ_{222}/Θ_0) em função da concentração de lipídio [L], são mostradas na figura 4.4. Os valores experimentais podem ser ajustados pela equação de Langmuir, equação 3.6, com um coeficiente de correlação maior que

98%. Por esse ajuste pode-se obter informação sobre dois parâmetros: a constante de partição (K_p) e a elipticidade máxima (Θ_∞), que nos informa sobre a quantidade máxima de hélice induzida pela bicamada no peptídeo, em cada composição de vesícula e em diferentes pHs.

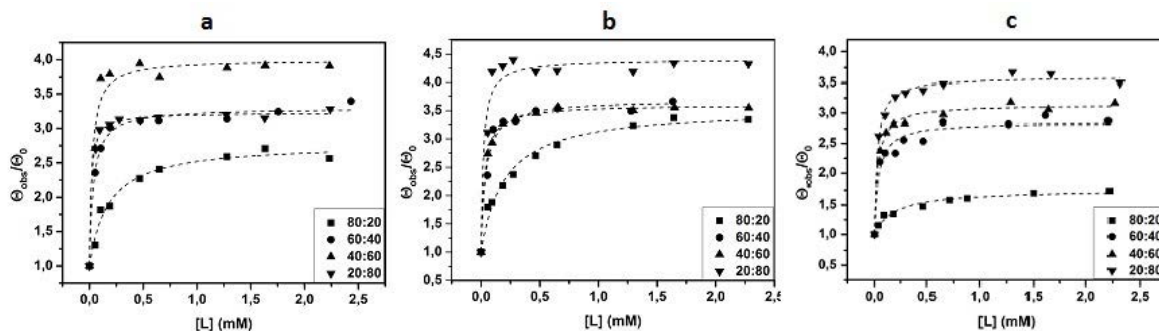


Figura 4.4: Isotermas de adsorção: elipticidade molar normalizada em 222 nm em função da concentração de lipídios, a linha tracejada é obtida pelo ajuste da equação não linear 3.6. Titulação de LUVs com proporções de POPC:POPG 80:20, 60:40, 40:60 e 20:80, como mostrado no gráfico, em tampão a) em pH 4, b) em pH 7 e c) em pH 10.

Os valores de constante de partição (K_p), apresentados na tabela 4.1, aumentam com a fração de lipídios aniônicos, que fazem parte da composição das vesículas, ao mesmo tempo a afinidade à vesículas zwitteriônicas é baixa comparada as vesículas aniônicas indicando a importância das interações eletrostáticas na adsorção de peptídeos a bicamadas. Na tabela 4.1 pode-se observar claramente, que para vesículas zwitteriônicas, as constantes de partição apresentam o mesmo comportamento em relação ao pH que foi observado para peptídeos puros em tampão. Para as vesículas aniônicas contendo 20% de POPG a tendência é aumentar a constante de partição com o pH, porém com 40% de POPG as constantes independem do pH e ao adicionar mais carga a essas vesículas os valores de constantes diminuem com o aumento do pH.

A partir do ajuste dos pontos experimentais, também encontramos o valor de elipticidade molar máxima em 222 nm, logo pode-se calcular por meio da equação 3.4 as frações de α -hélice máxima para o L1A em cada composição de vesícula, tabela 4.1.

Em todos pHs o conteúdo helicoidal é maior em vesículas aniônicas comparado com vesículas zwitterionica. Em cada um dos valores de pH investigados a tendência é de aumento da fração de α -hélice com a quantidade de lipídio aniônico da vesícula, embora nos pHs 4,0 e 7,0 fossem observadas flutuações nas frações de hélice. Em pH 10 a tendência é mais clara.

Tabela 4.1: Constante de partição ($10^3 K_p$ em M^{-1}) e frações máximas de hélices α para o peptídeo L1A

		Composição(POPC:POPG)				
		100:0	80:20	60:40	40:60	20:80
pH 4	K_p	$1,3 \pm 0,5$	$5,8 \pm 0,9$	$28,0 \pm 3,0$	$38,0 \pm 11,0$	$64,0 \pm 7,0$
	f_α	0,12	0,36	0,42	0,45	0,42
pH 7	K_p	$1,5 \pm 0,3$	$5,1 \pm 0,6$	$26,0 \pm 4,0$	$34,0 \pm 2,0$	$50,0 \pm 8,0$
	f_α	0,25	0,39	0,41	0,40	0,49
pH 10	K_p	$1,1 \pm 0,2$	$5,2 \pm 1,0$	$25,0 \pm 6,0$	$31,0 \pm 4,0$	$36,0 \pm 4,0$
	f_α	0,26	0,27	0,43	0,50	0,57

4.3 Potencial zeta e potencial de superfície

O potencial na superfície de vesículas aniônicas foi determinado por dois modos diferentes. Um deles o potencial zeta, determinado por mobilidade eletroforética, foi convertido em potencial de superfície usando a relação 1.22, apresentada na introdução. Sabendo que nessa relação é considerada uma simetria plana, para checar a acuracidade dessa aproximação, foi calculado o potencial de superfície usando a equação 4.1, proposta por Ohshima, que é considerada uma aproximação precisa da equação não linear de Poisson Boltzmann considerando uma simetria esférica [35].

$$2\sinh\left(\frac{F\Psi_0}{2RT}\right) + \frac{4}{A}\tanh\left(\frac{F\Psi_0}{4RT}\right) - \frac{\sigma F}{RT\kappa\epsilon_0\epsilon_r} = 0 \quad (4.1)$$

onde ϵ_0 e ϵ_r são as permissividades no vácuo e da água, $A = \kappa R$, κ é o inverso do comprimento de Debye e R é o raio da vesículas e σ é dado por

$$\sigma = \frac{eX_{PG}}{A_L} \frac{1}{1 + \left(\frac{[H^+]}{K_a} + K_m[M^+]\right) \exp\left(-\frac{F\Psi_0}{RT}\right)} \quad (4.2)$$

onde X_{PG} é a fração de lipídios aniônicos, $[H^+]$ e $[M^+]$ são a concentração de prótons e cátions univalentes da solução, respectivamente, K_a é a constante de dissociação do próton do grupo fosfato do POPG, calculado usando $pK_a = 3,5$ [36] e K_m é a constante de associação do cátion aos grupos da cabeça fosfolipídica, usando o valor de $0,6 M^{-1}$ [37].

Na tabela 4.3, estão apresentados os valores de potenciais de superfícies calculados pelos dois modos apresentados. Os valores dos potenciais de superfície calculados a

partir dos valores experimentais de potencial zeta e o teórico são próximos. Como esperado o potencial aumenta com a fração de lipídios carregados negativamente.

O potencial de superfície pode alterar o pH da solução próximo da superfície da membrana por atrair prótons, assim como, induzir variações na carga do peptídeo. O efeito do potencial de superfície nas cargas do peptídeo pode ser calculado assumindo que na interface bicamada-tampão, a fração de grupos protonados no peptídeo é dada por [38]:

$$f_{AH} = (1 + 10^{pH+0,43\frac{F\Psi_0}{RT}-pKa})^{-1} \quad (4.3)$$

onde $pKa = -\log(Ka)$, sendo Ka a constante de dissociação da cadeia lateral. Os valores de pKa usados foram 3,86 para ácido aspártico, 10,53 para lisina e 9,79 para o N terminal [39]. Os valores obtidos da fração protonada para cada aminoácido estão apresentados na tabela 4.2, esses resultados foram calculados em pH 4 para o resíduo de ácido aspártico, e pH 10 para o N terminal e os resíduos de lisina. Usando esses valores foi estimado o efeito da carga da vesícula no estado de protonação do peptídeo, obtendo valores da valência efetiva (z_{ef}), equação 4.4 para a valência em pH 4 e a equação 4.5 para pH 10, com n_a número de resíduos ácidos e n_b número de resíduos básicos.

$$z_{ef(pH4)} = n_b - (1 - f_{AH})n_a \quad (4.4)$$

$$z_{ef(pH10)} = f_{AH}n_b - n_a \quad (4.5)$$

Os valores de valência da carga efetiva estão apresentados na tabela 4.3, mostrando o efeito da composição da vesícula no aumento do estado de protonação dos resíduos carregados. Em pH 4, no entanto, usando o potencial de superfície obtido por medida de potencial zeta, $\Psi_0 = -27,0$ mV para vesículas com 20 % de POPG, a valência da carga efetiva do peptídeo é 4,34 ou 4,30 usando o potencial de superfície calculado pela equação 4.1, enquanto que quando o peptídeo se encontra somente em tampão a carga efetiva neste pH é 4,16. Em tampão, pH 10, a valência da carga efetiva do peptídeo é 1,46, mas na presença de vesículas com 20% de lipídios aniônicos encontra-se uma carga líquida de 2,30 e na presença da vesícula mais carregada (80% de POPG) a valência é 2,69.

Com a variação do pH os lipídios que compõe a vesícula também sofrem alterações no estado de protonação das cabeças polares. O POPC possui o grupo fosfato carregado com o $pK_{PO_4^-} \leq 1$, porém essa carga negativa é compensada pela carga positiva do grupo colina, $pK_{NH_3^+} = 11.25$, que confere neutralidade a esse lipídio pois devido a seus valores de pKas não são ionizados nos pHs estudados [40]. No entanto o grupo fosfato do lipídio POPG possui um pKa= 3,5 e sua carga pode variar dependendo do pH

Tabela 4.2: Fração de aminoácidos protonados. Para o ácido aspártico os valores foram calculados em pH 4, o N terminal e a lisina em pH 10. f_{AH}^E correspondem a fração de aminoácidos protonados obtidos pelos dados de potencial de superfície experimentais (Ψ_0^{exp}) e f_{AH}^T pelos potenciais teóricos Ψ_0^t . Os valores de potenciais de superfície estão em mV

			Composição(POPC:POPG)			
			80:20	60:40	40:60	20:80
pH 4	Ácido Aspártico	f_{AH}^E	0,67	0,78	0,81	0,84
		Ψ_0^{exp}	-27,0 $\pm$ 1	-41,0 $\pm$ 3	-47,0 $\pm$ 2	-52,0 $\pm$ 2
		f_{AH}^T	0,64	0,72	0,78	0,81
		Ψ_0^t	-24,0	-33,5	-41,5	-47,0
pH 10	N terminal	f_{AH}^E	0,66	0,76	0,81	0,83
	Lisina	f_{AH}^E	0,91	0,94	0,96	0,96
		Ψ_0^{exp}	-30,0 $\pm$ 2	-42,0 $\pm$ 5	-50,0 $\pm$ 2	-54,0 $\pm$ 1
		f_{AH}^T	0,69	0,81	0,86	0,89
	Lisina	f_{AH}^T	0,92	0,96	0,97	0,98
		Ψ_0^t	-33,0	-50,0	-59,5	-66,0

do tampão. Para estudar essa variação a fração dos grupos protonados dos lipídios foi calculado $\alpha = 1 - f_{AH}$ e os valores obtidos apresentados na tabela 4.3. É observado que somente em pH 4,0 os lipídios alteram sua carga devido ao pH, apresentando valores de fração de grupos não protonados de 0,56 para a composição 80:20 caindo para 0,34 em 20:80.

Tabela 4.3: Potencial de Superfície (mV), valência efetiva da carga do peptídeo e graus de ionização dos lipídios. Ψ_0^{exp} é calculado pelo valor de potencial zeta, pela equação 1.22 e Ψ_0^t pela equação 4.1

		Composição(POPC:POPG)			
		80:20	60:40	40:60	20:80
pH 4	Ψ_0^{exp}	-27,0 $\pm$ 1	-41,0 $\pm$ 3	-47,0 $\pm$ 2	-52,0 $\pm$ 2
	z_{ef}^e	4,34 $\pm$ 0,01	4,56 $\pm$ 0,01	4,62 $\pm$ 0,01	4,68 $\pm$ 0,01
	α	0,53 $\pm$ 0,01	0,40 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,02	0,30 $\pm$ 0,01
	Ψ_0^t	-24,0	-33,5	-41,5	-47,0
	z_{ef}^t	4,30	4,48	4,50	4,64
	α	0,56	0,45	0,39	0,34
pH 7	Ψ_0^{exp}	-28,0 $\pm$ 1	-43,0 $\pm$ 5	-48,0 $\pm$ 2	-54,0 $\pm$ 2
	z_{ef}^e	3,00	3,00	3,00	3,00
	α	1,00	1,00	1,00	1,00
	Ψ_0^t	-33,0	-50,0	-59,0	-69,0
	z_{ef}^t	2,97	2,98	2,99	2,99
	α	1,00	1,00	1,00	1,00
pH 10	Ψ_0^{exp}	-29,0 $\pm$ 2	-42,0 $\pm$ 5	-50,0 $\pm$ 2	-54,0 $\pm$ 1
	z_{ef}^e	2,30 $\pm$ 0,03	2,52 $\pm$ 0,06	2,65 $\pm$ 0,03	2,69 $\pm$ 0,01
	α	1,00	1,00	1,00	1,00
	Ψ_0^t	-33,0	-50,0	-59,5	-66,0
	z_{ef}^t	2,36	2,60	2,73	2,81
	α	1,00	1,00	1,00	1,00

4.4 Energética

A energética da adsorção do peptídeo em bicamadas lipídicas zwitteriônicas e aniônicas pode ser usada para explorar os efeitos da carga e do pH. Com esse objetivo a energia livre de adsorção ($\Delta G_{ads} = -RT \ln(55,5K_p)$) foi calculada em diferentes condições. As contribuições energéticas como as energias livres eletrostática e não eletrostática, por ex., hidrofóbica, são importantes para a partição de um peptídeo catiônico a bicamadas lipídicas [20, 32]. A energia livre eletrostática é dependente do potencial da vesícula e da valência efetiva do peptídeo ($\Delta G_{el} = z_{ef} F \Psi$). Os valores de energia livre eletrostática estão apresentados na tabela 4.4. E a variação da energia livre com o potencial superficial da vesícula é apresentada na figura 4.5.

Como mostrado na figura 4.5, a energia livre de adsorção varia linearmente com o potencial da superfície tanto calculada a partir dos dados experimentais como as calculadas teoricamente, porém em pH 4 e 7 os valores obtidos experimentalmente estão mais distantes dos teóricos, obtendo valores mais próximos entre os potenciais

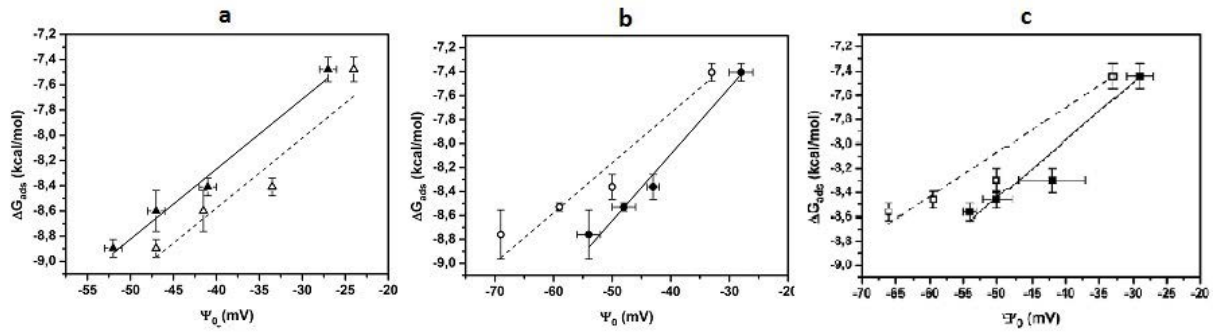


Figura 4.5: Energia livre de adsorção (ΔG_{ads}) em função do potencial na superfície da vesícula, calculado pela equação 1.22, a partir do potencial zeta obtido experimentalmente (símbolos preenchidos) e calculados teoricamente pela equação 4.1 (símbolos aberto). a) pH 4,0; b) pH 7,0 e c) pH 10,0

de superfície obtidos em pH 10. A variação da energia de adsorção com o potencial é maior nos pHs mais baixos e no pH mais alto a variação da energia de adsorção com o potencial é mais modesta, devido à menor valência efetiva e consequentemente menor contribuição da componente eletrostática.

O custo energético para estruturar o peptídeo em α -hélice na interface da bicamada, como proposto por Wimley e White [32], foi calculado usando o pacote MPEx. Este pacote possui duas opções para resíduos carregados, logo a energia (ΔG_{if}) foi calculada usando uma interpolação de valores de ΔG_{if} obtidos considerando as frações de resíduos ácidos protonados e não protonados, apresentados na tabela 4.2. O mesmo procedimento foi feito para o pH 10, considerando as frações do N-terminal protonado e não protonado. Essa energia hidrofóbica varia linearmente com a energia de adsorção, figura 4.6, como observado por Ladokhin [26].

Os valores de energia livre mostrados na tabela 4.4 indicam que a componente energética para estruturar o peptídeo na interface da bicamada tem maior contribuição nos pHs 4,0 e 10,0 quando comparadas com os valores em pH 7,0. ΔG_{if} constitui, provavelmente, a maior parte da contribuição hidrofóbica. Porém a contribuição eletrostática é a predominante em relação a hidrofóbica, nos dois pHs mais baixos nos quais a energia de adsorção variou mais intensamente com o potencial de superfície. No entanto, essas contribuições energéticas parecem só serem aditivas em pH 4,0 nas vesículas que possuem os três maiores conteúdos de POPG. No pH 10,0, a soma destas contribuições energéticas para as mesma bicamadas correspondem de 40 a 80% da energia livre de adsorção, sugerindo que nos pHs 7,0 e 10,0 deva existir outras contribuições energéticas a serem consideradas.

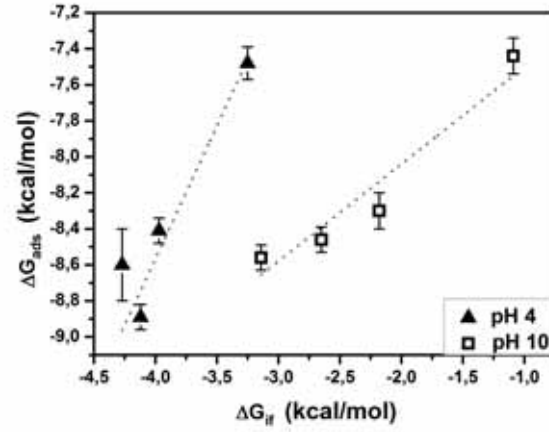


Figura 4.6: Energia livre de adsorção (ΔG_{ads}) em função da energia livre hidrofóbica (ΔG_{if}), calculada pelo pacote MPEx, com os valores de frações helicoidais apresentados na tabela 4.1, nos pHs 4 e 10.

Tabela 4.4: Energias livres de: adsorção (ΔG_{ads}), eletrostática (ΔG_{el}) e interfacial (ΔG_{if}). Energias em kcal/mol.

		Composição(POPC:POPG)			
		80:20	60:40	40:60	20:80
pH 4	ΔG_{ads}	$-7,48 \pm 0,09$	$-8,41 \pm 0,07$	$-8,60 \pm 0,2$	$-8,89 \pm 0,07$
	ΔG_{el}	$-2,70 \pm 0,1$	$-4,30 \pm 0,2$	$-5,00 \pm 0,3$	$-5,60 \pm 0,2$
	ΔG_{if}	-3,25	-3,97	-4,27	-4,12
pH 7	ΔG_{ads}	$-7,40 \pm 0,08$	$-8,36 \pm 0,1$	$-8,53 \pm 0,03$	$-8,76 \pm 0,2$
	ΔG_{el}	$-1,90 \pm 0,03$	$-3,00 \pm 0,3$	$-3,30 \pm 0,1$	$-3,70 \pm 0,1$
	ΔG_{if}	-1,73	-1,87	-1,81	-2,45
pH 10	ΔG_{ads}	$-7,40 \pm 0,1$	$-8,30 \pm 0,1$	$-8,46 \pm 0,07$	$-8,56 \pm 0,07$
	ΔG_{el}	$-1,60 \pm 0,2$	$-2,70 \pm 0,3$	$-3,00 \pm 0,2$	$-3,34 \pm 0,05$
	ΔG_{if}	-1,09	-2,18	-2,65	-3,14

Capítulo 5

Discussão

O peptídeo sintético L1A possui em sua composição dois resíduos de ácido aspártico e quatro lisinas e o C-terminal amidado, sendo que em pH neutro, sua valência líquida é +3. Um dos resíduos de ácido aspártico está na posição 2 (D2) no N-terminal. A presença de um resíduo ácido nesta posição foi mostrado ser um fator importante para a estabilidade da estrutura helicoidal [41, 42, 43]. Outra característica importante da sequência deste peptídeo é que as lisinas estão posicionadas de tal maneira que os resíduos ácidos e básicos são terceiros ou quartos vizinhos, favorecendo pontes de hidrogênio e/ou pontes salinas entre eles, estabilizando a estrutura helicoidal [33]. Trabalhos anteriores haviam mostrado que alterações no N-terminal deste peptídeo, por acetilação ou ligação covalente do marcador fluorescente ácido aminobenzóico, estabilizam a estrutura helicoidal, modulam a afinidade do peptídeo à vesículas aniônicas e a atividade lítica e biológica [44]. A interação de L1A e os análogos com vesículas de POPC:POPG (80:20) e de POPC mostrou que os análogos, com N-terminal bloqueado, têm afinidades maiores além de maior conteúdo helicoidal do que o L1A [44].

As cargas das cabeças polares aniônicas na vesícula, e consequentemente do potencial de superfície, quando combinados com pH da solução podem resultar em modulação da afinidade do peptídeo por meio de mudanças no estado de protonação de grupos ácidos e básicos e também do N-terminal por meio de um processo de regulação de cargas [45, 46]. Os experimentos de titulação do peptídeo com vesículas aniônicas contendo diferentes frações de POPG e nos pHs 4,0, 7,0 e 10,0 mostraram que tanto a afinidade quanto o conteúdo helicoidal são dependentes da carga da vesícula e do pH.

Em tampão pH 4,0 o peptídeo encontra-se na conformação aleatória com apenas 8% de resíduos na conformação helicoidal, 7% em pH 7,0 sendo que em pH 10,0 a fração é 12%, em acordo qualitativo com os resultados obtidos pelo grupo do Baldwin

[33], usando um peptídeo com a sequência baseada em alanina e com resíduos ácidos e básicos sendo suas sequências: Ac-(AEAAG)₃A-NH₂ e Ac-(AEAAAG)₃A-NH₂ portanto nas posições i, i+3 e i+4 [33]. A adsorção do L1A em vesículas zwitteriônicas ou aniônicas resulta em aumento significativo do conteúdo helicoidal, indicando que o meio hidrofóbico da bicamada lipídica, caracterizado por uma constante dielétrica menor favorece a formação de pontes hidrogênio na cadeia principal [31, 32]. Entretanto, a presença de lipídios aniônicos nas vesículas favorece a formação de hélice. Em cada valor de pH, o conteúdo helicoidal tende a aumentar com a fração de lipídios aniônicos. Em pH 4,0 a quantidade de hélice aumenta com a fração de POPG mas em 80% de POPG ela cai. Esta queda pode ser artefato pois as constantes de partição nitidamente aumentam com a quantidade de POPG. O efeito combinado de pH e de potencial de superfície modula a protonação de grupos ionizáveis no peptídeo. A tabela 4.2 mostra que à medida em que a fração de POPG aumenta, os resíduos de ácido aspártico do peptídeo na interface da bicamada, são protonados. Entretanto, este efeito reduz a possibilidade de pontes de salinas entre as cadeias laterais de resíduos ácidos e básicos sugerindo que a estabilização da estrutura helicoidal nas bicamadas aniônicas tenha mecanismo diferente daquele observado em tampão [33] e em TFE [47]. Não se pode deixar de descartar a possibilidade de formação de pontes de hidrogênio entre resíduos do peptídeo e a cabeça polar dos fosfolipídios como mostrado por simulações de dinâmica molecular [48]. Embora os mecanismos de formação e estabilização de hélice em vesículas possam ser diferentes do que em TFE, é importante destacar que este valor máximo observado em vesículas aniônicas é próximo ao obtido em solução aquosa de 40% de TFE na qual o peptídeo apresentou 29, 47 e 47 % de hélice nos três valores de pH em ordem crescente. No pH 10,0 foi observada que a fração de hélice tende a ser maior comparada com os outros pHs. Neste pH parte dos grupos amida do N-terminal e das lisinas está desprotonada. O N-terminal não carregado juntamente com o resíduo ácido D2 foram mostrados contribuir com a estabilidade da conformação helicoidal [33]. A desprotonação das lisinas também reduz a possibilidade de pontes de hidrogênio com os resíduos ácidos sugerindo que o mecanismo de estabilização da conformação helicoidal seja diferente também em pH 10,0.

O potencial de superfície, determinado experimentalmente por medidas de potencial zeta, é também dependente do pH e, como esperado, da fração de lipídios aniônicos nas vesículas. Os valores experimentais, obtidos do modelo de Gouy-Chapmann, em alguns casos diferem em até 20% dos valores teóricos obtidos por meio da aproximação numérica da equação de Poisson-Boltzmann em simetria esférica proposta por Ohshima [35]. Esta diferença pode ser devida ao valor da distância do plano de cisalhamento utilizada para calcular o potencial zeta como de 0,2 nm como sugerido pelo fabricante

do equipamento. Utilizando os valores experimentais de potencial de superfície e os pKa dos grupos ácidos, básicos e do N-terminal foram obtidos os estados de protonação destes grupos e consequentemente da valência ou carga efetiva do peptídeo nos diferentes pHs e de fração de lipídios aniônicos. Nestes cálculos foi considerado que o estado de ionização de um grupo é independente de outros grupos e também, como primeira aproximação que o pKa dos grupos ionizáveis não muda quando o peptídeo particiona na bicamada. Wimley e colaboradores mostraram que resíduos ionizáveis no peptídeo Ac-WLXLL mudam o pKa quando particionam do tampão para octanol [31]. Utilizando estas aproximações os cálculos realizados mostram que a carga efetiva do peptídeo é maior no pH mais baixo e tende a aumentar com a carga da vesícula. Por outro lado, o grau de dissociação do POPG também é dependente do potencial da superfície. Em pH baixo, efeito do potencial é trazer o próton para os grupos que têm pKa próximos do pH usado. No pH mais alto, a carga efetiva do peptídeo diminui devido à desprotonação do N-terminal e das lisinas, que é favorecida com o aumento do potencial da superfície, resultando em aumento da carga efetiva com o aumento da fração de POPG. Estas variações de carga efetiva e de potencial de superfície resultaram em afinidades maiores em pH mais baixo, no qual o peptídeo tem maior carga efetiva indicando a contribuição significativa das interações eletrostáticas em modular a afinidade do peptídeo a bicamadas aniônicas.

Apesar da constante de partição do peptídeo em bicamada de POPC ser praticamente independente do pH, foi observado que a fração de hélice é fortemente dependente dele. Em pH 4,0 quando 42% dos resíduos de ácido aspártico estão protonados em solução, o conteúdo de hélice é de 12%, enquanto que em pH 7,0 quando todos os resíduos ácidos estão desprotonados a fração de hélice dobra. O aumento do pH para 10,0 por outro lado, reduz a carga do N-terminal para 0,38e e de cada lisina para 0,77e resultando em aumento da fração de hélice para 33%. A energia livre para a transferência do peptídeo para a interface de POPC foi calculada utilizando o pacote Membrane Protein Explorer (MPEx) [30]. Estes cálculos apontam que pH 4,0 esta energia é desfavorável, $\Delta G_{if} = 0,22$ kcal/mol quando se usa a fração de hélice medida em POPC, entretanto, a redução das cargas devida à protonação dos ácidos aspárticos torna a transferência favorável $\Delta G_{if} = - 0,87$ kcal/mol. Embora a energia livre de transferência para a interface seja favorável, seu valor é muito baixo comparado com as energias livres de adsorção medidas, sugerindo que outras formas de energia devam ser levadas em conta, tais como de-solvatação do peptídeo, formação de pontes hidrogênio e/ou salina com as cabeças polares de POPC, perturbação da bicamada pelo peptídeo entre outras.

O aumento da energia livre de adsorção com o potencial de superfície foi mais acen-

tuado em pH 4,0 comparado com pH 10,0 devido ao efeito das cargas efetivas nestes pHs, sugerindo dependência similar da energia livre com a energia livre eletrostática. Os valores de energia livre mostrados na tabela 4.4 indicam que a componente energética para estruturar o peptídeo na interface da bicamada tem maior contribuição nos pHs 4,0 e 10,0 quando comparadas com os valores em pH 7,0. ΔG_{if} constitui, provavelmente, a maior parte da contribuição hidrofóbica. No pH 4,0, o aumento da fração de lipídios aniônicos (POPG) e portanto do potencial da superfície resulta em aumento do número de aspárticos protonados e consequentemente de carga efetiva do peptídeo. Os cálculos de energia de transferência pelo MPEx mostraram que ΔG_{if} aumenta com a protonação dos aspárticos, sendo quase tão intensa quanto a componente eletrostática, sugerindo que protonação favorece a contatos hidrofóbicos com a bicamada. No pH 10,0, por outro lado, a componente eletrostática diminui devido à desprotonação do N-terminal e das lisinas portanto da carga efetiva do peptídeo, apesar do potencial de superfície ser maior neste pH. Enquanto que em pH 4,0 e com 80 % de POPG a energia eletrostática representa 63 % da energia de adsorção, em pH 10 ela corresponde a 40 %. Embora a desprotonação do N-terminal favoreça a transferência do peptídeo para a interface, o pacote MPEx só leva em conta alteração no estado de protonação do N-terminal, portanto, é possível que ΔG_{if} seja subestimada para este pH. Entretanto, alguns trabalhos de dinâmica molecular sobre o estado de protonação de lisinas e argininas de hélices transmembranares tem apontado que o estado de protonação destes resíduos não se altera quando estão em contato com a região hidrofóbica da membrana [48, 49, 50].

Nos três valores de pH estudados, a energia livre de adsorção do peptídeo em vesículas aniônicas aumenta linearmente com o potencial da superfície (figura 4.5), indicando que a adsorção do peptídeo é dirigida por interações eletrostáticas. A energia livre de adsorção varia também linearmente com a energia livre de transferência (figura 4.6). Ladokhin e White [26] sugerem que a linearidade nestes gráficos seja uma evidência da aditividade destas interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Entretanto, somente no pH 4,0 e para as vesículas com maiores conteúdos de lipídios aniônicos, a soma destas contribuições se aproxima das energias livres de adsorção, indicando que nos pHs 7,0 e 10,0 a soma destas contribuições energéticas é bem menor do que a energia de adsorção, portanto não aditivas e outras contribuições energéticas devam ser levadas em conta.

Capítulo 6

Conclusões

O peptídeo L1A apresenta transição conformacional estruturando em hélice em vesículas lipídicas.

A estruturação em hélice tem forte contribuição eletrostática sendo que a fração de hélice é significativamente maior em vesículas aniônicas do que em vesículas zwitteriônicas, especialmente em pH 4,0.

A afinidade do peptídeo a vesículas aniônicas é significativamente maior do que a vesículas zwitteriônicas reforçando a importância das interações eletrostáticas em dirigir o processo de adsorção do peptídeo na bicamada.

O potencial da bicamada induz regulação de cargas do peptídeo adsorvido na interface da bicamada, especialmente nos pHs 4,0 e 7,0, resultando em carga efetiva que segue a seguinte ordem: $z_{ef}(\text{pH } 4,0) > z_{ef}(\text{pH } 7,0) > z_{ef}(\text{pH } 10,0)$.

A carga efetiva dependente do pH indica redução de pareamento iônico (ponte de hidrogênio ou salina) entre cadeias laterais. A fração média de hélice semelhante nos três valores de pH e nas diferentes composições lipídicas indica que se na bicamada, ocorrer pareamento iônico entre as cadeias laterais, ele não contribui para a estabilidade conformacional do peptídeo na bicamada.

A soma das energias livres eletrostática e interfacial em pH 4,0 se aproxima da energia de adsorção nas composições lipídicas mais ricas em lipídios aniônicos, nas quais a regulação de cargas é maior. Nestas condições estas energias são aditivas.

Referências Bibliográficas

- [1] BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n. 3, p. 238–250, 2005.
- [2] <http://blanco.biomol.uci.edu/mpex/>), 2014.
- [3] <http://www.bachem.com/service-support/peptide-calculator/>), 2014.
- [4] <http://avantilipids.com/>, 2014.
- [5] VERLY, R. M. *Peptídeos antimicrobianos: Síntese, ensaios biológicos, estudos termodinâmicos e análise estrutural por rmn em meios biomiméticos*. 2010. Tese (Doutorado em Física) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.
- [6] ALVES, E. S. F. *Estudo estrutural por h-rmn de peptídeos bioativos isolados da secreção cutânea de *hypsiboas albopunctatus* e *leptodactylus labyrinthicus**. 2012. Tese (Doutorado em Física) - UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, 2012.
- [7] MANUAL, Z. N. S. U. Malvern instruments ltd. *Manual Version IM*, v. 100, p. 1–23, 2003.
- [8] KALKERT, C.; KAYSER, J. Laser doppler velocimetry. 2006.
- [9] [http : //blanco.biomol.uci.edu/hydrophobicity_scales.html/](http://blanco.biomol.uci.edu/hydrophobicity_scales.html/), 2014.
- [10] PASUPULETI, M.; SCHMIDTCHEN, A.; MALMSTEN, M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Critical reviews in biotechnology*, v. 32, n. 2, p. 143–171, 2012.
- [11] HANCOCK, R. E.; LEHRER, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in biotechnology*, v. 16, n. 2, p. 82–88, 1998.
- [12] EHRENSTEIN, G.; LECAR, H. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Quarterly reviews of biophysics*, v. 10, n. 01, p. 1–34, 1977.

- [13] YANG, L.; HARROUN, T. A.; WEISS, T. M.; DING, L.; HUANG, H. W. Barrel-stave model or toroidal model? a case study on melittin pores. *Biophysical journal*, v. 81, n. 3, p. 1475–1485, 2001.
- [14] MATSUZAKI, K. Why and how are peptide–lipid interactions utilized for self-defense? magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1462, n. 1, p. 1–10, 1999.
- [15] OREN, Z.; SHAI, Y. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Peptide Science*, v. 47, n. 6, p. 451–463, 1998.
- [16] WIMLEY, W. C.; HRISTOVA, K. Antimicrobial peptides: successes, challenges and unanswered questions. *The Journal of membrane biology*, v. 239, n. 1-2, p. 27–34, 2011.
- [17] MATSUZAKI, K.; YONEYAMA, S.; MIYAJIMA, K. Pore formation and translocation of melittin. *Biophysical journal*, v. 73, n. 2, p. 831–838, 1997.
- [18] TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. *Peptide Science*, v. 55, n. 1, p. 4–30, 2000.
- [19] OREN, Z.; SHAI, Y. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Peptide Science*, v. 47, n. 6, p. 451–463, 1998.
- [20] LADOKHIN, A. S.; WHITE, S. H. Folding of amphipathic α -helices on membranes: energetics of helix formation by melittin. *Journal of molecular biology*, v. 285, n. 4, p. 1363–1369, 1999.
- [21] SEELIG, J. Thermodynamics of lipid–peptide interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1666, n. 1, p. 40–50, 2004.
- [22] DOS SANTOS CABRERA, M. P.; COSTA, S. T. B.; DE SOUZA, B. M.; PALMA, M. S.; RUGGIERO, J. R.; NETO, J. R. Selectivity in the mechanism of action of antimicrobial mastoparan peptide polybia-mp1. *European Biophysics Journal*, v. 37, n. 6, p. 879–891, 2008.
- [23] HUNTER, R. J. Zeta potential in colloid science: principles and applications. 1981.
- [24] KLOCEK, G.; SCHULTHESS, T.; SHAI, Y.; SEELIG, J. Thermodynamics of melittin binding to lipid bilayers. aggregation and pore formation†. *Biochemistry*, v. 48, n. 12, p. 2586–2596, 2009.

- [25] BESCHIASCHVILI, G.; SEELIG, J. Peptide binding to lipid bilayers. binding isotherms and. zeta.-potential of a cyclic somatostatin analog. *Biochemistry*, v. 29, n. 49, p. 10995–11000, 1990.
- [26] LADOKHIN, A. S.; WHITE, S. H. Protein chemistry at membrane interfaces: non-additivity of electrostatic and hydrophobic interactions. *Journal of molecular biology*, v. 309, n. 3, p. 543–552, 2001.
- [27] LEITE, N. B.; DOS SANTOS ALVARES, D.; DE SOUZA, B. M.; PALMA, M. S.; NETO, J. R. Effect of the aspartic acid d2 on the affinity of polybia-mp1 to anionic lipid vesicles. *European Biophysics Journal*, v. 43, n. 4-5, p. 121–130, 2014.
- [28] LUO, P.; BALDWIN, R. L. Mechanism of helix induction by trifluoroethanol: a framework for extrapolating the helix-forming properties of peptides from trifluoroethanol/water mixtures back to water. *Biochemistry*, v. 36, n. 27, p. 8413–8421, 1997.
- [29] ROHL, C. A.; BALDWIN, R. L. Deciphering rules of helix stability in peptides. *Methods in enzymology*, v. 295, p. 1, 1998.
- [30] SNIDER, C.; JAYASINGHE, S.; HRISTOVA, K.; WHITE, S. H. Mpex: a tool for exploring membrane proteins. *Protein Science*, v. 18, n. 12, p. 2624–2628, 2009.
- [31] WIMLEY, W. C.; WHITE, S. H. Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nature structural biology*, v. 3, n. 10, p. 842–848, 1996.
- [32] WHITE, S. H.; WIMLEY, W. C. Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, v. 28, n. 1, p. 319–365, 1999.
- [33] MARQUSEE, S.; BALDWIN, R. L. Helix stabilization by glu-... lys+ salt bridges in short peptides of de novo design. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 84, n. 24, p. 8898–8902, 1987.
- [34] MARQUSEE, S.; ROBBINS, V. H.; BALDWIN, R. L. Unusually stable helix formation in short alanine-based peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 86, n. 14, p. 5286–5290, 1989.
- [35] OHSHIMA, H.; HEALY, T. W.; WHITE, L. R. Accurate analytic expressions for the surface charge density/surface potential relationship and double-layer potential distribution for a spherical colloidal particle. *Journal of Colloid and Interface Science*, New York, v. 90, n. 1, p. 17–26, 1982.

- [36] MARSH, D. Crc handbook of lipid bilayers. 1990.
- [37] EISENBERG, M.; GRESALFI, T.; RICCIO, T.; MCLAUGHLIN, S. Adsorption of monovalent cations to bilayer membranes containing negative phospholipids. *Biochemistry*, v. 18, n. 23, p. 5213–5223, 1979.
- [38] SEELIG, J.; NEBEL, S.; GANZ, P.; BRUNS, C. Electrostatic and nonpolar peptide-membrane interactions. lipid binding and functional properties of somatostatin analogs of charge $z=+1$ to $z=+3$. *Biochemistry*, v. 32, n. 37, p. 9714–9721, 1993.
- [39] COX, M.; NELSON, D. Lehninger principles of biochemistry, 2004.
- [40] FIŠAR, Z. Interactions between tricyclic antidepressants and phospholipid bilayer membranes. *Gen. Physiol. Biophys*, v. 24, n. 2, 2005.
- [41] SHOEMAKER, K. R.; KIM, P. S.; BREMS, D. N.; MARQUSEE, S.; YORK, E. J.; CHAIKEN, I. M.; STEWART, J. M.; BALDWIN, R. L. Nature of the charged-group effect on the stability of the c-peptide helix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 82, n. 8, p. 2349–2353, 1985.
- [42] FAIRMAN, R.; SHOEMAKER, K. R.; YORK, E. J.; STEWART, J. M.; BALDWIN, R. L. Further studies of the helix dipole model: Effects of a free $\alpha\text{-nh}_3^+$ or $\alpha\text{-coo}^-$ group on helix stability. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 5, n. 1, p. 1–7, 1989.
- [43] HUYGHUES-DESPOINTES, B. M.; SCHOLTZ, J. M.; BALDWIN, R. L. Effect of a single aspartate on helix stability at different positions in a neutral alanine-based peptide. *Protein Science*, v. 2, n. 10, p. 1604–1611, 1993.
- [44] ZANIN, L. M. P.; DOS SANTOS ALVARES, D.; JULIANO, M. A.; PAZIN, W. M.; ITO, A. S.; NETO, J. R. Interaction of a synthetic antimicrobial peptide with model membrane by fluorescence spectroscopy. *European Biophysics Journal*, v. 42, n. 11-12, p. 819–831, 2013.
- [45] EVANS, D. F.; WENNERSTRÖM, H. The colloidal domain: where physics, chemistry, biology, and technology meet. 1999.
- [46] LUND, M.; JÖNSSON, B. Charge regulation in biomolecular solution. *Quarterly reviews of biophysics*, v. 46, n. 03, p. 265–281, 2013.
- [47] SONNICHSEN, F.; VAN EYK, J.; HODGES, R.; SYKES, B. Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure: an nmr and cd study using a synthetic actin peptide. *Biochemistry*, v. 31, n. 37, p. 8790–8798, 1992.

- [48] ORIONI, B.; BOCCHINFUSO, G.; KIM, J. Y.; PALLESCHI, A.; GRANDE, G.; BOBONE, S.; PARK, Y.; KIM, J. I.; HAHM, K.-S.; STELLA, L. Membrane perturbation by the antimicrobial peptide pmap-23: a fluorescence and molecular dynamics study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1788, n. 7, p. 1523–1533, 2009.
- [49] MACCALLUM, J. L.; BENNETT, W. D.; TIELEMAN, D. P. Partitioning of amino acid side chains into lipid bilayers: results from computer simulations and comparison to experiment. *The Journal of general physiology*, v. 129, n. 5, p. 371–377, 2007.
- [50] LI, L.; VOROBYOV, I.; ALLEN, T. W. Potential of mean force and p k a profile calculation for a lipid membrane-exposed arginine side chain. *The journal of physical chemistry B*, v. 112, n. 32, p. 9574–9587, 2008.