

Sabrina Thais Broggio Costa

Estudos Conformacionais por Dinâmica Molecular de Peptídeos
Antimicrobianos da Família dos Mastoparanos em Misturas de TFE-água.

Tese de doutorado para a obtenção do título de Doutor
em Biofísica Molecular, área de concentração
Biofísica Molecular apresentada ao Departamento de
Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciência
Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio
Mesquita Filho” – UNESP

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Ruggiero

São José do Rio Preto

2006

Broggio-Costa, Sabrina Thais.

Estudos conformacionais por dinâmica molecular de peptídeos antimicrobianos da família dos Mastoparanos em misturas de TFE-água / Sabrina Thais Broggio-Costa. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2006. 133 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: José Roberto Ruggiero

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

1. Biofísica molecular. 2. Dinâmica molecular. 3. Peptídios. 4. Peptídios antimicrobianos. 5. Misturas de trifluoretano (TFE)-água. 6. Hélice-alfa - Estabilidade. I. Ruggiero, José Roberto. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.32

À Virgem Maria, dedico não só esta tese, mas toda minha vida.

Agradecimentos

Se vivesse o resto de minha vida a serviço de Deus, ainda assim, não seria capaz de retribuir todas as graças que todos os dias tenho recebido de Suas ternas mãos. Obrigado Senhor por Sua presença tão sutil e tão doce em minha vida!

Ao Prof. Dr. José Roberto Ruggiero, pela valiosa orientação e amizade de todos estes anos. Sua paixão e ética profissional é contagiante e um exemplo para todos nós. Gostaria de registrar minha admiração por sua imensa responsabilidade e empenho empregado em minha formação.

Ao Prof. Dr. João Ruggiero Netto, pela colaboração, amizade e exemplo de dedicação ao trabalho científico.

Ao Prof. Dr. Pedro Geraldo Pascutti, pela disponibilidade constante, a toda ajuda e ensinamentos importantes para a realização deste trabalho.

Ao amigo Prof. Dr. Valmir Fadel, pela preciosa amizade, pelas discussões, disposição e agradável convívio de todos estes anos.

Aos professores do Departamento de Física, pelas conversas, sugestões e amizade.

Aos meus pais, Gil e Rose, por todo esforço empregado na minha formação profissional, ética e religiosa. Agradeço pelo incentivo constante, pelas inúmeras orações e por terem suportado minha ausência durante todos estes anos. O que mais toca meu coração não são vossas palavras, mas vosso exemplo.

Ao meu esposo João Carlos, por toda a vida dedicada a mim, pelo amor que jamais vi igual, pelo respeito, por cada palavra de incentivo, por acreditar em mim mais do eu mesma, por ser meu porto seguro e por jamais permitir que eu me afaste de Deus.

À minha irmã e afilhada, Tarsila, pessoa tão especial em minha vida, agradeço por entender e aceitar minha ausência em momentos importantes de sua vida.

À amiga e cunhada, Fernanda, sou eternamente grata por todo amor e preocupação que tens por mim. Agradeço pela disponibilidade constante, ajuda incondicional, companhia, torcida e amizade.

Ao João e Cidinha, pelo carinho com que me acolhem em sua família e pela ajuda tão valiosa durante a realização deste trabalho.

A todos os meus familiares e amigos que foram, em muitos momentos, meu apoio e equilíbrio.

À amiga Márcia Perez dos Santos Cabrera, pela colaboração essencial neste trabalho. Além das palavras de incentivo e das valiosas idéias, gostaria de registrar meu agradecimento e admiração a esta grande amiga.

Aos amigos e padrinhos, Jana, Gel, Gláucia e Ocimar, pelo amor, respeito, ajuda e dedicação. Durante este doutorado vocês foram muito especiais, estiveram presentes nas alegrias e nas tristezas, proporcionaram momentos de descontração e sempre tiveram palavras de consolo e de incentivo.

As amigas de graduação Andrea, Bárbara e Milena, que durante tempos difíceis de graduação, foram pra mim tal como uma família.

Aos colegas do Departamento de Física, pela amizade e agradável convívio. Agradeço especialmente aos amigos Carlos, Leandro, Luciana, Marisa, Priscilla e Sidney, pela ajuda com os mais diversos assuntos e por terem conquistado um lugar especial em meu coração.

Aos funcionários e amigos do Departamento de Física, Ilva, Rose, Paulinho e Barbosa, pela eficiência, disposição e amizade em todos os momentos.

Aos amigos do presente e do passado do Grupo de Oração Universitário (GOU) UNidos no ESPírito, que foram fundamentais para minha perseverança em Deus, nos estudos e na universidade.

A todos os amigos e irmãos do Ministério Universidades Renovadas que passaram pela minha vida, e além de compartilharem comigo sonhos, contribuíram para o meu amadurecimento na fé durante todos estes anos de universidade. Vocês são muitos, mas o amor não ocupa espaço, por isso tenho todos em meu coração.

A CAPES, pelo suporte financeiro para realização deste trabalho.

*“É impossível alguém que tenha feito uma profunda experiência com Deus,
não desejar que outros também a façam.”*

(João Paulo II)

Os Mastoparanos são peptídeos curtos e catiônicos extraídos do veneno de vespas. Estes peptídeos dependem de sua sequência primária, composição, hidrofobicidade, ângulo polar, anfipaticidade e amidação do C-terminal para apresentar diferentes atividades biológicas. A conformação em hélice anfipática parece ser fundamental para interação destes peptídeos com a bicamada membranar. Neste trabalho buscamos as correlações destas características com as atividades antimicrobianas e hemolíticas apresentadas por três mastoparanos conhecidos, usando simulações por dinâmica molecular em misturas de TFE-água. Misturas de TFE-água apresentam um caráter hidrofóbico e hidrofílico assim como o ambiente membranar. Um dos peptídeos estudados é o Eumenine Mastoparano-AF (EMP-AF), no qual constatamos que a desamidação do C-terminal acarretou na desestruturação da conformação helicoidal e na perda da anfipaticidade nesta região, devido à atração eletrostática entre a carga negativa do grupo carboxila e os grupos catiônicos das cadeias laterais de alguns resíduos. Por esse fato a atividade hemolítica é perdida. Outro peptídeo investigado é o Paulista-MPI, para o qual propomos como estrutura estável uma hélice- α anfipática. Para este caso, também exploramos as razões da existência de atividade antimicrobiana e ausência da atividade hemolítica. O outro peptídeo estudado foi o Anoplin com e sem o grupo amida do C-terminal. O Anoplin natural, Anoplin-NH₂ é um peptídeo antimicrobiano. Novamente esta atividade pode ser associada com sua estrutura helicoidal anfipática que se apresenta estável por fatores como o equilíbrio eletrostático entre os grupos carregados das cadeias laterais; pela predominância dos grupos apolares das moléculas de TFE na região dos átomos eletronegativos da cadeia principal; e pela solvatação da cadeia lateral. A desamidação do C-terminal (Anoplin-OH), perde sua atividade antimicrobiana devido a desestruturação dos resíduos deste terminal da hélice, causando um decréscimo na anfipaticidade devido as interações atrativas da carga negativa do grupo carboxila e os grupos catiônicos das cadeias laterais de alguns resíduos.

Abstract

Mastoparans is a class of peptides extracted from wasp venom, named after their first recognized biological action, the degranulation of mast cells. They are short and cationic peptides that depending on their primary sequence, degree of charge and amidation of C-terminal present different biological activities. Fundamental for their interactions with biological membranes seems to be an amphipatic helix conformation. In this work we search for correlations among these characteristics and the antimicrobial and hemolytic activities of three known mastoparans, using molecular dynamics simulation in TFE-water mixtures. TFE-water media shows both hydrophobic and hydrophilic character and in this way mimics a membrane-like environment. The peptides studied are the Eumenine Mastoparan (EMP-AF), for which the desamidation of the C-terminal leads to the lost of the helix conformation and amphipaticity at this region, due to the electrostatic attraction among the negative charge of carboxylate group and the cationic groups of the lateral chain of some residues. Consequently the hemolytic activity is lost. Another peptide studied is Paulista-MPI, for which an amphipatic α -helix is proposed as a stable structure. We rationalize also the reasons for its antimicrobial activities and the absence of hemolytic activity. The last peptide studied is Anoplin, the C-terminal amidated wild type and its carboxylated analog. The former type, Anoplin-NH₂, is an antimicrobial and non-hemolytic peptide. Again this can be associated to the amphipatic helical structure, that we show is maintained by factors as the electrostatic equilibrium between charged groups, predominance of apolar groups of TFE molecules around the electronegative atoms of the main chain and solvation of lateral side chains. Deamidation of C-terminal, rendering Anoplin-OH, abolishes its antimicrobial activity due to the unfolding of the helix terminal and the loss of amphipaticity, caused by attractive interactions among the negatively charged carboxylated group at the C-terminal and the cationic groups in the lateral chains of some residues.

Lista de Ilustrações

Figura 1.1: Hélice- α ideal do peptídeo KLAL com 16 resíduos de aminoácidos.....	9
Figura 1.2: Hélice- α anfipática do peptídeo KLAL com 16 resíduos de aminoácidos. Esta estrutura helicoidal está projetada no plano normal ao eixo da hélice.....	12
Figura 1.3: Estrutura secundária do MP (extraído de vespa social) ligada à membrana lipídica (código no PDB: 1d7n).....	17
Figura 1.4: Estrutura secundária do MP-X (extraído vespa social), ligado a proteína G (código no PDB: 1a13).....	17
Figura 1.5: Representação das ligações de hidrogênio formadas pelas moléculas de TFE, em agrupamentos “clusters” formados em misturas com água.....	18
Figura 1.6: Estrutura secundária do EMP-AF (extraído de vespa solitária) em mistura de TFE e água 30:70 (v:v).....	19
Figura 1.7: Estrutura secundária do Anoplin (extraído de vespa solitária) em SDS.....	19
Figura 1.8: Estrutura helicoidal anfipática resolvida por RMN para o EMP-AF1 em solução com TFE.	20
Figura 1.9: Estrutura em hélice- α anfipática resolvida por RMN para o EMP-AF em solução com TFE.....	20
Figura 2.1: Estrutura tetraédrica do carbono- α	31
Figura 2.2: Condições periódicas de Contorno bidimensional de um sistema quadrado. A caixa central representa o sistema original e as 8 demais são suas imagens.....	41
Figura 2.3: Sistema periódico bidimensional quadrado. São consideradas somente as interações entre o átomo cinza (i) e aqueles situados dentro do círculo de raio R_C	42
Figura 2.4: Ligação de Hidrogênio. Convenção implementada no pacote computacional GROMACS. R é a distância entre D e A, e α o ângulo formado entre a ligação D-H e r.....	46
Figura 2.5: Ligação peptídica de dois aminoácidos consecutivos. Os ângulos torcionais ϕ e ψ permitem que cada plano formado por esta ligação gire em relação aos seus vizinhos.....	47
Figura 2.6: Diagrama de Ramachandran, no qual estão mostradas as regiões fisicamente permitidas para os aminocidos.....	48
Figura 3.1: Gráficos do RMSD da cadeia principal da primeira estrutura com as demais obtidas por RMN para o EMP-AF-NH ₂ e EMP-AF-OH.....	51

Figura 3.2: Padrões de estrutura secundária por resíduo, ao longo da dinâmica, para o EMP-AF-NH ₂ em água.....	53
Figura 3.3: Gráfico do número de ligações de hidrogênio.....	53
Figura 3.4: Gráficos do RMSF e RMSD do EMP-AF-NH ₂	55
Figura 3.5: Padrões de estruturas secundárias por resíduo, ao longo da dinâmica, para o EMP-AF-NH ₂ em mistura de TFE e água.....	56
Figura 3.6: Gráfico do número de ligações de hidrogênio, do tipo n-n+4, entre os átomos eletronegativos da cadeia principal do peptídeo.....	57
Figura 3.7: Gráfico das ligações de hidrogênio entre os resíduos a) Ala 7 e Ile 11, b) Lys 8 e Lys 12, e c) Ile 10 e Leu 14.....	58 e 59
Figura 3.8: Gráfico das ligações de hidrogênio entre os átomo O da cadeia lateral da Asn 2 e o N da cadeia principal da Lys 5.....	60
Figura 3.9: Gráfico do Macro-dipolo da hélice do peptídeo EMP-AF-NH ₂	60
Figura 3.10: Estrutura média da hélice- α do EMP-AF-NH ₂ obtida no intervalo de 14 a 20 ns. Estrutura projetada no plano normal ao eixo da hélice.....	61
Figura 3.11: Gráficos da integral da função de distribuição radial de pares (RIN) para os grupos da cadeia lateral dos resíduos hidrofóbicos (Leu 4, Ile 6 e Ile 10).....	62
Figura 3.12: Gráfico da integral de função de distribuição radial de pares (RIN), do grupo NH ₃ ⁺ da cadeia lateral da Lys 8.....	63
Figura 3.13: Gráfico de RIN dos resíduos polares do peptídeo. Para a Asn 2 escolhemos o grupo NH ₂ da cadeia lateral, e para a Ser 3 o grupo OH também da cadeia lateral.....	63
Figura 3.14: Representação da hélice- α anfipática do peptídeo, estrutura média obtida no intervalo de 14 a 20 ns.....	64
Figura 3.15: Gráfico de RIN dos resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos do peptídeo.....	65
Figura 3.16: Padrões de estruturas secundárias por resíduo, ao longo da dinâmica, para o EMP-AF-OH.....	68
Figura 3.17: Gráfico do RMSD entre a estrutura de partida minimizada e as demais conformações encontradas ao longo da dinâmica.....	69
Figura 3.18: Gráfico do RMSD entre a conformação em hélice- α ideal e as das demais conformações obtidas ao longo da dinâmica.....	69
Figura 3.19: Representação das conformações obtidas em diferentes tempos da dinâmica.....	69
Figura 3.20: Gráficos de ϕ e ψ para os resíduos Ala 7, Lys 8, Gly 9 e Ile 10.....	70

Figura 3.21: Gráficos de ϕ e ψ ao longo da dinâmica, para os resíduos Ile 11, Lys 12 e Ser 13....	71
Figura 3.22: Gráfico do número de ligações de hidrogênio, do tipo $n - n+4$, entre os átomos letronegativos (N e O) da cadeia principal do peptídeo.....	72
Figura 3.23: Gráfico das ligações de hidrogênio entre os átomos eletronegativos (N e O) da cadeia principal dos resíduos O Lys 5 com N Gly 9 (a), O Ile 6 com N Ile 10 (b) e O Ala 7 com N Ile 11 (c).....	73
Figura 3.24: Gráficos das distâncias entre as lisinas e a carga OH do C-terminal.....	74
Figura 3.25: Gráfico do Macro-dipolo da hélice do peptídeo EMP-AF-OH ao logo da dinâmica.	75
Figura 3.26: Gráficos das curvas de RIN para o EMP-AF-OH durante os intervalos de 5 a 10 ns (linha contínua) e de 10 a 15 ns (linha tracejada).....	77 e 78
Figura 3.27: Padrões de estruturas secundárias por resíduo, ao longo da dinâmica, para o EMP-AF carboxilado.....	80
Figura 4.1: Sobreposição das 10 estruturas encontradas para o MP (a) por RMN ligado à membrana lipídica e a sobreposição das 14 estruturas do MP-X (b) encontradas por RMN, ligado a proteína-G.....	85
Figura 4.2: Gráficos de RMSD (a) com a hélice ideal e RMSF (b) para ambos peptídeos.....	87
Figura 4.3: Gráfico do número de ligações de hidrogênio do tipo $(n-n+4)$	88
Figura 4.4: Padrões de estrutura secundária por resíduo para o MP-X e MP-I.....	90
Figura 4.5: Esquema de projeção das hélices num plano ortogonal a seu eixo.....	91
Figura 4.6: Projeção das hélices de ambos peptídeos num plano ortogonal a seu eixo.....	91
Figura 4.7: Gráficos da Integral da Função de Distribuição Radial de Pares (RIN) para o MP-X ao longo da dinâmica de 20 ns.....	93
Figura 4.8: Curvas de RIN para o carga da Lys 11.....	94
Figura 4.9: Gráficos da Integral da Função de Distribuição Radial de Pares (RIN) para o MP-I ao longo da dinâmica de 20 ns.....	95
Figura 4.10: Representação da distribuição do solvente na região do peptídeo.....	97
Figura 4.11: Estrutura média obtida ao longo da dinâmica.....	98
Figura 4.12: Distância entre a carga negativa da Asp 8 (O^-) e o grupo polar da Gln 12 (NH_2), em preto, e a distância entre esta mesma carga negativa e a carga positiva da Lys 11 (NH_3^+), em azul, ao longo da dinâmica.....	99
Figura 4.13: Estrutura média obtida ao longo da dinâmica.....	100
Figura 5.1: Sobreposição das 20 estruturas encontradas para o Anoplin- NH_2 (a) e Anoplin-OH (b), por RMN em solução com SDS.....	104
Figura 5.2: Gráficos de RMSD e RMSF de ambos peptídeos.....	107

Figura 5.3: Gráfico do número de ligações de hidrogênio do tipo (n-n+4).....	107
Figura 5.4: Gráficos das distâncias entre os átomos N e O da cadeia principal dos peptídeos Anoplin-NH ₂ (preto) e do Anoplin-OH (azul).....	108
Figura 5.5: Padrões de estrutura secundária por resíduo, ao longo da dinâmica, para o Anoplin-NH ₂ e Anoplin-OH.....	109
Figura 5.6: Gráficos dos macros-dipolo das hélices do Anoplin-NH ₂ (preto) e Anoplin-OH (azul) ao longo da dinâmica.....	110
Figura 5.7: Gráficos das distâncias entre as cargas das cadeias laterais da Lys 4 e Arg 5 com a carga negativa (OH) do C-terminal.....	111
Figura 5.8: Cadeias obtidas por RMN projetadas no plano ortogonal ao eixo da hélice.....	112
Figura 5.9: Estruturas médias obtidas no intervalo de 5 a 8 ns da DM de ambos peptídeos, projetadas no plano ortogonal ao eixo da hélice. Em a) estrutura do Anoplin-NH ₂	113
Figura 5.10: Gráficos da Integral da Função de Distribuição Radial de Pares (RIN), no intervalo de 5 a 8 ns, para os grupos NH ₃ ⁺ (N-terminal), NH ₂ (C-terminal) e COO ⁻ (C-terminal) dos peptídeos Anoplin-NH ₂ e Anoplin-OH.....	114
Figura 5.11: Gráficos da Integral da Função de Distribuição Radial de Pares (RIN), no intervalo de 5 a 8 ns, para as cadeias laterais dos resíduos Leu 9 e Leu 10 dos peptídeos Anoplin-NH ₂ e Anoplin-OH.....	115
Figura 5.12: Gráficos da Integral da Função de Distribuição Radial de Pares (RIN) para o Anoplin-NH ₂ ao longo da dinâmica de 8 ns.....	116 e 117

Lista de Tabelas

Tabela 1.1: Hidrofobicidade por resíduos de aminoácidos, em azul estão os resíduos polares positivos, em vermelho os resíduos polares negativos, em verde os resíduos polares e em preto os hidrofóbicos (Eisenberg et al., 1984b).....	8
Tabela 1.2: Peptídeos extraídos de vespas sociais.....	26
Tabela 1.3: Peptídeos extraídos de vespas solitárias.....	27
Tabela 2.1: Parâmetros propostos por Fioroni et al. (2000), para simulação por DM com a molécula de TFE.....	34
Tabela 2.2: Parâmetros e condições usados na Dinâmica Molecular.....	43
Tabela 3.1: Seqüência primária do EMP-AF e análogos.....	51
Tabela 3.2: Percentual temporal de existência das ligações de hidrogênio do tipo n-n+4 ao longo dos 20 ns de dinâmica para EMP-AF-NH ₂ em mistura de TFE e água.....	58
Tabela 4.1: Seqüência primária dos mastoparanos MP, MP-X e MP-I.....	84
Tabela 4.2: Tempo de permanência (em porcentagem do tempo total da simulação) das ligações de hidrogênio do tipo n-n+4 para a cadeia principal dos peptídeos.....	88
Tabela 4.3: Tempo de permanência (em porcentagem do tempo total da simulação) das ligações de hidrogênio entre as cadeias laterais dos resíduos Asn 2 e Asp 2 com a cadeia principal dos peptídeos MP-X e MP-I respectivamente.....	89
Tabela 4.4: Tabela com as distâncias médias entre os grupos de cargas e grupos polares das cadeias laterais do MP-I.....	98
Tabela 5.1: Seqüência primária do Anoplin e seu análogo Anoplin-OH.....	103

Lista de Siglas, Símbolos e Abreviaturas.

A – Anfipaticidade

Aib – “ α -aminoisobutyryl” - aminoácido sintético.

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”

CL – Cardiolipina

Cl⁻ – Cloro

CPC – Condições Periódicas de Contorno

Cys – Cisteína

DM – Dinâmica Molecular

DPPC – Dipalmitoil-D,L-fosfatidilcolina

DSSP – “Database of Secondary Structure in Proteins”

EMP-AF – Eumenine Mastoparano-AF

EMP-EM – Eumenine Mastoparano-EM

Gln – Glutamina

Glu – Ácido Glutâmico

Gly – Glicina

GROMACS – “GRONingen MACHine for Chemical Simulation”

GROMOS – “GRONingen Molecular Simulation”

H – Hidrofobicidade

His – Histidina

H_n – Hidrofobicidade do resíduo *n*

Ile – Isoleucina

KLAL – Peptídeo catiônico e anfipático, composto por lisinas (K), leucina (L) e alanina (A).

Leu – Leucina

LPS – Lipopolisacarídeos

Lys – Lisina

Met – Metionina

Met – Metionina

MP – Mastoparano

PC – $L\text{-}\alpha$ - fosfatidilcolina

PCPG – $L\text{-}\alpha$ -fosfatidilcolina e $L\text{-}\alpha$ -fosfatidil-DL-glicerol

PDB – “Protein Data Bank”

PG – $L\text{-}\alpha$ -fosfatidilglicerol

Phe – Fenilalanina

PME – “Particle Mesh Ewald”

Pro – Prolina

PS – Fosfatidilserina

Q – carga

RIN – “Run Integration Number”

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMSD – “Root Mean Square Deviation”

RMSF – “Root Mean Square Flutuation”

S – Sequência

SDS – Dodecil sulfato de sódio

Ser – Serina

SI – Sistema Internacional

SPC – “Simple Point Charge”

TFE – Trifluoretanol

Thr – Treonina

Trp – Triptofano

Tyr – Tirosina

Val – Valina

θ_H – ângulo hidrofóbico

θ_p – ângulo polar

μ_H – momento hidrofóbico

Sumário

Capítulo 1 – Introdução	- 1
1.1 – Mecanismo de Ação dos Peptídeos Antimicrobianos	- 1
1.2 – Determinantes Estruturais da Atividade dos Peptídeos Antimicrobianos	- 3
1.2.1 – Seqüência (S) e Conformação (χ)	- 3
1.2.2 – Carga (Q)	- 6
1.2.3 – Hidrofobicidade (H)	- 7
1.2.4 – Momento Hidrofóbico (μ_H)	- 8
1.2.5 – Anfipáticidade (A)	- 10
1.2.6 – Ângulo Polar (θ_p) e Ângulo Hidrofóbico (θ_h)	- 11
1.2.7 – C-Terminal Amidado	- 12
1.3 – Peptídeos Antimicrobianos Extraídos do Veneno de Vespas	- 13
1.3.1 – Características Conformacionais e Seqüenciais	- 16
1.3.2 – Atividades Antimicrobiana e Hemolítica x Aspectos Estruturais	- 21
1.4 – Objetivos	- 24
Capítulo 2 – Métodos Teóricos	- 27
2.1 – Abordagem Clássica e Campo de Forças.	- 27
2.1.1 – Potenciais Harmônicos	- 28
2.1.2 – Potencial Torcional	- 30
2.1.3 – Potencial de Lennard-Jones	- 31
2.1.4 – Potencial de Coulomb	- 31
2.1.5 – Função Clássica para a Energia Potencial	- 32
2.2 – Algoritmos de Otimização	- 34
2.3 – Dinâmica Molecular	- 36
2.3.1 – Método de Integração	- 37
2.3.2 – Modelagem do Solvente	- 38
2.3.2.1 – Condições Periódicas de Contorno	- 39
2.3.2.2 – Raio de Corte	- 40
2.4 – Condições e Parâmetros para Dinâmica Molecular	- 41

2.5 – Análises Estatística	- 43
Capítulo 3 – Análise estrutural do Eumenine Mastoparano-AF (EMP-AF).	48
3.1 – Introdução	-49
3.2 – Eumenine Mastoparano-AF (EMP-AF-NH ₂) em água.	-51
3.2.1 – Métodos	-51
3.2.2 – Resultados e Discussões	-51
3.3 – Eumenine Mastoparano-AF (EMP-AF-NH ₂) em misturas de TFE e água.	-53
3.3.1 – Métodos	-53
3.3.2 – Resultados e Discussões	-54
3.4 – Eumenine Mastoparano-AF com o C-terminal carboxilado (EMP-AF-O ⁻) em TFE e água.	-65
3.4.1 – Métodos	-66
3.4.2 – Resultados e Discussões	-66
3.5 – Discussão e Conclusões	-80
Capítulo 4 – Análise Estrutural do MP-X e Paulista-MPI.	-83
4.1 – Introdução	-83
4.2 – Métodos	-85
4.3 – Resultados e Discussões	-85
Capítulo 5 – Análise Estrutural do Anoplin-NH ₂ e Anoplin-OH.	-102
5.1 – Introdução	-102
5.2 – Métodos	-104
5.3 – Resultados e Discussões	-105
Capítulo 6 – Conclusões Gerais	-120
Referências Bibliográficas	-123
Apêndice A – Artigo em Preparação	-133

Capítulo 1 – Introdução

Neste capítulo abordaremos os aspectos biológicos e estruturais dos peptídeos bioativos estudados nesta tese.

1.1 Mecanismos de Ação dos Peptídeos Antimicrobianos

As membranas biológicas são compostas por fosfolipídios e proteínas. Em alguns organismos, esteróis e glicerídeos também contribuem para a superfície topológica e a arquitetura bioquímica das membranas (Yeaman et al., 2003). O componente elementar da membrana é a bicamada fosfolipídica, que é anfipática, tendo domínios hidrofóbicos e hidrofílicos. As membranas citoplasmáticas dos mamíferos geralmente são compostas por fosfolipídios zwitteriônicos, ou seja, não apresentam carga líquida e muitas bactérias patogênicas têm a membrana celular altamente eletronegativa (aniônicas). Dentro destas perspectivas a diferença fundamental existente entre peptídeos antimicrobianos e hospedeiros de membrana é representada pela escolha seletiva do tipo de grupos químicos que a compõem.

Muitos peptídeos são relativamente desestruturados ou em conformação estendida quando estão em solução, isto é, antes da interação com seu alvo celular. Na presença da membrana, entretanto, estes peptídeos apresentam estruturas anfipáticas, permitindo que haja uma seleção por seus alvos de acordo com a afinidade de carga entre a membrana e o peptídeo. Essa característica, de serem ao mesmo tempo solúveis em água e capazes de interagir com a bicamada, se deve ao fato dos resíduos hidrofóbicos estarem particionados ao longo da cadeia.

Devido a cationicidade destes peptídeos há uma atração eletrostática entre eles e as superfícies microbianas carregadas negativamente. Essa interação direta com a bicamada lipídica pode induzir a formação de hélice- α (Turner et al., 1998 e Matsuzaki et al., 1999b) e favorecer a penetração dos mesmos. O modelo que se tem é que, inicialmente o peptídeo catiônico é atraído pelo grupo polar carregado negativamente do fosfolipídio da camada externa, assumindo uma conformação helicoidal anfipática que permite a inserção da face hidrofóbica na bicamada (Matsuzaki et al., 1997 e Dathe et al., 2001). Nestas interações

iniciais ocorre a mudança de fase conformacional, ou dinâmica da formação de estruturas secundárias, nas intermediações da membrana. (Unger et al., 2001; Oren et al., 1999a e Yeaman et al., 2003).

A permeabilização da membrana pode ocorrer através de três mecanismos: (1) um grupo de moléculas de peptídeos em hélice- α anfipática se reorienta formando um poro ou canal transmembrânico, de modo que a superfície hidrofóbica do peptídeo interaja com a região central hidrofóbica da membrana e a superfície hidrofílica forme um poro aquoso. (Yang et al., 2001; Shai, 1999); (2) A agregação dos peptídeos faz com que a membrana sofra uma perturbação ficando mais fina, além disso, os peptídeos formam cavidades chamadas de poros toroidais (Matsuzaki et al., 1995a; Tossi et al., 2000; Matsuzaki et al., 1996a); (3) As moléculas de peptídeo se acumulam paralelamente à superfície e causam desarrumação dentro da membrana, ou seja, agem como um detergente. Neste terceiro modelo, a penetração da membrana ocorre apenas em altas concentrações de peptídeos (Oren and Shai, 1998).

A inserção do peptídeo na membrana pode ser acompanhada por uma série de eventos que contribuem para a desativação celular: despolarização da membrana, vazamento de metabólitos essenciais, perda de composições específicas na membrana devido às perturbações nos fosfolipídios. (Matsuzaki et al., 1996a).

Estão disponíveis na literatura estudos que especificam o tipo de perturbação que determinados peptídeos podem causar em seus alvos, como por exemplo, o trabalho de Lasch e colaboradores (1998) que investigam a interação da polilisina com uma bactéria composta de lipopolissacarídeo (LPS), e mostram o aumento da assimetria dentro ou entre a “folha” fosfolipídica, comprimindo a bicamada na membrana microbiana. Simplificadamente, o buforin II mata a *Escherichia coli* sem permeabilizar a membrana (Park et al., 1998). O peptídeo “tachyplesin”, que tem estrutura secundária em folha- β antiparalela transloca-se através da membrana lipídica PC (fosfatidilcolina) e forma poros transientes (Matsuzaki et al., 1997). Outro exemplo, é a alameticina, peptído helicoidal não catiônico, que forma aglomerados (“clusters”) de hélices que atravessam a bicamada formando poros que transportam íons entre a célula e sua vizinhança aquosa (Sansom, 1993).

1.2 Determinantes Estruturais da Atividade dos Peptídeos

Antimicrobianos

Para o entendimento destes mecanismos muitas estratégias e modelos têm sido sugeridos buscando associar estrutura e atividade. Consideraremos, nesta seção, alguns aspectos estruturais de peptídeos antimicrobianos que são relevantes para sua atividade e seletividade tóxica, tais como, sequência (S) e conformação (χ), carga (Q), hidrofobicidade (H), momento hidrofóbico (μ_H), anfipaticidade (A), ângulo polar (θ_p) e ângulo hidrofóbico (θ_h) e amidação do C-terminal. Estes determinantes moleculares são interdependentes, ou seja, modificações em alguns parâmetros levam à alterações de compensação em outros. A composição fundamental e a sequência de aminoácidos influenciam não somente nas propriedades bioquímicas do peptídeo (como carga, anfipaticidade e hidrofobicidade), mas também comandam sua conformação tridimensional (como conformação, ângulo polar e toda sua geometria). Entretanto, mudanças na composição, sequência e ligações intramolecular podem causar efeitos nas relações estrutura-atividade dos peptídeos em solução, ou ligado na membrana alvo, ou pode promover transições de fase conformacionais para estados ativados. (Yeaman et al., 2003; Zhao, 2003; Argiolas and Pisano, 1983)

Nas subseções seguintes estão relacionados alguns estudos que envolvem estrutura e atividade e mostram que variações nestes parâmetros podem influenciar a potencialidade, seletividade e o espectro de atividade dos peptídeos antimicrobianos.

1.2.1 Sequência (S) e Conformação (χ)

Os peptídeos antimicrobianos se diferenciam enormemente na sequência e origem, mas é possível classificá-los de acordo com sua estrutura secundária (Epand and Vogel, 1999; van't Hof et al., 2001; Yeaman et al., 2003; Zhao, 2003). O princípio estrutural fundamental é a habilidade destes peptídeos adotarem uma conformação anfipática que permita a organização espacial dos resíduos hidrofóbicos e catiônicos em partes distintas da molécula. Veremos com mais detalhes na seção de anfipaticidade que esta característica é

de extrema importância para que os peptídeos sejam absorvidos pela membrana lipídica e para que assumam e mantenham sua estrutura secundária quando em misturas com cosolventes que mimetizam a membrana (hidrofóbicos), como o trifluoretanol (TFE), que é considerado indutor de estrutura secundária. (dos Santos Cabrera et al., 2004; Buck, 1998; Fioroni et al., 2000; Chuang et al., 1996; Higashijima et al., 1983; Ifrah et al., 2005)

Podemos classificá-los em dois grandes grupos, peptídeos em hélice- α e folha- β . Uma das maiores e mais estudada classe de peptídeos antimicrobianos é aquela formada pelas hélices- α catiônicas, por exemplo, magainina (Zasloff et al., 1987; Matsuzaki 1998, 1999), cecropina A (Andreu et al., 1983), temporin (Mangoni et al., 2000), os peptídeos estudados neste trabalho, os mastoparans (Sforça et al., 2004; Park et al., 1995; Kusumoki et al., 1998; Chuang et al., 1996), além de muitos peptídeos antimicrobianos sintéticos e projetados computacionalmente (Boman, 1995; Mangoni et al., 2000). Estes peptídeos são abundantes em fluidos extracelulares de insetos, sapos, e, freqüentemente, apresentam-se estendidos ou desestruturados em solução aquosa e passam a assumir a conformação helicoidal quando interagem com solventes hidrofóbicos ou superfícies lipídicas, como visto na seção 1.1.

A helicidade destes peptídeos é essencial para que haja interação com a membrana zwitteriônica (eucariótica) e menos necessária na interação com membranas aniônica (procarióticas), portanto, trocas de aminoácidos podem quebrar a estrutura helicoidal causando pequena diminuição na atividade antimicrobiana e considerável diminuição da ação hemolítica (Zhao, 2003; Zhang et al., 1999; Dathe et al., 1999). Como exemplo podemos citar um trabalho com o peptídeo pardaxin que é estruturado em hélice- α anfipática e apresenta atividade lítica em células microbianas e de mamíferos. Quando tem alguns de seus resíduos trocados por D-aminoácidos, assume uma conformação em folha- β perdendo a atividade hemolítica, mas mantendo a atividade antimicrobiana (Oren et al., 1999b; Pouny et al., 1992).

Chen e colaboradores (1988) propuseram substituições em dois resíduos consecutivos na magainina, trocando-os por D-aminoácidos. Estas modificações causaram a desestruturação da conformação helicoidal e a perda da atividade hemolítica. Em outro trabalho com a magainina os resíduos de glicina foram substituídos por alanina (Ala), melhorando drasticamente a atividade hemolítica e antimicrobiana (Chen et al., 1990).

Exclusão dos resíduos de glicina (Gly) e substituições com leucina (Leu) no N-terminal da hélice da melitina garantem um aumento na atividade hemolítica e antimicrobiana (Blondelle and Houghten, 1991a; Blondelle et al., 1991b). Entretanto, os trabalhos mais recentes com peptídeos pequenos (de 10 a 20 aminoácidos) afirmam a necessidade de ampliar os estudos com modificações nos resíduos, já que a helicidade condiciona, de modo significativo, a atividade hemolítica destes peptídeos (Oh et al., 1999).

Os peptídeos em folha- β representam um grupo de peptídeos que são altamente diversos na composição primária, e apresentam composição anfipática, com distintas superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas. Ao contrário dos peptídeos helicoidais lineares, os peptídeos em conformação β são cíclicos, como é o caso do Tachyplesin I (Matsuzaki, 1999a), protegrins (Harwig et al., 1995) e β -defensin-2 (Hancock, 2001). A maioria destes peptídeos apresenta conformação em folha- β em solução aquosa que é adicionalmente estabilizada através das interações com a superfície lipídica, e, além disso, pouco se sabe sobre os mecanismos de ação desta classe de peptídeos (Zhao, 2003).

Zhang e colaboradores (2001), realizaram experimentos com peptídeos antimicrobianos catiônicos com diferentes conformações interagindo com modelos de membrana de composições de fosfolipídios distintas. Nestes estudos exploraram várias conformações catiônicas para estes peptídeos, dentre estas, hélices- α , folhas- β , conformações estendidas e modificações cíclicas. Todos os peptídeos, independente da conformação, foram testados interagindo com bicamadas aniônicas e zwitteriônicas. Os peptídeos em hélice- α e cadeias estendidas produzem vazamentos em bicamadas zwitteriônicas e aniônicas, entretanto, por serem catiônicos, interagem mais fortemente com as bicamadas aniônicas. Diferentemente, um peptídeo em folha- β induz uma rápida translocação do fosfolipídio aniônico, ou seja, movimenta o lipídio da face externa para a outra face da membrana (movimento “flip-flop”), sem produzir vazamentos comparáveis aos provocados por peptídeos em hélice- α .

Outras conformações que se aproximam das estruturas em α e β também são encontradas. van't Hof e colaboradores (2001) classificam os peptídeos antimicrobianos em mais duas categorias além de hélice- α e folha- β ; composição não usual e peptídeos em forma de voltas (“loops”) ou aleatórios.

Peptídeos em composição não usual são aqueles que apresentam uma sequência rica em um ou mais aminoácidos específicos. Como o peptídeo histatina, encontrado na saliva humana, que é composto basicamente de histidina (His) (Brewer et al., 1998; Tsai and Bobek, 1998; Helmerhorst et al., 1999). Este peptídeo transloca-se pela membrana de fermento, apresentando um mecanismo antifúngico não usual (Helmerhorst et al., 1999a). Outro exemplo deste grupo de peptídeos é indolicidina (Selsted et al., 1992), rico em triptofano (Trp), adota uma conformação torcida e permeabiliza a membrana exterior da *E. coli* formando canais. (Ladokhin et al., 1999; Subbalakshmi and Sitaram, 1998).

No grupo de peptídeos aleatórios podemos destacar outros peptídeos antimicrobianos rico em prolina (Pro) e arginina (Arg), que não podem formar estrutura anfipática devido à alta concentração de prolina, além disso, tem sido proposto que a poliprolina forme uma estrutura helicoidal do tipo II (Boman et al., 1993; Cabiaux et al., 1994).

1.2.2 Carga (*Q*)

Muitos dos peptídeos antimicrobianos possuem carga líquida positiva, que vai de +2 a +9, e podem conter domínios altamente catiônicos. Esta característica é sem dúvida importante para a atração eletrostática inicial dos peptídeos antimicrobianos com a membrana fosfolipídica das bactérias e dos microorganismos carregada negativamente, e para que haja o processo de seletividade entre os alvos microbianos ou células de mamíferos.

As membranas bacterianas são ricas em ácidos fosfolipídicos (PS (fosfatidilserina), PG e CL (cardiolipina)), por isso são carregadas negativamente. Adicionalmente LPS e ácidos teicoico ou teicuronico de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, adicionam, em parte, carga negativa à superfície destes respectivos organismos. Como o potencial elétrico negativo é 50% maior em procariontes do que em células de mamíferos, é possível concentrar os peptídeos carregados positivamente em superfícies microbianas (Yeaman et al., 2003). Baseado nestas considerações, pode-se concluir que há uma forte correlação entre atividade antimicrobiana e cationicidade do peptídeo (Bessalle et al., 1992; Matsuzaki et al., 1996a; Dathe et al., 1997; Dathe et al., 1999).

Dentro de uma certa taxa, o aumento da cationicidade do peptídeo está geralmente associada com o aumento do potencial antimicrobiano. Estudos com análogos da magainina, peptídeo isolado da pele do sapo africano *Xenopus laevis*, no qual outros parâmetros como hidrofobicidade e heliticidade são mantidos constantes, têm mostrado que o aumento de carga +3 para +5 resulta num aumento da atividade antibacteriana (Dathe et al., 2001). Por outro lado, peptídeos helicoidais não catiônicos, ou seja, hidrofóbicos e/ou suavemente aniônicos como a alameticina, apresentam preferência por células de mamíferos e tem atividade hemolítica considerável e baixa atividade antimicrobiana (Duclohier and Wroblewski, 2001; Kikukawa and Arais, 2002).

1.2.3 Hidrofobicidade (H)

A hidrofobicidade de um peptídeo é definida como a média de valores numéricos da hidrofobicidade por resíduo conforme a tabela 1.1 (Eisenberg et al., 1984b) e é uma medida da habilidade de um peptídeo mover-se de uma fase aquosa para uma fase hidrofóbica (Zhao, 2003). Este parâmetro mede o grau de afinidade do peptídeo com as cadeias lipídicas dos modelos de membranas por isso é um fator essencial para as interações entre os peptídeos e as membranas (Yeaman et al., 2003).

Aminoácidos	Hidrofobicidade (H)
Arg	-2,53
Lys	-1,5
Asp	-0,9
Glu	-0,85
Asn	-0,78
Gln	-0,74
His	-0,40
Ser	-0,18
Thr	-0,05
Pro	0,12
Tyr	0,26
Cys	0,29
Gly	0,48

Ala	0,62
Met	0,64
Trp	0,81
Leu	1,06
Val	1,08
Phe	1,19
Ile	1,38

Tabela 1.1: Hidrofobicidade por resíduos de aminoácidos. Em azul estão os resíduos carregados positivamente, em vermelho os resíduos carregados negativamente, em verde os resíduos polares e em preto os hidrofóbicos (Eisenberg et al., 1984b).

Muitos estudos mostram que o aumento da hidrofobicidade está associado com o aumento da permeabilização de bicamadas zwitteriônicas, ou seja, aumento na atividade hemolítica (Zhao, 2003; Javadpour et al., 1996; Yeaman et al., 2003). Wieprecht e colaboradores (1997c) testaram peptídeos análogos da magainina e confirmaram que a interação com membranas neutras foi favorecida pelo aumento da hidrofobicidade, mas a atividade antimicrobiana foi pouco diminuída. Estudos com a histatina também confirmaram que a atividade hemolítica está fortemente correlacionada com a hidrofobicidade, e que não há uma relação clara de que o aumento da hidrofobicidade exija uma diminuição de carga do peptídeo e vice-versa (Helmerhorst et al., 1999b).

Estes estudos mostraram que como a atividade antimicrobiana foi pouco afetada, a hidrofobicidade seria um parâmetro secundário para avaliar as interações dos peptídeos com a membrana aniônica (Kwon et al., 1998; Kiyota et al., 1996; Wieprecht et al., 1997c).

1.2.4 Momento Hidrofóbico(μ_H):

O momento hidrofóbico pode ser calculado como o vetor soma das hidrofobicidades de cada resíduo de aminoácidos perpendicular ao eixo da hélice, baseando-se em uma hélice- α ideal onde o ângulo entre as cadeias laterais dos resíduos no eixo da hélice é aproximadamente 100° (figura 1.1). A magnitude de μ_H mede a anfipaticidade dos peptídeos. Devido as características das funções propostas (Eisenberg et al., 1984b) para a equação do momento hidrofóbico, o valor de μ_H é maior quando os resíduos com

hidrofobicidade compatível estiverem concentrados em uma mesma região. Em muitos estudos é usado o momento hidrofóbico médio por resíduo (Eisenberg et al., 1984b; Dathe et al., 1999)

Eisenberg e colaboradores (1984b) propuseram uma equação para o momento hidrofóbico (μ_H) dada por:

$$\mu_H = \frac{\left[\left(\sum_{n=1}^N H_n \sin(n\delta) \right)^2 + \left(\sum_{n=1}^N H_n \cos(n\delta) \right)^2 \right]^{1/2}}{N} \quad (1.1)$$

onde H_n é a hidrofobicidade do resíduo n , δ é o ângulo entre as cadeias laterais dos resíduos vizinhos relativo ao eixo da hélice e N é o número de resíduos que compõem o peptídeo (Eisenberg et al., 1984a). A dependência do momento hidrofóbico por resíduo com a hidrofobicidade média por resíduo, pode ser usada na predição da atividade de peptídeos helicoidais em membranas (Dathe et al., 1999).

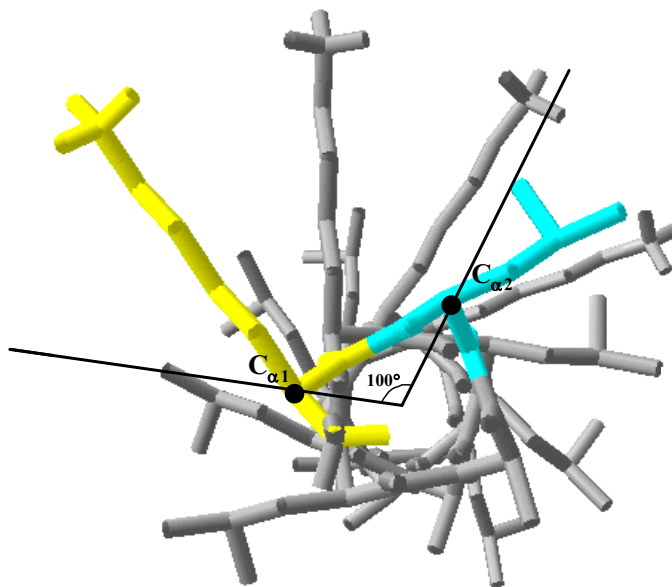


Figura 1.1: Hélice- α ideal do peptídeo KLAL com 16 resíduos de aminoácidos. Observa-se o ângulo $\delta=100^\circ$ entre os resíduos 1 e 2 deste peptídeo com o eixo da hélice.

Wieprecht e colaboradores (1997a) sugerem que o aumento no momento hidrofóbico influencia muito mais na atividade destes peptídeos com modelos de membrana neutra do que com bicamadas carregadas negativamente. Um exemplo disso é observado

com peptídeos análogos da magainina 2 que apresentam o μ_H maior gerando uma eficiência maior na permeabilização das bicamadas de fosfatidilcolina (PC), além de apresentar atividade antimicrobiana pouco afetada (Wieprecht et al., 1997a; Dathe et al., 1997). Por outro lado, a redução gradual do momento hidrofóbico da melitina através da substituição por lisina no N-terminal hidrofóbico da hélice conduz a uma redução considerável na atividade antimicrobiana e hemolítica deste peptídeo (Pérez-Payá et al., 1995). Estudos com um fragmento do C-terminal altamente polar da melitina mostram que pequenas modificações na sequência relacionadas com o aumento de μ_H causam um aumento considerável na atividade antimicrobiana comparado com a variação na atividade hemolítica, isto sugere um direcionamento para a criação (“design”) de peptídeos curtos com atividade antimicrobiana seletiva (Zhao, 2003; Subbalakshmi et al., 1999).

1.2.5 Anfipaticidade (A):

Praticamente todos os peptídeos antimicrobianos quando interagem com a membrana alvo, formam estruturas anfipáticas, ou seja, mantêm os resíduos polares e carregados em regiões separadas dos resíduos hidrofóbicos. Esta estruturação é possível porque a maioria dos peptídeos antimicrobianos tem um total de +4 a +6 cargas, e de 40 a 60% dos resíduos são hidrofóbicos, esta taxa é consistente pra que se encontre estruturas anfipáticas (Tossi et al., 2000). É possível encontrar nas proteínas estruturas anfipáticas, mas sem dúvida uma das mais simples, abundante e também mais elegante é a hélice anfipática (Cornut et al., 1993).

A hélice- α anfipática tem periodicidade de três a quatro resíduos e é ideal para interagir com membranas anfipáticas. A helicidade anfipática contribui com a atividade dos peptídeos ao interagirem com a membrana carregada negativamente, e permite um efeito mais pronunciado em peptídeos hemolíticos, ou seja, interagentes com membrana zwitteriônica ou neutra (Dathe and Wieprecht, 1999). O tamanho relativamente pequeno de uma hélice- α anfipática e a facilidade de reproduzir esses peptídeos sinteticamente, favorecem estes estudos, gerando um aumento considerável nos dados que correlacionam atividade e estrutura. (Yeaman et al., 2003).

Tossi e colaboradores (2000) constataram que a atividade antimicrobiana é pouco afetada pelas variações na anfipatidade, isso pôde ser visto na seção 1.2.4, pois o grau de anfipaticidade é medido pela magnitude do momento hidrofóbico. Estudos com o peptídeo catiônico e anfipático KLAL e análogos, com modificações nos resíduos 9 e 10 por troca de L por D-aminoácidos, confirmaram que a hélice anfipática é essencial para a ação destes peptídeos em membranas zwitteriônicas e menos importante para a permeabilização de membranas aniônicas (Dathe et al., 1996).

Embora estes resultados mostrem a importância da hélice anfipática para o efeito biológico destes peptídeos, uma correlação quantitativa na estrutura helicoidal que relacione efetivamente a atividade destes peptídeos na membrana raramente é demonstrada. A razão disso é que modificações na estrutura helicoidal do peptídeo, através de substituições de resíduos de aminoácidos, envolvem além de mudanças nas características das cadeias laterais (carga, hidrofobicidade, área acessível ao solvente) podem afetar outras propriedades do peptídeo como momento hidrofóbico, conseqüentemente a anfipaticidade, e tamanho do ângulo polar/hidrofóbico. (Dathe and Wieprecht, 1999)

1.2.7 Ângulo Polar (θ_p) e Ângulo Hidrofóbico (θ_h)

Estes ângulos são definidos pelas faces polares e hidrofóbicas das estruturas anfipáticas dos peptídeos, e modulam a maneira na qual estes peptídeos se ligam à membrana (Dathe and Wieprecht, 1999). Este parâmetro é considerado de extrema importância para o entendimento das interações entre peptídeos e membranas, pois enfatizam as diferenças entre ligação e permeabilização. Peptídeos com ângulos hidrofílicos (ou polares) pequenos e altas médias de hidrofobicidade tendem a formar poros transmembranares, portanto permeabilizando a membrana, enquanto que peptídeos que tem as faces hidrofóbicas e hidrofílicas equivalentes orientam-se paralelamente ao ligar-se a membrana (Zhao, 2003).

Foram propostos análogos da magainina com diferentes ângulos polares, mas com alteração estrutural minimizada, e constatou-se que a ligação com membranas aniônicas é favorecida pelo aumento de θ_p , enquanto que a permeabilização é maior quanto menor for θ_p (Wieprecht et al., 1997b). Outros trabalhos confirmam estes dados, como é o caso de

dois peptídeos que diferem apenas nos valores dos ângulos polares, têm $\theta_p = 180^\circ$ e $\theta_p = 100^\circ$, e foram testados para interagirem com a bicamada carregada negativamente. Com relação à ligação inicial com a bicamada aniônica, o peptídeo com θ_p maior é suavemente mais eficiente do que o outro, porém o peptídeo com $\theta_p = 100^\circ$ é mais efetivo na permeabilização da mesma bicamada (Uematsu and Matsuzaki, 2000).

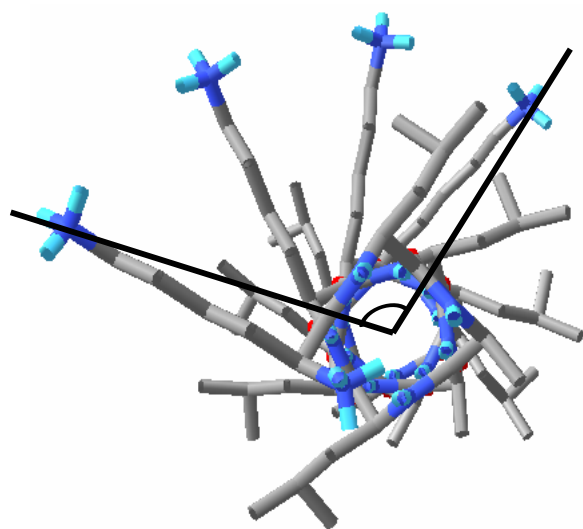


Figura 1.2: Hélice- α anfipática do peptídeo KLAL com 16 resíduos de aminoácidos. Esta estrutura helicoidal está projetada no plano normal ao eixo da hélice. Os 4 resíduos carregados de lisina, por se concentrarem na mesma região do plano, formam o ângulo polar θ_p mostrado na figura. O complementar deste ângulo corresponde ao ângulo hidrofóbico θ_h .

1.2.7 Terminal Amidado

Dentro do vasto grupo de peptídeos antimicrobianos extraídos de invertebrados, peixes, anfíbios e mamíferos, destaca-se a importância da amidação do C-terminal. Isto ocorre através de um processo enzimático que envolve a clivagem (descarboxilação oxidativa) de um resíduo de glicina (Gly) adicional no C-terminal (Bradbury and Smyth, 1991). Em geral os peptídeos amidados apresentam atividade hemolítica muitas vezes maior do que os que apresentam o C-terminal sem o grupo amida. No caso dos invertebrados, o *Ceratitis capitata*, secreta um grupo de peptídeos antimicrobianos para a proteção de seus ovos, estes peptídeos têm de 29-32 resíduos em α -hélice e não são amidados, matam bactérias Gram-positiva e Gram-negativa, e tem moderada ação hemolítica (Ragona et al., 1996). Enquanto a Melitina, tem 26 resíduos estruturados em duas hélices com C-terminal amidado, apresentam ação antimicrobiana e alta atividade hemolítica (Kreil, 1973; Degrado et al., 1982).

Os dos peptídeos extraídos de peixes que, em sua maioria, são estruturados em hélice- α anfipática, não amidados (Cole et al., 1997), são 10 vezes menos hemolíticos se

comparados à melitina, mesmo tendo aspectos estruturais semelhantes, exceto a cationicidade, que é mais baixa para os peptídeos antimicrobianos de peixes. (Tossi et al., 2000). Os peptídeos antimicrobianos extraídos de sapos têm em sua maioria o terminal não amidado e baixa ação hemolítica, como é o caso do Brevenina-2 e o esculetina. Contrapondo-se a este exemplo, têm-se estudado os peptídeos dermasepitinas, que são os únicos extraídos de sapo que apresentam o C-terminal amidado e uma ação notável no vazamento de eritrócitos, ou seja, acentuada atividade hemolítica. (Tossi et al., 2000; Mor et al., 1991; Pouny et al., 1992).

1.3 Peptídeos Antimicrobianos Extraídos do Veneno de Vespas.

Na classe dos insetos uma das maiores e mais perigosa das ordens é a *Hymenoptera*, composta por 200.000 espécies de abelhas, vespas e formigas, que são muitas vezes nocivas à vida humana (Vetter and Wisscher, 1998). Os venenos das ferroadas destes insetos contêm numerosas substâncias biologicamente ativas, que são identificadas como aminas (histamina, serotonina, dopamina, e norepinefrina), enzimas (fosfolipase, hialuromidase, histidina decarboxilase), e polipeptídeos como melitina, apamina além de peptídeos degranuladores de mastócitos (Argiolas and Pisano, 1983).

Os himenópteros usam seu veneno de diferentes maneiras e por isso podem ser classificados como sociais ou solitários. Himenópteros sociais incluem abelhas, vespas e formigas, enquanto que os solitários são as vespas solitárias e vespas parasitas (extremamente benéfica à agricultura como agentes de controle biológico de insetos causadores de pestes agrícolas) (Vetter and Visscher, 1998; Sforça et al., 2004). O veneno de himenópteros sociais é usado para defesa própria e de suas larvas, contra o ataque de predadores e invasores. A ferroada destes insetos produz dores severas, danos locais, podendo levar à morte. As vespas solitárias usam seu veneno para capturar suas presas, injetando-o em aranhas e insetos que, ficando paralisados, servem de alimento para suas larvas. Com esta finalidade, os venenos de vespa solitária contem uma variedade de neurotoxinas (Lorenzi, 2002).

Diversos peptídeos bioativos foram isolados de veneno de vespas. Tais peptídeos são classificados em famílias, segundo suas atividades biológicas e estruturas moleculares,

como por exemplo, a dos mastoparanos e das cininas de vespas (Nakajima et al., 1985; Dohtsu et al., 1993).

Os mastoparanos são peptídeos catiônicos, biologicamente ativos, formados de 10 a 14 resíduos de aminoácidos, ricos em aminoácidos hidrofóbicos e básicos, têm o C-terminal amidado e apresentam conformação anfipática. Alguns deles têm suas seqüências apresentadas nas tabelas 1.2 e 1.3 (páginas 26 e 27). Estes peptídeos possuem uma variedade de atividades biológicas como a ativação da fosfolipase A₂ (Hirai et al., 1980; Argiolas and Pisano, 1983) e fosfolipase C (Cho et al., 1995; Argiolas and Pisano, 1983; Okano et al., 1985); liberam histamina através da degranulação de mastócitos (Konno et al., 2000; Argiolas and Pisano, 1983; Hirai et al., 1979a,b; Hirai et al., 1980; ligam-se na calmodulina (Linse et al., 1986; McDowell et al., 1985; Malencik and Anderson, 1983); apresentam atividades hemolítica e antimicrobiana, através de interações com biomembranas (Katsu et al., 1989; Nakajima, 1984; dos Santos Cabrera et al., 2004; Wakamatsu et al., 1992), e aumentam a atividade da GTP (regulador da proteína G), atuando como um receptor acoplado a essa proteína (Higashijima et al., 1988; Klinker et al., 1994; Sukumar and Higashijima, 1992; Wakamatsu et al., 1992; Weingarten et al., 1990).

Em geral, estas atividades biológicas estão associadas à forma de interação com as biomembranas provocando aumento da permeabilidade das mesmas, através da liberação de fosfolipídios (Katsu et al., 1990; Park et al., 1995; Whiles et al., 2001). Na presença da membrana, estes peptídeos assumem a conformação em hélice- α anfipática (Higashijima et al., 1983; Wakamatsu et al., 1992; Kusunoki et al., 1998; McDowell et al., 1985). Esta conformação é ideal para que ocorra interação entre os grupos catiônicos destes peptídeos e os grupos carregados dos fosfolipídios, e favorecem a inserção dos mesmos na face hidrofóbica da bicamada (ver seção 1.1). Além disso, por serem muito pequenos para atravessar as membranas como hélices anfipáticas, os mastoparanos associam-se podendo formar poros temporários aumentando a permeabilização das bicamadas lipídicas (Arbuzova and Schwarz, 1999; Nakajima et al., 1985).

Katsu e colaboradores (1990) associaram o mecanismo de ação dos mastoparanos (neste caso o MP) com a melitina, devido às semelhanças nas conformações assumidas na presença das bicamadas lipídicas e por ambos estimularem a liberação de fosfolipídios

através da ruptura da estrutura membranar. Esta associação é feita mesmo concluindo que o MP apresenta preferências por alvos aniônicos e a melitina interage com os fosfolipídios sem apresentar seletividade.

Ao ligar-se à membrana o MP-X aumenta a permeabilidade da célula conduzindo a um desequilíbrio dos eletrólitos e à morte da mesma. Isso pode ocorrer através de dois mecanismos: estreitamento da membrana devido seu rearranjo, no qual ocorre o desempacotamento local dos lipídios devido a presença do peptídeo; e formação de poros temporários (Whiles et al., 2001; Matsuzaki et al., 1996b). No trabalho de Whiles e colaboradores (2001), foi usada técnica de RMN para analisar as orientações e estruturas adotadas pelo MP-X nas interações com as bicamadas. Constataram que o MP-X apresenta os mecanismos de ação acima, sendo totalmente dependente do tipo de composição da bicamada, mas em ambos os casos a estrutura helicoidal anfipática é observada. Em bicamadas zwitteriônicas, o eixo da hélice tangencia a superfície da membrana, o que parece consistente com o terceiro mecanismo citado na seção 1.1 para a atividade lítica do peptídeo. Em bicamadas aniônicas, por outro lado, o eixo da hélice é paralelo ao vetor normal ao plano da superfície membranar.

Matsuzaki e colaboradores (1996b), mostraram que a formação do poro pelo MP-X está acoplada a translocação destes peptídeos para a “folha” interna da membrana, além disso, este peptídeo ativa um rápido deslocamento dos lipídios da camada externa para a interna (movimento “flip-flop”) tanto nas bicamadas aniônicas quanto nas zwitteriônicas. Este mecanismo de ação parece ser padrão para alguns peptídeos antimicrobianos, este fenômeno é observado para a magainina 2 (Matsuzaki et al., 1995a,b,c) e melitina (Fattal et al., 1994)

Em trabalhos de análise conformacional com os peptídeos EMP-AF, MP e MP-B, também se verificam que a estrutura helicoidal anfipática é adotada quando estes peptídeos estão em contato com a bicamada lipídica (dos Santos Cabrera et al., 2004; Higashijima et al., 1983; Park et al., 1995). dos Santos Cabrera e colaboradores (2004) sugerem que o mecanismo de ação do peptídeo EMP-AF envolva um limiar na acumulação destes na superfície da membrana, além de constatar que os outros peptídeos análogos ao EMP-AF de *Anterhynchium flavomarginatum micado* (EMP-AF1, 2 e 3) são menos eficientes e apresentam baixo teor de conformação helicoidal.

1.3.1 Características Conformacionais e Seqüenciais.

A necessidade de compreender as atividades biológicas e os mecanismos de ação destes peptídeos, abriu um vasto campo para pesquisas de análise conformacional para as condições de formação e estabilidade de estruturas secundárias em peptídeos.

Os primeiros trabalhos de análise estrutural destes peptídeos já mostravam que os mastoparanos apresentam conformações não conhecidas (ou estrutura aleatória) em solução aquosa e assumem uma configuração ordenada em solução com o metanol e na presença da lisofosfatidil colina (Higashijima et al., 1983). Em 1983, Wakamatsu e colaboradores através de estudos de RMN sugeriram que esta estrutura ordenada tratava-se de uma hélice- α anfipática quando ligada à bicamada fosfolipídica na membrana celular. Vários trabalhos confirmaram a afinidade e conformação helicoidal anfipática dos mastoparanos em ambiente membranar (Higashijima et al., 1983; Wakamatsu et al., 1983, 1992; Katsu et al., 1990; Park et al., 1995; Chuang et al., 1996; Kusunoki et al., 1998; Hellmann and Schwarz, 1998; Whiles et al., 2001; dos Santos Cabrera et al., 2004; Sforça et al., 2004; Ifrah et al., 2005).

Os mastoparanos apresentam este caráter anfipático devido à distribuição dos resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos (ver tabelas 1.2 e 1.3). São compostos em sua maioria por resíduos carregados positivamente, tornando a face hidrofílica da hélice- α totalmente catiônica. Nas figuras 1.3 e 1.4 são exibidos os mastoparanos MP e MP-X em suas estruturas secundárias, resolvidas por RMN, na presença da membrana (MP) e ligado a proteína G (MP-X). As cadeias helicoidais estão projetadas no plano cujo vetor normal é o eixo da hélice.

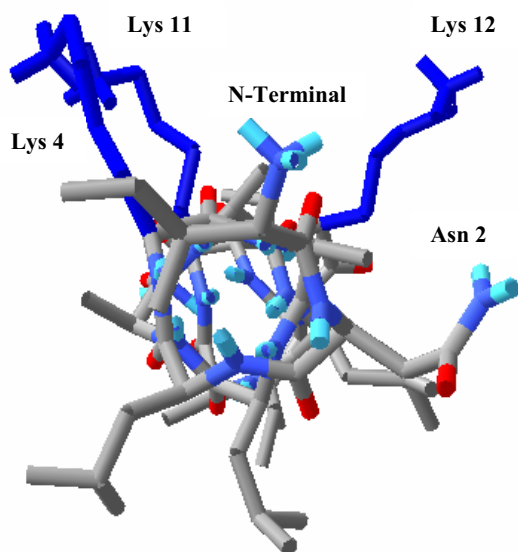


Figura 1.3 – Estrutura secundária do MP (extraído de vespa social) ligada à membrana lipídica (código no PDB: 1d7n). Trata-se da primeira estrutura das 10 depositadas (Hori et al., 2001).

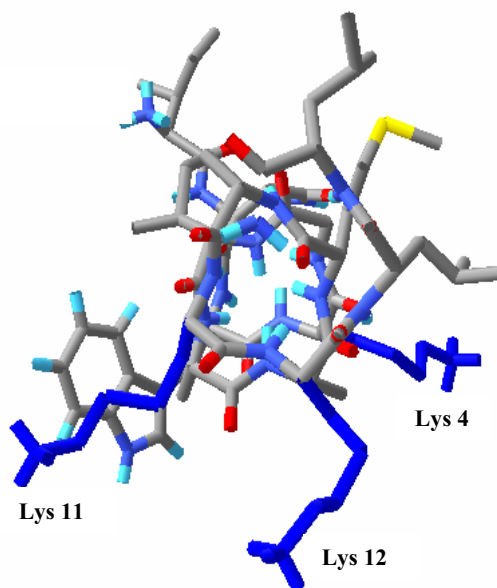


Figura 1.4 – Estrutura secundária do MP-X (extraído de vespa social), ligado a proteína G (código no PDB: 1a13). Trata-se da primeira estrutura das 14 depositadas (Kusunoki et al., 1998).

Outro co-solvente muito usado na predição das estruturas secundárias dos mastoparanos é o trifluoretanol (TFE), que é considerado indutor e estabilizador de destas estruturas devido a dois fatores principais: mimetiza a membrana lipídica devido a capacidade de formar aglomerados (“clusters”) em solução aquosa proporcionando ambientes hidrofóbicos e hidrofílicos; na presença do peptídeo as moléculas de TFE se organizam de modo a proporcionar uma solvatação ideal para os grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, ou seja, os três átomos de flúor estão ligados no mesmo carbono, proporcionando um ambiente hidrofóbico enquanto que o outro átomo de carbono tem ligado a ele um grupo OH (ver figura 1.5), este por sua vez, é responsável pela formação de pontes de hidrogênio com os grupos hidrofílicos de peptídeo ou com as moléculas de água (Buck, 1998).

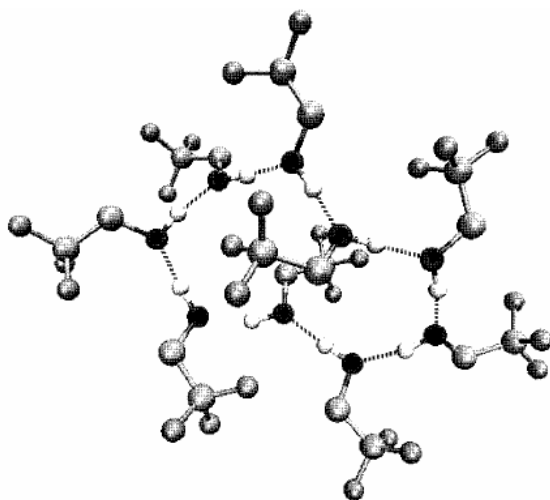


Figura 1.5: Representação das ligações de hidrogênio formadas pelas moléculas de TFE, em agrupamentos “clusters” formados em misturas com água (Fioroni et al., 2000).

McDowell e colaboradores (1985) realizaram estudos de CD e verificaram que os mastoparanos MP, MP-X e MP-Polistes apresentaram percentuais de 55, 56 e 72% respectivamente, de conformações helicoidais em misturas de água com 70% de TFE (v:v). Para o MP-B, Chuang e colaboradores (1996) mostraram, também por dados de CD, que o percentual helicoidal varia de 50 a 60% em solução aquosa com volume de TFE variando 30 a 60% (v:v). Em outro trabalho com este mesmo peptídeo (MP-B), estes percentuais de hélice- α se confirmaram, porém o percentual de TFE usado foi apenas 20% (Ho et al., 1998).

O EMP-AF apresenta de 54 a 62% de conformação helicoidal, enquanto que o EMP-AF1 tem de 22 a 29%, ambos em solução aquosa com 40% de TFE (dos Santos Cabrera et al., 2004; Sforça et al., 2004).

O Anoplin e alguns análogos mais hidrofóbicos foram submetidos a testes de CD, e constatarem que estes peptídeos apresentavam um percentual de 55 a 77% de conformação helicoidal em solução com 50% de TFE (Ifrah et al., 2005).

Nas figuras 1.6 e 1.7 estão mostradas as estruturas dos peptídeos EMP-AF e Anoplin, respectivamente. Estas estruturas foram resolvidas por RMN e concordam com dados de CD em misturas de água e 40% de TFE. É possível observar que estas estruturas helicoidais são anfipáticas e tem os primeiros resíduos em conformação aleatória. Nas figuras as hélices foram projetadas no plano cujo vetor normal é seu próprio eixo (Sforça et al., 2004; Apêndice A).

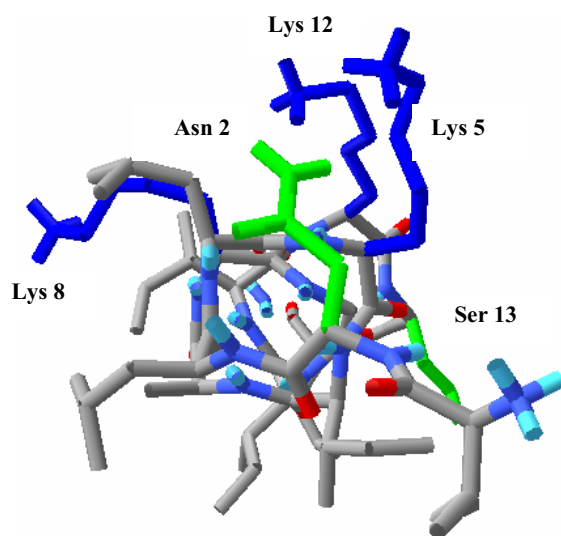


Figura 1.6 – Estrutura secundária do EMP-AF (extraído de vespa solitária) em mistura de TFE e água 30:70 (v:v). Trata-se da primeira estrutura das 27 resolvidas por RMN (Sforça et al., 2004).

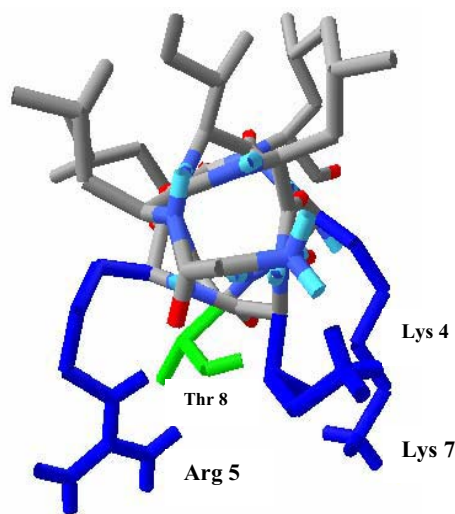


Figura 1.7 – Estrutura secundária do Anoplin (extraído de vespa solitária) em SDS. Trata-se da primeira estrutura das 18 resolvidas por RMN (Apêndice A).

A estrutura do mastoparano-B (MP-B) também foi resolvida por RMN, em misturas de água e TFE (40:60; v:v), e o resultado indica a presença de um hélice- α anfipática entre os resíduos 3 a 14, com os resíduos hidrofílicos Lys 4, Ser 5, Ser 8, Lys 11 e Lys 12 localizados de um lado e os resíduos hidrofóbicos Leu 3, Ile 6, Trp 8, Ala 10, Val 13 e Leu 14 do outro lado da hélice (Chuang et al., 1996).

Os peptídeos EMP-AF1, 2 e 3, são análogos ao EMP-AF, e foram isolados do mesmo veneno de vespa *Anterhynchium flavomarginatum micado*. Eles foram obtidos pela clivagem do N-terminal, ou até mesmo clivando o grupo amida do C-terminal, pela ação de enzimas contidas no veneno em função da elevação da temperatura (Konno et al., 2000). O EMP-AF1 possui 14 resíduos de aminoácidos, porém seu C-terminal não contém o grupo amida. O EMP-AF2 e 3 possuem 11 resíduos de aminoácidos, mas somente o primeiro possui o C-terminal amidado, além disso, possuem baixo teor de estrutura helicoidal, sendo respectivamente 14 e 13% em 40 % de TFE, 28 e 6% em ambiente com vesículas de SDS, 14 e 10% em vesículas aniônicas (PCPG) e de 6 e 4% em membranas zwitteriônicas (PC) (dos Santos Cabrera et al., 2004).

Sforça e colaboradores (2004) resolveram por RMN a estrutura dos peptídeos EMP-AF e EMP-AF1 em solução com 40% de TFE (v:v). Nas figuras 1.8 e 1.9 estão mostradas as estruturas helicoidais obtidas. Pode-se observar que o teor helicoidal encontrado para o EMP-AF1 é menor do que para o EMP-AF, isto ocorre devido a ausência do grupo amida no peptídeo da figura 1.18.

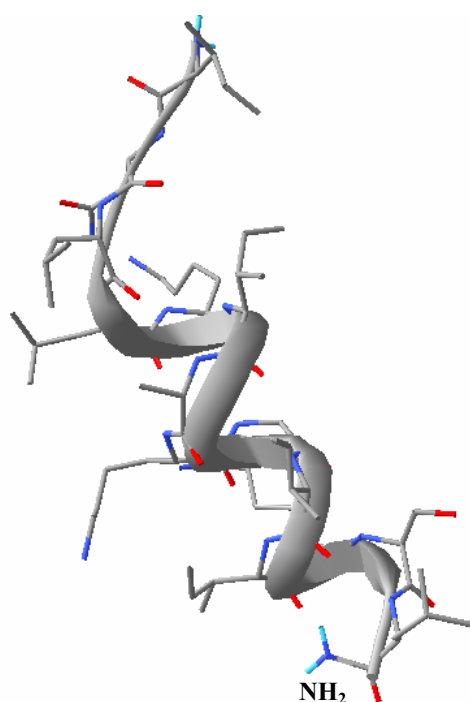


Figura 1.9: Estrutura em hélice- α anfipática resolvida por RMN para o EMP-AF em solução com TFE. A presença do grupo amida (NH_2) estabiliza a conformação helicoidal dos resíduos do C-terminal.

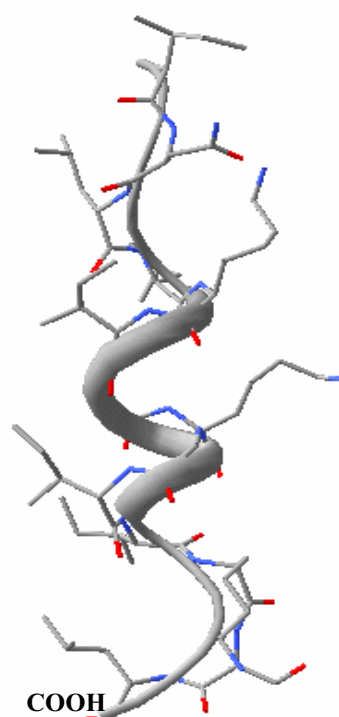


Figura 1.8: Estrutura helicoidal anfipática resolvida por RMN para o EMP-AF1 em solução com TFE. A ausência do grupo amida (NH_2) desestabiliza a conformação helicoidal dos resíduos do C-terminal.

Estes resultados podem ser confrontados com dados de CD, que apresentam 54% de percentual helicoidal para o EMP-AF e 22% para o EMP-AF1 ambos em solução com 40% de TFE (v:v) (dos Santos Cabrera et al., 2004).

Mastoparano-S (MP-S) é um peptídeo análogo sintético que apresenta na posição 10 um aminoisobutirico (Aib), aminoácido sintético, e tem uma estrutura helicoidal quebrada por uma dobra ao redor do resíduo nove. Quando ligado à proteína G, esta dobra cria um contato maior entre o N e C-terminal do peptídeo com a proteína, favorecendo a exposição dos resíduos catiônicos e o empacotamento dos resíduos hidrofóbicos. O MP-S quando

ligado em vesículas de DPPC assume uma hélice- α anfipática, devido a facilidade desta estrutura se acomodar na interface água-lipídio (Sukumar et al., 1997).

Dados preliminares de CD com HR1, Eumenitin e Decoralin, mostraram que estes peptídeos também apresentam caráter helicoidal anfipático em ambiente apropriado, como em solução com TFE ou na presença da membrana (dos Santos Cabrera, 2006).

Vários análogos do mastoparano (MP) têm sido sintetizados, como por exemplo, os peptídeos MP-7 e MP-8, que têm suas lisinas da posição 12 substituída por Ala e Arg, respectivamente e a Ile 13 substituída por uma Leu nos dois casos (ver tabela 1.2). Estes peptídeos apresentam 69 e 79% de conformação helicoidal, respectivamente, em membrana zwitteriônicas (PC), sendo que o MP apresenta 61% nas mesmas condições. Logo, as mudanças nos resíduos foram favoráveis para a formação da hélice anfipática (Higashijima et al., 1990). Outro análogo sintético é o MP-17 que tem a leucina da 6ª posição substituída por uma lisina. Esta modificação provoca uma quebra na seqüência dos resíduos hidrofóbicos concentrados entre os resíduos 4 e 11, provocando uma queda no percentual helicoidal (31%) deste peptídeo em membranas zwitteriônicas.

1.3.2 Atividades Antimicrobiana e Hemolítica X Aspectos Estruturais

A atividade antimicrobiana destes peptídeos não é específica, ou seja, não é mediada por receptores específicos, estando correlacionada às suas características estruturais. Fundamentalmente estas interações ocorrem devido ao arranjo estrutural anfipático assumido por estes peptídeos na presença da membrana aniônica (bacteriana). Os mastoparanos apresentam forte atividade hemolítica. Muitas vezes esta hemólise atua por sinergismo com a proteína do veneno de vespa, garantindo a estes venenos efeito letal (Ho and Hwang, 1991). Nas interações com membranas aniônicas e zwitteriônicas, os fatores estruturais são imprescindíveis, pois devido às variações que os mastoparanos apresentam em sua cationicidade, hidrofobicidade, momento hidrofóbico, variações no ângulo polar da cadeia e até mesmo na amidação do C-terminal, ocorrem mudanças no espectro de atividades.

A atividade hemolítica dos mastoparanos Protopolybia-MP-I, II e III, foram testada e comparadas com o MP. Constataram que a Protopolybia-MP-I apresenta 40% de hemólise

em eritrócitos de ratos, enquanto que o MP apresenta capacidade hemolítica um pouco mais pronunciada. Os Protopolybia-MP-II e III não são hemolíticos, ou seja, não causam nenhuma perturbação em membranas zwitteriônicas (Mendes et al., 2005). É importante enfatizar que os peptídeos Protopolybia-MP-I e III apresentam 64% de similaridade seqüencial, a menos da presença de um resíduo carregado negativamente (Ácido Aspártico –Asp), que torna a Protopolybia-MP-III com carga líquida +2 e não +4 como o Protopolybia-MP-I. O mastoparano Protopolybia-MP-II também apresenta carga líquida de +2, devido a ausência de um resíduo de Lys na posição 8 que é substituído por um resíduo de Glu. Este exemplo comprova a correlação existente entre o número de cargas positivas e atividades destes peptídeos (seção 1.2.2).

Outro fator muito influente no espectro de atividade dos mastoparanos é o momento hidrofóbico e a hidrofobicidade. Por exemplo, Chuang e colaboradores (1996) fizeram uma comparação entre o MP-B e o MP-X. Entre estes dois peptídeos existem 8 aminoácidos diferentes, das quais 6 apresentam diferentes hidrofobicidades. A hidrofobicidade do MP-X é maior do que a do MP-B, devido a presença de resíduos polares (serinas) nas posições 5 e 8 do MP-B, em vez disso o MP-X tem dois resíduos hidrofóbicos (glicina e alanina, respectivamente) nas mesmas posições. Estas diferenças também tornam o MP-B mais anfipático do que o MP-X, aumentando, assim, o momento hidrofóbico de seu segmento helicoidal (Leu 3 a Leu 14). Estes aspectos estruturais contribuem para o que o MP-B seja um dos mais perigosos peptídeos encontrado no veneno de vespas por apresentar potente atividade hemolítica maior, portanto, do que o MP-X (Ho and Hwang, 1991).

O mastoparano MP apresenta forte ação antimicrobiana em células da *S. aureus* e *E. coli*. A liberação dos fosfolípidios destas membranas bacterianas indicam que o MP permeabiliza as mesmas através da ruptura membranar. Por outro lado, o MP não permeabiliza células de eritrócitos e células de mastócitos, ou seja, não tem atividade hemolítica (Katsu et al., 1990).

Park e colaboradores (1995) realizaram um estudo das atividades antimicrobiana e hemolítica do MP-B comparando-as com o MP. O MP-B apresenta forte atividade antimicrobiana tal como o MP, mas a diferença está na especificidade antimicrobiana. De fato, o MP só é ativo em bactérias gram-positivas, enquanto que o MP-B é ativo em ambas: gram-positivas e gram-negativas. Apenas o MP-B interage com membrana celular de

eritrócitos apresentando forte atividade hemolítica. Observaram que a estrutura anfipática do MP-B tem mais resíduos hidrofílicos na face polar da hélice, tornando o ângulo polar deste peptídeo maior quando comparado ao do MP. Este fator estrutural resulta nestas alterações das atividades biológicas que ocorrem devido as mudanças no modo de interações destes peptídeos com membranas.

Dois trabalhos recentes avaliam as atividades antimicrobianas e hemolíticas do EMP-AF e análogos (Sforça et al., 2004 e dos Santos Cabrera et al., 2004). dos Santos Cabrera e colaboradores (2004) constaram que o EMP-AF apresenta forte atividade antimicrobiana enquanto que seus análogos EMP-AF2 e 3 não a tem. O EMP-AF1, apesar ter a mesma composição estrutural do EMP-AF, a menos do C-terminal que não é amidado, é consideravelmente menos antimicrobiano. A importância do C-terminal amidado na atividade antibactericida destes peptídeos já foi observada anteriormente (seção 1.2.7) e é rediscutida do ponto de vista estrutural no trabalho de Sforça e colaboradores (2004) (ver seção 1.3.1).

A reduzida atividade hemolítica destes peptídeos (EMP-AF e análogos) é correlacionada com a baixa interação com vesículas neutras, e também com o baixo teor helicoidal que estes peptídeos apresentam em contato com bicamadas de PC. O EMP-AF e EMPAF1 podem ser considerados pouco hemolíticos, quando comparados com o MP, e os EMP-AF2 e 3 são considerados inativos em eritrócitos humanos (dos Santos Cabrera et al., 2004).

O Anoplin apresenta forte atividade antimicrobiana em células da *E. coli* e *S. aureus*, porém sua atividade hemolítica em eritrócitos humanos é muito baixa. Ifrah e colaboradores (2005) propuseram vários análogos do anoplin que apresentavam, um a um, um resíduo de alanina substituindo os demais resíduos, percorrendo assim, todas as posições deste peptídeo. Os três análogos que apresentavam os resíduos carregados positivamente (Lys 4, Arg 5 e Lys 7) trocados por Ala resultaram em melhor eficiência do peptídeo na atividade antimicrobiana e apresentaram considerável atividade hemolítica. Esta melhora na atividade antimicrobiana e aparecimento de hemólise se deve ao aumento significativo da hidrofobicidade destes peptídeos quando comparados com o anoplin. O mesmo ocorreu com outros 5 análogos que tiveram o resíduo de Arg da posição 5 trocados por diferentes resíduos hidrofóbicos como valina, triptofano, leucina, isoleucina ou

fenilalanina. Concluiu-se que o aumento da hidrofobicidade e a diminuição de uma carga positiva permitem que estes peptídeos, análogos do anoplin, interajam com membranas zwitteriônicas de eritrócitos humanos se tornando hemolíticos (Ifrah et al., 2005).

1.4 Objetivos

Discutiu-se, nesta introdução, a importância das estruturas secundárias para a atividade biológica dos peptídeos antimicrobianos. Nessa perspectiva, sabe-se que os mastoparanos são peptídeos estruturados em hélice- α anfipática tanto na presença da membrana como em co-solventes apropriados. As diferenças tanto estruturais como nas atividades biológicas podem ser atribuídas, principalmente, ao número e distribuição de resíduos carregados (carga), à sequência e número de aminoácidos (estrutura primária), aos ângulos subentendidos pelas regiões polar e apolar (ângulo polar), à hidrofobicidade, relacionada aqui à natureza polar ou apolar da vizinhança do peptídeo e ou de seus grupos e à amidação ou não do C-terminal. A variação destes fatores causa diferenças nos mecanismos de ação e nas atividades biológicas.

A proposta deste trabalho é analisar e correlacionar alguns destes aspectos à atividade biológica, utilizando a simulação por dinâmica molecular. Para isso, selecionamos três peptídeos da família dos mastoparanos em meios que mimetizam a membrana biológica:

(1) **Eumenine mastoparan-AF (EMP-AF-NH₂) e seu análogo sintético sem o C-terminal amidado (EMP-AF-OH)** – com o propósito de entender por que a desamidação do C-terminal deixa o peptídeo sem atividade antimicrobiana e hemolítica, que são, por outro lado, observadas no peptídeo natural, correlacionando esse comportamento à estrutura e as interações que a controlam;

(2) **Paulista-MP-I** – com o duplo objetivo de: (a) propor uma estrutura para o MP-I, a partir da estrutura conhecida do MP-X, com o qual existe uma identidade de 43% dos resíduos, incluindo um triptofano; (b) entender como a carga e sua distribuição podem determinar a ausência de atividade hemolítica do peptídeo em comparação com o MP-X que é hemolítico, enquanto ambos são antimicrobianos;

(3) **Anoplin-NH₂** e seu **análogo sintético Anoplin-OH** - com objetivo de compreender como a desamidação do C-terminal determina a perda da atividade antimicrobiana.

Neste último caso, diferentemente do EMP-AF, mesmo com a desamidação do C-terminal o peptídeo mantém um considerável percentual de resíduos em hélice e tem quatro resíduos a menos na cadeia, portanto os efeitos podem estar relacionados também ao número de resíduos da cadeia.

Vespas Sociais

Peptídeo	Sequência	Vespas
HP	Ile- Asn -Leu-Lys-Ala-Leu-Ala-Ala-Leu-Ala-Lys-Lys-Ile-Leu-NH ₂	<i>Vespa lewisii</i> (Hirai et al., 1979a)
HP-7	Ile- Asn -Leu-Lys-Ala-Leu-Ala-Ala-Leu-Ala-Lys-Ala-Leu-Leu-NH ₂	(Higashijima et al., 1983; Cho et al., 1995; van Himbergen et al., 1999)
HP-8	Ile- Asn -Leu-Lys-Ala-Leu-Ala-Ala-Leu-Ala-Lys-Ala-Leu-Leu-NH ₂	(Higashijima et al., 1990; van Himbergen et al., 1999)
HP-17	Ile- Asn -Leu-Lys-Ala-Leu-Ala-Ala-Leu-Ala-Lys-Lys-Leu-Leu-NH ₂	(Higashijima et al., 1983; Cho et al., 1995; van Himbergen et al., 1999)
HP-A	Ile-Lys-Trip-Lys-Ala-Ile-Leu- Asp -Ala-Ual-Lys-Lys-Ual-Ile-NH ₂	<i>Vespa analis</i> (Nakajima et al., 1986)
HP-B	Leu-Lys-Leu-Lys- Ser -Ile-Ual- Ser -Tyr-Ala-Lys-Lys-Ual-Ile-NH ₂	<i>Vespa basalis</i> (Ho et al., 1991)
HP-C	Ile- Asn -Leu-Lys-Ala-Leu-Leu-Ala-Ual-Ala-Lys-Lys-Ile-Leu-NH ₂	<i>Vespa crabro</i> (Argiolas and Pisano, 1984)
HP-H	Ile- Asn -Leu-Lys-Ala-Ile-Ala-Ala-Leu-Ala-Lys-Lys-Leu-Leu-NH ₂	<i>Vespa mandarina</i> (Hirai et al., 1981)
HP-Polistes	Ual- Asp -Tyr-Lys-Lys-Ile-Gly-Gly- His -Ile-Leu- Ser -Ual-Leu-NH ₂	<i>Polistes jacksoni</i> (Hirai et al., 1980)
HP-T	Ile- Asn -Leu-Lys-Ala-Ile-Ala-Ala-Phe-Ala-Lys-Lys-Leu-Leu-NH ₂	<i>Vespa tropica</i> (Nakajima et al., 1986)
HP-S	Ile- Asn -Tyr-Lys-Gly-Ile-Ala- Ser -Met- Arg -Gln-Ual-Leu-NH ₂	(Análogo sintetizado - Sukumar et al., 1997)
HP-X	Ile- Asn -Tyr-Lys-Gly-Ile-Ala-Ala-Met-Ala-Lys-Lys-Leu-Leu-NH ₂	<i>Vespa xanthoptera</i> (Hirai et al., 1979b)
HR1 = HP-II	Ile- Asn -Leu-Lys-Ala-Ile-Ala-Ala-Leu-Ual-Lys-Lys-Ual-Leu-NH ₂	<i>Vespa orientalis</i> (Miroshnikov et al., 1981; Argiolas and Pisano, 1984)
HR2	Phe-Leu-Pro-Leu-Ile-Leu-Gly-Lys-Leu-Ual-Lys-Lys-Ual-Leu-NH ₂	<i>Vespa orientalis</i> (Miroshnikov et al., 1982)
Cabrolin	Phe-Leu-Pro-Leu-Ile-Leu- Arg -Lys-Ile-Ual- Thr -Ala-Leu-NH ₂	<i>Vespa crabro</i> (Argiolas and Pisano, 1984)
Protopolýbia-HP1	Ile- Asn -Tyr-Lys-Lys-Leu-Gly-Lys-Lys-Ual- Ser -Ala-Ile-Leu-NH ₂	<i>Protopolýbia exigua</i> (Mendes et al., 2005)
Protopolýbia-HP2	Ile- Asn -Tyr-Lys-Ala-Ile-Ile- Glu -Ala-Ala-Lys-Lys-Gln-Ala-Leu-NH ₂	<i>Protopolýbia exigua</i> (Mendes et al., 2005)
Protopolýbia-HP3	Ile- Asn -Tyr-Lys-Lys-Leu-Gly-Lys-Lys-Ala-Ual-Ile- Asp -Ala-Leu-NH ₂	<i>Protopolýbia exigua</i> (Mendes et al., 2005)
PAULISTA-HP1	Ile- Asp -Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu- Asp -Ala-Ala-Lys-Gln-Ile-Leu-NH ₂	<i>Polybia Paulista</i>
PAULISTA-HP2	Ile-Leu-Gly- Thr -Ile-Leu-Gly-Leu-Leu-Lys- Ser -Leu-NH ₂	<i>Polybia Paulista</i>
PAULISTA-HP3	Ile- Lys - Asp -Lys-Ile-Cys-Lys-Ile-Ile-Gln-Ala-Gln-Cys-Gly-Lys-Lys-Leu-Pro-Phe- Thr -NH ₂	<i>Polybia Paulista</i>
Protonectarina-HP	Ile- Asn -Tyr-Lys-Ala-Leu-Leu- Asp -Ala-Ala-Lys-Lys-Ual-Leu-NH ₂	<i>Protonectarina sylvarum</i> (Dortsu et al., 1993)
Parapolybia-HP	Ile- Asn -Tyr-Lys-Lys-Met-Ala-Ala- Thr -Ala-Leu-Lys-Met-Ile-NH ₂	<i>Parapolybia indica</i> (Toki et al., 1988)
Ropalidia-HP	Ile- Asn -Tyr-Ala-Lys-Leu-Gly-Lys-Leu-Ala-Leu-Gln-Ala-Leu-NH ₂	<i>Ropalidia</i> sp. (Dortsu et al., 1993)

Tabela 1.2: Peptídeos extraídos de vespas sociais. Em azul, resíduos de aminoácidos carregados positivamente. Em vermelho, resíduos carregados negativamente. Em verde, resíduos polares e os demais são hidrofóbicos.

Vespas Solitárias

Peptídeo	Sequência	Vespas
ERP-ΔF	Ile- Asn -Leu-Leu-Lys-Ile-Ala-Lys-Gly-Ile-Ile-Lys- Ser -Leu-NH ₂	Anterhynchium flavomarginatum micado (Konno et al., 2000)
ERP-ΔF 1	Ile- Asn -Leu-Leu-Lys-Ile-Ala-Lys-Gly-Ile-Ile-Lys- Ser -Leu-OH	Anterhynchium flavomarginatum micado (Konno et al., 2000)
ERP-ΔF 2	Leu-Lys-Ile-Ala-Lys-Gly-Ile-Ile-Lys- Ser -Leu-NH ₂	Anterhynchium flavomarginatum micado (Konno et al., 2000)
ERP-ΔF 3	Leu-Lys-Ile-Ala-Lys-Gly-Ile-Ile-Lys- Ser -Leu-OH	Anterhynchium flavomarginatum micado (Konno et al., 2000)
ANOPLIN	Gly-Leu-Leu-Lys-Arg-Ile-Lys-Thr-Leu-Leu-NH ₂	Anoplius samariensis (Konno et al., 2001)
ANOPLIN-OH	Gly-Leu-Leu-Lys-Arg-Ile-Lys-Thr-Leu-Leu-OH	Sintetizado
DEGORALIN	Ser -Leu-Leu- Ser -Leu-Ile-Arg-Lys-Leu-Ile-Thr-OH	Oreumenes decoratus (dos Santos Cabrera, 2006)
DEGORALIN-NH ₂	Ser -Leu-Leu- Ser -Leu-Ile-Arg-Lys-Leu-Ile-Thr-NH ₂	Análogo sintetizado (dos Santos Cabrera, 2006)
EUMENITIN	Leu- Asn -Leu-Lys-Gly-Ile-Phe-Lys-Lys-Ual-Ala- Ser -Leu-Leu-Thr-OH	Eumenes rubronotatus (dos Santos Cabrera, 2006)
ERP-EH1	Leu-Lys-Leu-Met-Gly-Ile-Ual-Lys-Lys-Ual-Leu-Gly-Ala-Leu-NH ₂	Eumenes micado
ERP-EH2	Leu-Lys-Leu-Leu-Gly-Ile-Ual-Lys-Lys-Ual-Leu-Gly-Ala-Ile-NH ₂	Eumenes micado
ERP-EH3	Phe- Asp -Ile-Gly-Ile-Ile-Ile-Lys-Lys-Ual- Ser -Gly-Leu-NH ₂	Eumenes micado
ERP-EH4	Phe- Asp -Leu-Lys-Ile-Ile-Ile-Lys-Lys-Ual- Ser -Gly-Leu-NH ₂	Eumenes micado
Bu-5	Leu- Asn -Leu-Lys-Gly-Leu-Ile-Lys-Lys-Ual-Ala- Ser -Leu-Leu-NH ₂	Eumenes rubrofemoratus
Bu-6	Phe- Asp -Ile-Met-Gly-Leu-Ile-Lys-Lys-Ual-Ala-Gly-Ala-Leu-NH ₂	Eumenes rubrofemoratus

Tabela 1.3: Peptídeos extraídos de vespas solitárias. Em azul, resíduos de aminoácidos carregados positivamente. Em vermelho, resíduos carregados negativamente. Em verde, resíduos polares e os demais são hidrofóbicos.

Capítulo 2 – Métodos Teóricos

Neste capítulo serão abordados aspectos gerais das técnicas aplicadas nas simulações por Dinâmica Molecular. Os átomos, constituintes das moléculas, são considerados como partículas pontuais com uma certa massa e carga elétrica. As interações entre estas partículas são representadas através de uma função de energia potencial empírica, como descrito na seção 2.1. Na seção 2.2 foi brevemente discutida a importância da utilização prévia de algoritmos de otimização nas simulações computacionais por DM. As trajetórias de dinâmicas envolvem a solução das equações de Newton que relacionam as forças sobre cada partícula com a segunda derivada da posição das mesmas. Os algoritmos para a integração destas equações de movimento e algumas técnicas de simulações por DM foram expostas na seção 2.3. Na seção 2.4 expomos as condições e os parâmetros usados nas dinâmicas contidas nesta tese. As trajetórias de DM são submetidas a análises que fornecem informações a respeito de propriedades mecânicas, interações e comportamento dos átomos em determinados ambientes e, algumas destas análises foram detalhadas na seção 2.5.

2.1 Abordagem Clássica e Campo de Forças

Para o desenvolvimento de estudos em modelagem molecular, dependendo da escolha do sistema, torna-se inviável computacionalmente o tratamento das interações através da Mecânica Quântica, por considerar todas as interações entre as partículas subatômicas (elétrons e prótons). Como alternativa, a representação das interações moleculares, para sistemas de muitas partículas, é feita utilizando funções potenciais clássicas, que permitem que o cálculo da energia do sistema seja dependente apenas das posições dos núcleos atômicos.

Esta abordagem é denominada por alguns autores como Mecânica Molecular (Burkert and Allinger, 1982; Rappé e Casewit, 1997), por assumir que os movimentos das partículas que compõem o sistema podem ser tratados segundo as leis que regem a Mecânica Clássica (leis de Newton, potencial de Hooke e eletromagnetismo clássico). Os átomos e moléculas são tratados como esferas de Van der Waals com carga e massa

interagindo através de forças que dependem da separação entre as partículas; e a energia potencial é representada como a soma de um certo número de funções relacionadas com as interações entre os átomos quimicamente (covalentemente) ligados e não ligados.

A função energia potencial e sua respectiva parametrização são chamadas, genericamente, de Campo de Forças. Os Campos de Forças podem diferir nas funções potenciais escolhidas, na parametrização dessas funções e, mesmo no tratamento dado a várias partes do sistema. Os campos de forças mais usuais são: CHARMM (Brooks et al., 1983), AMBER (Weiner et al., 1986), GROMOS (van Gunsteren and Berendsen, 1987), e outros. A construção de um campo de forças é feita a partir de resultados de cálculos quânticos *ab-initio* de pequenas moléculas, por dados semiempíricos com ajustes de dados experimentais (Difração de raio-X, espectroscopia de infravermelho, ressonância magnética nuclear, e outros.) (Israelachvili, 1991; Brooks III et al., 1988; de Vlieg and van Gunsteren, 1991; Voet and Voet, 1995).

Os sistemas estudados nesta tese foram submetidos a simulações computacionais através do campo de forças GROMOS/96 (van Gunsteren et al., 1996), e a função energia potencial, neste campo de forças, é constituída por: 3 termos harmônicos que descrevem as interações entre os pares de átomos ligados covalentemente e ângulos entre as ligações químicas vizinhas; um termo que descreve a torção em torno da ligações químicas e dois termos para átomos não ligados (a partir do terceiro vizinho).

2.1.1 Potenciais Harmônicos

Estes termos clássicos para a Energia Potencial representam as vibrações características das moléculas que são determinadas pela natureza das ligações e pelas massas atômicas. Uma função aproximada ao potencial de Hooke é usada, de forma a manter o caráter oscilatório tanto dos comprimentos de ligação como dos ângulos formados pelas ligações vizinhas.

O termo potencial de ligação (ou linear) para dois átomos i e j ligados covalentemente é representado por:

$$V_b = \frac{1}{2} K_b (b - b_0)^2 \quad (2.1)$$

onde b é a distância entre o par (i,j) em um instante qualquer, b_0 é o comprimento de equilíbrio da ligação específica e K_b é a constante elástica da força. O valor de K_b pode ser estimado de dados de absorção de radiação, por estudos de espectroscopia, onde uma molécula diatômica passa do estado fundamental para o primeiro estado excitado. Comparando a energia do fóton absorvido com a diferença de energia (ΔE) entre esses estados vibracionais, estima-se o valor de K_b .

O termo potencial angular que mantém o ângulo de ligação entre três átomos $i-j-k$, covalentes e consecutivamente ligados, próximos a uma configuração de equilíbrio é dado por:

$$V_\theta = \frac{1}{2} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (2.2)$$

e θ é a variação angular ao longo do tempo, θ_0 é o ângulo de equilíbrio e K_θ é a constante elástica da força para a restituição ao ângulo de equilíbrio (θ_0).

No Campo de Forças GROMOS um terceiro potencial harmônico, chamado de torcional impróprio, é definido porque somente os hidrogênios ligados a átomos eletronegativos (N e O nas proteínas) são considerados explicitamente. No entanto, este termo é necessário para manter a estrutura tridimensional do conjunto de quatro átomos centrado no átomo de C , garantindo, com isso, a estrutura tetraédrica média dos átomos de C com hibridização sp^3 . Os hidrogênios ligados a estes átomos carbono são unidos a ele, em um “átomo unido” ($CH1$, $CH2$ e $CH3$). O potencial torcional impróprio é dado por:

$$V_\xi = \frac{1}{2} K_\xi (\xi - \xi_0)^2 \quad (2.3)$$

sendo ξ é o ângulo formado entre os planos definidos por $i-j-k$ e por $j-k-l$ (figura 2.1), K_ξ a constante de força para a restituição ao ângulo de equilíbrio ξ_0 . Nas proteínas o ângulo ξ é formado pela átomos $C_\alpha-N-C$ e $N-C-C_\beta$ mantendo, entretanto, a sequência dos átomos ($N-C_\alpha-C-C_\beta$), mostrados na figura 2.1, garantindo que o resíduo de aminoácido fique na posição levógira do C_α . Para reforçar a coplanaridade dos átomos $C_\alpha-C-O-N-H-C_\alpha$ das ligações peptídicas, ξ_0 assume o valor de 0 (figura 2.2).

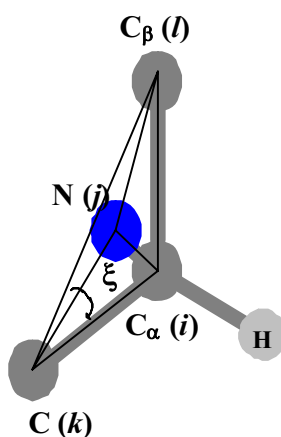


Figura 2.1: Estrutura tetraédrica do carbono- α . ξ é o ângulo entre os planos $i-j-k$ e $j-k-l$.

2.1.2 Potencial Torcional

Para representar explicitamente a torção (rotações) própria das ligações covalentes entre dois átomos é normalmente adicionado à função energia potencial um termo conhecido com Potencial Torcional Próprio. Estes ângulos diedrais, que apresentam liberdade periódica de torção, são formados por quatros átomos em seqüência onde os três primeiros formam um plano que faz um ângulo (φ) com o plano formado pelos três últimos.

$$V_{\varphi} = K_{\varphi} [1 + \cos(n\varphi - \delta)] \quad (2.4)$$

A periodicidade deste potencial é dada por uma função co-seno, sendo n o número de mínimos para a torção de uma ligação química determinada, δ a diferença de fase do ângulo diedral φ , que pode ser 0° ou 180° , de forma que o ponto de máximo ou mínimo é deslocado e K_{φ} é a constante que define a barreira de torção (van Gunsteren and Berendsen, 1987).

Nas proteínas, as mudanças conformacionais sofridas pela cadeia principal (“backbone”) são principalmente devido às rotações dos ângulos diedrais (definidos como φ e ψ) em torno das ligações $N-C_{\alpha}$ e $C_{\alpha}-C$. Os valores de φ ($C-N-C_{\alpha}-C$) e ψ ($N-C_{\alpha}-C-N$) definem as estruturas secundárias de uma proteína, formando padrões regulares de dobramento que são definidos como hélices- α ou folhas- β (Voet and Voet, 1995).

2.1.3 Potencial de Lennard-Jones

Para descrever as interações entre os átomos não ligados quimicamente (separados por três ou mais ligações), são inseridos à função potencial termos de curto e longo alcance. O potencial de Lennard-Jones é usado para representar as interações de van der Waals, ou seja, de curto alcance. Este potencial é descrito por um termo atrativo e um repulsivo. O termo atrativo é derivado das forças de London, que surgem devido à interação de pequenos dipolos formados pelos deslocamentos oscilantes das nuvens eletrônicas. O repulsivo, de curtíssimo alcance, impede a interpenetração das nuvens eletrônicas dos átomos não ligados, respeitando o princípio de exclusão de Pauli.

Estes termos são associados e expressos na função:

$$V_{LJ} = 4\varepsilon \left[\frac{\sigma^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{\sigma^6}{r_{ij}^6} \right] \quad (2.5)$$

sendo que o primeiro termo, que varia com o inverso da décima segunda potência da distância (r) que separa dois núcleos atômicos, descreve a parte repulsiva e a parte atrativa é descrita pelo segundo termo. Na equação 2.5, ε é a profundidade do poço e os parâmetros σ é o diâmetro de Lennard-Jones e dependem dos tipos de pares de átomos. Estes parâmetros são ajustados empiricamente.

2.1.4 Potencial de Coulomb

As interações consideradas de longo alcance são descritas pelo potencial eletrostático, que surgem devido à distribuição dos elétrons em uma ligação química. Os elétrons em dois átomos ligados quimicamente deslocam-se preferencialmente sobre um dos átomos, de acordo com sua eletronegatividade. Na tentativa de reproduzir as diferentes eletronegatividade dos átomos, num campo de forças, os parâmetros de carga são definidos pela atribuição de cargas parciais. As pontes salinas e de hidrogênio são decorrentes das interações eletrostáticas e são de grande importância na estabilização de estruturas secundárias em peptídeos ou proteínas. Além disso, as interações entre as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos carregados (Lys, Arg, Glu, Asp, His, N- e C-terminal e íons),

polares ou formadores de dipolos (Ser, Asn, Gln, Thr, NH, NH₂, C=O, OH e água) e quadrupolos (Tyr, Phe, Trp) são responsáveis, em muitos casos, pela atividade biológica de determinados sistemas.

A interação eletrostática entre dois átomos i e j é descrito pela lei de Coulomb, e é dado por:

$$V_{col} = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon r_{ij}} \quad (2.6)$$

sendo q_i e q_j as cargas residuais sobre os átomos i e j , separados pela distância r_{ij} , ϵ_0 é permissividade do espaço livre, igual a $8,854 \times 10^{-12}$ (unidade do S.I.) e ϵ a constante dielétrica do meio.

Em simulações em que o solvente não é considerado explicitamente, o valor de ϵ é fixo ou, em alguns casos, uma função linear dependente da distância (r) de separação entre os átomos (van Gunsteren and Berendsen, 1990; Higerty et al., 1985). Esta função é crescente a medida em que r aumenta, mas mantém-se constante quando atinge o valor limiar (ϵ) para o meio em que se pretende simular.

2.1.5 Função Clássica para a Energia Potencial

A função clássica para a energia Potencial Total do sistema molecular de análise, é escrita através da soma de todos os termos de potencial apresentados nas seções antecedentes. Esta função descreve a interação entre todos os átomos do sistema, os ligados e os não ligados. Os quatro primeiros termos tratam das interações entre átomos ligados e modelam as interações que deveriam ser tratadas a nível quântico. Os termos de Lennard-Jones e Coulomb tratam das interações entre os átomos não ligados, ou seja, átomos distantes quatro vizinhos ou mais.

$$V(\vec{x}_i) = V(\vec{x}_1, \vec{x}_2, \dots, \vec{x}_N) = \sum_{n=1}^{N_b} \frac{K_{b_n} (b_n - b_0)^2}{2} + \sum_{n=1}^{N_\theta} \frac{K_{\theta_n} (\theta_n - \theta_0)^2}{2} + \sum_{n=1}^{N_\xi} \frac{K_{\xi_n} (\xi_n - \xi_0)^2}{2} \\ + \sum_{n=1}^{N_\phi} K_{\phi_n} [1 + \cos(n_n \phi_n - \delta_n)] + \sum_{i < j}^N \left[\frac{C_{12}(i, j)}{r_{ij}^{12}} + \frac{C_6(i, j)}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon r_{ij}} \right] \quad (2.7)$$

Sendo N o número de átomos, $\vec{x}_i (i = 1, 2, \dots, N)$ os vetores posição, N_b número de ligações químicas, N_θ número de átomos entre pares de ligações consecutivas, N_ξ número de ângulos diedrais impróprios, N_ϕ número de ângulos diedrais próprios. $C_{12}(i,j)$ e $C_6(i,j)$ são constante que substituem os parâmetros ε e σ na equação (2.5).

Nas simulações por DM realizadas neste trabalho, foi usado o grupo de parâmetros nomeado como 43a1, do campo de forças GROMOS/96 (van Gunsteren, et al. 1996), com algumas modificações para os átomos que compõem a molécula de 2,2,2-Trifluoretanol (TFE). Estas modificações foram propostas por Fioroni e colaboradores (2000) e são mostradas na tabela 2.1.

a)

Átomos	$(C_6(i,j))^{1/2}$ (kJmol ⁻¹ nm ⁶)x10 ³	$(C_{12}(i,j))^{1/2}$ (kJmol ⁻¹ nm ²²)x10 ⁶	q/e
F	1,177862	1,000000	-0,17
OA	2,261954	1,505529	-0,625

b)

Ligação química	Distância-b ₀ (Å)
F-C	1,36
CH2-OA	1,43
CH2-C	1,53
OA-H	1,00

c)

Ângulo da Ligação	θ_0 (deg)	K _θ (kJmol ⁻¹ rad ⁻²)
H-OA-CH2	109,5	397,5
O-CH2-C	110,3	460,2
CH2-C-F	111,4	460,2
F-C-F	107,6	460,2

d)

Ângulo Diedral	δ (degrees)	K _φ (kJmol ⁻¹ rad ⁻²)
H-O-C-C	3	1,300

Tabelas 2.1: Parâmetros propostos por Fioroni et al. (2000), para simulação por DM com a molécula de TFE. Em a), são mostrados os valores das constantes de van der Walls e as cargas parciais para os átomos F e O do TFE. OA é o nome usado para o átomo de oxigênio da molécula de TFE para diferenciá-lo dos demais do sistema. Em b), valores para o comprimento das ligações químicas (b₀). Em c), valores de equilíbrio para os

ângulos formados pelas ligações químicas (θ_0) e para K_θ . Em d), valor para o ângulo diedral formado pelos átomos ligados H-O-C-C e para K_ϕ .

Aproximações através da mecânica clássica permitem o cálculo de propriedades mecânicas. Para a obtenção de propriedades termodinâmicas devemos recorrer ao formalismo da Mecânica Estatística, que assume que o valor de uma propriedade termodinâmica macroscópica é uma média dos seus valores nos estados quânticos correspondentes (Hill, 1960). Os sistemas envolvidos nesta tese, submetidos a DM, são considerados pertencentes ao ensemble canônico (N, P, T), pois apresentam número fixo de moléculas e, a temperatura e a pressão são controladas usando técnicas de acoplamento (Berendsen et al., 1984) com constantes de acoplamento e compressibilidade isotérmica.

2.2 Algoritmos de Otimização

Os problemas de otimização, em geral, apresentam uma infinidade de soluções possíveis, sendo que o número dessas soluções cresce à medida que o número de graus de liberdade do sistema aumenta. Os sistemas a serem otimizados são descritos por uma função custo apropriada $f(\vec{x})$ com $\vec{x} \in R^D$, onde D representa o espaço contínuo em que esta função está definida (Moret *et al.*, 1997). Para os casos em que a função custo é convexa (apresenta um único ponto de mínimo) qualquer um dos métodos considerados “clássicos” (“Downhill-Simplex”, métodos gradientes, “steepest descent” e outros) soluciona facilmente o problema. Estes métodos são considerados de otimização local, ou seja, aceitam somente situações em que o valor da função custo é menor do que o encontrado no passo anterior. Desta maneira, os métodos “clássicos” não permitem passos em busca de outros mínimos, fazem com que o sistema limite-se a encontrar o mínimo mais próximo.

Em sistemas moleculares a função custo é dada por uma superfície de energia potencial de muitas variáveis (equação 2.7). Neste caso, nos pontos de mínimo de energia a combinação dos átomos correspondem aos estados estáveis do sistema (Leach *et al.*, 1996). Devido ao elevado número de graus de liberdade das macromoléculas biológicas, é praticamente impossível uma exploração por completo da superfície de

energia, através da minimização da energia potencial. Porém, o procedimento de busca local a partir de uma determinada configuração é um passo de extrema importância no processo de simulações por Dinâmica Molecular. Varrendo uma pequena parte da superfície de energia potencial, a minimização de energia pode ajustar as posições atômicas e com isso relaxar as distorções nas ligações químicas, nos ângulos entre as ligações e nos contatos de van der Waals.

O procedimento de otimização da geometria através dos algoritmos de otimização clássicos, consiste em comparar o valor da função energia potencial em dois vetores posição aleatórios consecutivos, $\vec{x}_{t+1}$ e $\vec{x}_t$, sendo que $\vec{x}_t \in R^D$ contém todas as coordenadas a serem otimizadas. O vetor posição para dois passos consecutivos é dado por:

$$\vec{x}_{t+1} = \vec{x}_t + \Delta\vec{x}_t \quad (2.8)$$

sendo t o passo em análise e $\Delta\vec{x}_t$ uma perturbação aleatória na coordenadas que estão sendo otimizadas. Os valores de $\Delta\vec{x}_t$ são gerados, nos métodos mais comuns, a partir do cálculo da primeira derivada da função custo e, em métodos mais sofisticados, também a segunda derivada para melhorar a taxa de convergência é calculada.

Neste trabalho, os sistemas moleculares submetidos a simulações por DM, têm suas energias potenciais previamente minimizadas por dois algoritmos de otimização. O “Steepest Descent” (descida rápida) é um método de primeira derivada e converge vagarosamente nas proximidades do mínimo, mas é poderoso na convergência de situações em que o vetor posição encontra-se longe de um mínimo de energia.

Outro método de otimização usado neste trabalho é o Gradiente Conjugado, método considerado de segunda ordem, apresenta convergência mais rápida e pode ser aplicado em sistemas que tenham restrições de posição e ângulo para seus átomos. Este método precisa de dois passos anteriores para dar início a minimização. O que se costuma fazer é executar uma otimização curta por “steepest descent” e aproveitar suas duas últimas configuração para iniciar o método de gradiente conjugado. Ou ainda, usá-los simultaneamente estipulando previamente o intervalo para intercalá-los. Mais detalhes sobre estes métodos podem ser encontrados em referencias (Brooks III et al., 1988; Press et al., 1992; Leach *et al.*, 1996).

2.3 Dinâmica Molecular

Dinâmica Molécula (DM) é uma técnica usada para simulação de sistemas de partículas que permite o acompanhamento temporal de todos os átomos através da integração das equações clássicas de movimento. Cada átomo pode ser especificado em termos de suas posições e momentos, assim pode-se escrever a hamiltoniana H para um sistema molecular como a soma das energias cinética C e potencial V .

$$H(\{\vec{x}_i, \vec{p}_i\}) = C(\{\vec{p}_i\}) + V(\{\vec{x}_i\}) \quad (2.9)$$

Sendo o sistema molecular constituído por N átomos com posições $\vec{x}_1, \vec{x}_2, \dots, \vec{x}_N$ e momentos $\vec{p}_1, \vec{p}_2, \dots, \vec{p}_N$, a energia cinética é dada por: $C(\{\vec{p}_i\}) = \sum_{i=1}^N \frac{\vec{p}_i^2}{2m_i}$; e $V(\{\vec{x}_i\})$ é a energia potencial total de interação dada pela equação 2.7. Neste caso é possível, a partir da equação 2.9, construir as equações de movimento que, resolvidas, fornecem a evolução temporal e propriedades dinâmicas de cada partícula do sistema. Na formulação hamiltoniana, as equações de movimento são dadas por:

$$\frac{\partial H}{\partial \vec{p}_i} = \frac{\vec{p}_i}{m} \Rightarrow \vec{v}_i = \frac{d\vec{x}_i}{dt} \quad (2.10)$$

$$-\frac{\partial H}{\partial \vec{x}_i} = \frac{d\vec{p}_i}{dt} \Rightarrow \frac{\vec{F}_i}{m_i} = \frac{d\vec{v}_i}{dt} \quad (2.11)$$

sendo t o tempo, $\vec{F}_i$ a força sobre o átomo i e m_i sua massa. Estas equações tem que ser resolvidas numericamente e o tamanho do passo de integração depende do detalhamento dos movimentos que se deseja estudar. O movimento molecular mais rápido é a vibração do átomo de hidrogênio, cerca de meio fentosegundo. Isso significa que se quisermos acompanhar este movimento o passo de integração deve ser significativamente menor do que ele. Ao menos uma ordem de grandeza menor. Nos estudos por dinâmica molecular de proteínas ou outras macromoléculas, o interesse está em movimento de grupos funcionais, ou de partes da molécula e não nas vibrações dos átomos. Dessa forma, passo de integração maiores podem ser usados, desde que acoplados a sub-rotinas que controlem as distorções que podem aparecer. Por exemplo, as sub-rotinas SHAKE (Ryckaert et al., 1977) e LINCS

(Hess et al., 1997) são usadas para restringir as distorções nos comprimentos e ângulos das ligações químicas e a SETTLE (Miyamoto et al., 1992) o faz para água. Mais detalhes sobre o método de simulação por dinâmica molecular podem ser encontrados em Berendsen and van Gunsteren (1986), Allen and Tildesley (1987), Leach (1996) e van Gunsteren (1994).

2.3.1 Método de Integração

Um método simples para a integração numérica das equações de movimento, baseado no algoritmo de Verlet (Verlet, 1967), é o “summed Verlet” ou “leapfrog” (Allen and Tildesley, 1987; van Gunsteren and Berendsen, 1990). Este algoritmo calcula as velocidades na metade do passo de integração e usa estas velocidades para calcular as novas posições. As velocidades são obtidas por meio de uma expansão em série de Taylor em torno de $\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right)$ e $\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right)$, truncada nos termos de terceira ordem.

$$\vec{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \vec{v}_i(t) + \frac{d\vec{v}_i(t)}{dt}\left(\frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{d^2\vec{v}_i(t)}{dt^2}\left(\frac{\Delta t}{2}\right)^2 \frac{1}{2!} \quad (2.12a)$$

$$\vec{v}_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) = \vec{v}_i(t) - \frac{d\vec{v}_i(t)}{dt}\left(\frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{d^2\vec{v}_i(t)}{dt^2}\left(\frac{\Delta t}{2}\right)^2 \frac{1}{2!} \quad (2.12b)$$

subtraindo 2.12a e 2.12b temos,

$$\vec{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \vec{v}_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{\vec{F}_i(\vec{x}_i)}{m_i}\Delta t \quad (2.13)$$

Expandindo a função posição $\vec{x}_i(t)$ em torno do ponto $(t + \Delta t)$, até segunda ordem, temos:

$$\vec{x}_i(t + \Delta t) = \vec{x}_i(t) + \frac{d\vec{x}_i(t)}{dt}\Delta t + \frac{d^2\vec{x}_i(t)}{dt^2}\frac{(\Delta t)^2}{2!} \quad (2.14)$$

Se substituirmos as equações 2.12a na equação 2.14 e desprezarmos os termos de ordem superior,

$$\vec{x}_i(t + \Delta t) = \vec{x}_i(t) + \vec{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right)\Delta t \quad (2.15)$$

As equações 2.13 e 2.15 são resolvidas de forma iterativa, formando o esquema “leap-frog”. Pela equação 2.13, para que a velocidade do instante $t + \frac{\Delta t}{2}$ seja determinada, a velocidade no instante $t - \frac{\Delta t}{2}$ precisa ser conhecida e, para isso, nas dinâmicas realizadas nesta tese, o método de Verlet é usado como método de partida.

O algoritmo “leap-frog” permite que o sistema seja acoplado a um banho térmico, através de correções nas velocidades, uma vez que estas são usadas no cálculo das novas posições. Como a energia potencial é uma função das posições e a variação desta depende das velocidades (equação 2.15), controlar as velocidades significa controlar a energia cinética e também a energia potencial.

Entretanto, as velocidades e as posições não são calculadas ao mesmo tempo. Em consequência disto, as energias cinéticas e potencial também não podem ser calculadas no mesmo instante. A velocidade no instante t é calculada pela média das velocidades nos instantes $t + \frac{\Delta t}{2}$ e $t - \frac{\Delta t}{2}$, não podendo ser obtida diretamente utilizando-se o algoritmo “leap-frog”.

2.3.2 Modelagem do Solvente

Nos sistemas moleculares, submetidos a simulações por DM contidos neste trabalho, o solvente é representado explicitamente. Para que o sistema seja bem modelado computacionalmente, é preciso técnicas que torne as simulações as mais próximas possíveis do real. Algumas destas técnicas foram detalhadas nas subseções seguintes, tais como, o conceito de Condições Periódicas de Contorno (CPC), utilizada para minimizar os efeitos de fronteira; e de Raio de Corte, que limita as interações de van der Waals entre átomos não ligados do sistema. As interações eletrostáticas são calculadas pelo Método de Ewald (PME) que permite que uma determinada partícula interaja com as demais do sistema e com todas as suas imagens.

Estas e outras técnicas foram implementadas computacionalmente no programa computacional GROMACS (Berendsen et al., 1995; van der Spoel et al., 1996 and Lindahl et al., 2001). GROMACS significa “Gröningen Machine for Chemical Simulations” (<http://www.gromacs.org> – van der Spoel et al., 2001), é um pacote computacional aberto e

sem custo para o usuário, contem rotinas para execução de simulações por DM e por métodos de otimização, tem rápido processamento se comparado com os demais programas de DM e apresenta uma série de rotinas com programas de análise das trajetórias.

2.3.2.1 Condições Periódicas de Contorno

O ideal para simulação de sistemas moleculares é que o meio seja infinito, ou que contenha um número elevado de partículas (da ordem do número de Avogrado). Simulações com sistemas de muitas partículas demandam um alto custo computacional e não liquidam com o problema decorrente das condições de fronteira (efeito de borda). Assim, uma forma de tratar estes problemas é através da utilização de condições periódicas de contorno (CPC) (Allen and Tildesley, 1987; van Gunsteren and Berendsen, 1990). Esta técnica consiste em circundar a caixa que contém o sistema com outras caixas imagens (ou réplicas), sem que haja espaços não preenchidos entre as junções, ou seja, transladar a caixa original nas três direções espaciais formando uma rede (figura 2.2). Desta maneira, não é necessário definir coordenadas para os átomos que estão na caixa réplica e um determinado átomo estará sempre rodeado por outros átomos ou por sua própria imagem.

No decorrer da simulação, quando um átomo move-se em sua caixa original, sua imagem periódica em cada uma das caixas réplicas move-se também. Além disso, quando um átomo (i) sai da caixa central, atravessando uma de suas seis faces, uma de suas imagens (i') entra pela face oposta, com a mesma velocidade. Dessa forma, há uma conservação do número total de átomos na caixa central e portanto, do sistema como um todo.

Uma versão bidimensional da CPC é mostrada na figura 2.2, neste caso, para um sistema quadrado.

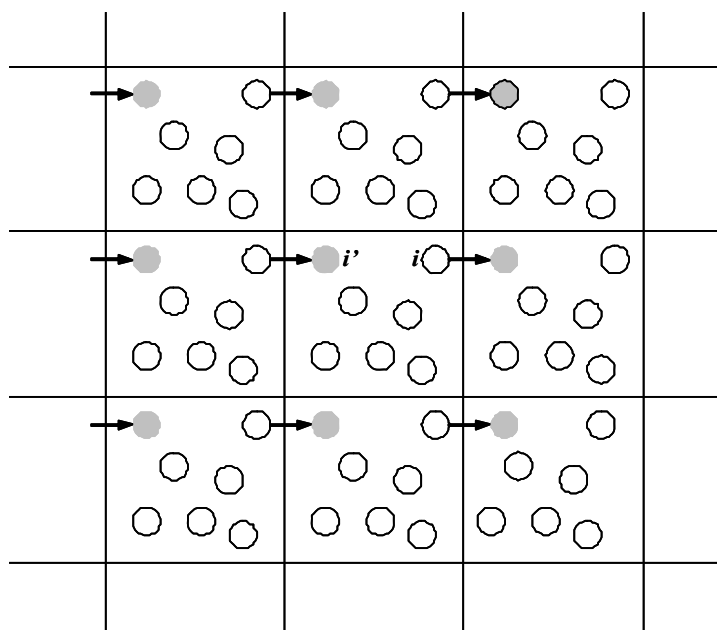


Figura 2.2: Condições periódicas de Contorno bidimensional de um sistema quadrado. A caixa central representa o sistema original e as 8 demais são suas imagens. O movimento de um átomo na caixa central é repetido em cada uma das caixas réplicas, e se um dado átomo i sair pela face direita, sua imagem i' (em cinza) entra pela face esquerda.

2.3.2.2 Raio de Corte

O uso de Condições Periódicas de Contorno implica a necessidade de se definir uma região para que o cálculo das interações de longo alcance seja realizado, pois em sistemas líquidos ou constituídos por moléculas em solução, a periodicidade serve apenas como um artifício computacional que representa sistemas contínuos e evita efeitos de borda. Esta região é delimitada por uma esfera de raio (R_c), denominado raio de corte, de tal forma que um dado átomo do sistema não possa interagir com sua própria imagem ou também com um outro átomo e, simultaneamente, com as imagens periódicas deste átomo. Em geral, o raio de corte é usado no cálculo das interações Coulombinas e de van der Walls, mas neste trabalho usaremos somente para as interações de van der Walls.

O R_c pode ser definido de duas maneiras: $R_c \leq L/2$, onde L é o menor comprimento lateral da caixa retangular (Allen and Tildesley, 1987); $d \leq R_c/2$, sendo d a distância

mínima entre o soluto e a parede da caixa. Estas maneiras de escolher o raio de corte evitam a interação do soluto (proteína, peptídeo, carboidrato) com suas imagens.

A figura 2.3 mostra uma representação bidimensional de um sistema periódico quadrado, sendo o átomo i escolhido para exemplificar a utilização do raio de corte.

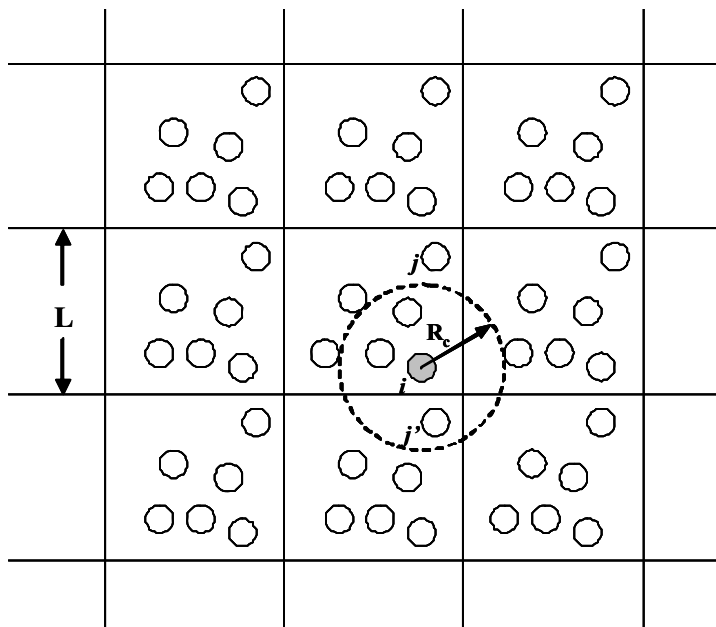


Figura 2.3: Sistema periódico bidimensional quadrado. São consideradas somente as interações entre o átomo cinza (i) e aqueles situados dentro do círculo de raio R_c . Neste caso o átomo i interage com o átomo j através de sua imagem j' .

2.4 Condições e Parâmetros para as DM

As simulações por DM deste trabalho foram realizadas no ensemble (N,P,T), com uma caixa cúbica (45 Å) de água e TFE, previamente termalizada. Nesta caixa adicionamos 1932 moléculas de água e 227 moléculas de TFE, numa proporção de 70:30 (v:v), com os mesmos parâmetros de campo de forças (seção 2.1.5) e condições de simulação propostas no trabalho de Fioroni e colaboradores (2000). Realizamos uma simulação por DM de 2ns e refizemos os testes com a função de distribuição radial de pares ($g(r)$) para verificar o acoplamento das moléculas de TFE em água. Esta caixa previamente equilibrada foi usada em todas as simulações por DM contidas nesta tese, a menos de pequenas variações no número de moléculas de TFE.

As simulações com os peptídeos catiônicos foram realizadas de acordo com uma mesma sequência de passos: 1) o campo de forças usado é o GROMOS/96 (van Gunsteren et al., 1996) com algumas modificações, mostradas na tabela 2.1, para os átomos que compõe as moléculas de (TFE); 2) as moléculas do sistema foram otimizadas por 8000 passos de gradiente conjugado e um ciclo de “steepest descent” foi realizado a cada 500 passos; 3) a dinâmica de restrição de posição do peptídeo, para relaxação do solvente e dos íons (que neutralizam o sistema), foram corridas por 1ns, com um passo de integração de 2fs, usando o algoritmo “leapfrog”; 4) os vínculos foram, então, removidos e o sistema total (peptídeo, solvente e íons) foi submetido a 20ns de simulações por DM.

O algoritmo LINCS (Hess et al., 1997) foi usado para vincular todos os comprimentos de ligação e o algoritmo SETTLE (Miyamoto and Kollman, 1992) para a geometria da água. A temperatura e a pressão foram mantidas constantes e controladas usando técnicas de acoplamento (Berendsen et al., 1984) com constantes de acoplamento e compressibilidade isotérmica, estes parâmetros são mostrados na tabela 2.2. As interações eletrostáticas foram corrigidas usando o método PME (“Particle Mesh Ewald” – Darden et al., 1993 e Cheatham et al., 1995). O raio de corte usado para as interações de van der Walls foi de 1,4nm. As coordenadas de todos os átomos do sistema foram escritas a cada 10ps, para a análise das trajetórias. Os cálculos e as análises das trajetórias foram feitos usando as facilidades do pacote computacional GROMACS (Lindahl et al., 2001).

Condições	
Restrição de Posição	1ns
Tempo total	20ns
Tamanho da Caixa	$4.5 \times 4.5 \times 4.5 \text{ nm}^3$
Intervalo de integração	0,002 ps
Acoplamento de Temperatura	Berendsen
Tempo de acoplamento	0.01ps (solvente e peptídeo)
Banho Térmico	300K
Acoplamento de Pressão	Berendsen
Tempo de acoplamento	1.0 ps (solvente e peptídeo)
Compressibilidade Isotérmica	$6.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$
Pressão de referência	1atm

Tabela 2.2: Parâmetros e condições usados na Dinâmica Molecular.

2.5 Análises Estatísticas

Da Dinâmica Molecular obtém-se um conjunto de trajetórias para as partículas do sistema. Este conjunto de trajetórias contém coordenadas, velocidades e energias de cada átomo, ou do sistema como um todo, ao longo do tempo. Através das análises destas trajetórias podemos obter informações sobre as interações entre os átomos e/ou grupos de átomos, temperatura, pressão, forças e outras propriedades físicas macroscópicas. Para esta tese são destacados os seguintes tipos de análises estatísticas:

Desvio da Raiz Média Quadrática:

Para obter as flutuações atômicas, e os desvios entre estruturas resultantes da dinâmica e uma estrutura de referência, usamos o Desvio da Raiz Média Quadrática (ou “Root Mean Square Deviation” – RMSD). Este tipo de análise compara as diversas conformações espaciais assumidas pelo sistema, sob a influência do solvente, ao longo do tempo. Além disso, fornece informações sobre as flutuações de estrutura secundária ou dos resíduos que a compõem, durante a dinâmica. A equação usada para o cálculo do desvio padrão é dada por:

$$RMSD = \left[\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left(\vec{x}_i - \vec{x}_i^0 \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (2.19)$$

onde $\vec{x}_i$ e $\vec{x}_i^0$ são os vetores de posições atômicas do átomo i em dois instantes distintos da DM. No caso de proteínas e peptídeos o RMSD pode ser calculado de toda estrutura secundária ou apenas da cadeia principal. Neste trabalho, usamos o RMSD como análise inicial, para verificar o quanto as estruturas obtidas ao longo do tempo diferem da primeira (de partida), e posteriormente analisamos as interações envolvidas nas possíveis mudanças conformacionais.

Flutuação Média ou Desvio Padrão (RMSF):

Através desta análise obtemos o desvio padrão entre todas as conformações obtidas ao longo de um dado intervalo de tempo de DM e uma conformação de referência. Esta conformação de referência pode ser a média das conformações obtidas no intervalo

escolhido. A conformação média é calculada através da média das posições (coordenadas) atômicas. Esta análise nos fornece o desvio dos átomos ou resíduos das conformações da DM em comparação com uma dada conformação que em nossas análises trata-se da média.

Distâncias entre átomos ou grupos de átomos:

A distância entre dois átomos ou entre dois grupos de átomos em função de tempo é calculada através das coordenadas do centro de massas destes átomos ou grupos de átomos. A distancia geométrica entre o átomo A e B é dada por:

$$d(A, B) = \sqrt{(x_{cm,A} - x_{cm,B})^2 + (y_{cm,A} - y_{cm,B})^2 + (z_{cm,A} - z_{cm,B})^2} \quad (2.20)$$

Usamos o cálculo da distância para verificar a intensidade das interações eletrostáticas entre os grupos de cargas das cadeias laterais de uma proteína ou peptídeo.

Ligações de hidrogênio:

Observando-se uma rede de gelo, tem-se que as distâncias das ligações intramolecular entre os átomos O e H das moléculas de água é de 1 Å como o esperado para ligações covalentes. Porém, as distâncias das ligações de hidrogênio intermoleculares de O...H são de 1,76 Å, menores, entretanto, que as distâncias entre os raios de van der Waals destes átomos, que são de 2,6Å (Israelachvili, 1991). Estas ligações intermoleculares parecem ter, a princípio, caráter de ligações covalentes, mas são conhecidas com ligações de hidrogênio (ou pontes de hidrogênio).

As pontes de hidrogênio são ligações de origem eletrostática, orientadas e extremamente fortes; não são propriedades unicamente da água, mas ocorrem também entre átomos eletronegativos (O, N, CL e F) e o átomo de H covalentemente ligado a outros átomos com eletronegatividade similar. Defini-se como *doador* (D) o átomo eletronegativo que tem o H a ele ligado, e *aceitador* (A) o outro átomo eletronegativo que participa desta ligação.

Para determinar se uma ponte de hidrogênio existe, um critério geométrico é usado:

$$\begin{cases} r \leq 0,35nm \\ \alpha \leq 60^\circ \end{cases} \quad (2.21)$$

onde r e α são mostrados na figura 2.4.

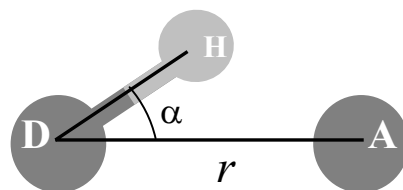


Figura 2.4: Ligação de Hidrogênio. Convenção implementada no pacote computacional GROMACS. R é a distância entre D e A, e α o ângulo formado entre a ligação D-H e r.

Os átomos doadores podem ser o nitrogênio, oxigênio, enxofre e flúor, estes átomos juntamente com o hidrogênio formam um dipolo elétrico. Os aceptadores podem ser oxigênio e nitrogênio.

Função de distribuição radial de pares:

A distribuição de átomos do tipo B em torno de um dado átomo do tipo A , ao longo de uma simulação por DM, pode ser calculada através da função de distribuição radial de pares, ou função de correlação de pares ($g_{AB}(r)$) (Allen and Tildesley, 1987). Esta função é definida através da densidade média de átomos do tipo B contidos em uma esfera de raio r de distância de A , o valor de r varia até atingir um valor r_{max} , que normalmente é igual a metade do comprimento da caixa em que o sistema está inserido.

$$g_{AB}(r) = \frac{\langle \rho_B(r) \rangle}{\langle \rho_B \rangle_{local}} = \frac{1}{\langle \rho_B \rangle_{local}} \frac{1}{N_A} \sum_{i \in A} \sum_{j \in B} \frac{\delta(r_{ij} - r)}{4\pi r^2} \quad (2.22)$$

$\langle \rho_B \rangle_{local}$ é a densidade média de átomos do tipo B sobre todas as esferas de $r = 0$ até $r = r_{max}$ em torno do átomo A .

Para obtermos o número de átomos B em torno de A (n_{AB}), basta integrarmos a função $g(r)$ (“runnig integration number” - RIN).

$$n_{AB}(r) = 4\pi \langle \rho_B \rangle_{local} \int_0^r g_{AB}(r') r'^2 dr' \quad (2.23)$$

RIN nos fornece o número médio de átomos B contidos em uma esfera de raio R centrada em A . Para simulações em que o solvente é composto por misturas de água e um co-solvente qualquer, este tipo de análise é essencial, pois fornece o perfil de solvatação dos grupos hidrofóbicos, polares e carregados de uma proteína ou peptídeo.

Estruturas Secundárias:

Toda estrutura secundária pode ser escrita completamente pelos ângulos de torção ϕ e ψ mostrados na figura 2.5, que são repetidos a cada aminoácido. Os valores permitidos de ϕ e ψ , ou aceitáveis para estrutura tridimensional de proteínas, para que não haja conflitos estéricos, são, usualmente, demonstrados graficamente pelo diagrama de Raachandran na figura 2.6 (Lenhinger et al., 1982). A maioria das combinações de ϕ e ψ representam combinações proibidas para a cadeia polipeptídica e apenas três pequenas regiões do diagrama são fisicamente acessíveis à maioria dos aminoácidos (Voet and Voet, 1995).

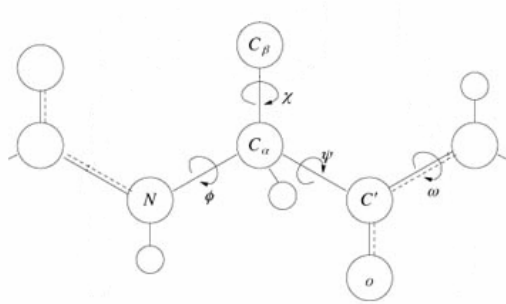


Figura 2.5: Ligação peptídica de dois aminoácidos consecutivos. Os ângulos torcionais ϕ e ψ permitem que cada plano formado por esta ligação gire em relação aos seus vizinhos.

O diagrama de Ramachandran tornou-se uma poderosa ferramenta para validação ou não de estruturas tridimensionais geradas a partir de dados de cristalografia de raios-X e de RMN, além disso, podemos através do diagrama de Ramachandran avaliar as mudanças conformacionais dos resíduos ao longo das simulações por DM. Este tipo de análise é feita através da comparação dos diagramas de Ramachandran entre as simulações de sistemas semelhantes, em busca das mudanças e acomodações locais da cadeia principal e da cadeia lateral quando houve trocas de resíduos, grupos de cargas e modificações nos terminais.

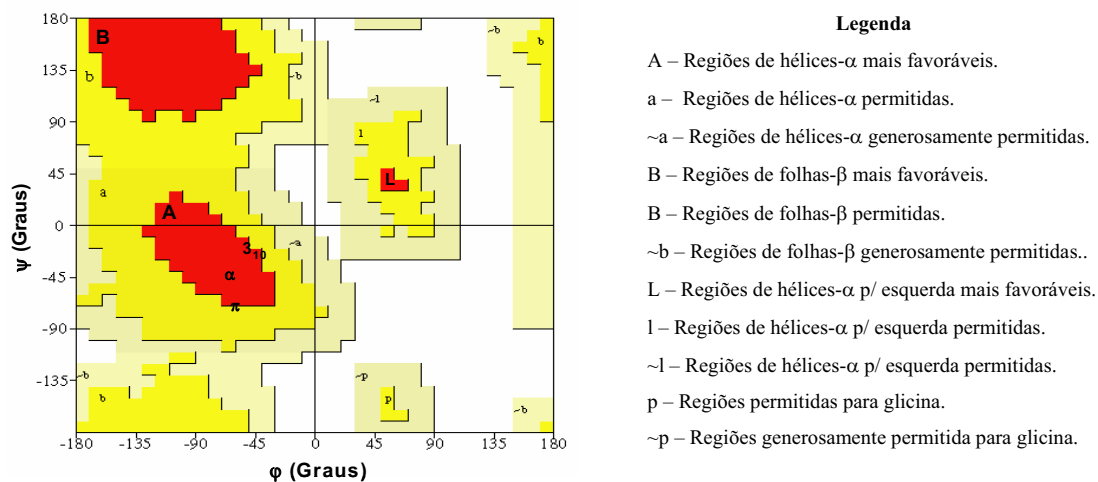


Figura 2.6: Diagrama de Ramachandran, no qual estão mostradas as regiões fisicamente permitidas para os aminoácidos. É possível identificar regiões de estrutura secundária.

As estruturas secundárias podem ser identificadas através das ligações de hidrogênio entre os átomos eletronegativos O e N da cadeia principal dos resíduos de aminoácidos. Ligações de Hidrogênio entre os resíduos $i - i + 3$, $i - i + 4$ e $i - i + 5$, são características de estruturas helicoidais, e através da DM, é possível identificá-las.

Para identificar os padrões de estruturas secundárias assumido pelo peptídeo ao longo da DM, usamos o programa DSSP (“Database of Secondary Structure in Proteins”- Kabsch & Sander, 1983) implementado ao GROMACS. Com esse programa podemos identificar, através de diferentes cores, quais as conformações (por resíduo) assumidas pelo peptídeo no tempo. Nesta análise os resíduos do N e C-terminais não são considerados pertencentes à estrutura secundária e a classificação dos resíduos em determinada estrutura secundária, é feita através do tipo de ligações de hidrogênio e dos valores dos pares de diedrais.

Capítulo 3 – Análise Estrutural do Eumenine Mastoparano-AF (EMP-AF)

A estrutura helicoidal anfipática, a hidrofobicidade, o momento de dipolo, o número de grupos carregados e sua distribuição no peptídeo são fatores determinantes no modo de interação destes peptídeos com bicamadas lipídicas e para sua ação biológica.

Neste capítulo analisamos os resultados do estudo estrutural do Eumenine Mastoparano-AF (EMP-AF) em misturas trifluoretanol-água, por simulação computacional de dinâmica molecular.

Misturas TFE-água vêm sendo utilizadas em experimentos de CD e RMN com peptídeos, pois esse solvente é indutor de estrutura secundária. O TFE é um co-solvente anfipático, que se aglomera em solução aquosa, proporcionando ambientes hidrofóbico e hidrofílico aos peptídeos. O grupo polar OH do TFE pode formar ligações de hidrogênio com outras moléculas de TFE, com a água e com grupos polares do peptídeo, enquanto o grupo CF₃ protege (solvata) as regiões hidrofóbicas do peptídeo, mimetizando assim o ambiente de uma membrana lipídica.

As simulações têm por objetivo estudar a estabilidade das conformações experimentais e/ou a dinâmica de suas variações, bem como identificar os fatores que determinam esses comportamentos. A análise dos resultados será feita por meio de gráficos de RMSD; RMSF; das variações dos padrões de estrutura ao longo da dinâmica; da estrutura de ligações de hidrogênio da cadeia principal do peptídeo; das interações entre os grupos carregados e polares; do momento de macro-dipolo do peptídeo e da solvatação dos diversos grupos do peptídeo.

Os ensaios foram realizados no EMP-AF-NH₂, a forma nativa (Konno et al., 2000), na sua variação sintética com o C-terminal não amidado, e com o EMP-AF-OH. O capítulo está organizado da seguinte forma: na seção 3.1 descrevemos as características estruturais/conformacionais obtidos de dados experimentais do EMP-AF-NH₂ e EMP-AF-OH; nas seções seguintes apresentamos e analisamos os resultados de dinâmica molecular para o EMP-AF-NH₂ em água (3.2), EMP-AF-NH₂ em misturas de TFE-água (3.3) e do EMP-AF-OH em mistura TFE-água (3.4).

3.1 Introdução

O peptídeo antimicrobiano Eumenine Mastoparano-AF (EMP-AF), extraído do veneno de vespa *Anterhynchium flavomarginatum micado* (Konno et al., 2000), interage fortemente com bicamadas lipídicas aniônicas e zwitteriônicas apresentando atividades antimicrobina e hemolítica. Em trabalhos de análise conformacional (dos Santos Cabrera et al., 2004 e Sforça et al., 2004) mostra-se que este peptídeo apresenta estrutura helicoidal anfipática tanto em contato com a bicamada lipídica quanto em misturas de TFE e água (ver seção 1.3.1).

Sforça e colaboradores (2004) resolveram, por RMN, a estrutura do peptídeo EMP-AF-NH₂ e de seu análogo com C-terminal carboxilado (EMP-AF-OH), ambos em misturas de água e TFE (70:30). As cadeias encontradas para o EMP-AF-NH₂ (ou EMP-AF) têm, o RMSD da cadeia principal da primeira estrutura com as demais obtidas por RMN mostrado na figura 3.1a e apresenta uma média de 0,25Å, e conformação em hélice- α anfipática do 4º ao 14º resíduo (figura 1.9). O grupo de estruturas obtidas para o EMP-AF-OH (ou EMP-AF1) apresenta hélice- α do 3º ao 8º resíduo (figuras 1.8), e o RMSD da cadeia principal da primeira estrutura com as demais obtidas por RMN está mostrado na figura 3.1b e apresenta uma média de 1,18 Å. Estes resultados que representam um percentual de cerca de 43 % de resíduos em hélice- α mostra razoável concordância com os percentuais revelados pelos experimentos de CD (- 28%) (Lorenzi, 2002; dos Santos Cabrera et al., 2004) e de DM (Sforça et al., 2004). Estes autores concluem que o EMP-AF-OH tem conformação helicoidal dos resíduos 3 a 8, apresentando os resíduos do C-terminal (Ile 10, Ile 11, Lys 12, Ser 13 e Leu 14) em famílias de conformações do tipo helicoidal, mas “relaxados”. Os resíduos do N-terminal (Ile 1 e Asn 2) encontram-se em conformação aleatória (Sforça et al., 2004).

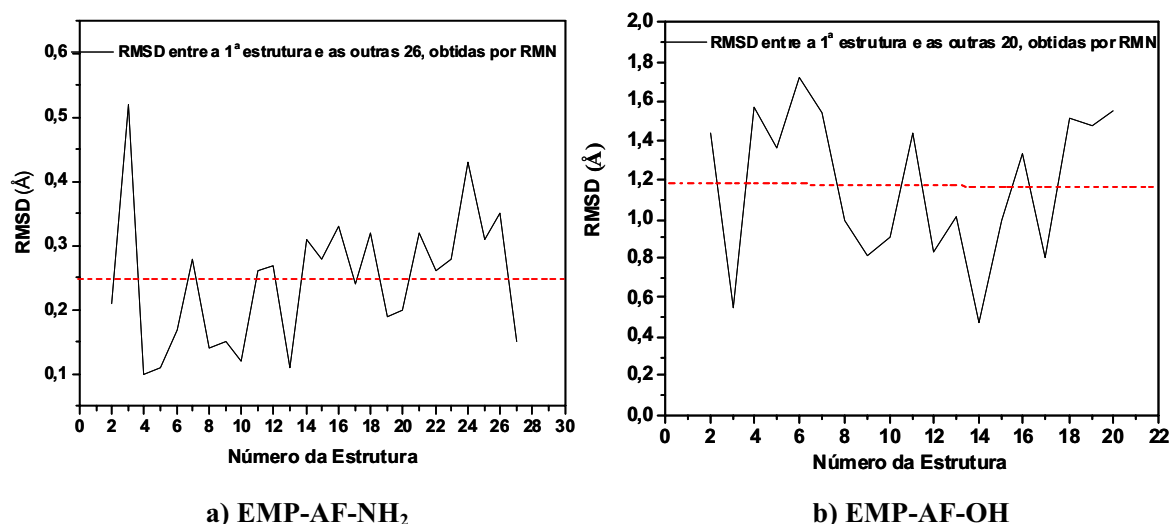


Figura 3.1: Gráficos do RMSD da cadeia principal da primeira estrutura com as demais obtidas por RMN para o EMP-AF-NH₂ e EMP-AF-OH. Em a) apresentamos o RMSD da primeira estrutura com as outras 26 encontradas para o EMP-AF-NH₂, em vermelho destacamos o valor médio que é de 0,25 Å. Em b) apresentamos o RMSD da primeira estrutura com as outras 20 encontradas para o EMP-AF-OH, em vermelho destacamos o valor médio que é de 1,18 Å.

Como base nestas informações experimentais, realizamos um estudo estrutural para analisar a importância do grupo amida no C-terminal deste peptídeo em misturas de água e TFE (70:30). Este percentual foi adotado porque, de um lado, percentuais maiores de TFE não implicam em maior estruturação dos peptídeos e, por outro, foi usado anteriormente em simulações de peptídeos (Johnston et al., 2006, Roccatano et al., 2002 e Fioroni et al., 2002). A sequência primária do EMP-AF-NH₂, que é a mesma do EMP-AF-OH, está mostrada na tabela abaixo.

EMP-AF-NH ₂	Ile-Asn-Leu-Leu-Lys-Ile-Ala-Lys-Gly-Ile-Ile-Lys-Ser-Leu-NH ₂
EMP-AF-OH	Ile-Asn-Leu-Leu-Lys-Ile-Ala-Lys-Gly-Ile-Ile-Lys-Ser-Leu-OH

Tabela 3.1: Sequência primária do EMP-AF. Em azul, são representados os resíduos carregados positivamente. Em preto, os resíduos hidrofóbicos. Em verde os resíduos polares.

3.2 Eumenine Mastoparano-AF (EMP-AF-NH₂) em água

3.2.1 Métodos

A primeira cadeia das 26 obtidas por RMN do EMP-AF-NH₂ em misturas de TFE e água (40:60) (Sforça et al., 2004) foi usada como estrutura inicial para a simulação. Essa estrutura apresenta conformação helicoidal do 3º ao 14º resíduo. O N-terminal deste peptídeo foi tratado como grupo carregado positivamente (NH₃⁺), o C-terminal é amidado (NH₂) e as 3 lisinas foram carregadas.

Um sistema contendo o peptídeo e 4 contraíons de cloro (Cl⁻), que neutralizam as 4 cargas positivas, foi solvatado com 2088 moléculas de água modelo SPC (“Simple Point Charge” – Berendsen et al., 1981). Uma dinâmica de 10 ns foi realizada usando condições periódicas de contorno em uma caixa cúbica com dimensões iniciais de 4,5 nm. O protocolo e parâmetros do campo de forças usados na simulação foram discutidas no capítulo 2 (seção 2.4).

3.2.2 Resultados e Discussões

O EMP-AF-NH₂, assim com os demais mastoparanos, não apresenta estrutura secundária em água (dos Santos Cabrera et al., 2004). Para verificar a desestruturação deste peptídeo em água realizamos uma dinâmica molecular de 10 ns. Na figura 3.2 apresentamos o gráfico que define os padrões de estrutura secundária assumida pelo peptídeo ao longo da dinâmica, as diferentes cores correspondem aos diferentes padrões, tais como hélice- α , folha- β , aleatório, volta e outros, como descritos na legenda. A partir do 4º ns o peptídeo começa perder seu percentual helicoidal de forma sistemática. As principais modificações estruturais acontecem principalmente nos resíduos de 7 a 13, já os resíduos 3 a 6 mantêm seus diedrais na região de hélice mantendo esse padrão a despeito das flutuações entre 7,5 e 9 ns.

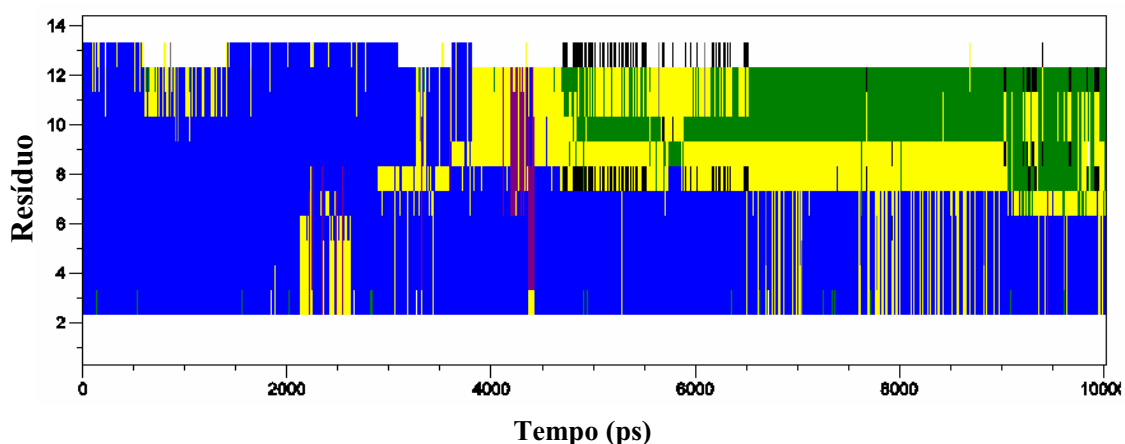


Figura 3.2: Padrões de estrutura secundária por resíduo, ao longo da dinâmica, para o EMP-AF-NH₂. Em branco, resíduos em conformação aleatória (“coil”); em verde, resíduos em curvas (“bend”); em amarelo, resíduos em voltas (“turn”); em preto, resíduos em folha- β ; em roxo, resíduos em hélice-5 e em azul, resíduos em hélice- α .

As ligações de hidrogênio típicas de hélice- α (n - $n+4$) são perturbadas devido à presença das moléculas de água. Pelo gráfico da figura 3.3a verifica-se o decrescimento no número destas ligações na medida que o peptídeo perde seu percentual helicoidal ao longo da dinâmica, e na figura 3.3b o aumento no número de ligações de hidrogênio entre os átomos eletronegativos (N e O) da cadeia principal do peptídeo com as moléculas de água.

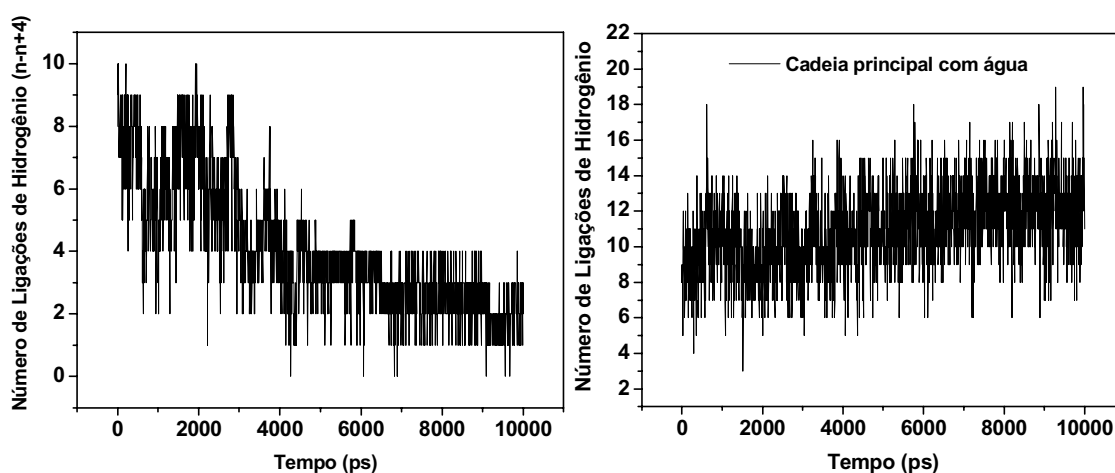


Figura 3.3: Gráfico do número de ligações de hidrogênio. Em a) mostramos o número das ligações de hidrogênio entre os átomos da cadeia principal do peptídeo do tipo n - $n+4$. Em b), o número de ligações de hidrogênio entre os átomos eletronegativos (N e O) da cadeia principal do peptídeo e as moléculas de água ao longo da dinâmica.

As ligações de hidrogênio que estabilizam a conformação helicoidal do peptídeo são desfeitas devido à presença das moléculas de água na região da cadeia principal do peptídeo.

Estes dados mostram que o peptídeo se desenovela em solução aquosa, como mostram os dados experimentais para diversos mastoparanos em água (Chuang et al., 1996; Park et al., 1995; McDowell et al., 1985 - Capítulo 1 – seção 1.3.1). No entanto, para que esse tipo de resultado se mostre se deve acompanhar a dinâmica por tempos superiores a 4 ns e, mesmo assim, há uma parte, dos resíduos 3 a 6, que se mantém em hélice- α por todo o período simulado.

Considerando nosso interesse em estudar a estruturação do peptídeo para poder compreender sua função biológica e testes anteriores de busca conformacional usando algoritmos de otimização tipo recozimento simulado normal e generalizado, que revelavam estruturas aleatórias como as de menor energia em água (na aproximação de campo médio com constante dielétrica ~ 80) limitamos nossas dinâmicas a esse exemplo.

3.3 Eumenine Mastoparano-AF (EMP-AF-NH₂) em misturas de TFE e água

3.3.1 Métodos

A mesma cadeia do EMP-AF-NH₂ obtida por RMN usada na seção anterior foi utilizada como estrutura inicial para a simulação em misturas de TFE e água. Uma caixa cúbica, inicialmente com 4,5 nm de aresta, contendo o EMP-AF-NH₂, 199 moléculas de TFE, 1889 moléculas de água, aproximadamente 30% de TFE em volume e 4 íons Cl⁻, foi submetido à simulação por DM de 20ns.

Esta simulação foi realizada com condições periódicas de contorno. Inicialmente o peptídeo teve suas 3 lisinas e o N-terminal (NH₃⁺) carregados, ficando, portanto, com carga líquida +4. Ele foi solvatado com moléculas de água modelo SPC (“Simple Point Charge” – Berendsen et al., 1981) para que se pudesse substituir 4 moléculas de água por 4 íons de cloro (Cl⁻), usando como critério o maior potencial eletrostático no átomo de oxigênio. Com isso o sistema foi neutralizado. Mantendo apenas os átomos do peptídeo e os

contrações, as moléculas de água foram substituídas pela caixa previamente equilibrada de água e TFE.

3.3.2 Resultados e Discussões

Variações nos Determinantes Estruturais:

A Dinâmica de 20ns do EMP-AF-NH₂ gerou algumas modificações estruturais aproximando o peptídeo de uma hélice- α ideal. O gráfico do desvio médio dos resíduos ao longo da dinâmica, ou seja, o de RMSF por resíduo, está apresentado na figura 3.4a. Dele pode-se observar que os resíduos de 2 a 6 apresentam flutuações muito pequenas (≤ 1 Å) enquanto os resíduos 13 e 14 são os que mais flutuam ($\geq 2,25$ Å). Os demais resíduos apresentam flutuações intermediárias. Este comportamento pode ser indicativo de um equilíbrio entre as conformações próximas ou de alguma mudança conformacional sistemática. Esse dado sozinho não pode nos dar a resposta a essa questão.

Na figura 3.4b apresentamos o gráfico do desvio quadrático médio, RMSD, entre a cadeia principal de uma hélice- α ideal e a cadeia principal do peptídeo ao longo da dinâmica. Observa-se que o peptídeo inicialmente flutua, RMSD aproximadamente de 1 Å nos primeiros 12 ns de simulação, enquanto no período restante esse desvio cai para um valor aproximado de 0,3 Å. Em outras palavras a hélice se aproxima, no tempo, de uma hélice- α ideal.

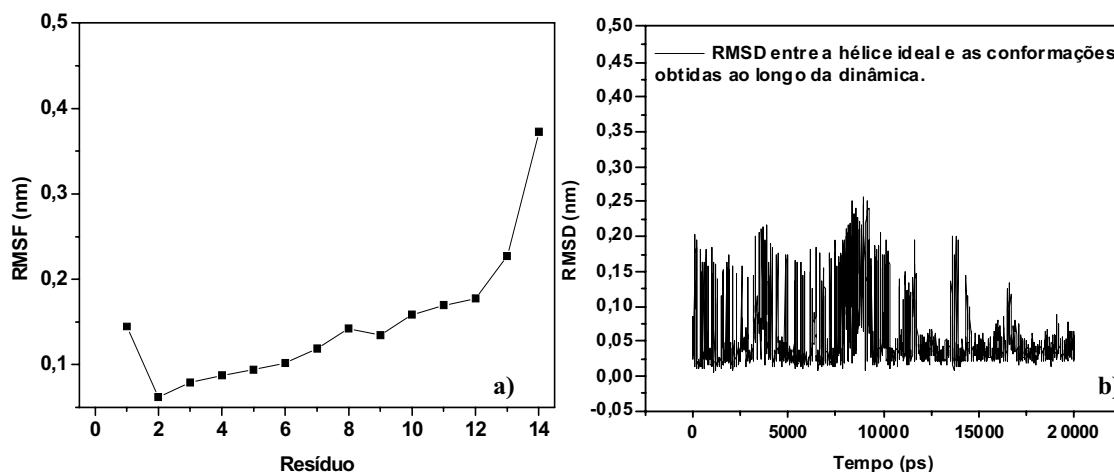


Figura 3.4: Gráficos do RMSF e RMSD obtidos através da dinâmica de 20 ns do EMP-AF-NH₂. a) desvio da flutuação média (RMSF) por resíduo ao longo da dinâmica, b) desvio da raiz media quadrática (RMSD) entre

a conformação em hélice- α ideal e as demais conformações obtidas ao longo da dinâmica. O RMSD refere-se apenas à cadeia principal.

As variações conformacionais podem ser acompanhadas a partir do gráfico de padrões de estrutura secundária por resíduo ao longo da dinâmica. Na figura 3.5 apresentamos esse gráfico para a simulação do EMP-AF-NH₂. Note que a conformação inicial corresponde ao padrão helicoidal e é fruto da escolha da estrutura de RMN. A dinâmica revela, porém, que as interações com o solvente desestruturam inicialmente (~0 a 3 ns) os resíduos de 9 a 13 (o resíduo 14, o último, não é classificado pelo programa). Entre 3 e 4 ns há uma desestruturação, recuperada no próprio intervalo, dos resíduos 7 e 8 e a reestruturação em hélice- α dos resíduos 10 a 13. O resíduo 9 permanece fora desse padrão até cerca de 10 ns, quando uma nova desestruturação do final da cadeia ocorre. Em seguida ocorre um processo lento (escala de nanosegundos), mas que gradativamente recompõe a estrutura helicoidal entre os resíduos 3 ao 14, como observado experimentalmente do RMN.

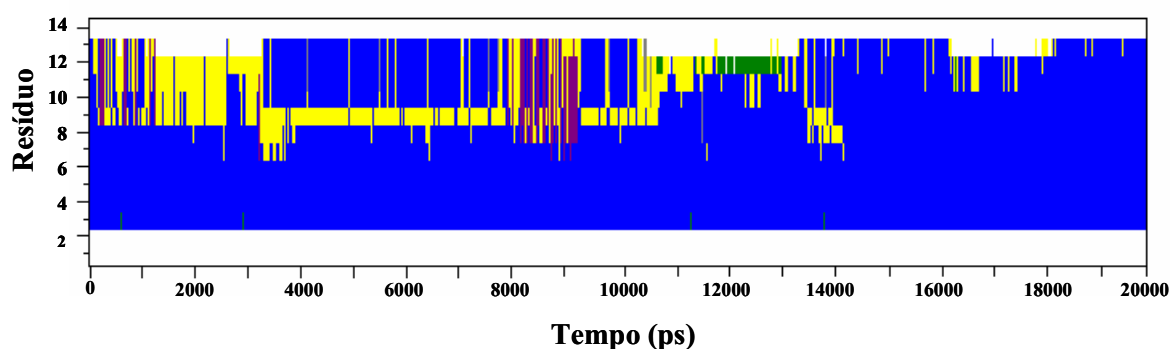


Figura 3.5: Padrões de estruturas secundárias por resíduo, ao longo da dinâmica, para o EMP-AF-NH₂. Em branco, resíduos em conformação aleatória (“coil”); em verde, resíduos em curvas (“bend”); em amarelo, resíduos em voltas (“turn”); em roxo, resíduos em hélice-5 e em azul, resíduos em hélice- α .

A figura 3.5 revela também uma característica do protocolo usado nesta simulação, ou seja, colocou-se o peptídeo na conformação obtida por RMN em mistura TFE-água. Porém o procedimento consistiu em usar uma mistura TFE-água previamente equilibrada, que como foi comentado no capítulo II, mostra a formação de “clusters” de TFE, no qual a parte hidrofóbica das moléculas, os grupos CF₃ tendem a se voltar uns para os outros, “escondendo-se” das moléculas de água com as quais não interagem favoravelmente por

não formarem ligações de hidrogênio. A dinâmica com o peptídeo deve rearranjar estas estruturas adaptando-as à presença deste. Esse processo provoca a desestruturação inicial do peptídeo, com as flutuações na estrutura de ligações pelo hidrogênio dos átomos eletronegativos O e N da cadeia principal entre resíduos n e $n + 4$ adjacentes ao C-terminal. A partir do terceiro nanosegundo as variações conformacionais são no sentido de recompor a conformação helicoidal. Os resíduos 3 a 8 permanecem nessa conformação por todo o período. Depois de 3 ns o resíduo que permanece longo tempo fora da hélice é a Gly 9 que é considerado um resíduo que interfere a conformação helicoidal pela liberdade proporcionada pela ausência de cadeia lateral.

Outro aspecto importante para analisar a estrutura, especialmente para hélices- α , e sua estabilidade são as ligações de hidrogênio entre resíduos n e $n+4$ na cadeia principal. Os números de ligações de hidrogênio do tipo $n-n+4$ para os átomos N e O da cadeia principal do peptídeo, ao longo do tempo, são mostrados na figura 3.6. Estes dados confirmam a discussão anterior. Observa-se que o número médio destas ligações é 5 entre 0 e 10 ns, e 8 entre 14 e 20 ns. Estes números mostram um aumento de 3 ligações de hidrogênio ao longo da dinâmica. Tais ligações de hidrogênio que eram encontradas na conformação inicial da dinâmica do EMP-AF-NH₂, mas se tornaram instáveis durante a fase inicial da dinâmica, para se refazer no final, são formadas pelos resíduos: Ala 7 com Ile 11; Lys 8 com Lys 12 e Ile 10 com Leu 14.

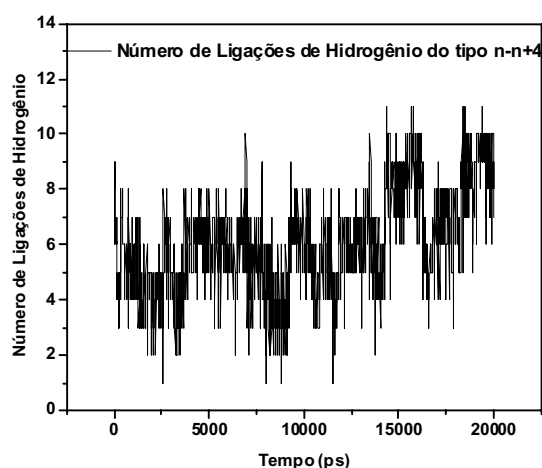


Figura 3.6: Gráfico do número de ligações de hidrogênio, do tipo $n-n+4$, entre os átomos eletronegativos da cadeia principal do peptídeo.

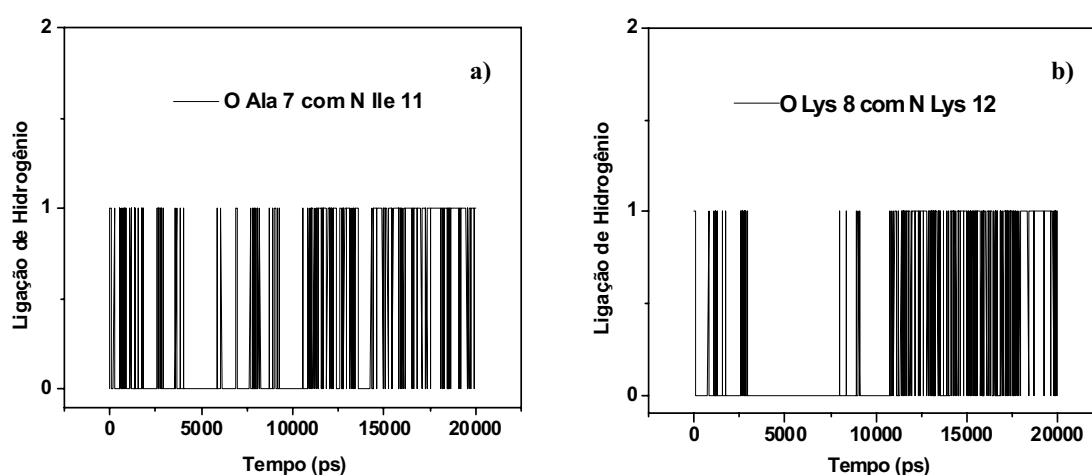
Na tabela 3.2 apresentamos o tempo de permanência, como percentual do tempo de simulação, das ligações de hidrogênio do tipo $n-n+4$ da cadeia principal do peptídeo. Estes

dados mostram, ainda, que as ligações de hidrogênio que contribuem para manter na conformação helicoidal os resíduos de 3 a 7, estão formados a maior parte do tempo (~80%). O que confirma as informações da figura 3.5.

	1---5	2---6	3---7	4---8	5---9	6---10	7---11	8---12	9---13	10---14
EMP-AF	—	79%	96%	89%	77,1%	55%	41,1%	35,3%	65%	47,1%

Tabela 3.2: Tempo de permanência das ligações de hidrogênio do tipo n-n+4 ao longo dos 20 ns de dinâmica para EMP-AF-NH₂ em mistura de TFE e água.

Na figura 3.7 mostramos os gráficos da formação das ligações de hidrogênio que contribuem para a inclusão dos resíduos de 10 a 13 na conformação helicoidal do EMP-AF-NH₂. Nos gráficos 3.7a e 3.7b apresentamos as ligações de hidrogênio entre os átomos O Ala 7 com N da Ile 11 e O da Lys 8 com N da Lys 12, que podem ser consideradas formadas a partir do 11^o ns, período no qual os resíduos 10 e 11 passam a fazer parte da conformação helicoidal do peptídeo. Entretanto a ligação entre O da Ile 10 e N da Leu 14 pode ser considerada formada, em média, nos intervalos de 3 a 10 ns, de 14 a 16 ns e de 18 a 20 ns contribuindo para a inclusão do 13^o resíduo na conformação helicoidal do peptídeo.



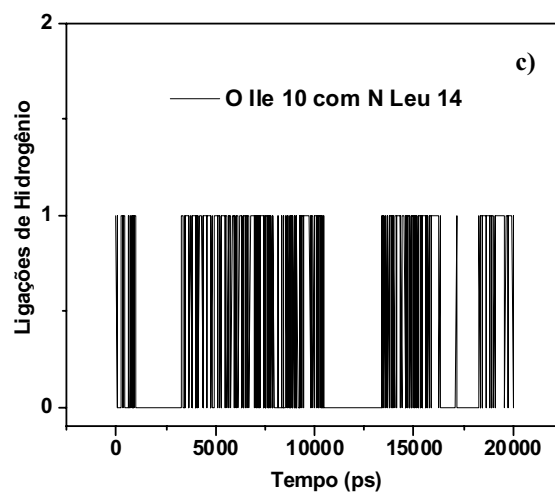


Figura 3.7: Gráfico das ligações de hidrogênio entre os resíduos a) Ala 7 e Ile 11, b) Lys 8 e Lys 12, e c) Ile 10 e Leu 14. Estas ligações não são encontradas inicialmente, mas se tornam estáveis nos últimos 6 ns da DM.

O átomo O da cadeia lateral da Asn 2 forma uma ligação de hidrogênio com o N da cadeia principal da Lys 5, durante 91% do tempo de dinâmica (figura 3.8). Esta ligação impede a formação da ligação entre o O (cadeia principal) da Ile 1 com o N (cadeia principal) da Lys 5, contribuindo para que os resíduos do N-terminal permaneçam em conformação aleatória.

É interessante observar que estes dados da dinâmica permitem compreender o comportamento do RMSF apresentado na figura 3.4a. A ligação de hidrogênio que envolve a Asn 2 e a Lys 5, discutido acima, praticamente fixa o resíduo 2, como se vê do RMSF. Os resíduos 3 a 6 participam de ligações de hidrogênio a maior parte do tempo e se mantêm na estrutura de hélice- α , praticamente, durante toda a dinâmica e o RMSF reflete somente oscilações pequenas dessa estrutura e movimentos de grupos laterais.

Os resíduos de 7 a 12 têm uma intermitência maior na estrutura e na estabilidade das ligações de hidrogênio e apresentam RMSF crescentes, a exceção do resíduo 9, uma glicina, que apesar de não mostrar o padrão de hélice- α pela maior parte da dinâmica, não possui cadeia lateral. Finalmente, os maiores valores do RMSF ocorrem para os resíduos 13 e 14 que são aqueles para os quais as ligações de hidrogênio são menos estáveis.

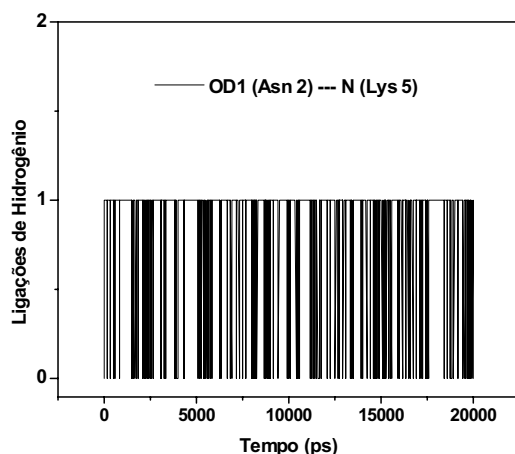


Figura 3.8: Gráfico das ligações de hidrogênio entre os átomos O da cadeia lateral da Asn 2 e o N da cadeia principal da Lys 5. OD1 é nome usado para o átomo de oxigênio da cadeia lateral da asparagina.

Macro-dipolo da hélice:

O macro-dipolo da hélice, formado pelos dipolos das ligações peptídicas, foi calculado ao longo da dinâmica. Na figura 3.9, podemos observar o gráfico do momento de macro-dipolo da hélice, que tem seu valor médio igual a $0,45 \text{ nm e}$ de 0 a 10 ns, mas de 14 a 20 ns teve um aumento, apresentando um de macro-dipolo médio de $0,75 \text{ nm e}$. Este aumento se deve ao melhor alinhamento dos dipolos da hélice do peptídeo, refletindo a aproximação de sua conformação àquela da hélice- α ideal (figura 3.4b).

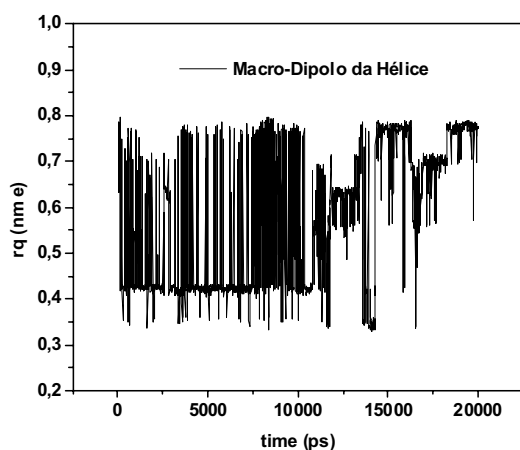


Figura 3.9: Gráfico do Macro-dipolo da hélice do peptídeo EMP-AF-NH₂ ao longo da dinâmica.

Análise de Solvatação:

A anfipaticidade da conformação helicoidal pode ser estudada pela análise do perfil de solvatação em torno dos grupos laterais e da cadeia principal do peptídeo. Esta análise foi feita por meio da integração (“Run Integration Number” - RIN) da função de Distribuição Radial de Pares ($g(r)$).

RIN é o número médio de um dado átomo ou grupo de átomo contido numa esfera de raio r centrada em outro átomo ou grupo previamente escolhido. Nestas análises escolhemos os grupos de carga (NH_3^+), polares (NH_2 ou OH) ou hidrofóbicos (CH_3 ou CH_2) da cadeia lateral do peptídeo, e calculamos a distribuição das moléculas do solvente em torno destes grupos. A figura 3.10 mostra a estrutura média do peptídeo em hélice- α , obtida no intervalo de 14 a 20 ns da simulação, projetada no plano normal a seu eixo.

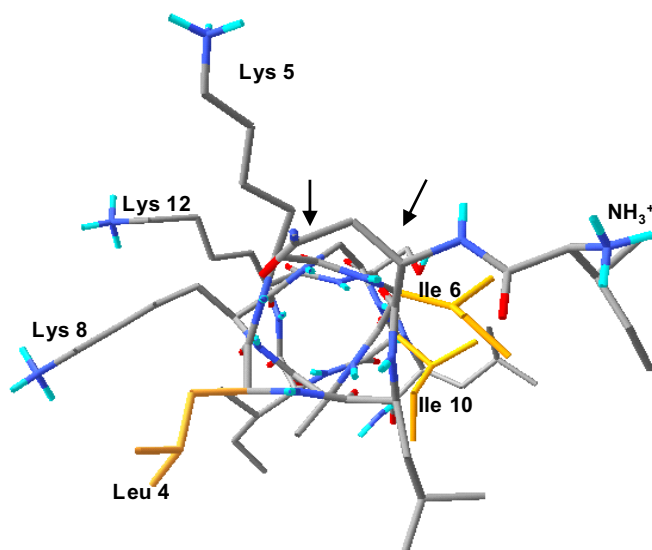


Figura 3.10: Estrutura média da hélice- α do EMP-AF-NH₂ obtida no intervalo de 14 a 20 ns. Estrutura projetada no plano normal ao eixo da hélice. Em amarelo, estão marcadas as cadeias laterais dos resíduos hidrofóbicos Leu 4, Ile 6, Ile 10 e, em azul os grupos carregados.

Os resíduos hidrofóbicos (Leu 3, Leu 4, Ile 6, Ala 7, Ile 10, Ile 11 e Leu 14) desta estrutura concentram-se de um lado da hélice, enquanto que os resíduos polares (Asn 2 e Ser 13) e carregados (Lys 5, Lys 8 e Lys 12) estão na face oposta.

Na figura 3.11 apresentamos o gráfico de RIN para os grupos hidrofóbicos mostrados na figura 3.10. Os três átomos de flúor (F1, F2 e F3) das moléculas de TFE foram selecionados, e nas curvas em azul temos o número médio de centros de massa destes três átomos em torno de um determinado grupo, em preto apresentamos o número médio de átomos O (OW) da molécula de água, e em vermelho número médio de átomos O (OA) da molécula de TFE. Para o resíduo de leucina, posição 4, selecionamos o átomo de carbono (C_γ - átomo “CH”) ligado ao C_β . Nas isoleucinas (Ile 6 e Ile 10) selecionamos o átomo carbono (“CH₃”) da cadeia lateral mais exposto ao solvente.

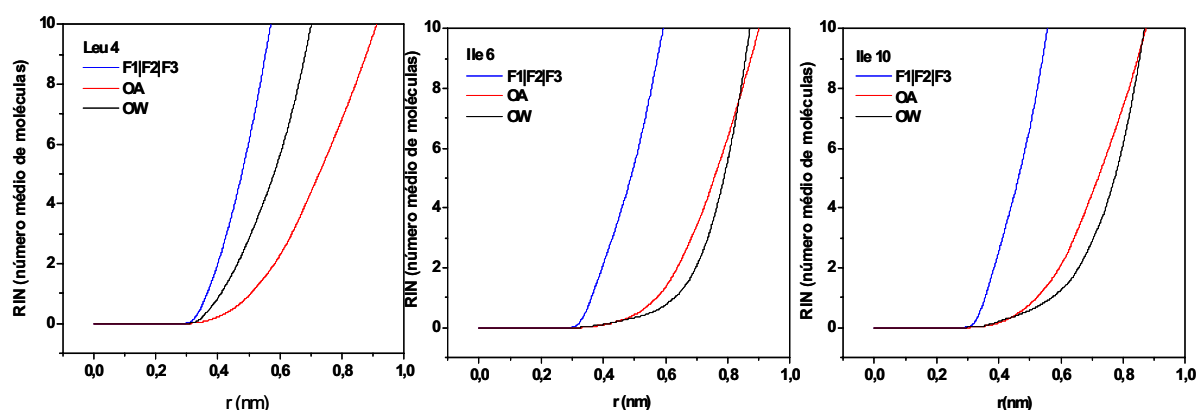


Figura 3.11: Gráficos da integral da função de distribuição radial de pares (RIN) para os grupos da cadeia lateral dos resíduos hidrofóbicos (Leu 4, Ile 6 e Ile 10). Em azul, RIN para o centro de massa dos átomos de flúor da molécula de TFE, em preto o RIN para os átomos de O (OW) das moléculas de água e em vermelho o RIN para os átomos de O (OA) das moléculas de TFE.

Fixando a distancia radial em 5 Å (0,5 nm) encontramos a seguinte relação entre os números de centros de massa dos átomos de flúor (F), oxigênio da água (OW) e oxigênio do TFE (OA) (F:OW:OA): para Leu 4 – 6,8:3:1, para Ile 6 – 5,8:0,5:0,5 e para Ile 10 – 6,2:0,5:0,8. Estes dados evidenciam que a região em que se localizam os resíduos hidrofóbicos é solvatada preferencialmente pelas moléculas de TFE, além de confirmar as localizações dos resíduos na região hidrofóbica. Por exemplo, a Leu 4 encontra-se nas proximidades da interface das faces hidrofóbica e hidrofílica, e se comparada com as isoleucinas tem, em média, mais moléculas de água nas proximidades.

As curvas de RIN para as três lisinas são aproximadamente iguais. Na figura 3.12, apresentamos o gráfico para a Lys 8, como exemplo.

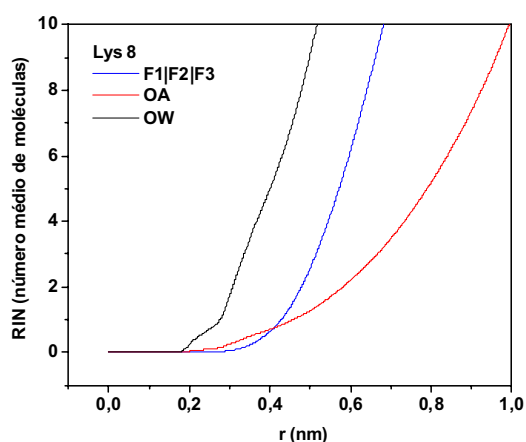


Figura 3.12: Gráfico da integral de função de distribuição radial de pares (RIN), do grupo NH_3^+ da cadeia lateral da Lys 8.

O grupo NH_3^+ da cadeia lateral das lisinas são preferencialmente solvatadas com moléculas de água. Para a Lys 8, em 5 Å, temos 9 moléculas de água para 2,5 moléculas de TFE com os átomos de flúor apontados para a carga e 1 molécula de TFE com o oxigênio apontado. A solvatação das lisinas evidencia que a face hidrofílica é solvatada preferencialmente com moléculas de água.

Os resíduos polares Asn 2 e Ser 13 têm seus gráficos de RIN mostrados na figura 3.13. Para a asparagina selecionamos o grupo NH_2 da cadeia lateral e para serina o grupo OH da cadeia lateral.

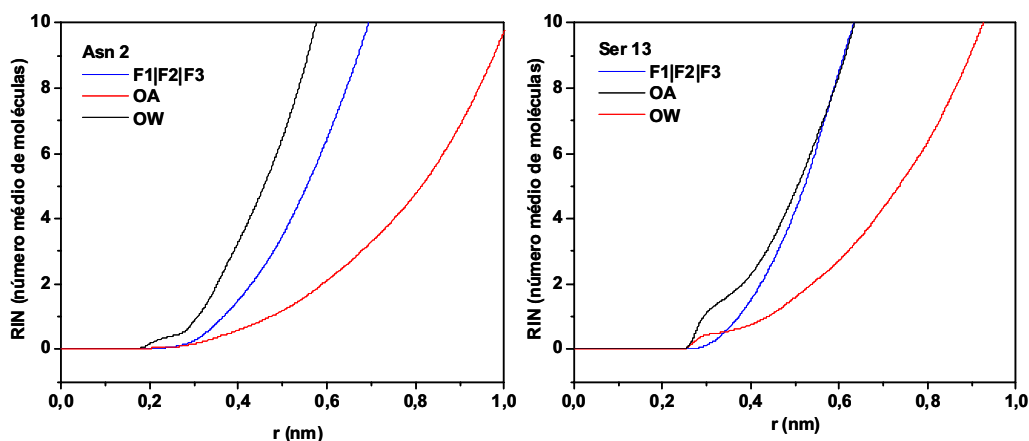


Figura 3.13: Gráfico de RIN dos resíduos polares do peptídeo. Para a Asn 2 escolhemos o grupo NH_2 da cadeia lateral, e para a Ser 3 o grupo OH também da cadeia lateral.

A Asn 2 tem seu grupo NH_2 na região hidrofílica, e isso se reflete nas proporções discutidas anteriormente. Para ela F:OW:OA é 3,2:6,2:1 ou seja, para $r = 5$ Å tem-se, em média 2 moléculas de água para cada uma de TFE com os átomos flúor apontados para o grupo NH_2 . A Ser 13 tem seu grupo OH localizado na interface hidrofóbica-hidrofílica, e apresenta, nesse mesmo raio, as frações 4:4,5:1,5, concordante com essa localização.

Na figura 3.14 apresentamos, vista de outro ângulo, a mesma hélice- α anfipática da figura 3.10. Em preto estão representados os átomos que compõem a cadeia principal do peptídeo, em amarelo estão as cadeias laterais dos resíduos que compõem a face hidrofóbica da hélice (Leu3, Leu 4, Ile6, Ala 7, Ile 10 e Ile 11), em azul as cadeias laterais dos resíduos que compõem a face hidrofílica da hélice (Asn 2, Lys 5, Lys8, Gly 9, Lys 12 e Ser 13) e em cinza as cadeias laterais dos resíduos dos terminais (Ile1 e Leu 14).

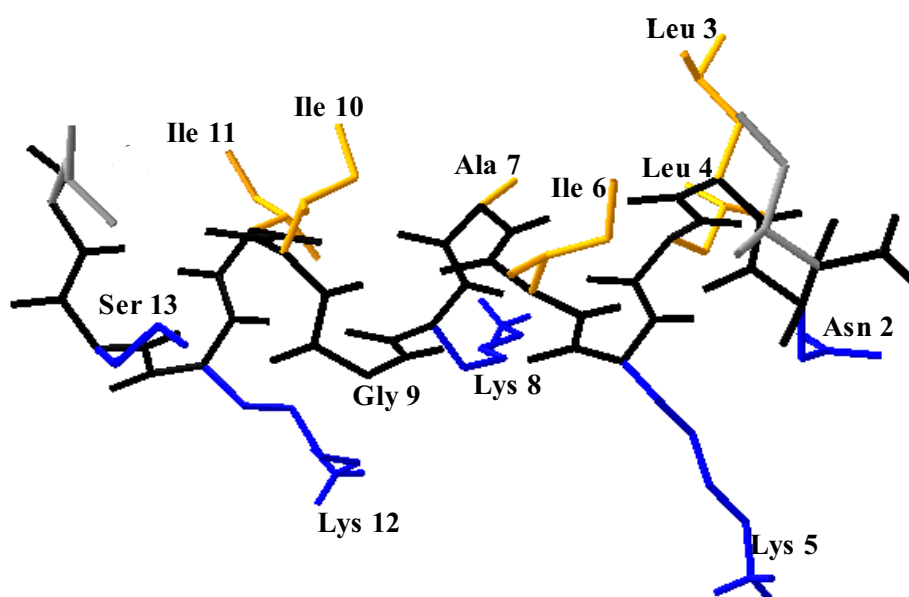


Figura 3.14: Representação da hélice- α anfipática do peptídeo, estrutura média obtida no intervalo de 14 a 20 ns. Em preto temos a cadeia principal, em azul as cadeias laterais dos resíduos que estão na região hidrofílica da hélice (Asn 2, Lys 5, Lys8, Gly 9, Lys 12 e Ser 13), em amarelo as cadeias laterais dos resíduos que estão na região hidrofóbica da hélice (Leu3, Leu 4, Ile6, Ala 7, Ile 10 e Ile 11) e em cinza os dois resíduos dos terminais (Ile 1 e Leu 14)

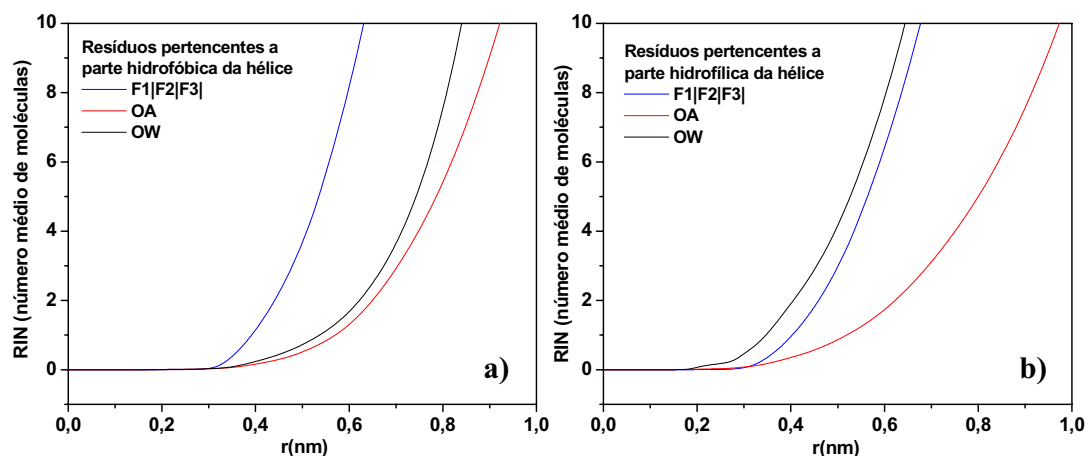


Figura 3.15: Gráfico de RIN dos resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos do peptídeo. Em a) apresentamos o RIN dos resíduos que estão na face hidrofóbica da hélice (Leu3, Leu 4, Ile6, Ala 7, Ile 10 e Ile 11). Em b) apresentamos o RIN da cadeia principal dos resíduos que estão na face hidrofílica da hélice (Asn 2, Lys 5, Lys8, Gly 9, Lys 12 e Ser 13).

Se escolhermos o centro de massa dos resíduos da face hidrofóbica e dos resíduos da face hidrofílica teremos uma idéia da distribuição de moléculas d'água e de TFE nestas faces. Na figura 3.15a temos o gráfico de RIN para os resíduos da face hidrofóbica, que para distâncias de até 5 Å, tem em média 3,6 moléculas de TFE com os átomos de flúor apontados para o peptídeo, 0,6 moléculas de água e 0,5 molécula de TFE com o OA apontado para o peptídeo. Esta região do peptídeo, como esperado, é preferencialmente solvatada por moléculas de TFE. No gráfico da figura 3.15b, por outro lado, mostramos o perfil de solvatação em torno dos resíduos que compõe a face hidrofílica da hélice. Ainda para uma distância radial de 5 Å, obtemos 2,8 moléculas, em média, de TFE como os átomos de flúor apontados para a hélice, 4,2 moléculas de água. Nesta região há uma predominância da solvatação por moléculas de água. O número proporcionalmente grande de moléculas de TFE em torno da região hidrofílica da hélice deve-se à presença de grupos apolares metilênicos (CH, CH₂ e CH₃) nas cadeias laterais das lisinas. Estes grupos são hidrofóbicos e são solvatados preferencialmente pelos átomos de flúor do TFE.

Correlação com dados experimentais de estrutura do EMP-AF-NH₂:

Dados experimentais sobre estrutura do EMP-AF-NH₂ e seus análogos estão restritos ao dicroísmo circular (CD) e ressonância magnética nuclear (RMN). Dados de CD mostram que em mistura TFE-água eles apresentam significativo percentual de hélice- α : 54% em 40:60 (v/v) (dos Santos Cabrera et al.; 2004) e 62% em 30:70 (Sforza et al.; 2004). Em ambiente mais aniônico, como na presença de micelas de SDS (8 mM) os autores acima reportam, respectivamente, 72% e 83% para esse percentual.

Os dados de DM apresentados nesta seção mostram que, após um período inicial de rearranjo dinâmico da mistura em torno do peptídeo, que produz alterações em relação a estrutura inicial do mesmo, uma porção em hélice- α se estabiliza entre os resíduos 3 a 12 ou 13. Isso fornece um percentual de resíduos em hélice igual a 71% ou 78% que é compatível com os dados de CD.

Experimentos de RMN em mistura TFE-água mostram uma estrutura helicoidal entre os resíduos 3 a 14. Este dado está confirmado pela dinâmica aqui realizada, especialmente para o período final da simulação.

3.4 Eumenine Mastoparano-AF com C-Terminal carboxilado (EMP-AF-OH)

A atividade e estruturação de análogos com C-terminal carboxilado (não amidado) de peptídeos extraídos do veneno de vespa têm sido estudados do ponto de vista experimental e teórico (Sforza et al., 2004; Lorenzi, 2002, dos Santos Cabrera et al., 2004). No capítulo introdutório (seção 1.2.8) destacamos as diferenças nas atividades dos peptídeos antimicrobianos, relacionando-as com a amidação do C-terminal. Nesta seção apresentamos um estudo, por DM, das propriedades estruturais do EMP-AF-OH (ou EMP-AF1) partindo de sua estrutura obtida por RMN. Verificamos dessa análise a estabilidade da porção helicoidal do 3º ao 7º resíduo, e as oscilações dos resíduos 8, 9 e 10 dentro desta porção helicoidal.

3.4.1 Métodos

A primeira das 20 cadeias obtidas por RMN do EMP-AF-OH (EMP-AF1) em misturas de TFE e água (30:70) (Sforça et al., 2004) foi usada como estrutura inicial na simulação. Essa estrutura é uma hélice- α anfipática do 3º ao 10º resíduos e está representada nas figuras 1.8. As três lisinas, o N-terminal (NH_3^+) e o C-terminal (COOH) foram carregados, deixando o peptídeo com uma carga líquida +3. Para neutralizar a caixa de simulação três íons de cloro foram incluídos. O sistema final contém 7231 átomos em uma caixa cúbica inicial de 4,5 nm. Destes, 1414 átomos compõe as 202 moléculas de TFE, 5679 átomos compõe as 1893 moléculas de água, 135 átomos compõe os 14 resíduos do peptídeo e 3 são os íons de Cl^- . O campo de forças e o protocolo de simulação são os mesmos descritos nas seções anteriores (discutidas no capítulo 2).

3.4.2 Resultados e Discussões

Variações nos Determinantes Estruturais:

As variações estruturais do EMPAF-OH com o tempo podem ser visualizadas no seu conjunto pelo gráfico de padrões de estrutura secundária por resíduo, mostrado na figura 3.16. Observa-se que existem intervalos, razoavelmente bem caracterizados, nos quais o número de resíduos em conformação tipo hélice- α varia. Nos intervalos (I) 1 a 4,5 ns e (II) 10 a 15 ns, por exemplo, os resíduos de 3 a 10 encontram-se em estrutura de hélice- α , enquanto nos intervalos de (III) 4,5 a 10 e de (IV) 15 a 20 ns o número de resíduos em hélice- α é menor, no trecho do 3 ao 7. Os resíduos de 11 a 14 variam muito entre os vários padrões e, em boa parte da dinâmica, apresentação em conformação aleatória.

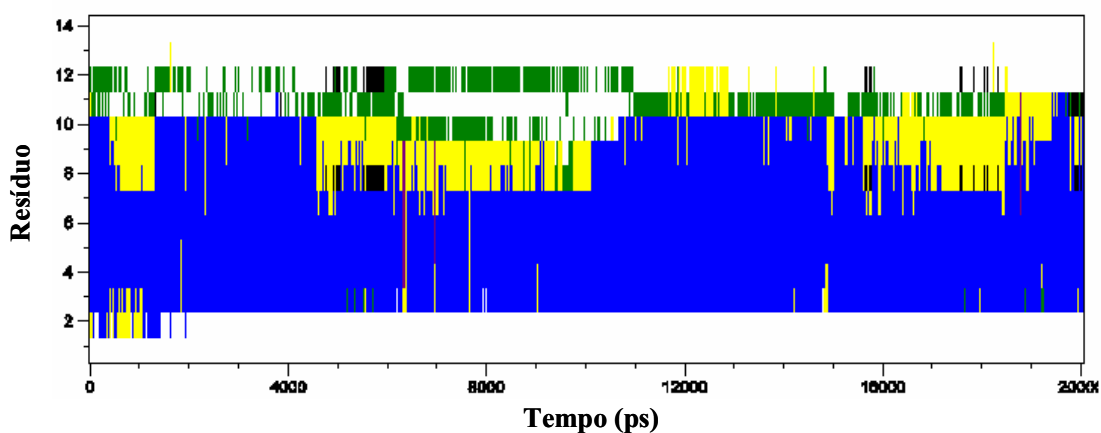


Figura 3.16: Padrões de estruturas secundárias por resíduo, ao longo da dinâmica, para o EMP-AF-OH. Em branco, resíduos em conformação aleatória (“coil”); em verde, resíduos em curvas (“bend”); em amarelo, resíduos em voltas (“turn”); em roxo, resíduos em hélice-5; em preto, resíduos em folha- β e em azul, resíduos em hélice- α .

Esse tipo de comportamento é comprovado também pela análise do RMSD dos instantâneos do peptídeo ao longo da dinâmica e a estrutura inicial. Na figura 3.17 mostramos as curvas de RMSD em função do tempo para a cadeia principal (em preto) e para os átomos da cadeia principal limitado aos resíduos de 3 a 10 (em vermelho). Os “dentes” dessa curva nos intervalos apontados acima evidenciam a desarrumação ocorrida entre os resíduos 8 a 10, como podemos ver também da figura 3.16. Variações estruturais desse porte no meio da cadeia peptídica produzem, obviamente, grandes flutuações nas posições dos átomos das extremidades do peptídeo, como se pode ver da curva de RMSD para toda a cadeia principal (curva preta).

Nos intervalos I e II a região central do peptídeo (resíduos 3 a 10) se aproxima de uma hélice- α ideal, como se pode ver da figura 3.18, na qual o RMSD da cadeia principal é confrontado com o de uma hélice- α ideal.

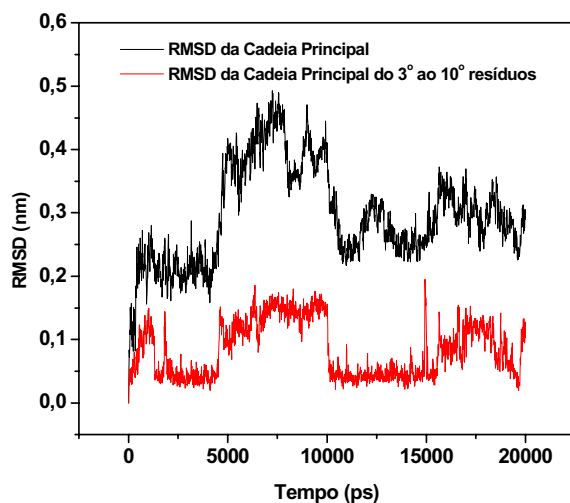


Figura 3.17: Gráfico do RMSD entre a estrutura de partida minimizada e as demais conformações encontradas ao longo da dinâmica. Em preto trata-se do RMSD da cadeia principal de todos os resíduos. Em azul, da cadeia principal do 3º ao 10º resíduo.

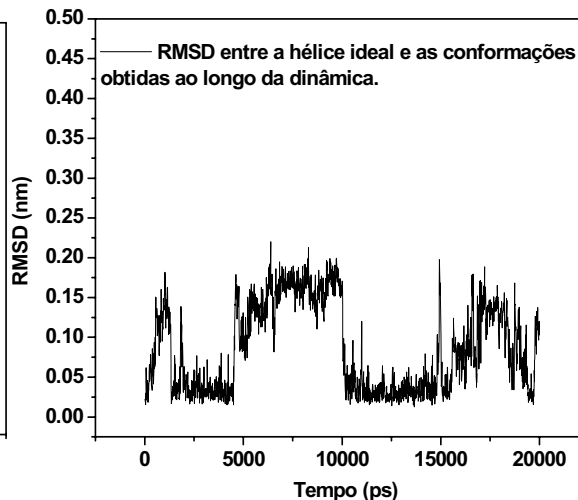


Figura 3.18: Gráfico do RMSD entre a conformação em hélice- α ideal e as das demais conformações obtidas ao longo da dinâmica. O RMSD é calculado apenas da cadeia principal.

Exemplos de estruturas formadas nos intervalos de I a IV estão apresentados na figura 3.19. As estruturas mostradas correspondem a instantes no centro dos intervalos. Duas observações são pertinentes: 1) a hélice- α do resíduo 3 ao 7 mostra-se estável, enquanto os resíduos 8 a 10 entram e saem dessa hélice e 2) os resíduos de 11 a 14 apresentam significativa liberdade conformacional e não se estabilizam em nenhum padrão de estrutura secundária ao longo da dinâmica.

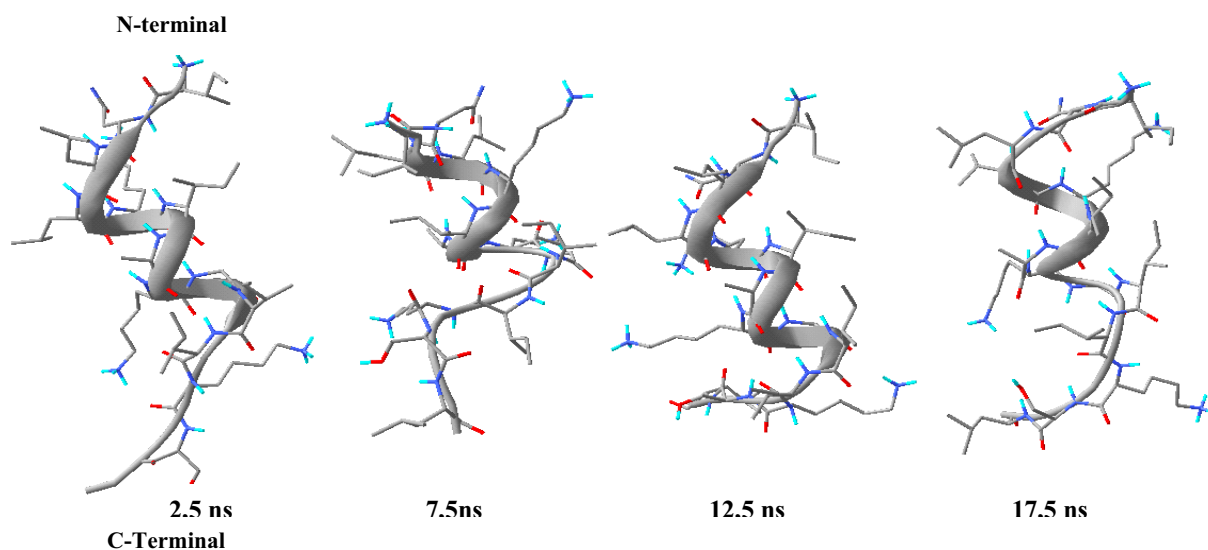


Figura 3.19: Representação das conformações obtidas em diferentes tempos da dinâmica. As cadeias principais estão representadas por uma fita cinza, a parte mais grossa da fita representa os resíduos na conformação de hélice- α .

Essa afirmação pode ser confirmada pela análise dos ângulos diedrais e das ligações de hidrogênio. Na figura 3.20 apresentamos as trajetórias correspondentes aos ângulos diedrais ϕ e ψ dos resíduos 7 ao 10.

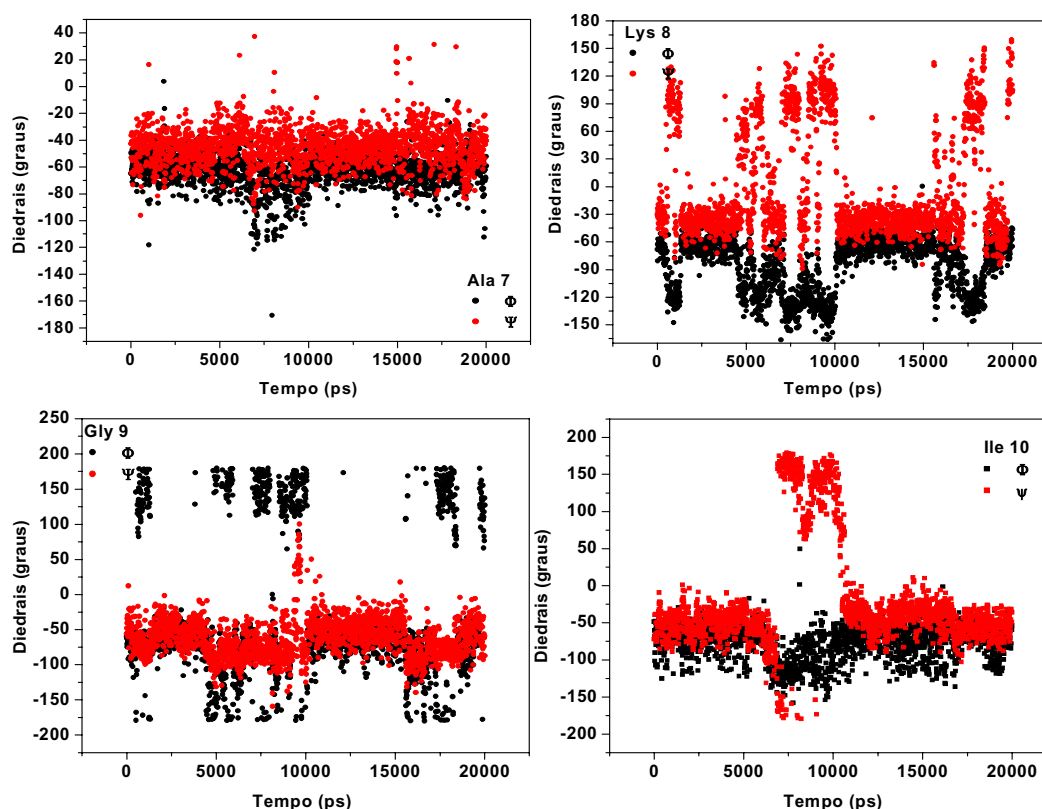


Figura 3.20: Gráficos de ϕ e ψ ao longo da dinâmica, para os resíduos Ala 7, Lys 8, Gly 9 e Ile 10.

Para a Ala 7, os valores de ϕ variam em torno de -60° e os valores de ψ variam em torno de -43° , ângulos típicos de conformação em hélice- α . No caso da Lys 8, nos intervalos de 5 a 10 ns e de 15 a 20 ns, ϕ e ψ desviam dos valores típicos da hélice- α . Nestes intervalos o mesmo ocorre para a Gly 9 e para a Ile 10. Isso está coerente com os resultados do gráfico de padrões (fig. 3.16) e, como veremos posteriormente com os

padrões de ligações de hidrogênio do tipo n-n+4. Nos intervalos apontados os ângulos ϕ e ψ estão distribuídos na região dos valores de folha- β “permitida”.

Na figura 3.21 mostramos os valores de (ϕ e ψ) para os resíduos Ile 11, Lys 12 e Ser 13. Vê-se que eles oscilam entre a região de hélice- α e folha- β se considerarmos a região “permitida”.

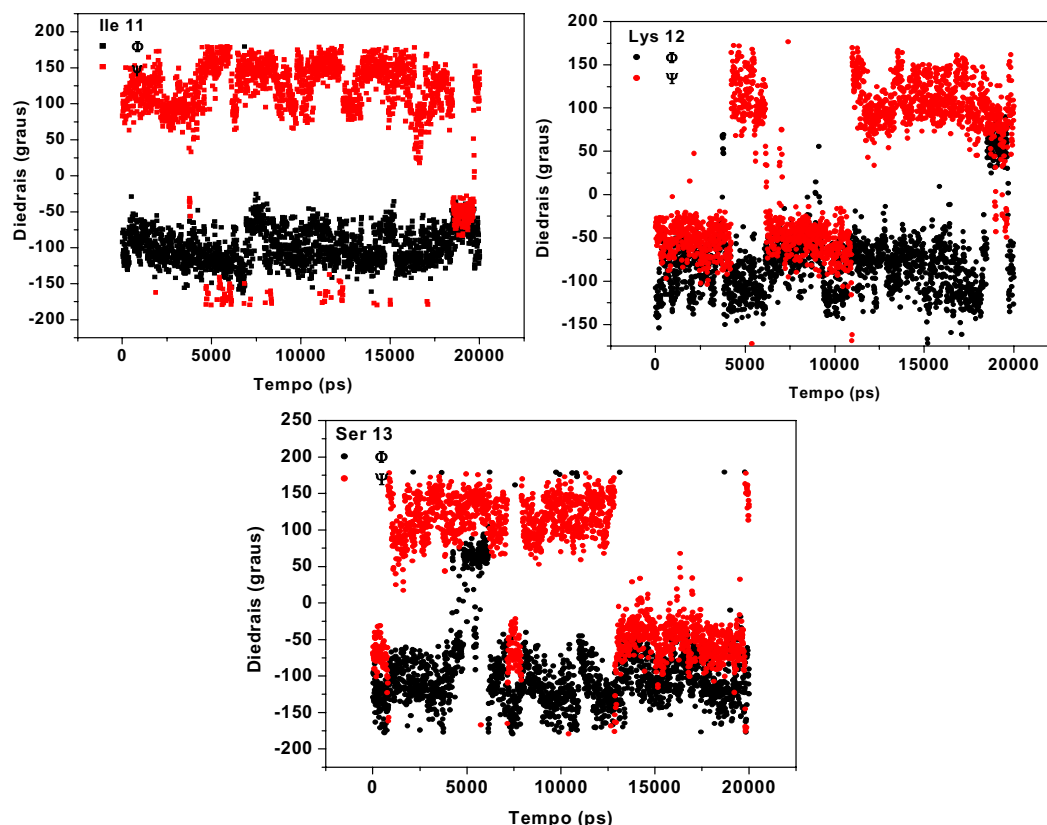


Figura 3.21: Gráficos de ϕ e ψ ao longo da dinâmica, para os resíduos Ile 11, Lys 12 e Ser 13.

A análise das ligações de hidrogênio entre os átomos eletronegativos (N e O) da cadeia principal mostra que as ligações do tipo n-n+4 são encontradas somente entre os resíduos 3 ao 10. Três ligações de hidrogênio são mantidas fixas ao longo da dinâmica, são elas: O da Asn 2 com N da Ile 6 (Tempo de permanência = 73%), O da Leu 3 com N da Ala 7 (Tempo de permanência = 94%) e O da Leu 4 com N da Lys 8 (Tempo de permanência = 90%). Na figura 3.22 apresentamos o gráfico do número de ligações de hidrogênio do tipo n – n+4 ao longo do tempo. Novamente está explícito o comportamento revelado pelos demais dados já discutidos, ou seja, nos intervalos ~5 a 10 ns e ~15 a 18 ns o número de

ligações de hidrogênio $n-n+4$, que caracterizam o padrão de hélice- α , diminuem pela metade em relação ao restante da dinâmica.

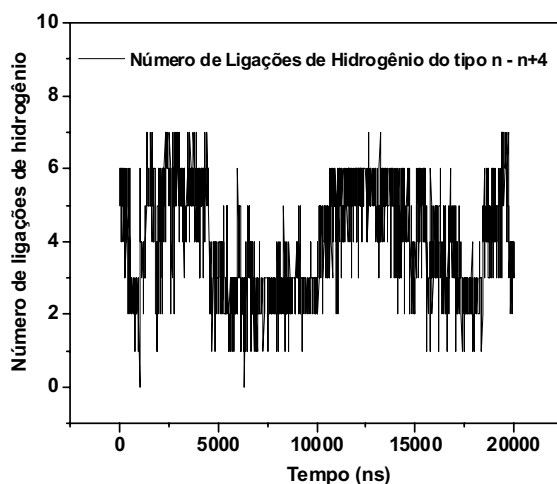


Figura 3.22: Gráfico do número de ligações de hidrogênio, do tipo $n - n+4$, entre os átomos eletronegativos (N e O) da cadeia principal do peptídeo.

As ligações de hidrogênio que não são estáveis nesses períodos são entre O da Lys 5 com N da Gly 9, O da Ile 6 com N da Ile 10 e O da Ala 7 com N da Ile 11, como revelam os resultados sobre a existência (1) ou não (zero) mostrados na figura 3.23 .

Por outro lado, diferentemente dos resultados para o EMPAF-NH₂, não encontramos ligações de hidrogênio do tipo $n-n+4$ entre os resíduos Ile 1 e Lys 5, Gly 9 e Ser 13 e Ile 10 e Leu 14. O que confirma a exclusão destes resíduos da porção helicoidal. A ligação de hidrogênio entre O da Lys 5 com N da Gly 9 (figura 3.23a) apresenta um percentual temporal de existência de 49%, ou seja metade do tempo da dinâmica formada e a outra metade não. No intervalo de tempo de 5 a 10 ns esta ligação não está formada, assim como no intervalo de 0 a 1,5 ns e de 17,3 a 18,5 ns. Observamos para a ligação entre O da Ile 6 com N da Ile 10 (figura 3.23b) que, em média, nos intervalos 5 a 10 ns e de 15 a 20 ns, pode ser considerada instável e nos demais intervalos, se estabiliza. Seu percentual temporal de existência é de 51%, condizente com a sua sobrevivência nos intervalos. O mesmo acontece com a ligação entre O da Ala 7 com N da Ile 11 (figura 3.23c), que nos intervalos de 5 a 10 ns e de 15 a 20ns não é formada e nos outro dois intervalos é formada e estável, apresentando um percentual temporal de existência de 41%. A ligação de

hidrogênio entre o O da Lys 8 com N da Lys 12 não é formada em nenhum momento ao longo da dinâmica. Não encontramos ligações de hidrogênio do tipo $n-n+4$ entre os resíduos Ile 1 e Lys 5, Gly 9 e Ser 13 e Ile 10 e Leu 14. O que confirma a exclusão destes resíduos da porção helicoidal.

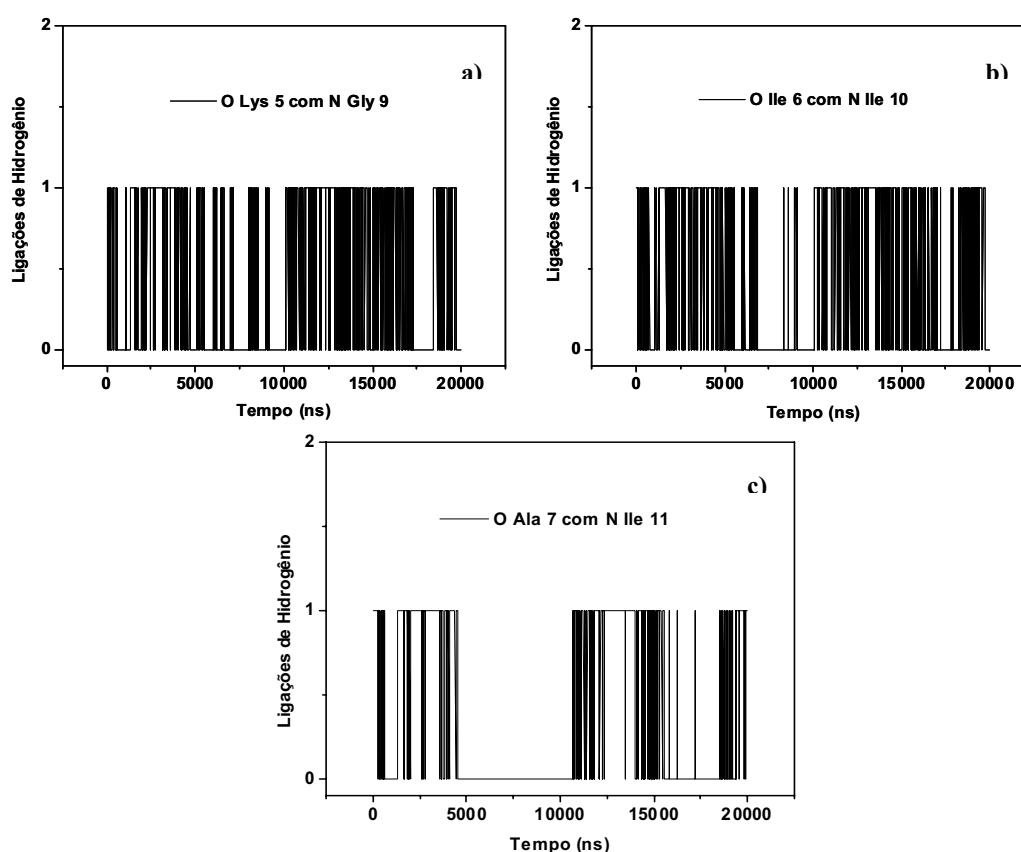


Figura 3.23: Gráfico das ligações de hidrogênio entre os átomos eletronegativos (N e O) da cadeia principal dos resíduos O Lys 5 com N Gly 9 (a), O Ile 6 com N Ile 10 (b) e O Ala 7 com N Ile 11 (c).

Análise das distâncias entre as cargas das cadeias laterais:

Considerando que a única modificação introduzida em relação ao EMPAF-NH₂ foi a desamidação do C-terminal, o que implica no carregamento do grupo carboxila desse terminal, ou à introdução de uma carga negativa nesse extremo do peptídeo. Isso introduz uma variação na distribuição de cargas no peptídeo, o que sugere que devemos analisar a relevância das interações eletrostáticas entre os grupos carregados e polares. Isso pode ser feito por meio da análise das distâncias entre estes grupos. No caso os grupos carregados

são NH_3^+ , Lys 5, Lys 8 e Lys 12 (cargas positivas), o O^- do C-terminal (carga negativa) e os grupos polares Ser 13 e Asn 2.

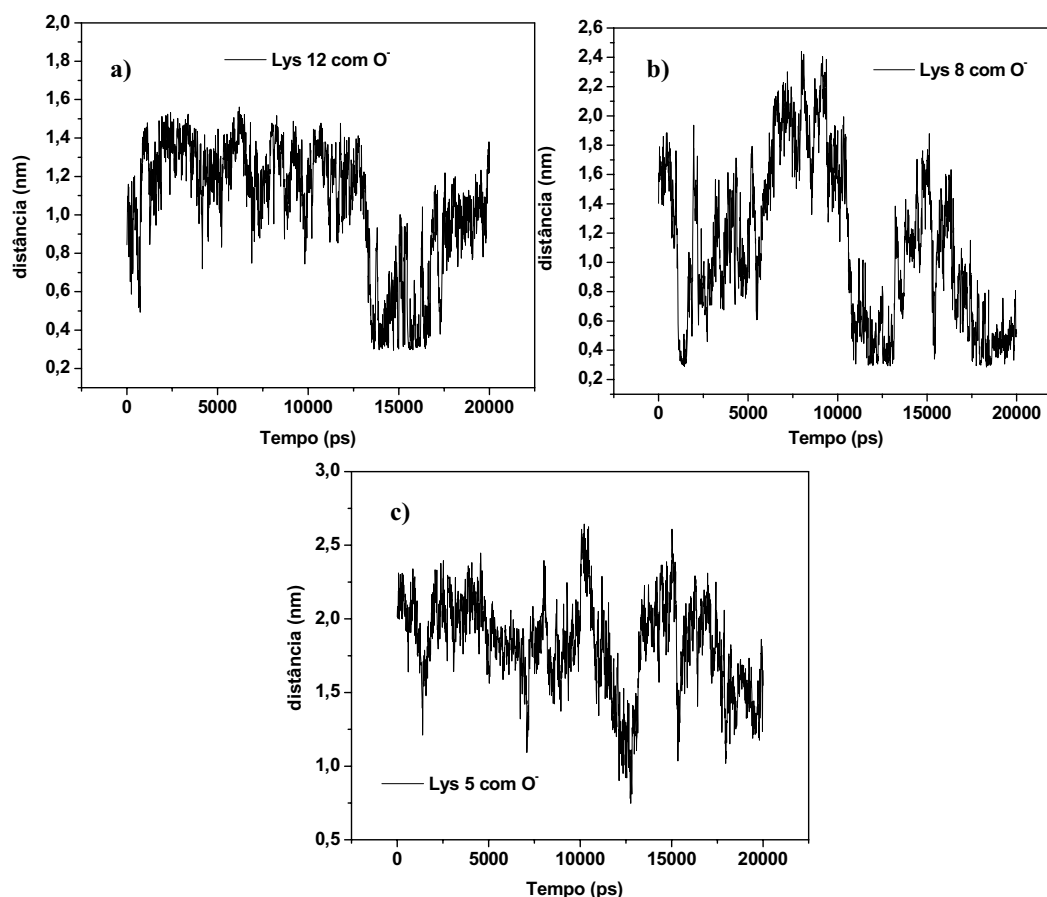


Figura 3.24: Gráficos das distâncias entre as lisinas e a carga O^- do C-terminal. Em a) mostramos a distância entre a carga da Lys 12 e a carga O^- do C-terminal. Em b), a distância entre a carga da Lys 8 e a carga O^- do C-terminal. Em c), a distância entre a carga da Lys 5 e a carga O^- do C-terminal.

Na figura 3.24 estão mostradas as trajetórias das distâncias dos grupos NH_3^+ das lisinas 12 (a), 8 (b) e 5 (c) com o O^- do C-terminal. Para avaliar o papel da interação deve-se ter em mente as distâncias médias entre estes mesmos grupos com o grupo amida na simulação do EMPAF- NH_2 , ou seja, $(11 \pm 1,8) \text{ \AA}$, $(14,7 \pm 2,2) \text{ \AA}$ e $(18 \pm 2,7) \text{ \AA}$, respectivamente, com Lys 12, Lys 8 e Lys 5. Comparando esses valores médios com os valores instantâneos da simulação do EMPAF-OH, vê-se que, em média, há uma aproximação destes grupos com a carga negativa. A liberdade conformacional representada pela Gly 9 promove a aproximação da carga negativa com as lisinas 8 e 12. Da figura 3.24b

vê-se que nos primeiros 5 ns a aproximação ocorre entre a lisina 8 e o terminal negativo. No intervalo entre 5 e 10 ns, no qual a estrutura helicoidal dos resíduos 8 a 10 é perdida estes grupos estão distantes. A hélice- α mantida dos resíduos 3 ao 10 nos 5 ns subsequentes está correlacionada com a distancia entre o terminal carregado negativamente e as lisinas 8 e 12 de forma complementar. Nesse sentido parece razoável afirmar que a interação eletrostática entre a carga das lisinas 8 e 12 com a carga negativa do C-terminal é fundamental para a manutenção e uma porção maior de hélice no peptídeo. A aproximação entre estes grupos favorece a conformação dos demais resíduos (de 11 a 14) que oscilam com valores de ϕ e ψ que varrem toda a região generosamente permitida do mapa de Ramachandran e, nesse sentido são classificados como em conformação aleatória.

Macro-dipolo da hélice:

O macro-dipolo da hélice foi calculado apenas dos resíduos que estão em hélice ao longo da dinâmica. Na figura 3.25 observamos o gráfico do momento de macro-dipolo da hélice, que tem seu valor médio igual a 0,5 nm e de 0 a 5 ns; 0,4 nm e de 5 a 10 ns; 0,56 nm e de 10 a 15 ns; e 0,45 nm e de 15 a 20 ns. Estas oscilações mostram que o peptídeo tem o valor do macro-dipolo da hélice diminuído a medida que alguns resíduos saem da conformação helicoidal. O aumento no valor do macro-dipolo médio em determinados intervalos se deve a um melhor alinhamento dos dipolos das ligações peptídicas dos resíduos 7 e 8, 8 e 9 e 9 e 10.

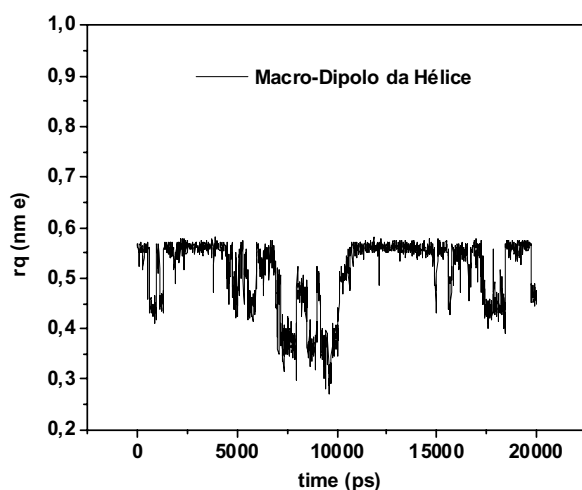


Figura 3.25: Gráfico do Macro-dipolo da hélice do peptídeo EMP-AF-O⁻ ao longo da dinâmica.

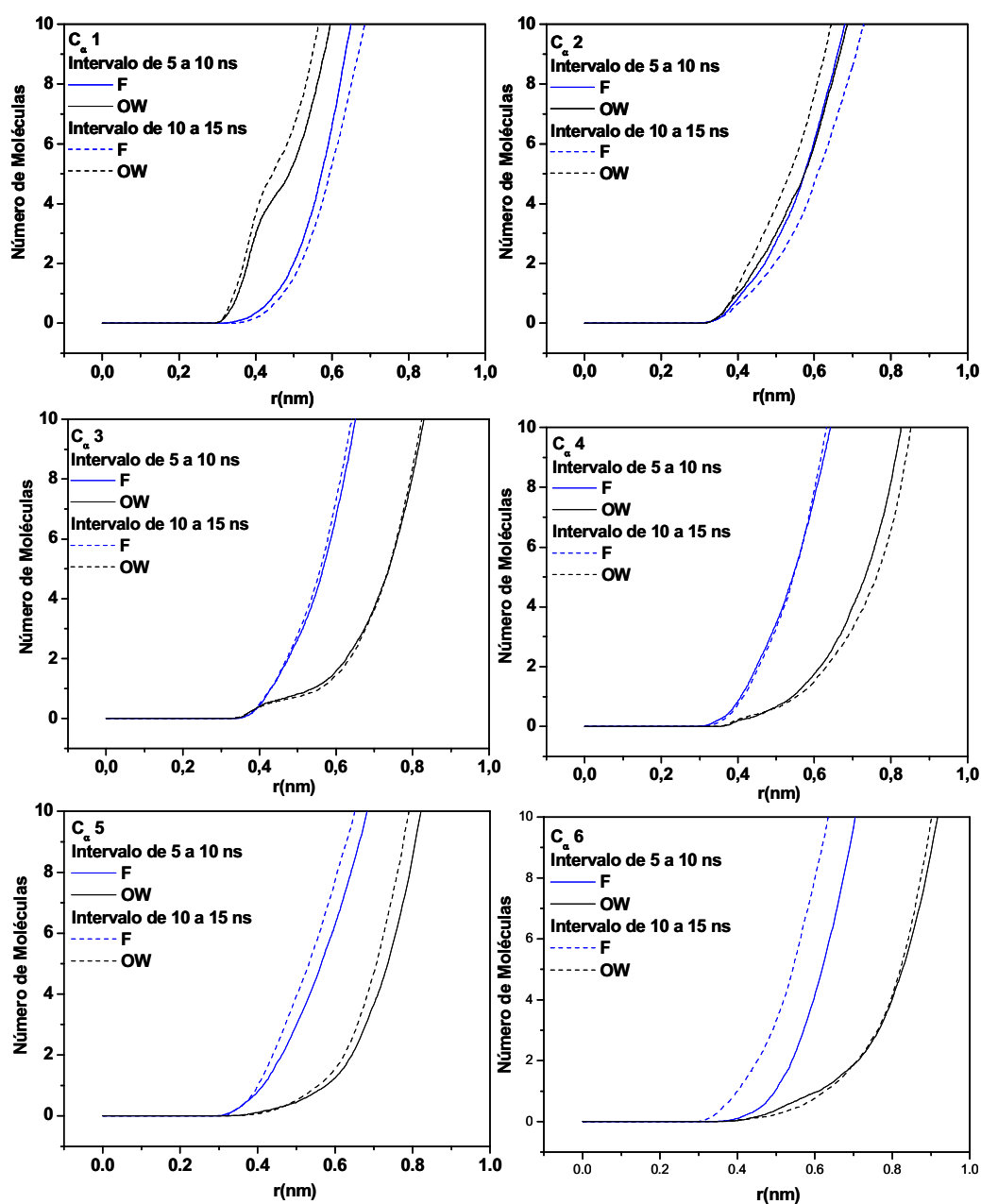
Perfil de Solvatação:

A análise do perfil de solvatação das cadeias laterais do peptídeo revela aquilo que se esperava, ou seja, os resíduos carregados e/ ou polares são solvatados preferencialmente por moléculas d'água, enquanto os resíduos hidrofóbicos têm predominância de grupos flúor do TFE voltados para eles. Isso foi observado das curvas do número de grupos (água, por meio do oxigênio ou flúor, por meio do centro de massa dos três átomos de flúor do TFE) contidos no volume esférico de raio r a partir do átomo ou grupo de átomos escolhido no resíduo, as curvas RIN vs r .

Nos gráficos da figura 3.26 apresentamos as curvas de RIN para os carbonos- α de todos os resíduos do EMP-AF-OH. Como a distância média entre dois C_α na cadeia é de aproximadamente 4 Å e para minimizar o efeito da contagem de um mesmo grupo para mais de um C_α tomamos como base da análise a distancia $r = 5$ Å restringindo a análise aos resíduos ímpares. Apesar disso apresentamos as curvas RIN como função de r para todos os resíduos, com as quais é fácil comprovar que as conclusões não se alteram se ao invés dos ímpares tomarmos os resíduos pares. Para cada resíduo dois pares de curvas são apresentados e eles correspondem aos intervalos de tempo de 5 a 10 ns (curvas contínuas) e de 10 a 15 ns (curvas tracejadas).

O primeiro resíduo contém um grupo NH_3^+ e está solvatado por água numa razão de 2:6 (TFE:água), o que era esperado tanto pelo fato resíduo ser carregado como da liberdade conformacional de que ele goza. Os resíduos 3, 5, 7, 9 e 11 são solvatados preferencialmente pelos grupos flúor do TFE. As razões aproximadas para cada caso são: C_α 3 (3:1); C_α 5 (3,7:0,8) e C_α 7 (3,7:1,1) no intervalo de 5 a 10 ns e (3,7:0,2) no intervalo 10 a 15 ns; C_α 9 (5:2) e C_α 11 (2,8:1,8) no intervalo 5 a 10 ns e (2,8:1) no intervalo 10 a 15 ns. O C_α 13, por outro lado, é solvatado por água na relação 2:4. Estes dados são coerentes com as demais análises realizadas nesta seção. Os perfis de solvatação dos resíduos 3 e 5 são coerentes com os tempos de permanência das ligações de hidrogênio entre os resíduos 3-7, 4-8 que persistem por quase a totalidade da dinâmica e mantém os resíduos de 3 a 7 na conformação helicoidal durante toda a integração. A queda nessa proporção verificada para o C_α 7 no intervalo de 5 a 10 ns está correlacionado com a desestruturação da hélice- α dos resíduos 8 a 10 e isso é o que se verifica nas curvas de existência de ligação de hidrogênio entre os resíduos 7 e 11. No intervalo de 10 a 15 ns, por outro lado, essa ligação está

formada e a proporção TFE:água corrobora isso. O C_{α} 9, uma glicina, resíduo com baixa propensão a conformação helicoidal, apresenta o perfil de solvatação acima por estar ladeado pela esquerda por uma lisina (Lys 8) que, apesar do grupo carregado possui cadeia lateral longa, com quatro grupos metilênicos e do lado direito uma isoleucina (Ile10) que é hidrofóbico. Apesar desse perfil a ligação de hidrogênio o O da Lys 5 e o N da Gly 9 permanece formada somente no segundo dos intervalos acima. A relação TFE:água para o C_{α} 13 é coerente com o fato da desestruturação ocorrida com o C-terminal do peptídeo e com o fato dele ser um resíduo polar.



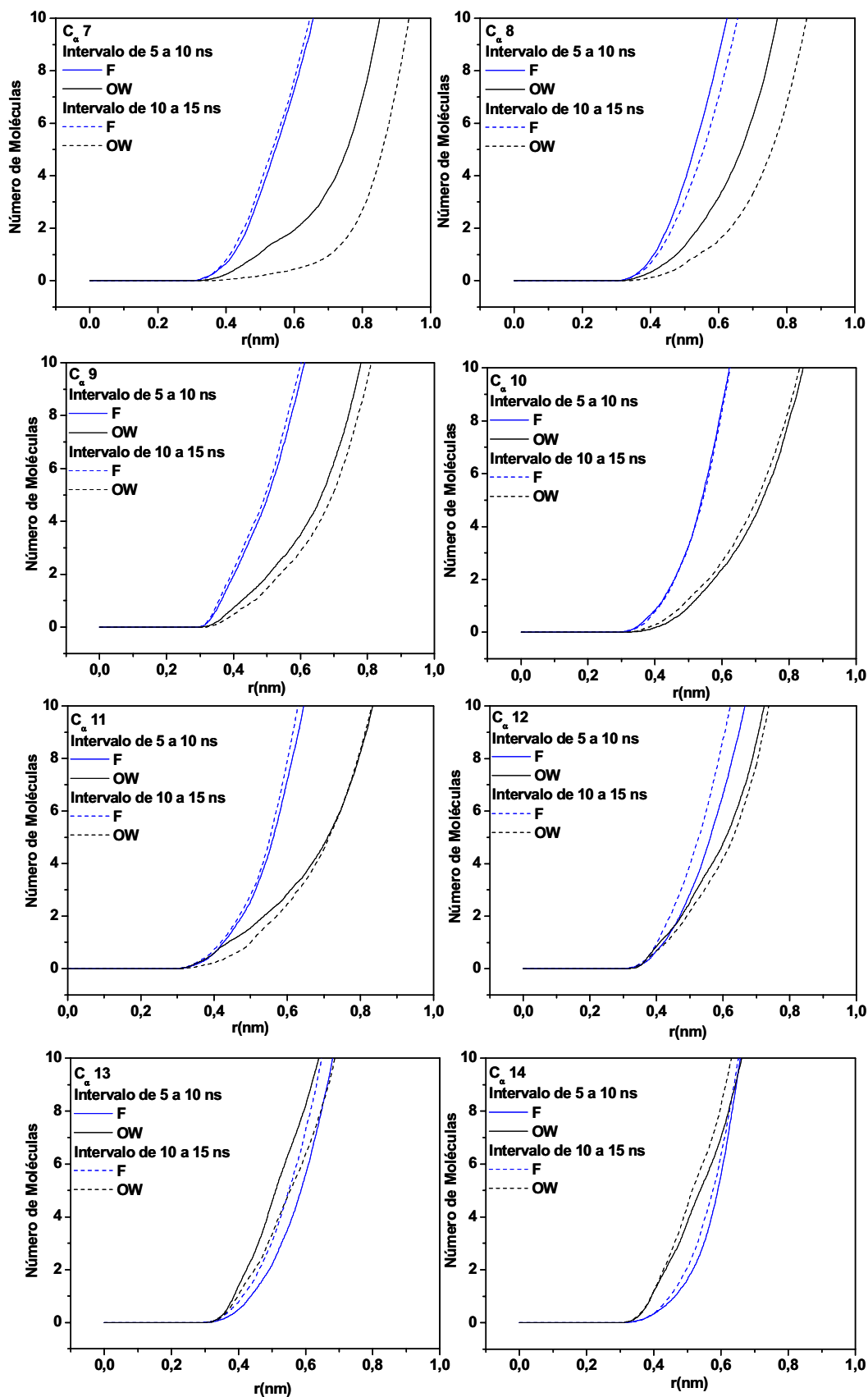


Figura 3.26: Gráficos das curvas de RIN para o EMP-AF-OH durante os intervalos de 5 a 10 ns (linha contínua) e de 10 a 15 ns (linha tracejada). Em preto apresentamos as curvas de RIN entre os C_{α} s e os átomos de oxigênio (OW) das moléculas de água. Em azul, as curvas de RIN entre os C_{α} s e os centros de massas entre os três átomos de flúor (F) das moléculas de TFE.

Confronto com dados da literatura

Assim como para o EMP-AF-NH₂ os dados estruturais existentes na literatura para o análogo EMP-AF-OH são de dados de CD e RMN. O percentual de hélice- α , em misturas TFE-água na proporção (40:60) é 22% (Cabrera et al.; 2004) e em (30:70) é 29% Sforça et al.; 2004). Em ambiente aniônico, como na presença de micelas de SDS (8 mM), estes autores reportam 29% e 31%, respectivamente.

Os resultados da dinâmica discutidos nesta seção mostram uma hélice- α estável entre os resíduos 3 e 7, ou seja, uma fração de aproximadamente 36%, que está coerente com os dados acima. Porém existem intervalos em que esse percentual cresce para 57%, quando os resíduos de 8 a 10 se tornam parte da hélice.

Sforça e colaboradores (2004) obtiveram também a estrutura desse peptídeo por RMN. A conclusão sobre a estrutura do peptídeo é que ela seria uma hélice- α entre os resíduos 3 e 8 (percentual de 43%), com um conjunto de quatro tipos de conformações entre os resíduos 10 e 14, articulados pela Gly 9. Os autores apresentam também dados de DM que suportam estas conclusões.

Como dos resultados acima não pudemos aferir com segurança nenhum padrão para a região dos resíduos de 10 a 14, convém destacarmos algumas diferenças entre as dinâmicas: 1) o número de moléculas de solvente utilizada neste trabalho é superior à usada no trabalho referido (~202 para 64 moléculas de TFE e 1893 para 804 moléculas de água); 2) a estrutura inicial que utilizamos foi a estrutura de RMN publicada pelos autores enquanto eles usaram uma hélice- α ideal como estrutura inicial; 3) os autores usaram um raio de corte de 0,8 nm para as interações de curto alcance, enquanto aqui usamos um raio de corte de 1,4 nm; 4) os autores usaram o campo de forças do GROMACS com todos os átomos de hidrogênio tratados explicitamente, enquanto aqui foi utilizado o campo de forças com átomo unido e 5) o tempo total de simulação foi de 5 ns no trabalho referido e neste trabalho de 20 ns.

Nos resultados apresentados na seção 3.2, a simulação do EMP-AF-NH₂ em água, iniciando a dinâmica da estrutura helicoidal, mostrou que a cadeia começa a se desestruturar somente por volta de 5 ns, mantendo até esse instante, praticamente, todos os resíduos em hélice.

Uma simulação de 20 ns foi realizada, utilizando como estrutura inicial a hélice- α do EMP-AF-NH₂, mas com o C-terminal desamidado, isto é, com o grupo amida NH₂ clivado e com o grupo carboxila remanescente carregado negativamente. O restante do protocolo é o mesmo descrito nesta seção. O gráfico de padrões para essa dinâmica está reproduzido na figura 3.27.

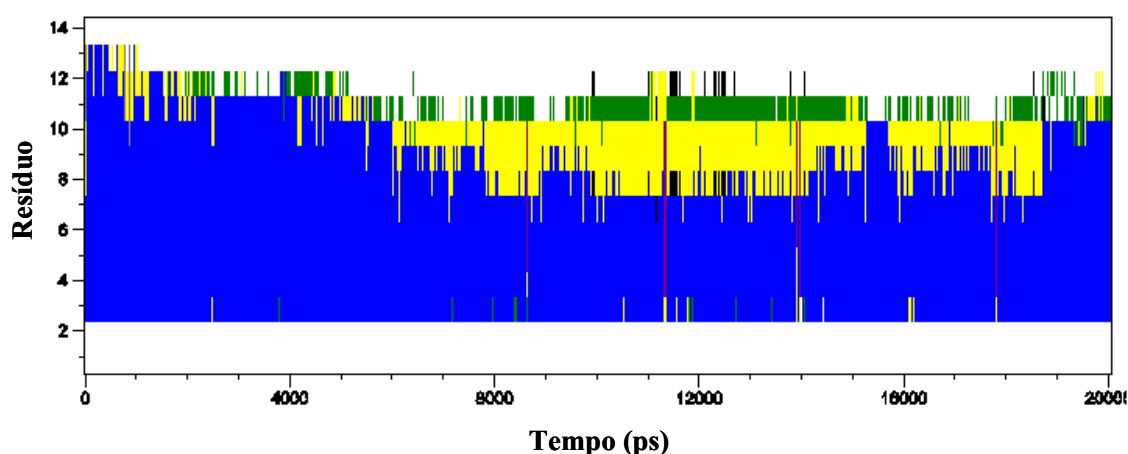


Figura 3.27: Padrões de estruturas secundárias por resíduo, ao longo da dinâmica, para o EMP-AF carboxilado. Em branco, resíduos em conformação aleatória (“coil”); em verde, resíduos em curvas (“bend”); em amarelo, resíduos em voltas (“turn”); em roxo, resíduos em hélice-5; em preto, resíduos em folha- β e em azul, resíduos em hélice- α .

Da figura é evidente que: (1) os resíduos 3 a 7 se mantêm em conformação de hélice- α durante a dinâmica; (2) cerca de 5 ns são necessários para os resíduos de 8 a 11 comecem a se desestruturar e (3) os resíduos de 8 a 11 têm considerável liberdade conformacional, retornando com o tempo à conformação helicoidal. A análise poderia proceder no mesmo sentido daquela apresentada nesta seção. Na sua essência qualitativa, no entanto, elas são equivalentes.

Tanto os resultados da dinâmica molecular quanto os resultados de RMN concordam na manutenção da estrutura helicoidal entre os resíduos 3 a 7, seja a dinâmica curta, 5 ns (Sforça et al.; 2004) ou as mais longas mostradas neste trabalho.

3.5 Discussão e Conclusões

No capítulo 1 e na introdução deste capítulo enfatizamos a estrutura helicoidal anfipática como sendo uma característica fundamental para o modo de ação de muitos peptídeos antimicrobianos, em particular os pertencentes à família dos Mastoparanos extraídos do veneno de vespas. Particularmente discutiu-se que a amidação do C-terminal é fundamental para justificar as características antimicrobianas e hemolíticas do EMP-AF. O mecanismo de ação com membranas parece ser o de efeito detergente, ou seja, há uma acumulação de peptídeos que vão gradativamente perturbando a estrutura da bicamada lipídica (afinamento) até que a mesma se rompa, deixando vazar moléculas fundamentais à sua manutenção. Nesse mecanismo os peptídeos são alinhados com seus eixos paralelos à membrana e serão tanto mais eficientes quanto mais se aprofundarem para o interior da bicamada lipídica. Por isso é fundamental o caráter helicoidal e anfipático, pois a face hidrofóbica ficará “enterrada” no interior da bicamada, que também é hidrofóbica, enquanto a face hidrofílica, catiônica, interage com as cabeças polares, sejam elas zwitterionicas ou aniônicas. Nesse sentido, conceitos como helicidade, anfipaticidade, hidrofobicidade, ângulo polar, amidação do C-terminal são utilizados na análise.

Propusemos também a discussão da importância da amidação do C-terminal, utilizando o Mastoparano EMP-AF, ambos na forma amidada (EMP-AF-NH₂) ou na forma carboxilada (EMP-AF-O⁻). A forma amidada tem uma eficiência 50% maior para a degranulação de mastócitos de células de rato quando comparado à forma carboxilada, em 10⁻⁵ M. Em eritrócitos humanos a forma carboxilada não apresenta qualquer atividade hemolítica, enquanto a forma amidada é hemolítica (Konno et al.; 2000, Cabrera et al.; 2004).

A perda de atividade antimicrobiana e hemolítica pelo EMP-AF-OH está associada à redução do conteúdo helicoidal, à diminuição da anfipaticidade. De fato, as simulações realizadas neste capítulo mostraram que:

(1) Para o EMP-AF-NH₂ o conteúdo helicoidal é alto, entre os resíduos 3 a 14, a anfipaticidade está bem caracterizada nas faces hidrofóbica e hidrofílica, a cadeia principal é solvatada preferencialmente por grupos CF₃ do TFE, o que permite que a rede de ligações de hidrogênio n-n+4 mantenha a hélice- α e sugere uma forte interação com a parte hidrofóbica da membrana lipídica. A glicina não possui cadeia lateral e por isso apresenta grande liberdade conformacional e permite a exposição dos átomos eletronegativos da cadeia principal ao solvente. Essas características fazem da glicina um resíduo “desestabilizador” de hélices em solvente polar como a água. Resíduos polares e ou carregados interagem favoravelmente com o solvente polar e também tem essa característica por que o solvente polar pode também interagir com a cadeia principal. Uma exceção é a lisina por causa dos quatro grupos metilênicos da cadeia lateral. A sequência primária do EMP-AF apresenta dois blocos com características distintas para essa abordagem. Os resíduos de 3 a 8 (Leu 3 – Leu 4 – Lys 5 – Ile 6 – Ala 7 – Lys 8) interagem com solvente polar de forma desfavorável, protegendo as ligações de hidrogênio da cadeia principal (as lisinas pela presença dos grupos metilênicos), enquanto os resíduos de 9 a 14 (Gly 9 – Ile 10 – Ile 11 – Lys 12 – Ser 13 – Leu 14) têm tendência contrária. É por isso que em solução aquosa essa parte da hélice é que se desestrutura primeiro, como vimos na seção 3.2. Apesar da presença do grupo amida no C-terminal, que permite aumentar a rede de ligações de hidrogênio e, potencialmente, favorece a estruturação em hélice, em solvente aquoso a presença da glicina, das isoleucinas e da serina (polar) induzem a desestruturação do peptídeo. Em misturas TFE-água a solvatação da cadeia principal por grupos CF₃ protege em parte a rede de ligações de hidrogênio e a presença do grupo amida no C-terminal, com mais uma ligação (O da Ile 11 com o NH₂) estabiliza a conformação em hélice- α do resíduo 3 ao 14. Esse comportamento pode ser visto tanto dos gráficos de RIN como da evolução temporal do macro-dipolo da hélice (figura 3.10) que cresce com a aproximação da estrutura do peptídeo da hélice ideal.

(2) Para o EMP-AF-OH encontramos uma fração de resíduos em hélice relativamente baixo, do resíduo 3 ao 7, a idéia de anfipaticidade está comprometida, embora o perfil de solvatação das cadeias laterais ainda apresente preferência por grupos CF₃ entre os resíduos 3 ao 10. Nesse sentido pode-se dizer que a hidrofobicidade associada ao peptídeo é baixa comparada à molécula amidada. O macro-dipolo da hélice, coerente

com estes dados, tem valor um terço menor comparado ao caso amidado e reflete, num certo sentido, a interação eletrostática dele próprio com o grupo carboxílico COOH. Dinamicamente, partindo da estrutura em hélice, a presença desse grupo quebra inicialmente as ligações de hidrogênio entre os aminoácidos próximos a ele e inicia um lento processo de desestruturação da hélice, acompanhado de uma aproximação do grupo COOH dos grupos NH_3^+ das cadeias laterais das lisinas (8 e 12). Estas “pontes salinas”, que persistem por períodos significativos da simulação, estabilizam a estrutura em hélice- α com os resíduos 8, 9 e 10.

Estas diferenças de estrutura e comportamento dinâmico sugerem, por que o ambiente de simulação é só uma mimetização de uma membrana lipídica, uma explicação para o comportamento biológico dos dois análogos. Considerando o mecanismo de ação do tipo detergente, ou de permeabilização da membrana, o EMP-AF-NH₂ devido a estrutura em hélice- α longa, estável, anfipática, com interação favorável ao ambiente hidrofóbico das caudas lipídicas e hidrofílico das cabeças polares, interage com a membrana enterrando a parte hidrofóbica nesta e fazendo interagir os grupos carregados das lisinas com as cabeças polares dos lipídeos. Dessa forma, o peptídeo potencializa sua capacidade de deformar a membrana e a partir de certa concentração de peptídeos passa a permeabilizá-la. O EMP-AF-OH, ao contrário, devido a pequena fração de resíduos em hélice, por apresentar parte dos resíduos em conformação aleatória, tem sua anfipaticidade comprometida e interage desfavoravelmente com a membrana e, em concentrações similares ao do análogo amidado, não produz a permeabilização da membrana, portanto, não apresenta o comportamento antimicrobiano, não apresenta atividade hemolítica e não desgranula mastócitos.

Capítulo 4 – Análise Estrutural do MP-X e Paulista-MPI

4.1 Introdução

O peptídeo PAULISTA-MPI (MP-I) é extraído do veneno de vespa social *Polybia Paulista* (Souza et al., 2005), têm 14 resíduos de aminoácidos, é encontrado na forma amidada, apresenta atividade antimicrobiana, de degranulação de mastócito e não apresenta atividade hemolítica. Sua seqüência primária é muito parecida com a seqüência de outros mastoparanos, tais como MP e MP-X (tabela 4.1). As cargas positivas do MP-I são localizadas nas posições 4, 5 e 11, além do N-terminal, e apresenta como particularidade dois resíduos carregados negativamente (Asp), nas posições 2 e 8, tornando a carga líquida deste peptídeo igual a +2. O MP e MP-X são catiônicos com carga +4 devido as lisinas 4, 11 e 12 e o N-terminal. Na posição 2 tanto MP como MP-X têm um resíduo polar a asparagina. Os demais resíduos são todos hidrofóbicos. As coincidências entre os três peptídeos são Ile 1, Lys 4, Ala 10, Lys 11 e Leu 14.

MP	Ile-Asn-Leu-Lys-Ala-Leu-Ala-Ala-Leu-Ala-Lys-Lys-Ile-Leu-NH ₂
MP-X	Ile-Asn-Trp-Lys-Gly-Ile-Ala-Ala-Met-Ala-Lys-Lys-Leu-Leu-NH ₂
PAULISTA-MPI	Ile-Asp-Trp-Lys-Lys-Leu-Leu-Asp-Ala-Ala-Lys-Gln-Ile-Leu-NH ₂

Tabela 4.1: Seqüência primária dos mastoparanos MP, MP-X e MP-I. Em azul, são representados os resíduos carregados positivamente. Em vermelho, os resíduos carregados negativamente. Em preto, os resíduos hidrofóbicos. Em verde, os resíduos polares.

Os peptídeos MP e MP-X são conhecidos por apresentarem atividade antimicrobiana e hemolítica, além de outras citadas no capítulo 1 (seção 1.3). Estes peptídeos apresentam conformação em hélice- α anfipática na presença de membranas aniônica, zwitteriônicas e em ambientes como misturas de TFE e água. Na figura 5.1 apresentamos as estruturas obtidas por RMN para o MP ligado à membrana lipídica (código no PDB: 1d7n - Hori et al., 2001), e para o MP-X ligado a proteína G (código no PDB: 1a13 - Kusunoki et al., 1998). O MP e MP-X são catiônicos com carga +4 devido as lisinas 4, 11 e 12 e o N-terminal. Na posição 2 tanto MP como MP-X têm um resíduo polar a Asn.

Os demais resíduos são todos hidrofóbicos. As coincidências entre os três peptídeos são Ile 1, Lys 4, Ala 10, Lys 11 e Leu 14.

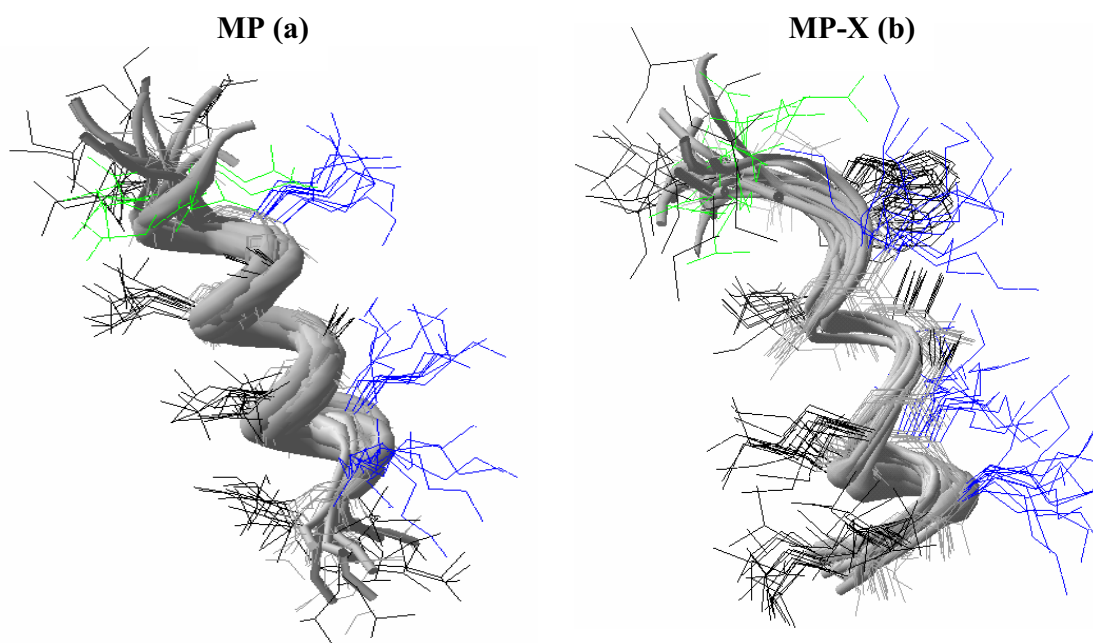


Figura 4.1: Sobreposição das 10 estruturas encontradas para o MP (a) por RMN ligado à membrana lipídica e a sobreposição das 14 estruturas do MP-X (b) encontradas por RMN, ligado a proteína-G. Em cinza estão os resíduos das cadeias principais, as fitas marcam as estruturas helicoidais. Em azul estão os resíduos carregados positivamente (Lys 4, Lys 11 e Lys 12 em ambos peptídeos). Em verde está o resíduo polar de Asn 2 (também para ambos peptídeos). Em preto, são os resíduos hidrofóbicos (Ile 1, Leu 3, Ala 5, Leu 6, Ala 7, Ala 8, Leu 9, Ala 10, Ile 13 e Leu 14 para o MP e Ile 1, Trp 3, Gly 5, Ile 6, Ala 7, Ala 8, Met 9, Ala 10, Leu 13 e Leu 14 para o MP-X)

A fita cinza mais grossa representa os resíduos que estão em hélice- α , a mais fina mostra os resíduos que estão próximos da região de hélice- α ou em conformação aleatória. Não existem informações estruturais de raio-X e RMN a respeito da conformação do MP-I. Sabemos apenas que este apresenta percentuais de estrutura helicoidal comparável a ambos MP e MP-X, entretanto sua atividade biológica em membranas zwitteriônica (ou vesículas de PC) é nula.

Dados de fluorescência de triptofano obtidos para o MP-I (dos Santos Cabrera, 2006) e para o MP-X (Matsuzaki et al., 1996b) mostram que o Trp 3 do MP-I não se desloca para a interface nem para o interior hidrofóbico de vesículas zwitteriônicas,

diferente do MP-X que se liga e se localiza próximo à superfície da vesícula, sugerindo que sua cadeia principal atinja o centro hidrofóbico da bicamada (ver também Whiles et al., 2001).

Neste capítulo nosso objetivo é propor uma estrutura para o MP-I num meio anfipático como o de misturas de TFE-água e a partir dela discutir os fatores que a estabilizam e do estudo da solvatação nesse meio sugerir uma explicação para a baixa eficácia da interação do MP-I com membranas zwitteriônicas e, conseqüentemente, para a baixa atividade hemolítica do peptídeo (Souza et al., 2005).

4.2 Métodos

A primeira cadeia das 14 obtidas por RMN do MP-X ligada a proteína G (Kusunoki et al., 1998) foi usada como ponto de partida para ambas simulações, sua conformação helicoidal está representada nas figuras 4.1b. Um sistema contendo o MP-X em 199 moléculas de TFE, 1893 moléculas de água e 4 contraíons de cloro (Cl^-) que neutraliza as 4 cargas positivas; para o MP-I modificamos os resíduos de acordo com sua seqüência solvatamos com 201 moléculas de TFE, 1893 moléculas de água e 2 contraíons de cloro (Cl^-) que neutraliza a carga líquida deste peptídeo (+2). Ambas as caixas são cúbicas com dimensões iniciais de 4.5nm e foram submetidas à simulação por DM de 20 ns, nas mesmas condições e parâmetros discutidos no capítulo 2.

Para os dois peptídeos, o N-terminal foi tratado como um grupo carregado positivamente (NH_3^+) e o C-terminal amidado. Além disso, em ambos os casos as lisinas foram carregadas e no caso do MP-I o ácido aspártico foi carregado negativamente.

4.3 Resultados e Discussões

Dados experimentais evidenciam que ambos peptídeos apresentam altos percentuais helicoidais em ambientes anfipáticos, não carregados, como misturas de TFE e água. A conformação do MP-X em ambientes de membrana também já foi resolvida por RMN (Wakamatsu et al., 1992) e este apresenta conformação em hélice- α anfipática do resíduo 3

ao 14. Sugerimos, devido sua similaridade sequencial e dados experimentais (dos Santos Cabrera, 2006), que o MP-I também deva assumir a conformação em hélice- α anfipática.

No gráfico da figura 4.2a apresentamos o RMSD das conformações de ambos peptídeos ao longo da dinâmica com suas respectivas hélices ideais. O RMSD médio para as dinâmicas do MP-X (azul) e MP-I (preto) é aproximadamente 0,25 Å, o que indica que as conformações de ambos peptídeos aproximam-se da hélice ideal. No gráfico da figura 4.2b mostramos o RMSF por resíduo para o MP-X (azul) e para o MP-I (preto). Os resíduos 2 e 12 apresentam variações conformacionais ao longo da dinâmica com o RMSF menor que 1 Å, enquanto os resíduos 1, 13 e 14 apresentam maior liberdade conformacional. Apesar das diferenças residuais das seqüências de 8 a 14 entre o MP-X e MP-I, o comportamento das conformações ao longo da dinâmica apresentam o mesmo padrão de flutuações resultando em estruturas helicoidais anfipáticas.

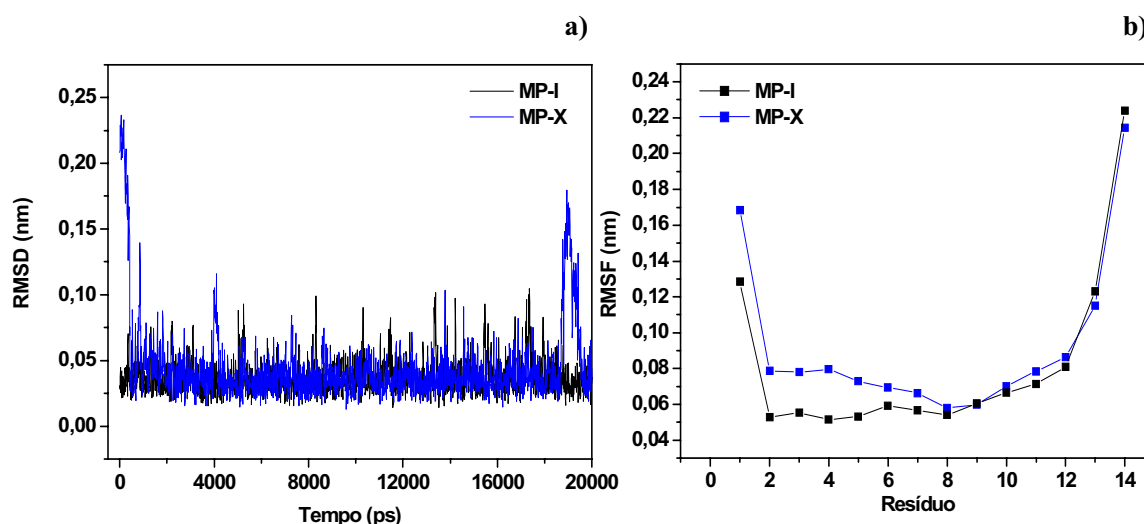


Figura 4.2: Gráficos de RMSD (a) com a hélice ideal e RMSF (b) para ambos peptídeos. Em a) mostramos o RMSD das conformações obtidas ao longo da dinâmica para o MP-X (azul) e MP-I (preto) com suas respectivas hélices ideais. Em b) apresentamos o RMSF por resíduo de ambos peptídeos, em azul para o MP-X e em preto para o MP-I.

Na figura 4.3 temos os gráficos do número de ligações de hidrogênio do tipo n-n+4 para a dinâmica de ambos peptídeos.

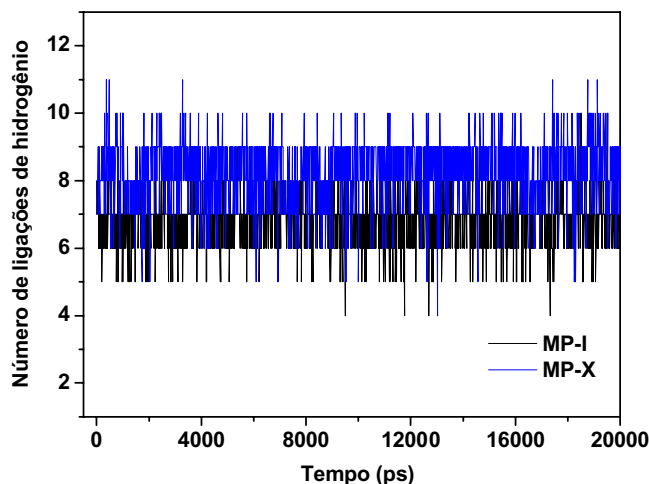


Figura 4.3: Gráfico do número de ligações de hidrogênio do tipo (n-n+4) ao longo da dinâmica. Em azul, temos o gráfico da dinâmica do MP-X. Em preto, o gráfico da dinâmica do MP-I.

Para o MP-X o número médio de ligações de hidrogênio do tipo n-n+4 é aproximadamente 8 e 6,8 para o MP-I. Na tabela 4.2 apresentamos o tempo de permanência das ligações de hidrogênio do tipo n-n+4 ao longo de toda a cadeia principal dos peptídeos.

	1---5	2---6	3---7	4---8	5---9	6---10	7---11	8---12	9---13	10---14	11-NH ₂
MP-X	—	70%	96%	95%	95%	96,1%	93,1%	90%	89%	80%	25,1%
MP-I	—	94%	97,6%	95%	96,3%	98%	94,5%	77%	76%	77%	27,3%

Tabela 4.2: Tempo de permanência (em porcentagem do tempo total da simulação) das ligações de hidrogênio do tipo n-n+4 para a cadeia principal dos peptídeos.

O MP-X apresenta os dois resíduos do N-terminal desestruturados quando em ambientes de membrana e de misturas como TFE e água. A não formação da ligação de hidrogênio entre os resíduos 1 e 5 confirmam a não estruturação do primeiro resíduo do MP-X e sugere que o MP-I também apresente esta característica estrutural que é típica dos mastoparanos. A ligação de hidrogênio entre o O do 2º resíduo e o N do 6º não garante a inclusão do segundo resíduo na região da hélice, apenas engloba o 3º resíduo na conformação helicoidal. Esta ligação de hidrogênio é mais estável para o MP-I devido a

presença de uma outra ligação de hidrogênio entre o grupo carregado da cadeia lateral da Asp 2 e o N da cadeia principal da Lys 5 (tabela 4.3), que por estar 90% do tempo de dinâmica formada, auxilia na fixação dos átomos daquela região. No caso do MP-X a ligação de hidrogênio entre o O da cadeia lateral da Asn 2 ressoa entre o N da cadeia principal da Lys 4 e o N da cadeia principal da gly 5 (tabela 4.3), permitindo que os átomos eletronegativos desta região da cadeia principal do MP-X tenham maior liberdade conformacional e desestabilize a ligação de hidrogênio do resíduo 2 com 6 (n-n+4).

	O (cadeia lateral) 2 -- N (cadeia principal) 4	O (cadeia lateral) 2 -- N (cadeia principal) 5
MP-X	31,2%	59%
MP-I	—	90%

Tabela 4.3: Tempo de permanência (em porcentagem do tempo total da simulação) das ligações de hidrogênio entre as cadeias laterais dos resíduos Asn 2 e Asp 2 com a cadeia principal dos peptídeos MP-X e MP-I respectivamente.

Nos gráficos da figura 4.4 mostramos os diagramas que definem os padrões de estrutura secundária assumida pelos peptídeos ao longo das dinâmicas. O MP-X assume a conformação em hélice- α anfipática, do 3º ao 13º resíduo, logo nos primeiros picosegundos. O MP-I apresenta o mesmo comportamento estrutural, definindo sua conformação helicoidal também do 3º ao 13º resíduo. Os dados evidenciam que a conformação helicoidal é estável durante toda a dinâmica nesse meio, embora pequenas flutuações nesse padrão podem ocorrer por pequenos intervalos de tempo.

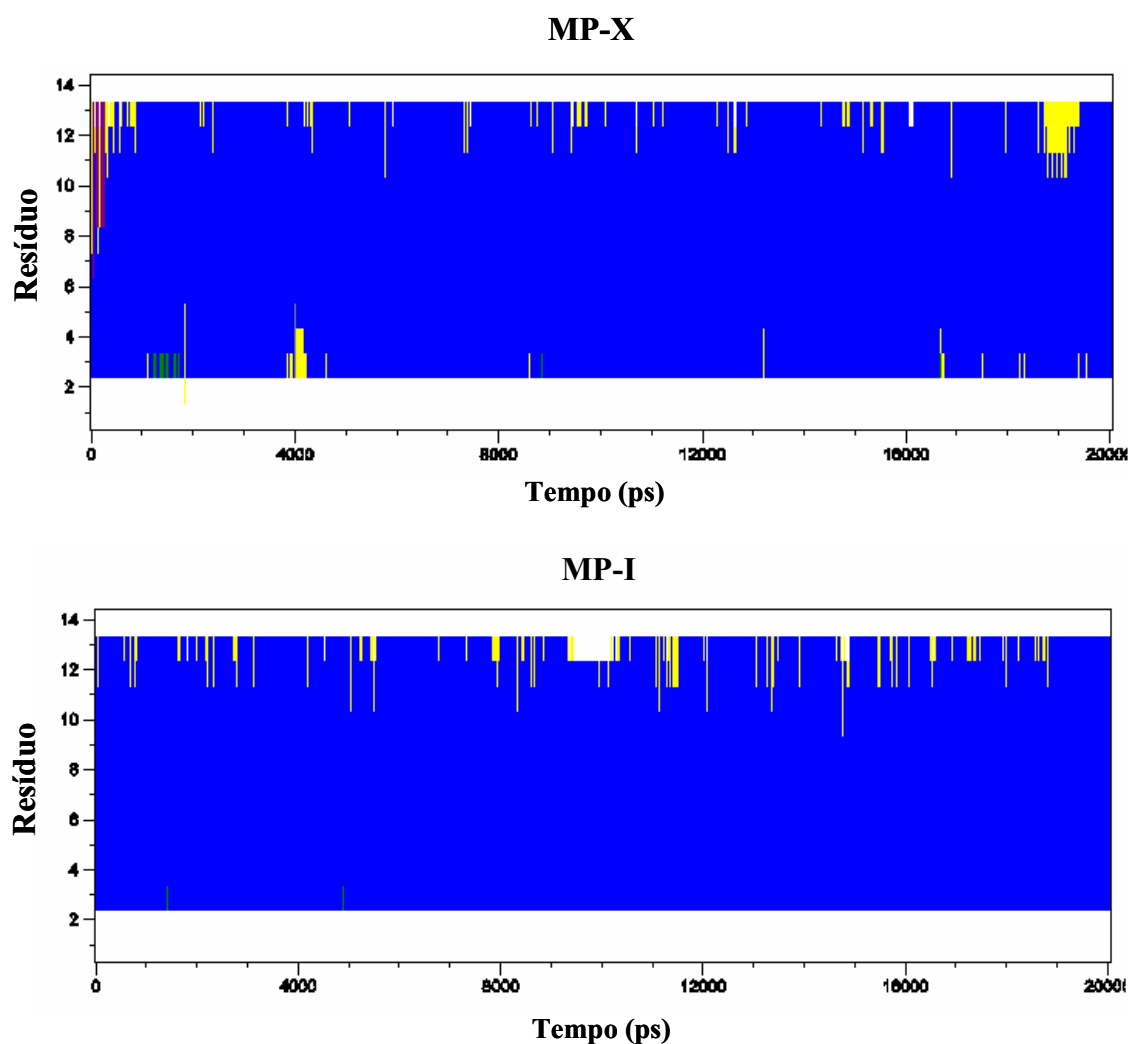


Figura 4.4: Padrões de estrutura secundária por resíduo, ao longo da dinâmica, para o MP-X e MP-I. Em branco, resíduos em conformação aleatória (“coil”); em verde, resíduos em curvas (“bend”); em amarelo, resíduos em voltas (“turn”); em roxo, resíduos em hélice-5; em azul, resíduos em hélice- α .

Na figura 4.5 apresentamos um esquema das hélices projetadas no plano ortogonal a seu eixo, em cinza estão os resíduos que não pertencem ao corpo da hélice, estão desestruturados. Assim como os demais mastoparanos, os resíduos carregados e polares concentram-se em uma região da hélice (face hidrofílica) e os hidrofóbicos em outra (face polar). Por esta representação, a face hidrofílica do MP-X compreende os resíduos (na figura 4.5 no sentido horário) Lys 11, Lys 4, Asp 8, Ile 1 e Lys 12, enquanto para o MP-I se tem Lys 11, Lys 4, Asp 8, Gln 12 e Lys 5. Os resíduos Ala 9 e Asp 2 não são considerados pertencentes a face hidrofílica devido a ligação de hidrogênio entre a cadeia lateral da Asp

2 e o N da cadeia principal da Lys 5, mostrada na tabela 4.3, a cadeia lateral deste resíduo fica dobrada e pertence a região hidrofílica demarcada na figura 4.6a, o mesmo acontece com a cadeia lateral da Asn 2 para o MP-X (figura 4.6b). O MP-I e o MP-X apresentam suas faces hidrofílicas aproximadamente iguais ($\sim 90^\circ$). Não é possível justificar a não atividade hemolítica do MP-I pela diferença no tamanho da região hidrofílica, então propomos uma análise mais detalhada da solvatação da cadeia principal destes peptídeos.

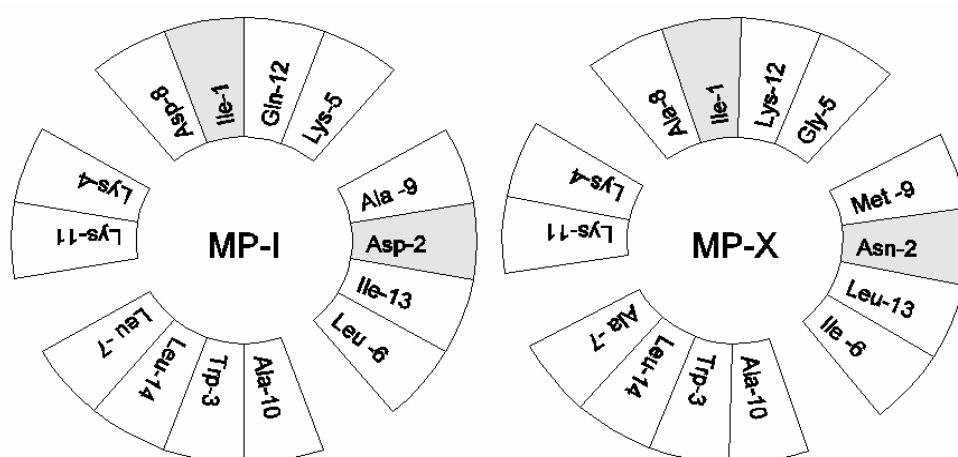


Figura 4.5: Esquema de projeção das hélices num plano ortogonal a seu eixo. Em cinza estão os resíduos Ile 1, Asn 2 que não estão desestruturados em ambos peptídeos.

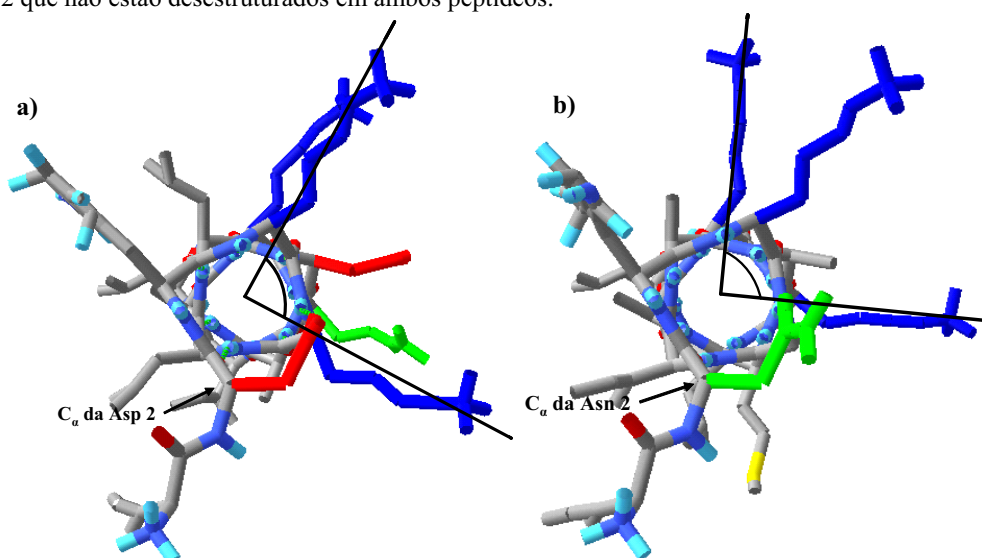


Figura 4.6: Projeção das hélices de ambos peptídeos num plano ortogonal a seu eixo. Em azul estão os resíduos de lisinas, em verde os resíduos polares (Gln 12 para o MP-I e Asn 2 para o MP-X), em vermelho os resíduos de ácido aspártico (Asp) do MP-I estão os resíduos Ile 1, Asn 2 que não estão desestruturados em ambos peptídeos.

Na figura 4.7 apresentamos o perfil de solvatação dos resíduos da cadeia principal do MP-X centrados nos $C_{\alpha}(s)$ de cada resíduo. A solvatação está baseado no cálculo do número médio de moléculas e/ou grupos em função da distância à cada carbono- α . Os grupos do solvente escolhidos foram os três flúor do TFE (centro de massa) e a molécula de água.

Como a distância média entre os Carbonos- α da cadeia peptídica é aproximadamente 4 Å, é necessário destacar que nos gráficos de RIN um mesmo grupo de átomos de flúor do TFE ou moléculas de água poderá estar sendo computada para diverso C_{α} , dependendo do raio da esfera considerada.

Uma maneira de diminuir essa sobreposição é realizar a análise considerando $r \sim 5$ Å e os carbonos- α pares ou ímpares. Dessa forma o volume de sobreposição das duas esferas para o cálculo do RIN é minimizado e preenchido em grande parte pelas esferas de van der Walls dos átomos e/ou grupos de átomos ligados ao C_{α} não considerados.

Procedendo à análise da figura 4.7 (MP-X) verifica-se que: 1) a Asn 2 é igualmente solvatada por flúor e água; 2) os resíduos hidrofóbicos do meio da cadeia do peptídeo estão solvatado por F, com uma preferência de 5 grupos flúor por água; 3) mesmo a lisina 4 está solvatada pelos grupos de flúor na proporção 3:1; 4) a lisina 12 apresenta um número praticamente igual de grupos de F e água e 5) a leucina do C-terminal também é igualmente hidratada. Deve-se enfatizar aqui que a análise não é alterada nem qualitativamente, nem quantitativamente, se ao invés de escolhermos os C_{α} dos resíduos pares o fizermos para os ímpares.

A face hidrofílica da hélice é constituída pelos resíduos Lys 11, Lys 4, Ala 8 e Lys 12, conforme o esquema da figura 4.5 e a representação da figura 4.6b para o MP-X. As figuras 4.7, no entanto, mostram que estes resíduos são solvatados preferencialmente pelos grupos de flúor. Isso ocorre porque a cadeia lateral das lisinas tem caráter hidrofóbico devido a presença de quatro grupos metilênicos e os dados de solvatação foram calculados a partir dos C_{α} . Se, ao contrário, formarmos como base para a análise da solvatação o grupo NH_3^+ obtemos um predomínio das moléculas de água, conforme figura 4.8.

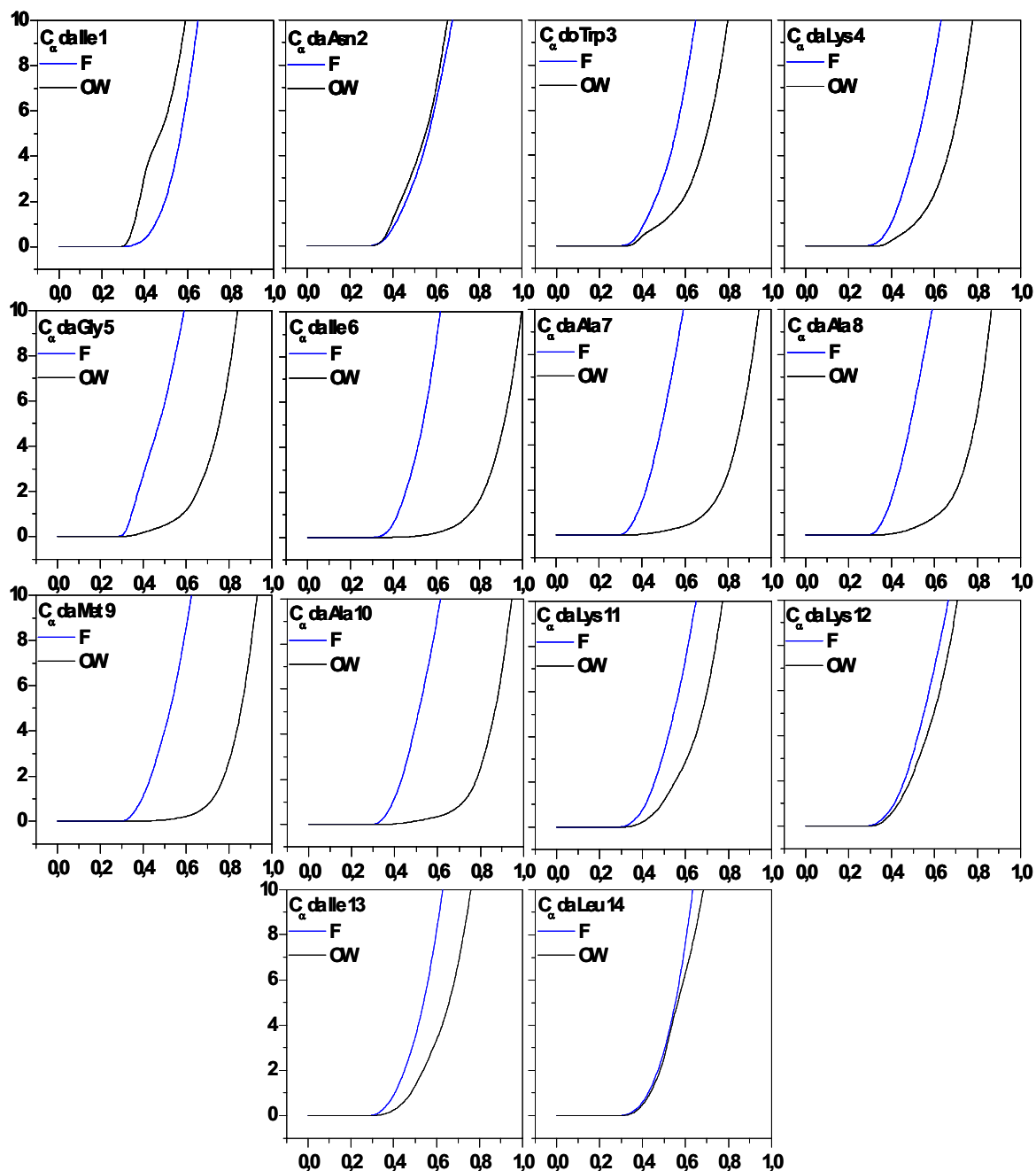


Figura 4.7: Gráficos da Integral da Função de Distribuição Radial de Pares (RIN) para o MP-X ao longo da dinâmica de 20 ns. Nas ordenadas apresentamos o número médio de moléculas e nas abscissas, o raio da esfera centrada no C_{α} variando de 0 a 1 nm. Para esta análise escolhemos o C_{α} de cada resíduo do peptídeo, o centro de massa dos 3 átomos de flúor (F) da molécula de TFE (em azul) e o átomo de oxigênio (OW) da molécula de água (em preto).

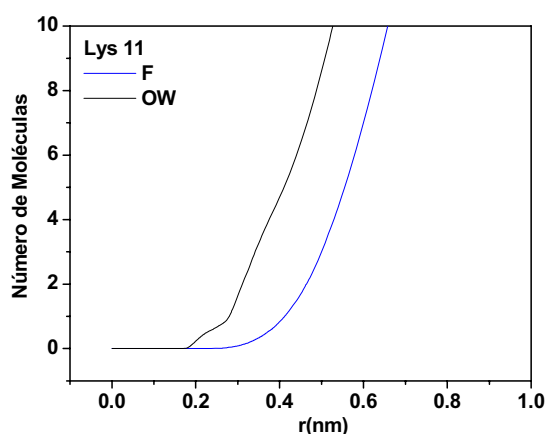


Figura 4.8: Curvas de RIN para o carga da Lys 11. Em azul mostramos a curva de RIN entre a carga da Lys 11 e o centro de massa dos três átomos de flúor (F). Em preto mostramos a curva de RIN entre a carga da Lys 11 e o átomo de oxigênio da água (OW).

Dessa forma a imagem possível de ser montada é a de uma hélice solvatada preferencialmente pelo TFE, com os três átomos de flúor voltados para o esqueleto do peptídeo e os grupos carregados (lisinas) ou polares (asparagina) solvatados pela água que pelas suas características dielétricas atenua as repulsões entre os diversos grupos carregados. A predominância de grupos de flúor solvatando o esqueleto do peptídeo tem como consequência a estabilização das ligações de hidrogênio da cadeia principal e a estabilidade da conformação helicoidal ao longo da dinâmica, como evidenciado na figura 4.4.

A solvatação do MP-I é significativamente diferente da solvatação do MP-X. Na figura 4.9 mostramos a solvatação para cada C_α do peptídeo, como na figura 4.7. A primeira observação é que a relação grupos de flúor/água é quantitativamente menor que para qualquer um dos resíduos, mesmo para aqueles da região hidrofóbica, com exceção da Ala 10 para o qual as proporções são praticamente as mesmas. É interessante observar que os terminais dos peptídeos têm um perfil de solvatação parecido, o que de certa forma era esperado uma vez que o N-terminal de ambas seqüências é carregado e apresentam a maior mobilidade ao longo da dinâmica. Essa distinção no perfil de solvatação está associada à distribuição de cargas no MP-I. Ambos, MP-X e MP-I, são catiônicos. No entanto, enquanto MP-X tem +4 cargas positivas (3 lisinas e o N-terminal) o MP-I tem carga +2, devido às três lisinas, o N-terminal e duas cargas negativas dos ácidos aspárticos (Asp 2 e Asp 8). O ácido aspártico tem, ao contrário das lisinas, uma cadeia lateral curta e devido o

grupo COOH, que interage favoravelmente com o dipolo da água, aumentando a porcentagem de água ao redor do peptídeo. Por exemplo, enquanto no MP-X o resíduo de Ala 8 apresenta uma solvatação 6:0,5 para o número médio de grupos F e água, o resíduo 8 do MP-I (Asp 8) a relação é 1,5:1,5. A consequência disso, é que o esqueleto do peptídeo é mais solvatado por moléculas de água nessa região, e que as ligações de hidrogênio n-n+4 da cadeia principal são menos estáveis, conforme foi mostrado na tabela 4.2.

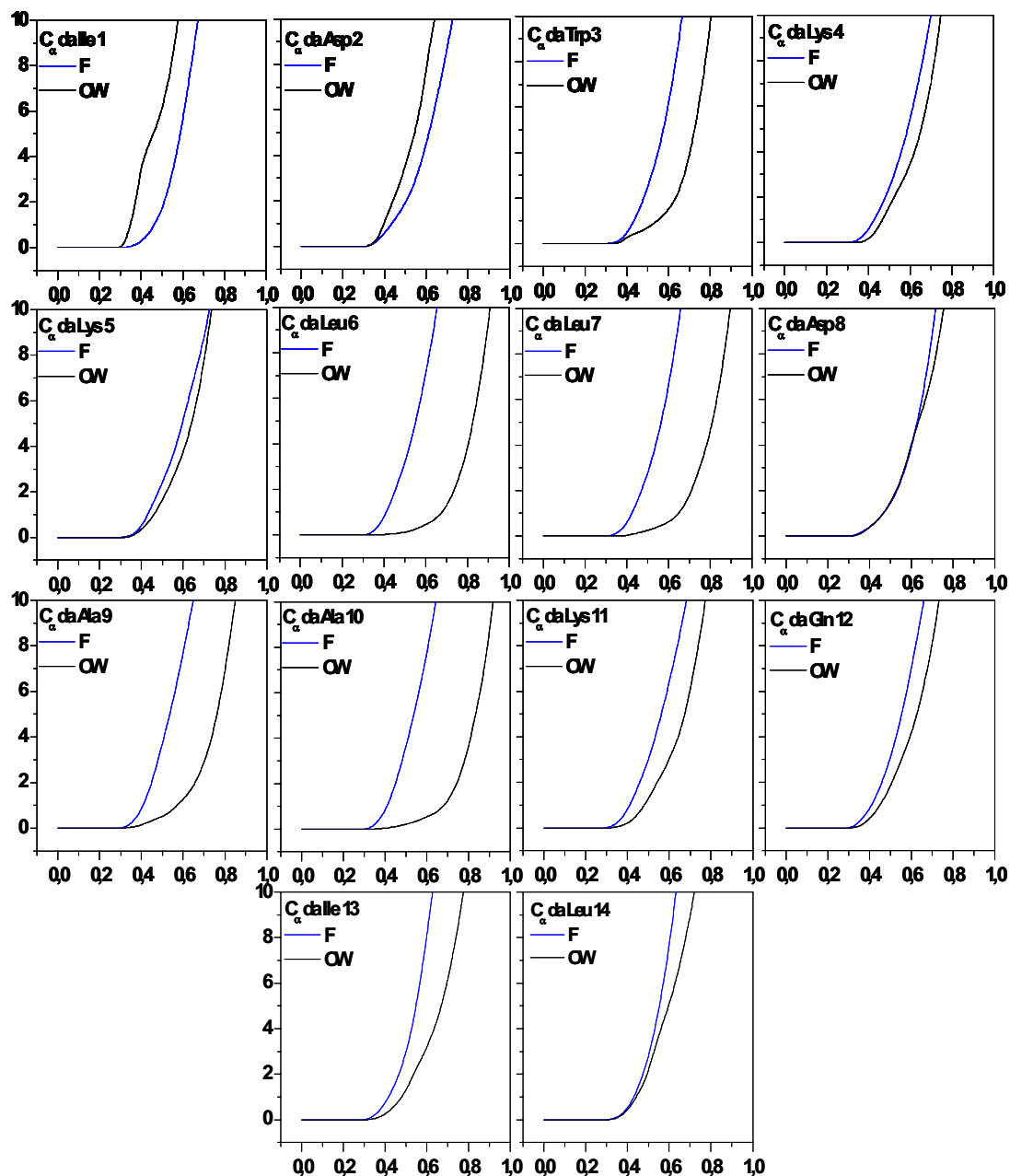


Figura 4.9: Gráficos da Integral da Função de Distribuição Radial de Pares (RIN) para o MP-I ao longo da dinâmica de 20 ns. Nas ordenadas apresentamos o Número Médio de Moléculas e nas abscissas, o raio da esfera centrada no C_α variando de 0 a 1 nm. Para esta análise escolhemos o C_α de cada resíduo do peptídeo, o centro de massa dos 3 átomos de flúor da molécula de TFE (em azul) e o átomo de oxigênio (OW) da molécula de água (em preto).

Em termos da figura 4.5 e 4.6 para o MP-I vemos que a parte hidrofóbica da hélice compreende os resíduos Lys 11 – Lys 14 – Asp 8 – Gln 12 – Lys 5 e se observarmos atentamente os perfis de solvatação apresentados na figura 4.9 veremos que essa está coerente pois estes resíduos são solvatados preferencialmente pela água, ou em proporções equivalentes de água, grupos de flúor (lembrando das características da cadeia lateral das lisinas já discutidas). É tentador incluir na região hidrofílica todos os resíduos carregados, porque, em princípio, eles interagem favoravelmente com os dipolos de água. Isso implicaria em incluir a Ile 1 do N-terminal (tem uma carga positiva do NH_3^+) e a Asp 2 (carga negativa). Nesse caso teríamos uma face hidrofílica e uma hidrofóbica com as interfaces definindo duas metades iguais, ou seja, cada uma subentenderia um ângulo de aproximadamente 180° quando projetamos todos os resíduos num plano perpendicular ao eixo da hélice. Para isso temos que incluir a Ala 9, que é hidrofóbico, nessa região. Porém o grupo carregado da Asp 2 participa de uma ligação de hidrogênio com o N da cadeia principal do resíduo 5 (ver tabela 4.3 e figura 4.6a) e está, dessa forma, próximo à região definida por esse resíduo e a Lys 11. Por esta região nos parece mais razoável definir o ângulo polar a partir dos grupos carregados e da região efetivamente solvatada pela água e não das projeções de hélice ideal dos carbonos- α , como é feito usualmente.

Na figura 4.10 mostramos uma representação das distribuições dos solventes na região da cadeia principal do MP-X e do MP-I no 8º ns das dinâmicas. Seleccionamos a cadeia principal dos resíduos 8 e 9 e mostramos, nas figuras, os átomos contidos numa esfera de 10 Å em torno destes resíduos. As cadeias laterais dos peptídeos são omitidas para melhor visualização das moléculas dos solventes. A fita (em cor cinza) representa a cadeia principal dos peptídeos projetados num plano ortogonal ao eixo de suas hélices, as moléculas de TFE estão representadas por bastões finos e brancos e as moléculas de água estão representadas por bastões mais grossos vermelhos (átomos de oxigênio – OW) e brancos (átomos de hidrogênio – HW1 e HW2).

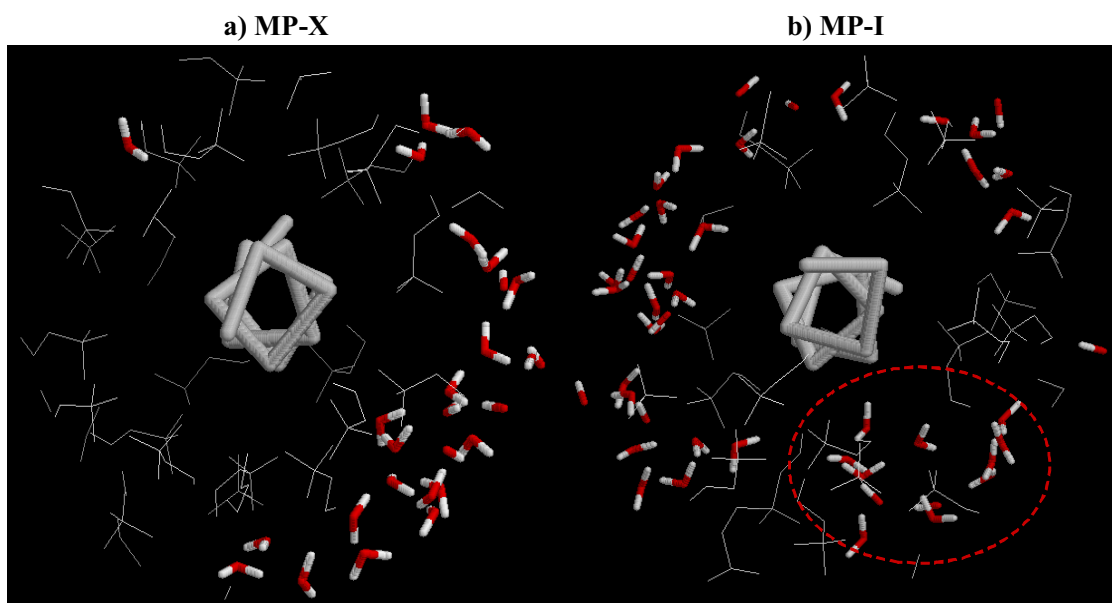


Figura 4.10: Representação da distribuição do solvente na região do peptídeo. A fita cinza representa a cadeia principal do peptídeo projetada num plano ortogonal ao eixo de sua hélice, os bastões brancos e finos representam as moléculas de TFE, os bastões vermelhos e brancos mais grossos representam as moléculas de água. A região circulada pelo tracejado vermelho mostra as moléculas de água que se mantiveram na região do resíduo Asp 8.

Na figura 4.10b destacamos, através da região circulada pelo tracejado vermelho, a solvatação da cadeia lateral da Asp 8, que atrai as moléculas de água para a proximidade da cadeia principal do peptídeo como observamos pelas curvas de RIN.

Vimos acima que o grupo aniônico da Asp 2 faz uma ligação de hidrogênio com o N da cadeia lateral da Lys 5. Essa é uma interação tipo carga-dipolo, que varia com o inverso do quadrado da distância entre a carga e o dipolo. Mas o peptídeo tem 6 grupos carregados, 4 catiônicos (N-terminal, Lys 4, Lys 5 e Lys 11) dois aniônicos (Asp 2 e Asp 8) e um resíduo polar (Gln 12). É interessante investigar eventuais particularidades na distribuição destes grupos.

Para tanto construímos a tabela 4.4 na qual o valor médio e respectivos desvios das distâncias entre os grupos aniônicos e os catiônicos e polares. Uma observação geral é que os desvios dos valores médios refletem a estabilidade da conformação helicoidal, tendo em

vista os tamanhos das cadeias laterais. Os dados da tabela mostraram também que o O⁻ da Asp 2 está, em média, distante 7,5 Å do NH₃⁺ (N-terminal), 7,2 Å do NH₃⁺ da Lys 4 e 6,0 Å do NH₃⁺ da Lys 5 e participa da ligação de hidrogênio (90% do tempo) com o N da cadeia principal da Lys 5. Considerando que a ligação de hidrogênio é de caráter dipolar é de se questionar o porque da estabilidade da ligação feita pela Asp 2. De fato ela é fruto de um equilíbrio eletrostático que envolve também os grupos NH₃⁺ do N-terminal e das lisinas 4 e 5. A figura 4.11 mostra a estrutura média obtida ao longo da dinâmica no qual estes grupos estão destacados. A figura 4.11a indica que o O⁻ da Asp 2 localizada num ponto que minimiza o campo elétrico provocado pelas cargas positivas. Da figura pode-se inferir que ela está localizada num ponto de um triângulo formado pelas três cargas. A figura 4.11b foi rodada de forma a mostrar as três cargas positivas no mesmo plano e dela se vê que o O⁻ da Asp 2, praticamente, também está nesse plano, ou seja, essa é uma posição que, de fato, minimiza o campo gerado pelas cargas positivas, e possibilita que a ligação de hidrogênio que obviamente faz parte do equilíbrio juntamente com todo o restante da distribuição de cargas, se mantenha ao longo da dinâmica.

	NH ₃ ⁺ (N-ter.)	Lys 4	Lys 5	Lys 11	Gln 12	NH ₂ (C-ter.)
Asp 2	7,5Å ± 0,5Å	7,2Å ± 1,4Å	6 Å ± 1,5Å	14Å ± 1,8Å	14Å ± 2 Å	20Å ± 1,2 Å
Asp 8	15Å ± 0,7 Å	9,6Å ± 2Å	8,5Å ± 1,7Å	6,3Å ± 2Å	5,5Å ± 2,2Å	12,6Å ± 1,6Å

Tabela 4.4: Tabela com as distâncias médias entre os grupos de cargas e grupos polares das cadeias laterais do MP-I. Para lisinas selecionamos o centro de massa do grupo NH₃⁺, para glutamina e grupo amida do C-terminal selecionamos o centro de massa do grupo NH₂, para o ácido aspártico selecionamos o centro de massa do grupo COOH.

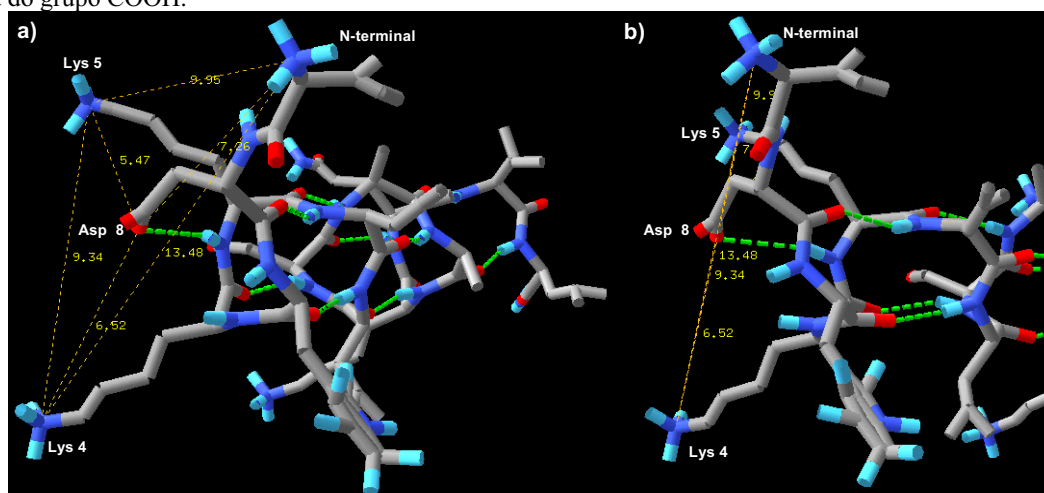


Figura 4.11: Estrutura média obtida ao longo da dinâmica. Em a) destacamos as distâncias entre as cargas positivas (N-terminal, Lys 4 e Lys 5) e a carga negativa (Asp 2). Em b) mostramos uma rotação de a) de forma a mostrar que a carga negativa está num mesmo plano que as cargas positivas. A linha tracejada amarela mostra as distâncias entre as cargas, a linha tracejada verde mostra as ligações de hidrogênio, em azul estão os átomos de nitrogênio, em azul claro os átomos de hidrogênio ligados aos átomos eletronegativos, em cinza os átomos de carbono e em vermelho os átomos de oxigênio.

A outra carga negativa (O^- da Asp 8), por sua vez, mantém-se mais próxima do NH_3^+ da Lys 11 do NH_2 (grupo polar) da Gln 12. Na figura 4.12 está mostrado como varia as distâncias do O^- com o NH_2 em cerca de 4 Å que mostra certa complementaridade com a distância entre O^- e NH_3^+ da Lys 11 (curva em azul). Embora mais complexo, este equilíbrio envolve mais diretamente o NH_3^+ da Lys 5 e também o NH_3^+ da Lys 4. Os três grupos catiônicos e o grupo polar formam, de forma aproximada, um tetraedro com O^- da Asp 8 com um ponto interno (figura 4.13), localizado novamente num ponto que minimiza o campo elétrico destas cargas, estabelecendo um equilíbrio que compensa, em parte, a diminuição da camada de solvatação e a menor estabilidade das ligações de hidrogênio, sobretudo daqueles que envolvem os resíduos de 8 a 14 conforme visto na tabela 4.2.

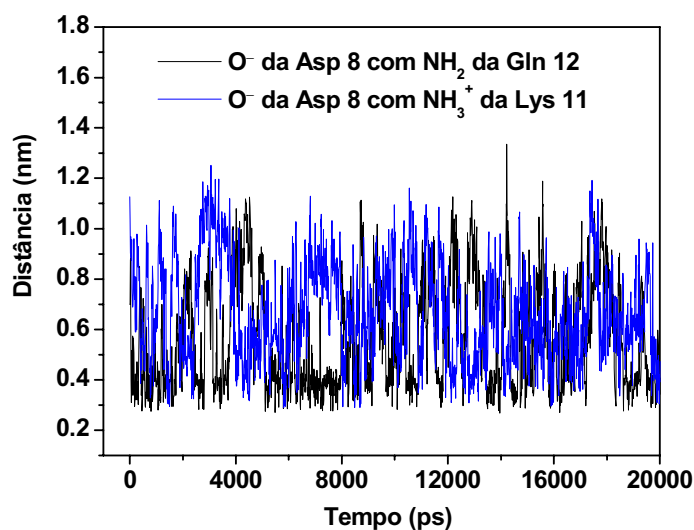


Figura 4.12: Distância entre a carga negativa da Asp 8 (O^-) e o grupo polar da Gln 12 (NH_2), em preto, e a distância entre esta mesma carga negativa e a carga positiva da Lys 11 (NH_3^+), em azul, ao longo da dinâmica.

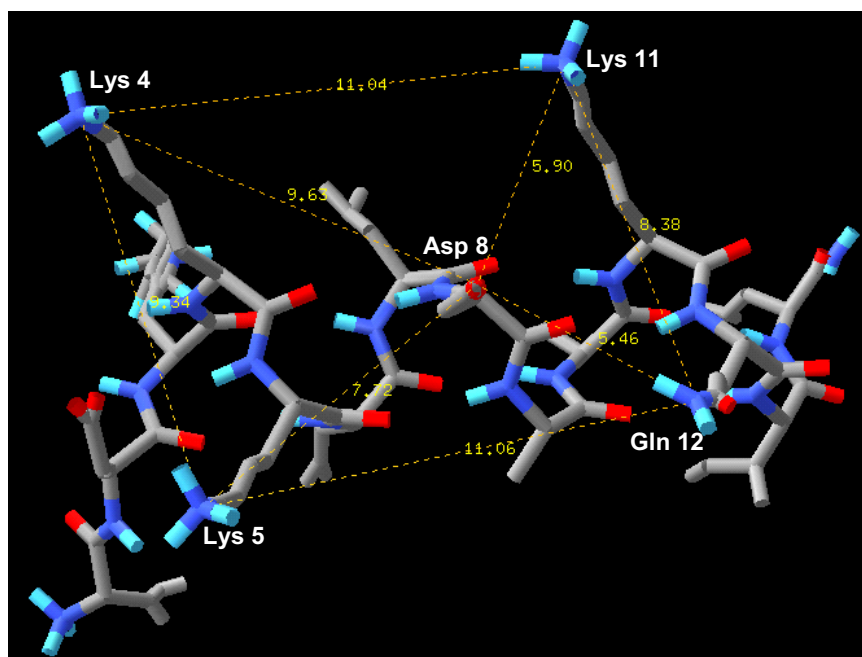


Figura 4.13: Estrutura média obtida ao longo da dinâmica. Destacamos as distâncias entre as cargas positivas (N-terminal, Lys 4 e Lys 5) e a carga negativa (Asp 8). A linha tracejada amarela mostra as distâncias entre as cargas, em azul estão os átomos de nitrogênio, em azul claro os átomos de hidrogênio ligados aos átomos eletronegativos, em cinza os átomos de carbono e em vermelho os átomos de oxigênio.

Conclusões:

A partir das informações obtidas deste estudo por dinâmica molecular, podemos sugerir que a conformação do MP-I em solventes anfipáticos e não carregados com misturas de TFE e água. É uma hélice anfipática composta pelos resíduos de 3 a 13. As informações estruturais fornecida pela dinâmica são concordantes com percentuais helicoidais obtidos por CD. O MP-X, por exemplo, apresenta 61% de conformação em hélice- α em solução com 40% de TFE (McDowell et al., 1985), o que corresponde aproximadamente a 8 resíduos (61% de 14) em hélice- α . Este número de resíduos pode ser correlacionado com as 8 ligações de hidrogênio do tipo n - $n+4$ mais estáveis ao longo da dinâmica (tabela 4.2). Para o MP-I o percentual helicoidal obtido, por CD, em misturas de TFE e água (40:60) é de 43% (dos Santos Cabrera, 2006) o que corresponde a 6 resíduos

em hélice- α , este número de resíduos pode ser correlacionados com as 6 ligações de hidrogênio do tipo n-n+4 mais estáveis ao longo da dinâmica (tabela 4.2).

Assim com os demais mastorparanos o MP-I apresenta os resíduos do N-terminal desestruturados, este fato pode ser explicado pela presença da ligação de hidrogênio entre o grupo de carga da cadeia lateral da Asp 2 com o nitrogênio da cadeia principal da Lys 5. Para o MP-X, o oxigênio da Asn 2, forma ligações de hidrogênio com o N da Lys 4 (31,2% do tempo) e com o N da Gly 5 (59% do tempo), colaborando para a desestruturação dos resíduos 1 e 2 deste peptídeo.

Da análise da solvatação da cadeia principal de cada peptídeos, fica evidente que as diferenças estão no número de moléculas de água na região dos carbonos- α . O MP-X tem quatro grupos carregados com a particularidade que três destes grupos são de lisinas, aminoácido que possui uma cadeia lateral com 4 grupos metilênicos, que são hidrofóbicos e, como vimos, solvatados preferencialmente por moléculas de TFE. Isso faz com que nesse meio se forme uma camada de TFE, uma espécie de tubo cilíndrico, que envolve a cadeia principal do peptídeo protegendo as ligações de hidrogênio e estabilizando a conformação em hélice- α . As cargas das lisinas se localizam além dessa camada e são solvatadas, como esperado, por água. Estes dados parecem dar sentido ao parâmetro hidrofobicidade, usualmente utilizado na literatura, e que está baseado numa escala da afinidade do aminoácido transferir-se de um meio apolar para um meio aquoso. Nessa escala o MP-X tem uma hidrofobicidade (0,24) que pode ser considerada alta. Considerando ainda a representação da figura 4.5 e a disposição das cargas ao longo da hélice verifica-se que o ângulo polar, outro parâmetro utilizado para discutir a interação de peptídeos com membranas, é razoavelmente pequeno ($\sim 90^\circ$), possibilitando que o peptídeo se “enterre” na membrana mantendo somente as lisinas interagindo com as cabeças polares dos lipídeos das membranas. Isso exige um rearranjo dos lipídeos que dá origem à formação de poros.

O MP-I, por outro lado, contém os mesmos grupos catiônicos que o MP-X, porém contém também dois resíduos aniônicos (Asp 2 e Asp 8) de cadeias laterais curtas. Estes resíduos, catiônicos e aniônicos, juntamente com um resíduo polar (Gln 12) são fundamentais na manutenção e estabilidade da estrutura helicoidal, do ponto de vista eletrostático. Esse equilíbrio mostra um peptídeo no qual a cadeia principal é significativamente menos solvatada por TFE do que no caso do MP-X, mas cuja estrutura

helicoidal tem mesmo grau de estabilidade (ver figura 4.4) desta, em função deste equilíbrio eletrostático. Isto está de acordo com o parâmetro de hidrofobicidade, que para o MP-I é 0,068, menor do que para o MP-X. Outra consequência desse equilíbrio eletrostático é que ele impede, diferentemente do que pode sugerir a figura 4.5, que o ângulo polar seja maior porque o grupo aniônico da Asp 2 permanece fixo numa posição de ligação de hidrogênio com o nitrogênio da cadeia principal do resíduo Lys 5 e, portanto, do ponto de vista da distribuição de carga, define um ângulo polar aproximadamente igual do que aquele do MP-X (figura 4.6).

Dessas considerações é de se supor que a interação deste peptídeo com membranas zwitteriônicas ou aniônicas seja menos intensa que para o MP-X, pois a hidrofobicidade (ou solvatação da cadeia principal) é menor e, como a carga líquida é +2, a interação eletrostática com as cabeças polares dos lipídeos também é menor.

Em conclusão, as diferenças observadas na ação hemolítica destes peptídeos, podem ser atribuídas ao fato de que o MP-X, por ter sua cadeia principal mais hidrofóbica, ser capaz de “enterrar-se” no interior (“core”) bicamada da membrana favorecendo as interações hidrofóbicas tanto em membranas aniônicas como em zwitteriônicas, diferentemente do MP-I que interage com membranas aniônicas por ser catiônico e não é capaz de enterrar-se no interior da bicamada zwitteriônica devido as diferenças na solvatação em sua cadeia principal (baixa hidrofobicidade) discutidas anteriormente.

Capítulo 5 – Análise Estrutural do Anoplin-NH₂ e Anoplin-OH

5.1 Introdução

O decapeptídeo Anoplin é o menor peptídeo antimicrobiano, não sintético, extraído do veneno de vespa *Anoplius samariensis*, é encontrado em sua forma amidada e não apresenta atividade hemolítica, mas é antimicrobiano e desgranulador de mastócitos (Konno et al., 2001). A única diferença entre Anoplin-NH₂ e seu análogo Anoplin-OH (tabela 5.1) é o grupo amida do C-terminal, suas propriedades conformacionais são as mesmas, mas há grandes diferenças nas atividades biológicas e conseqüentemente nas estruturas secundárias por eles adotadas. O Anoplin-OH não apresenta atividade antimicrobiana e nem de desgranulação de mastócitos e, como o Anoplin-NH₂ é tem atividade hemolítica (dos Santos Cabrera, 2006) .

Anoplin-NH ₂	Gly-Leu-Leu-Lys-Arg-Ile-Lys-Thr-Leu-Leu-NH ₂
Anoplin-OH	Gly-Leu-Leu-Lys-Arg-Ile-Lys-Thr-Leu-Leu-OH

Tabela 5.1: Seqüência primária do Anoplin e seu análogo Anoplin-OH. Em azul, são representados os resíduos carregados positivamente. Em preto, os resíduos hidrofóbicos. Em verde os resíduos polares.

Dados experimentais com o Anoplin-NH₂ e Anoplin-OH permitem verificar que a atividade biológica, assim como a estrutura secundária por eles adotada, é altamente dependente da composição da membrana de interação (Konno et al., 2001 e Ifrah et al., 2005). Dados de RMN com estes peptídeos em altas concentrações de micelas SDS mostram que ambos assumem conformações helicoidais, pois peptídeos com baixa hidrofobicidade, como o Anoplin, requer ambientes altamente aniônicos para formar estrutura helicoidal (Dathe et al., 2001). Neste ambiente os dois tipos de Anoplin interagem fortemente com a interface micelar, composta pelos grupos carregados negativamente das cabeças das moléculas de SDS e formam estruturas helicoidais anfipáticas bem definidas (figura 5.1). Por estas estruturas sugere-se que os grupos hidrofóbicos poderiam ficar escondidos do ambiente hidrofílico, ou seja, no interior (“core”) da micela (Blondelle et al., 1997 ; Deber & Li, 1995; Zhong & Johnson, 1992).

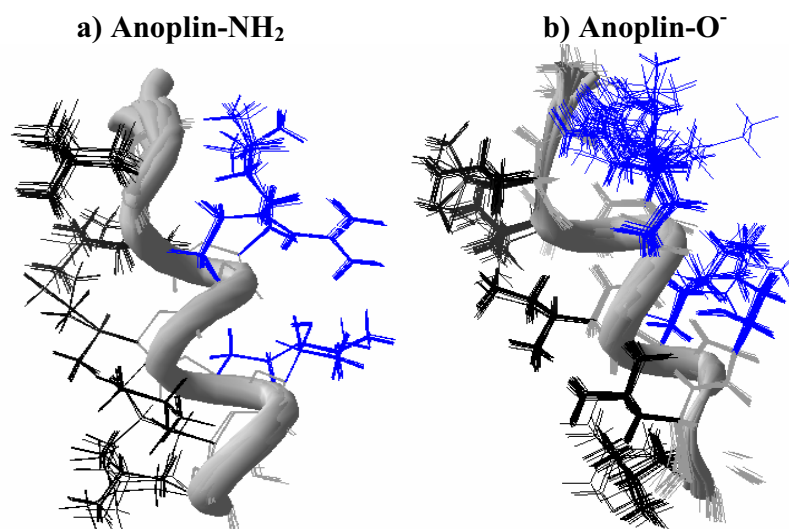


Figura 5.1: Sobreposição das 20 estruturas encontradas para o Anoplin-NH₂ (a) e Anoplin-OH (b), por RMN em solução com SDS. Em cinza estão os resíduos das cadeias principais e as fitas marcando as estruturas helicoidais, em azul os resíduos carregados positivamente (Lys 4, Arg 5 e Lys 7) e o resíduo polar de Thr 8. Em preto, são os resíduos hidrofóbicos (Gly 1, Leu 2, Leu 3, Ile 6, Leu 9 e Leu 10).

Dados de RMN mostram que para o Anoplin-NH₂ o trecho helicoidal se estende dos resíduos 3 a 10, e para o Anoplin-OH a conformação helicoidal é formada pelos resíduos de 2 ao 9. Este percentual helicoidal varia de acordo com a densidade de carga na superfície da membrana de interação e com a concentração de peptídeo. O Anoplin-NH₂ tem percentual helicoidal considerável em membranas aniônicas e em TFE, já em membranas zwitteriônicas (ex., PC - fosfatidilcolina) ele perde sua estrutura secundária e com isso, sua atividade biológica (Ifrah et al., 2005; Apêndice A). O Anoplin-OH apresenta um percentual helicoidal decrescente de acordo com a diminuição da densidade de carga do ambiente, por exemplo em SDS>PCPG:7030>TFE>PC. Em PC o Anoplin-OH também não apresenta conformação helicoidal e, por isso, também não é hemolítico.

Ao interagir com vesículas aniônicas (PCPG: 7030), o Anoplin-NH₂ e o Anoplin-OH não são capazes de induzir vazamento (“leakage”). Esta característica não deve ser atribuída ao número de resíduos, uma vez que outros peptídeos com cadeias curtas são capazes de romper a estrutura membranar produzindo vazamento. Por exemplo, o undecapeptídeo Decoralin, além de produzir vazamentos, apresenta um mecanismo de ação semelhante ao do poro toroidal (dos Santos Cabrera, 2006). Em diversos trabalhos a ação

antimicrobiana é relacionada com o potencial de determinados peptídeos em causar vazamentos em vesículas aniônicas (Andreu & Rivas, 1998; dos Santos Cabrera et al., 2004 and Park et al., 1995). Porém não é necessário que haja vazamento para que haja ação antimicrobiana, o que sugere que o Anoplin faça parte deste grupo de peptídeos (Papo & Shai, 2003; Giangaspero et al., 2001; Bárány-Wallje et al., 2005) que apresentam mecanismos de ação diferentes.

O Anoplin-NH₂ não tem o mecanismo de ação conhecido, apesar de apresentar cationicidade, anfipaticidade e estrutura helicoidal compatíveis com os demais mastoparanos. Dados experimentais de vazamento de vesículas, ou rompimento de membranas, mostram que ele não causa vazamento em vesículas zwitteriônicas nem em aniônicas, apesar de apresentar considerável atividade antimicrobiana (dos Santos Cabrera, 2006). Há também uma diferença estrutural entre o Anoplin-OH e os outros mastoparanos não-amidados. Enquanto o Anoplin-OH apresenta um percentual helicoidal maior que 50% em ambientes altamente aniônicos (SDS) o EMP-AF-OH, no mesmo ambiente, apresenta aproximadamente 30% de estrutura helicoidal.

No intuito de relacionar as informações experimentais de vazamento de vesículas, que pode sugerir o mecanismo de ação do Anoplin-NH₂ e do Anoplin-OH, com as informações estruturais obtidas por RMN em SDS, sugerimos um estudo conformacional por Dinâmica Molecular destes peptídeos em um ambiente não carregado, com características anfipáticas como misturas de TFE e água. Estes estudos também servem para correlacionar a atividade lítica de ambos peptídeos em vesículas com seus parâmetros estruturais, como anfipaticidade e hidrofobicidade. Para conseguir tais correlações verificamos as modificações conformacionais; as variações dos ângulos polares quando alteramos o ambiente de altamente aniônico (SDS) para um ambiente não carregado e anfipático como a mistura de TFE e água; e, como no capítulo anterior a solvatação de sua cadeia principal.

5.2 Métodos

A primeira cadeia das 20 obtidas por RMN do Anoplin-NH₂ em micelas de SDS (Apêndice A) foi usada como ponto de partida para as simulações, sua conformação em hélice- α anfipática está representada nas figuras 5.1a. Um sistema contendo o Anoplin-NH₂

em 205 moléculas de TFE, 1902 moléculas de água e 4 contraíons de cloro (Cl^-) que neutraliza as 4 cargas positivas; para o Anoplin-OH temos 203 moléculas de TFE, 1907 moléculas de água e 3 contraíons de cloro (Cl^-) que neutraliza a carga total deste peptídeo, foi montado numa caixa são cúbica com dimensões iniciais de 4.5nm e submetidos à simulação por DM de 8 ns.

Para os dois peptídeos o N-terminal foi tratado como um grupo carregado positivamente (NH_3^+); no Anoplin-OH o C-terminal foi tratado como um grupo carboxilado carregado negativamente (COOH). Além disso, em ambos os casos as duas lisinas e arginina de cada peptídeos foram carregados, em seguida os sistemas foram solvatados com moléculas de água modelo SPC (“Simple Point Charge” – Berendesen et al., 1981) A simulação por DM de 8 ns, para estes sistemas, tiveram as mesmas condições e parâmetros das simulações do capítulo 3 (seção 3.2.1).

5.3 Resultados e Discussões

Variações nos Determinantes Estruturais e Análise de pontes de hidrogênio:

As condições descritas acima correspondem aproximadamente a uma mistura de TFE e água (30:70 v/v). Duas dinâmicas de 8ns foram executadas. Na primeira, o C-terminal foi mantido amidado e na segunda, o grupo amida (NH_2) foi artificialmente extraído do C-terminal e o grupo carboxila foi carregado (COOH). Adotamos esta estratégia para verificar as possíveis variações conformacionais causadas na estrutura helicoidal inicial pela presença da carga negativa do grupo carboxila que, devido às interações eletrostáticas, gera modificações na solvatação do peptídeo nesta região.

Na figura 5.2 apresentamos os gráficos contendo o RMSD das cadeias principais (em a) e o RMSF por resíduo em b. Pelo gráfico do RMSD (figura 5.2a) observamos que o Anoplin-OH (azul) apresenta maior variabilidade conformacional em sua cadeia principal ao longo da dinâmica, sobretudo nos primeiros 400 ps, já o Anoplin- NH_2 (preto) apresenta suaves modificações em sua cadeia principal mantendo seu percentual helicoidal. Isso pode ser confirmado pelo gráfico da figura 5.2b, onde observamos que os resíduos de 2 a 9 deste peptídeo (preto) sofrem pequenos desvios médios (em torno de 0,8 Å). Os resíduos 8, 9 e 10 do Anoplin-OH sofrem variações (em torno de 2,5 Å) e saem da região helicoidal, mantendo apenas os resíduos de 2 a 7 próximos da conformação de partida.

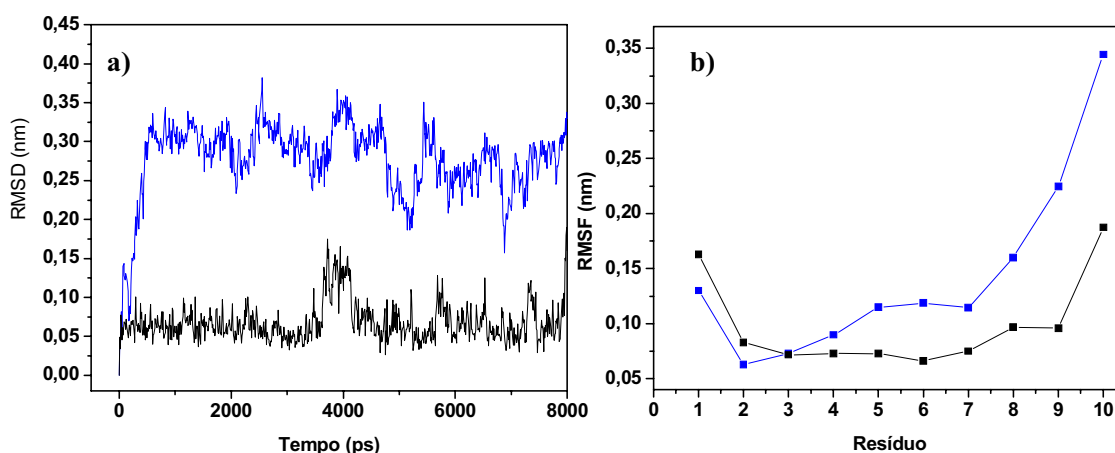


Figura 5.2: Gráficos de RMSD e RMSF de ambos peptídeos. Em a) mostramos o RMSD da cadeia principal do Anoplin-NH₂ em preto e da cadeia principal do Anoplin-OH em azul. Em b) apresentamos o RMSF por resíduo de ambos peptídeos, em preto Anoplin-NH₂ e em azul seu análogo.

Na figura 5.3 mostramos o gráfico do número de ligações de hidrogênio do tipo $n+4$ para ambos peptídeos para toda dinâmica (preto – Anoplin-NH₂ e azul – Anoplin-OH).

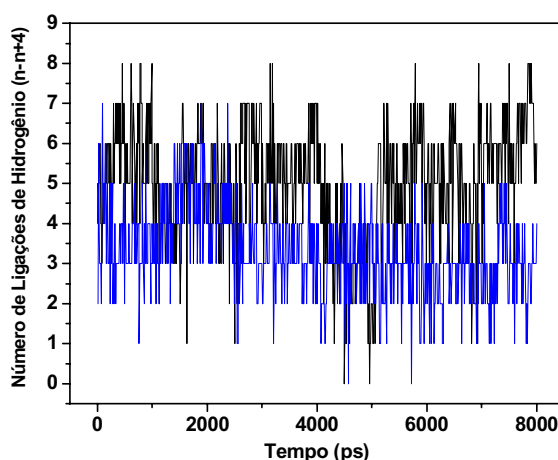


Figura 5.3: Gráfico do número de ligações de hidrogênio do tipo $(n-n+4)$ ao longo da dinâmica. Em preto, temos o gráfico da dinâmica do Anoplin-NH₂. Em azul, o gráfico da dinâmica do Anoplin-OH.

A análise destes gráficos mostra que o número médio de ligações de hidrogênio para o Anoplin-NH₂ é 5 enquanto que para o Anoplin-OH é 3, confirmando que este peptídeo análogo tem percentual helicoidal menor em solvente não carregado e anfipático do que o encontrado em SDS (solvente altamente aniônico). Já o Anoplin-NH₂ mantém sua estrutura helicoidal anfipática em misturas de TFE e água (Ifrah et al., 2005; dos Santos Cabrera,

2006), ou seja, todas as ligações de hidrogênio do tipo n - $n+4$ são mantidas, exceto aquela formada entre O da Gly1 com N da Arg 5, que já não era formada na conformação de partida.

Na figura 5.4 estão os gráficos das distâncias entre os átomos eletronegativos (N e O) da cadeia principal de ambos peptídeos, dos resíduos Arg 5 (O), Leu 9 (N) (figura 5.4a) e Ile 6 (O), Leu 10 (N) (figura 5.4b) que formam ligações de hidrogênio quando o peptídeo está estruturado em hélice- α .

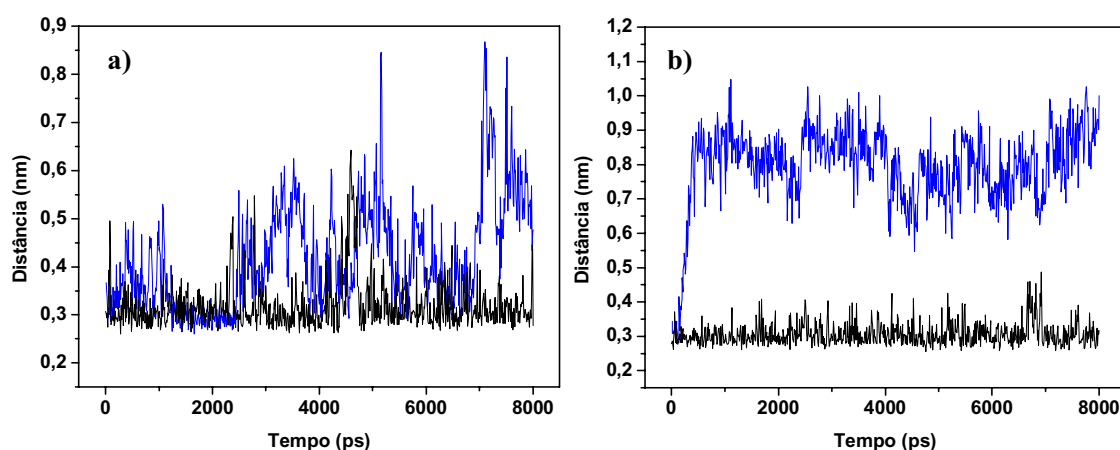


Figura 5.4: Gráficos das distâncias entre os átomos N e O da cadeia principal dos peptídeos Anoplin-NH₂ (preto) e do Anoplin-OH (azul). Em a) estão os gráficos das distâncias entre o O da Arg 5 e o N da Leu 9 para ambos peptídeos. Em b) estão os gráficos das distâncias entre o O da Ile 6 e o N da Leu 10 para ambos peptídeos.

Destes gráficos observamos que as distâncias entre o O (Arg 5) com N (Leu 9) e O (Ile 6) com N (Leu 10) são mantidas próximas de 3 Å para o Anoplin-NH₂, o que indica que estes átomos estão formando ligações de hidrogênio (n - $n+4$) entre si. O Anoplin-OH apresenta um afastamento entre os átomos O (Arg 5) e N (Leu 9) após 3ns (figura 5.4a), ou seja, há um rompimento desta ligação de hidrogênio causada pelas modificações conformacionais do resíduo Leu 9. O mesmo acontece para a ligação de hidrogênio entre Ile 6 (O) com Leu 10 (N) nos primeiros 400ps (figura 5.4b). Este rompimento de ligação de hidrogênio está associada com a modificação conformacional do resíduo Leu 10 abordada anteriormente.

A análise dos ângulos diedrais dos resíduos 7, 8 e 9 nas dinâmicas de ambos peptídeos, mostra que para o Anoplin-NH₂ os valores de ϕ e ψ estão na região favorável

para conformação em hélice- α . No caso do Anoplin-OH, constatamos que o ψ da Lys 7 sai da região de hélice logo nos primeiros 800 ps, mas o ϕ se mantém, em média na região helicoidal; a Thr 8 nos primeiros 300 ps tem seus ângulos diedrais fora da região de hélice, e o mesmo acontece com a Leu 9.

A desestruturação dos resíduos 8 e 9 pode ser observada pelos gráficos da figura 5.5, nas quais mostramos as variações dos padrões de estruturas secundárias de ambos peptídeos ao longo da dinâmica. Estes cálculos foram feitos utilizando o programa DSSP (“Database of Secondary Structure in Proteins”- Kabsch & Sander, 1983) implementado ao GROMACS. Os dois peptídeos têm uma estrutura helicoidal de partida composta pelos resíduos de 2 a 10. Consideramos o 10º resíduo inicialmente em conformação helicoidal devido sua ligação de hidrogênio com o 6º resíduo, nesta análise os resíduos do N e C-terminais não são considerados na estrutura secundária (seção 2.3). O Anoplin-OH sofre a desestruturação dos resíduos 8, 9 logo nos primeiros 200 ps, o que é condizente com as demais análises de ligações de hidrogênio e dos ângulos diedrais; assumindo ao longo da dinâmica uma estrutura helicoidal composta pelos resíduos de 2 a 7.

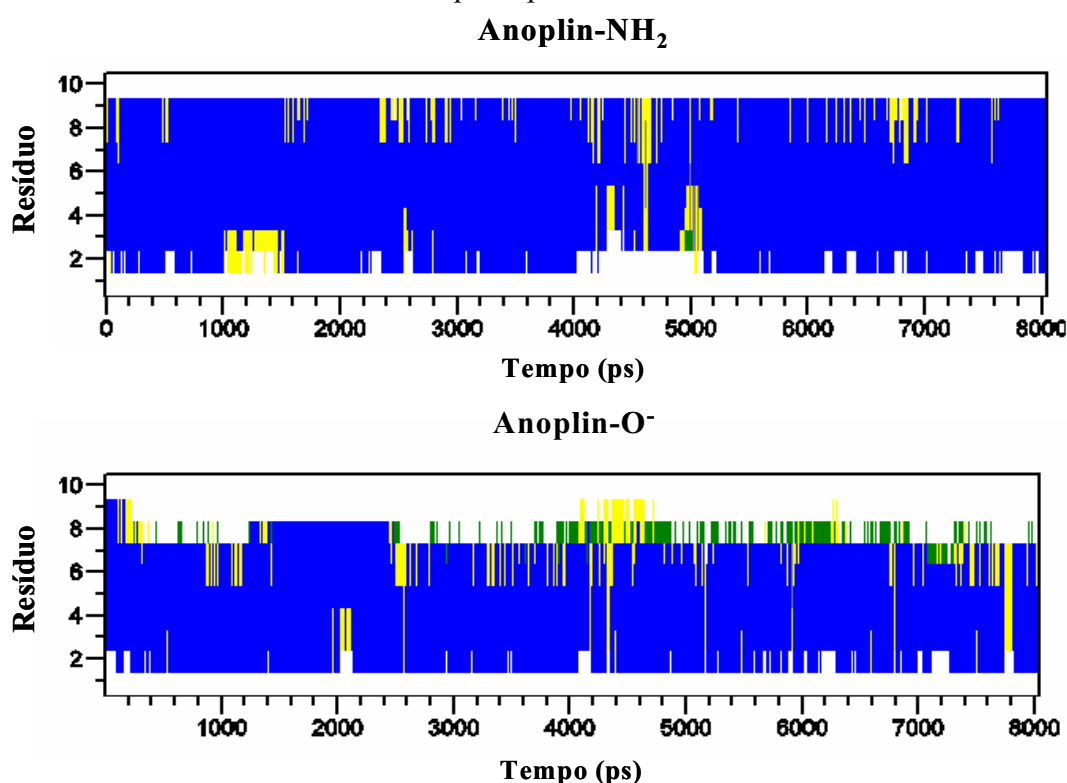


Figura 5.5: Padrões de estrutura secundária por resíduo, ao longo da dinâmica, para o Anoplin-NH₂ e Anoplin-OH. Em branco, resíduos em conformação aleatória (“coil”); em verde, resíduos em curvas (“bend”); em amarelo, resíduos em voltas (“turn”); em azul, resíduos em hélice- α .

O Anoplin-NH₂ mantém sua estrutura em hélice- α (da Leu 2 a Leu 10) estável ao longo da dinâmica, a menos de algumas flutuações do 2º resíduo no intervalo de 4 a 5 ns. Estes resultados estão em concordância com os percentuais helicoidais encontrados para estes peptídeos em ambientes anfipáticos como TFE e água (Ifrah et al., 2005; Apêndice A)

Macro-dipolo da hélice:

O macro-dipolo da hélice, formado pelos dipolos das ligações peptídicas, foi calculado ao longo da dinâmica de ambos peptídeos. Na figura 5.6, podemos observar os gráficos dos momentos de macro-dipolo dos resíduos que estão em conformação helicoidal ao longo do tempo. O valor médio do macro-dipolo é 0,49 nm e para o Anoplin-NH₂, e para o Anoplin-OH, que apresenta menos resíduos em hélice é de 0,41 nm e. Esta diferença já era esperada, pois o macro-dipolo da hélice é medido pelo alinhamento dos dipolos formados pelas ligações peptídicas dos resíduos que estão em hélice. A introdução de uma carga negativa no C-terminal o Anoplin-OH resultou na redução do percentual helicoidal.

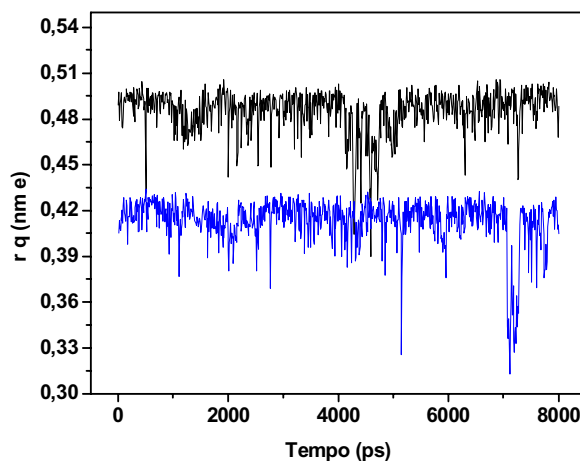


Figura 5.6: Gráficos dos macros-dipolo das hélices do Anoplin-NH₂ (preto) e Anoplin-OH (azul) ao longo da dinâmica.

No gráfico do Anoplin-NH₂ (preto) o macro-dipolo da hélice apresenta um suave decaimento no intervalo de 4 a 5 ns, que corresponde a desestruturação do 2º resíduo

mostrado pelo gráfico da figura 5.5. As flutuações do macro-dipolo do Anoplin-OH (azul) no intervalo de 7 a 8 ns são correspondentes às variações estruturais dos resíduo 5, 6 e 7 mostradas na figura 5.5.

Análise das Interações Eletrostáticas:

A presença da carga negativa no C-terminal, causa uma desestruturação dos resíduos 8, 9 e 10 no Anoplin-OH, com esta análise investigamos quais as interações eletrostáticas que estão envolvidas nesta desestruturação. Todas as distâncias entre os grupos de cargas e os grupos polares foram analisadas para ambos os peptídeos. O Anoplin-NH₂ apresenta um quadro de distâncias que não têm flutuações significantes ao longo da dinâmica, as interações entre as cargas são do tipo repulsiva e podem contribuir favoravelmente para a manutenção da hélice e para a estruturação do solvente (vista na próxima análise).

Na figura 5.7 apresentamos os gráficos das distâncias, para o Anoplin-OH, entre as cargas das cadeias laterais da Lys 4 e Arg 5 com a carga negativa (O⁻) do C-terminal. A carga negativa (O⁻) aproxima-se das cargas positivas (Lys 4 e Arg 5) logo nos primeiros picosegundos, esta aproximação pode ser associada com as modificações estruturais observadas nas análises anteriores.

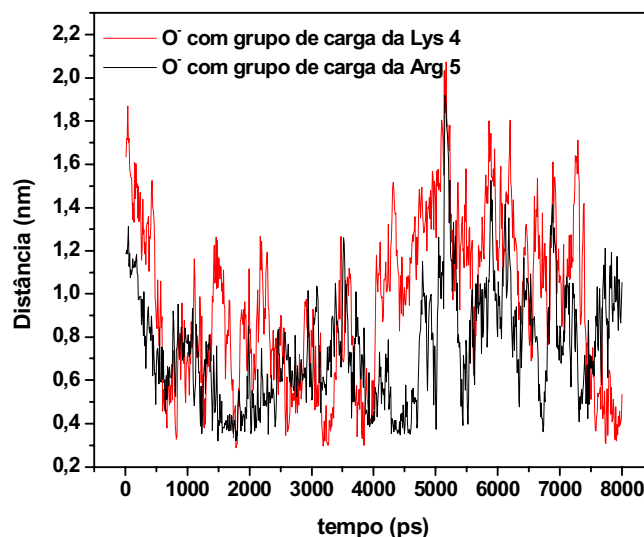


Figura 5.7: Gráficos das distâncias entre as cargas das cadeias laterais da Lys 4 e Arg 5 com a carga negativa (O⁻) do C-terminal. Em vermelho apresentamos a distância entre o grupo NH₃⁺ da cadeia lateral da Lys 4 e a átomo O⁻ do C-terminal. Em preto é mostrada a distância entre o centro de massa do grupo “NH₂-C-NH₂” da cadeia lateral da Arg 5 e o átomo O⁻ do C-terminal.

Notamos que em determinados intervalos de tempo as cargas ficam a distâncias pequenas (4 Å) típicas de “pontes salinas”, impedindo que os resíduos 8, 9 e 10 voltem para conformação helicoidal inicial. Fica evidente em alguns intervalos (de 1,5 a 2,5 ns, de 4 a 5 ns e de 7,5 a 8 ns) que a carga negativa oscila entre as cargas de ambos resíduos.

Ângulo Polar e Perfil de Solvatação:

As estruturas de RMN em SDS de ambos peptídeos mostram uma conformação helicoidal anfipática com uma face polar (ângulo polar) subentendida num ângulo, determinado pela projeção da hélice em um plano normal a seu eixo, de aproximadamente 90° para o amidado (figura 5.8a) e 110° para a forma carboxilada (figura 5.8b). A origem deste ângulo é o eixo da hélice e ele é limitado pelos grupos de carga dos resíduos polares que estão na interface hidrofóbica-hidrofílica (como mostra a figura 5.8).

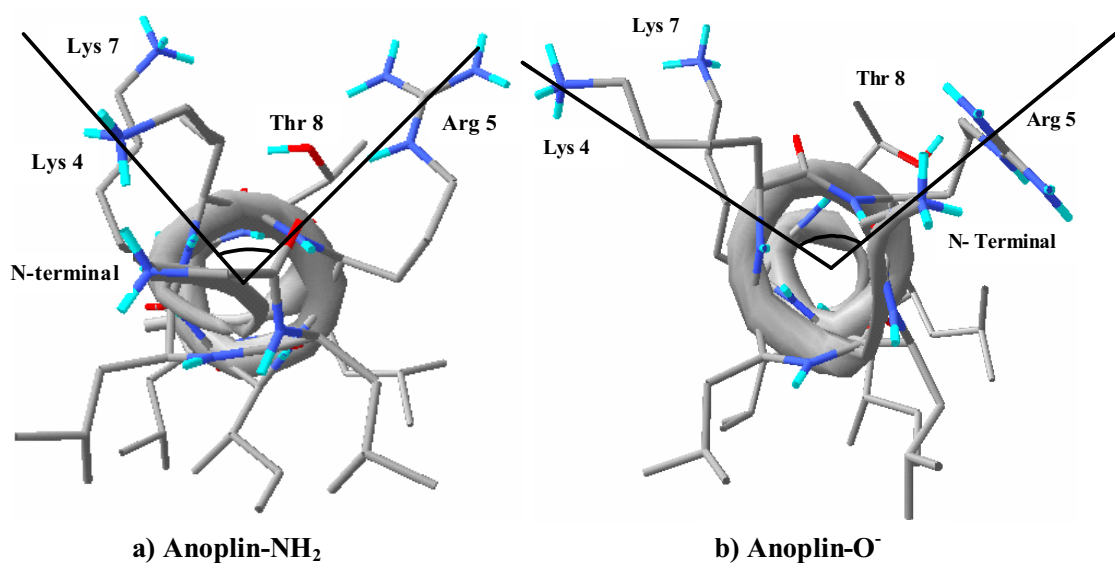


Figura 5.8: Cadeias obtidas por RMN projetadas no plano ortogonal ao eixo da hélice. Em a) estrutura do Anoplin-NH₂. Em b) estrutura do Anoplin-OH. Em azul claro estão os átomos de hidrogênio; em vermelho os átomos de oxigênio; em azul os átomos de nitrogênio; em cinza os átomos de carbono (C, CH, CH₂ e CH₃).

Os resultados a dinâmica molecular em TFE, por outro lado, mostram que o Anoplin-NH₂ mantém o C_α dos resíduos polares aproximadamente na mesma posição, mas os grupos carregados são encontrados em diferentes posições na face polar, aumentando o

ângulo polar para 160° (figura 5.9a). Devido a desestruturação do C-terminal do Anoplin-OH os resíduos Leu 9 e Leu 10 invadem a face polar deste peptídeo e destroem a anfipaticidade da hélice (figura 5.9b). A figura 5.9 mostra as estruturas médias no intervalo de 5 a 8 ns da dinâmica de ambos peptídeos.

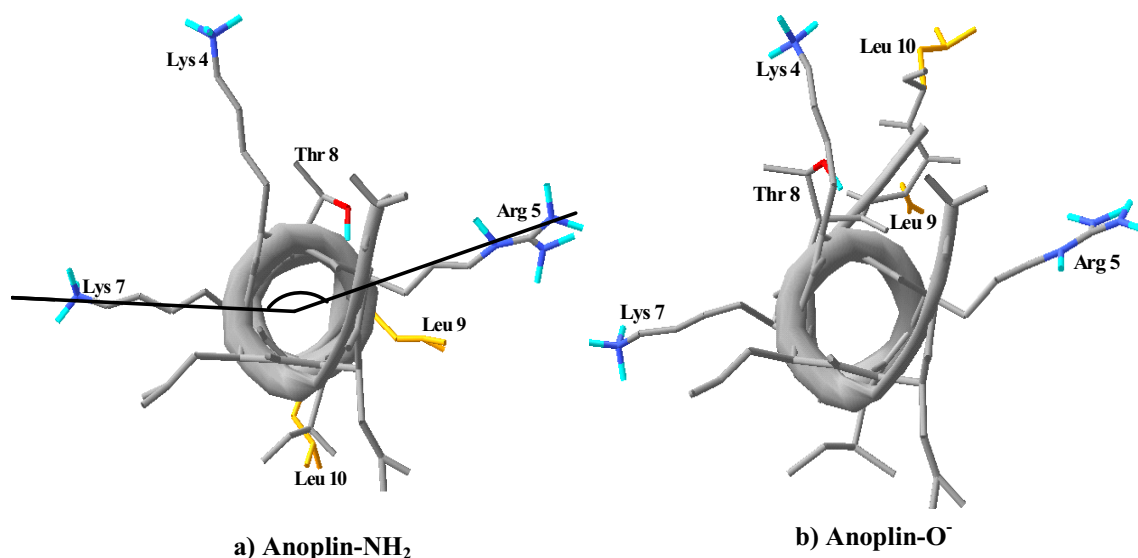


Figura 5.9: Estruturas médias obtidas no intervalo de 5 a 8 ns da DM de ambos peptídeos, projetadas no plano ortogonal ao eixo da hélice. Em a) estrutura do Anoplin-NH₂. Em b) estrutura do Anoplin-OH. Em azul claro estão os átomos de hidrogênio; em vermelho os átomos de oxigênio; em azul os átomos de nitrogênio; em cinza os átomos de carbono (C, CH, CH₂ e CH₃) e em amarelo a cadeia lateral dos resíduos Leu 9 e Leu 10.

As modificações estruturais produzidas pela presença da carga negativa no C-terminal do Anoplin-OH, se devem às diferenças no ambiente causadas pelo rearranjo das moléculas do solvente e pela interação entre a carga negativa do C-terminal e as cargas positivas das cadeias laterais dos resíduos Lys 4 e Arg 5. As análises de solvatação, no caso do Anoplin-NH₂, retratam a anfipaticidade da conformação helicoidal, ou seja, os resíduos carregados, polares e a carga do N-terminal são solvatados preferencial por moléculas de água, já os resíduos hidrofóbicos são solvatados por moléculas de TFE (pelo grupo CF₃).

Na figura 5.10 mostramos o perfil de solvatação, no intervalo de 5 a 8 ns, em torno do N e C-terminais. A carga positiva do N-terminal de ambos peptídeos são igualmente solvatadas, ou seja, o número de moléculas de água é maior que o número de moléculas de TFE para um mesmo raio (figura 5.10a). O que é concordante com os dados de RMN e de

CD, que mostram que as estruturas destes peptídeos têm o N-terminal desestruturado, fazendo com que o primeiro resíduo apresente uma grande liberdade conformacional e fique exposto ao solvente. Na figura 5.10b mostramos a análise de solvatação do C-terminal do Anoplin-NH₂ e do Anoplin-OH. Considerando o raio de 0,3 nm, verificamos a presença de aproximadamente 5 moléculas de água em torno do grupo carboxila do Anoplin-OH, três a mais do que em torno do grupo amida (polar) do Anoplin-NH₂.

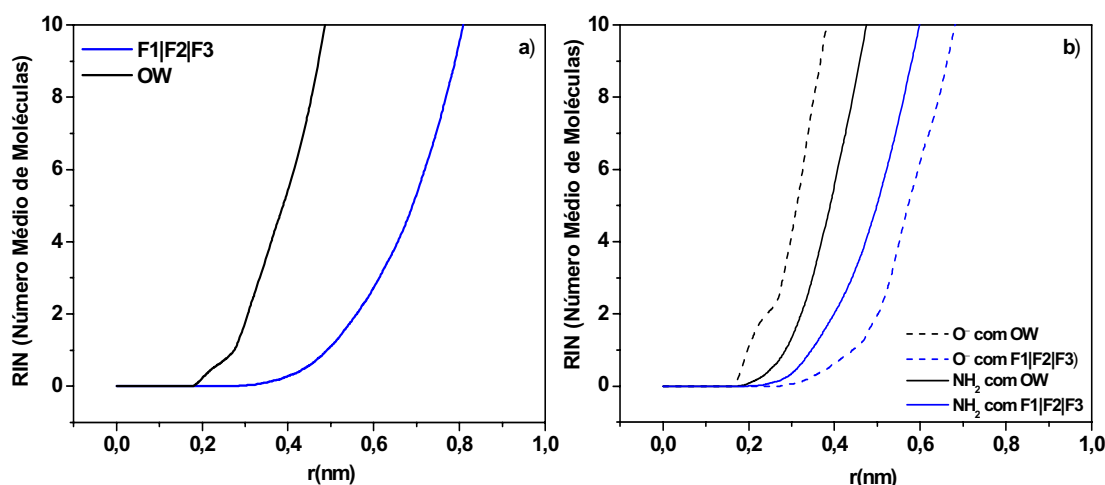


Figura 5.10: Gráficos da Integral da Função de Distribuição Radial de Pares (RIN), no intervalo de 5 a 8 ns, para os grupos NH₃⁺ (N-terminal), NH₂ (C-terminal) e COOH (C-terminal) dos peptídeos Anoplin-NH₂ e Anoplin-OH. Em azul são apresentadas as curvas de RIN para o centro de massa dos átomos de flúor da molécula de TFE. Em preto apresentamos as curvas de RIN para os átomos de O (OW) das moléculas de água. Em a) temos as curvas de RIN para o N-terminal do Anoplin-NH₂. Em b), temos as curvas de RIN para o C-terminal de ambos peptídeos: Anoplin-NH₂ (linhas contínuas) e para o Anoplin-OH (linhas tracejadas).

Da figura 5.9 e das demais análises, notamos que os resíduos Thr 8, Leu 9 e Leu 10 na dinâmica do Anoplin-OH sofre modificações conformacionais consideráveis, e os resíduos 9 e 10 deixam de pertencer a face hidrofóbica da hélice. Pela análise de solvatação no intervalo de 5 a 8 ns da dinâmica do Anoplin-NH₂, verificamos que a cadeia lateral Leu 9 manteve-se na região de interface hidrofóbica-hidrofílica (figura 5.11a), tendo o mesmo número de moléculas de água e de TFE na sua região de solvatação. Na dinâmica do Anoplin-OH, no mesmo intervalo, o número de moléculas de água e de TFE também são coincidentes apesar das mudanças conformacionais já citadas. Esta característica de solvatação tem conseqüências diferentes para cada tipo de peptídeo: para o Anoplin-NH₂ a estrutura helicoidal deve ser favorecida pela localização da cadeia lateral da Leu 9 na

interface; a desestruturação do C-terminal do Anoplin-OH deve ser favorecida devido a redução do caráter anfipático, ou seja, passou a ter moléculas de TFE solvatando a face hidrofílica.

Nas figuras 5.11b e 5.11c, apresentamos as curvas de solvatação, correspondente aos últimos 3ns, para a cadeia lateral Leu 10 nas dinâmicas do Anoplin-NH₂ e Anoplin-OH respectivamente. No caso do Anoplin-NH₂ a cadeia lateral Leu 10 localiza-se no centro da região hidrofóbica e por isso é solvatada preferencialmente por moléculas de TFE (figura 5.11b). No Anoplin-OH, a cadeia lateral da Leu 10 é preferencialmente solvatada por moléculas de água condizente com sua localização na região hidrofílica do Anoplin-OH.

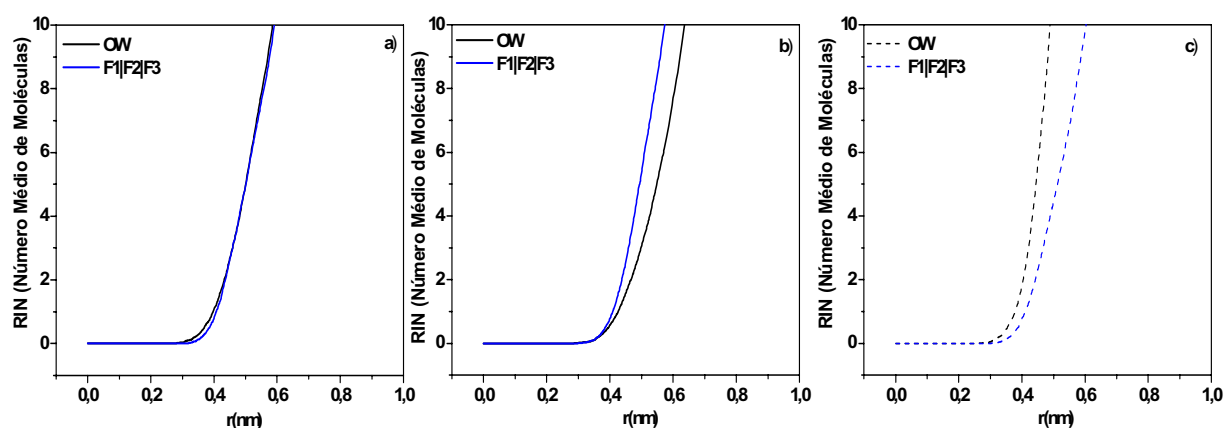
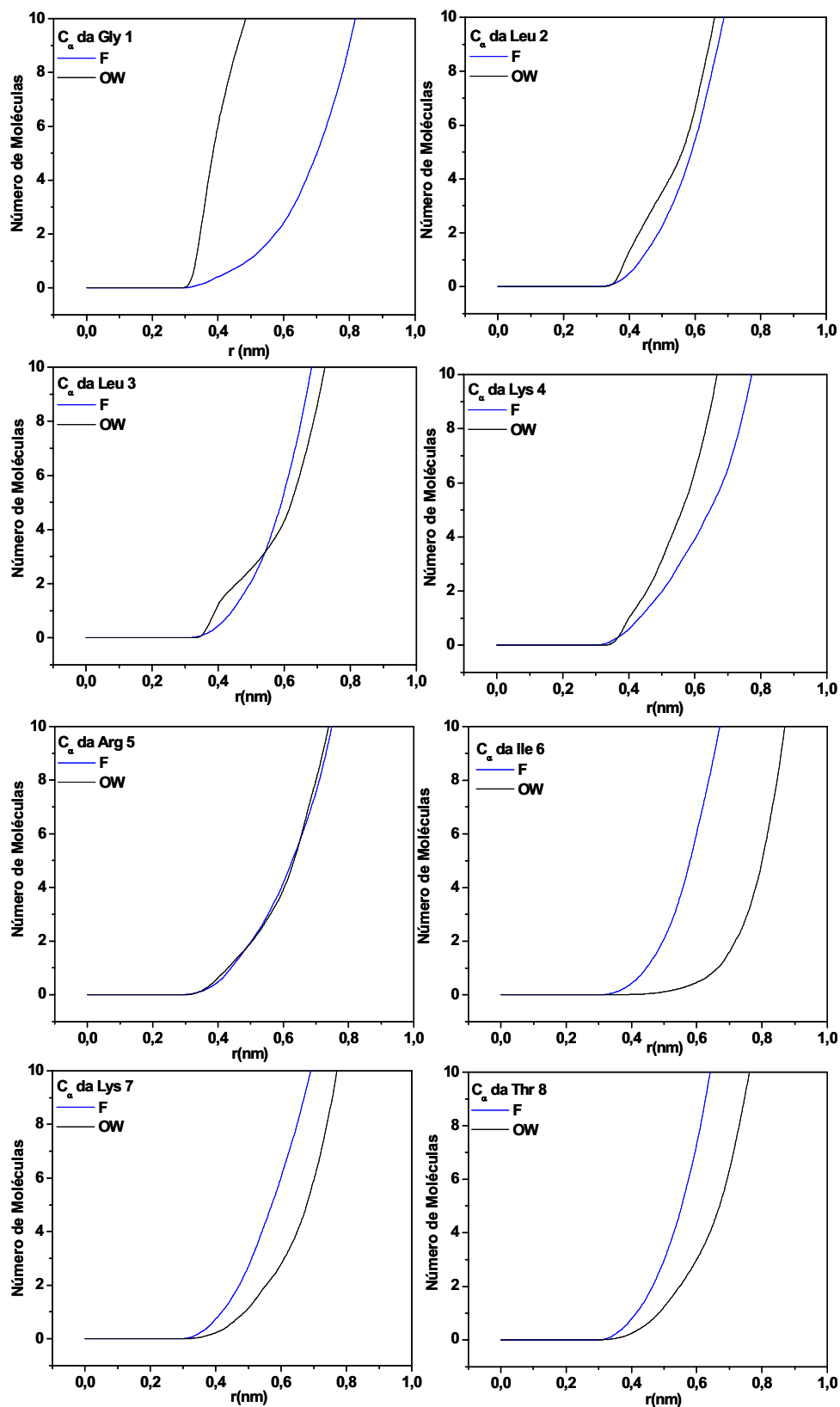


Figura 5.11: Gráficos da Integral da Função de Distribuição Radial de Pares (RIN), no intervalo de 5 a 8 ns, para as cadeias laterais dos resíduos Leu 9 e Leu 10 dos peptídeos Anoplin-NH₂ e Anoplin-OH. Em azul são apresentadas as curvas de RIN para o centro de massa dos átomos de flúor da molécula de TFE. Em preto apresentamos as curvas de RIN para os átomos de O (OW) das moléculas de água. Em a), temos as curvas de RIN para a cadeia lateral da Leu 9 do Anoplin-NH₂. Em b), temos as curvas de RIN para a cadeia lateral da Leu 10 do Anoplin-NH₂. Em c), temos as curvas de RIN para a cadeia lateral da Leu 10 do Anoplin-OH (linhas tracejadas).

Se considerarmos as cargas positivas dos resíduos Lys 4, Arg 5 e Lys 7 e o grupo polar do resíduo Thr 8, as curvas de RIN foram examinadas e são compatíveis umas as outras para ambos peptídeos. Estas curvas mostram uma abundância de moléculas de água, numa razão de 10 pra 1 num raio de 0,4 nm.

Como 40% dos resíduos do Anoplin são carregados ou polares, este peptídeo apresenta, assim com o MP-I, um valor baixo para hidrofobicidade (0,054 – seção 1.2.3).

Por esse fato, verificamos a solvatação na região da cadeia principal do Anoplin-NH₂ através da análise das curvas de RIN do C_α(s) apresentadas na figura 5.12.



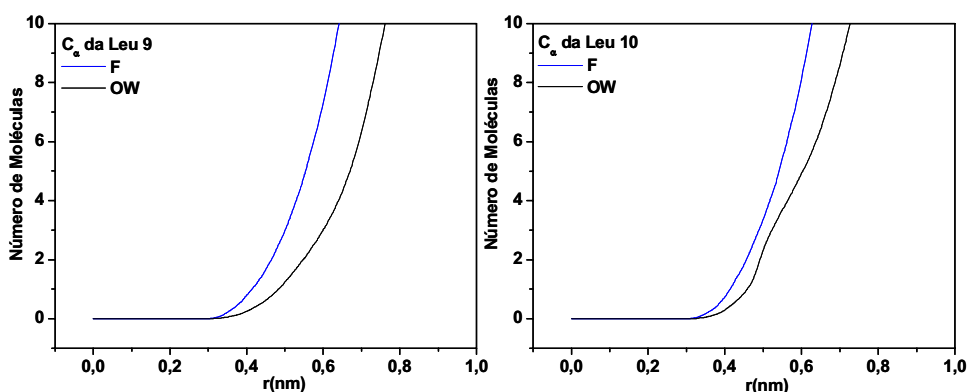


Figura 5.12: Gráficos da Integral da Função de Distribuição Radial de Pares (RIN) para o Anoplin-NH₂ ao longo da dinâmica de 8 ns. Nas ordenadas apresentamos o número médio de moléculas e nas abscissas, o raio da esfera centrada no C_α variando de 0 a 1 nm. Para esta análise escolhemos o C_α de cada resíduo do peptídeo, o centro de massa dos 3 átomos de flúor (F) da molécula de TFE (em azul) e o átomo de oxigênio (OW) da molécula de água (em preto).

Pelos motivos já discutidos no capítulo anterior, consideraremos para esta análise $r = 0,5$ nm e os carbonos- α dos resíduos ímpares. Pela figura 5.12 constatamos que a Gly 1 tem 10 moléculas de água para 1 de TFE na região do seu C_α. Isso ocorre devido a presença da carga do N-terminal (NH₃⁺) e do fato da glicina ter apenas um átomo de hidrogênio em sua cadeia lateral favorecendo a solvatação pela água e permitindo que este resíduo tenha uma grande variabilidade conformacional, como observado da figura 5.2b. Isso também impede que este resíduo forme ligações de hidrogênio n-n+4 com a Arg 5, mantendo-o fora da porção helicoidal.

A Arg 5 é solvatada aproximadamente pelo mesmo número de moléculas de TFE e de água, duas. Este resíduo tem cadeia lateral longa e apresenta grupos metilênicos em sua extensão, assim com as lisinas, “atraindo” moléculas de TFE para sua região, e as moléculas de água nessa região são devido a proximidade de seu C_α com o resíduo Gly 1 (figura 5.9 e 5.1). A Leu 3 e a Leu 9 localizam-se na interface hidrofóbica-hidrofílica, o que justifica a presença das moléculas de água na região dessas cadeias principais.

Este número elevado de moléculas de água na região da cadeia principal do Anoplin-NH₂ sugere, da mesma forma que para o MP-I, que a falta de atividade hemolítica deve-se a sua incapacidade de “enterrar-se” no interior da bicamada membranar, que está diretamente ligada a uma solvatação equilibrada entre água e grupos CF₃ na região da cadeia principal. Deve-se destacar aqui que em termos do fator hidrofobicidade, usualmente

utilizado na literatura para a racionalização do comportamento destes peptídeos, ambos MP-I e Anoplin-NH₂ têm valores próximos: 0,068 e 0,054, respectivamente. Neste trabalho entendemos que esse fator, num certo sentido, reflete a solvatação da cadeia principal.

Cabe questionar porque esse maior número de moléculas d'água próximo aos carbonos C_α não desestabiliza as ligações de hidrogênio, principalmente na região do N-terminal onde a quantidade de água é maior do que a de grupos CF₃. Esse equilíbrio e a manutenção das ligações de hidrogênio se mantém, além da solvatação, pelo equilíbrio eletrostático, determinado pela repulsão entre as cargas positivas dos resíduos carregados e do N-terminal. Além disso, a análise do RIN em torno dos átomos eletronegativos que participam das pontes de hidrogênio mostram que, na distância de 0,45 nm, eles estão solvatados por CF₃. A ligação, potencialmente, mais sensível a isso é aquela entre o O da Leu 2 com o N da Ile 6, pois a Leu 2 está numa região com muita água. O RIN em torno do O da Leu 2, contudo, é (1,0:0,2) (CF₃:água), enquanto para o O da leu 6 obtemos (0,9:0). O N da Leu 6. Para as demais ligações essas relações são ainda mais favoráveis. Porém o tempo de permanência destas ligações ao longo da dinâmica decaem da extremidade C-terminal para a N-terminal. A razão para isso pode ser atribuída à distribuição de cargas que estão, essencialmente, concentradas do N-terminal até a metade do peptídeo.

Conclusões:

A desamidação do C-terminal do Anoplin não causa variações na conformação do peptídeo em ambientes altamente aniônicos como SDS. Uma racionalização para esta observação é que as cargas positivas das cadeias laterais do peptídeo interagem fortemente com as cargas distribuídas no ambiente aniônico, impedindo uma interação mais efetiva destes grupos com a carga negativa do C terminal e, portanto, variações significativas na estrutura.

Em ambientes anfipáticos e não carregado como o TFE e água, ao contrário, notamos que a carga do C-terminal, passa a interagir de forma atrativa com as cargas das cadeias laterais, causando um rearranjo do solvente nas vizinhanças do peptídeo e, com isso, ocorre uma perda no teor helicoidal e na anfipaticidade da hélice. Estes fatores modulam a atividade biológica destes peptídeos (Giangaspero et al., 2001; Dathe et al.,

1997; Dathe et al., 2002), ou seja, a perda de anfipaticidade esta relacionada com a perda de atividade antimicrobiana (Giangaspero et al., 2001; Dathe et al., 1997).

O Anoplin-NH₂ não apresenta modificações no seu percentual helicoidal em solventes anfipáticos e não carregados (TFE/água), a presença do grupo amida no C-terminal favorece a permanência da Leu 10 na face apolar da hélice, que é solvatada preferencialmente por moléculas de TFE. Este agrupamento (“cluster”) nas proximidades da região hidrofóbica está em concordância com dados de dinâmica de peptídeos em misturas de TFE e água (Johnston et al., 2006; Fioroni et al., 2002; Roccatano et al., 2002). No caso do Anoplin-OH a interação eletrostática entre a carga negativa e as cargas positivas das cadeias laterais vence a interação hidrofóbica que mantinha a Leu 10 na face apolar.

Embora o Anoplin-NH₂ mantenha sua estrutura helicoidal em misturas de TFE e água, as cargas das cadeias laterais são repelidas mutuamente, produzindo alterações no ângulo polar deste peptídeo, que vai de ~90° (em SDS - RMN) para ~160° (em TFE/água - DM). Estas diferenças não são artifícios criados pela simulação, pois se observarmos do estudo do EMP-AF (capítulo 3), as estruturas de RMN (Sforça et al., 2004 – dados de RMN do EMP-AF em TFE/água) e as obtidas em média pela DM apresentam uma variação não significativa no ângulo polar. Entretanto, a variação do ângulo polar apresentada pelo Anoplin-NH₂ em diferentes ambientes pode ser correlacionada com a interação de suas cargas com as cargas da membrana. A medida que o ambiente se torna menos aniônico as cargas do peptídeo passam a interagir entre si, aumentando sua face polar. Esse aumento no ângulo polar implica em menor penetração no interior da membrana e, conseqüentemente, em menor desarranjo da bicamada lipídica, o que justifica a diminuição gradual do vazamento (“leakage”) causado pelo Anoplin-NH₂ com a diminuição da densidade das cargas negativas nas vesículas. Estes resultados são condizentes com testes de variação do ângulo polar para peptídeos catiônicos encontrados na literatura (Uematsu and Matsuzaki, 2000; Wieprecht et al., 1997b; Zhao, 2003 – Seção 1.2.7).

A análise de solvatação dos carbonos- α permite compreender o significado do baixo valor da hidrofobicidade atribuído ao Anoplin-NH₂ quando comparado com a maioria dos mastoparanos, e sua relevância para a manutenção da estrutura helicoidal. Dela, verifica-se a presença de um número elevado de moléculas de água na região da cadeia principal do

peptídeo, tornando-a menos hidrofóbica, fato que, como discutido acima, inibe o peptídeo de “enterrar-se” no interior da bicamada.

Capítulo 6 – Conclusões Gerais

O principal objetivo deste trabalho era correlacionar propriedades como estrutura secundária, anfipaticidade, hidrofobicidade, ângulo polar e amidação do C-terminal com informações extraídas da dinâmica molecular, com o intuito de sugerir explicações as diferenças entre as atividades biológicas e mecanismos de ação de alguns mastoparanos com bicamadas membranas.

Verificou-se, do estudo do EMP-AF, que a presença do grupo amida no C-terminal é essencial para a manutenção de sua estrutura helicoidal anfipática e, com isso, a manutenção de sua atividade antimicrobiana e hemolítica. Na simulação do EMP-AF-NH₂ encontramos um conteúdo helicoidal alto e compatível com dados experimentais de CD e RMN. A anfipaticidade está bem caracterizada devido a solvatação “ideal” proporcionada pelos grupos hidrofóbicos (CF₃) do TFE solvatando a face hidrofóbica do peptídeo, e a face hidrofílica solvatada pelas moléculas de água e também pelos átomos de oxigênio do grupo polar da molécula de TFE. Das simulações com o EMP-AF-OH verifica-se uma perda significativa do teor helicoidal, além do comprometimento da anfipaticidade. Forma-se uma hélice estável ao longo da dinâmica entre os resíduos de 3 a 7, enquanto os resíduos 8, 9 e 10 oscilam, ora entrando nessa conformação em determinados intervalos e em outros não. Mostrou-se que, esse comportamento, assim com a desestruturação dos resíduos do C-terminal, está associado às interações atrativas entre as cargas positivas das cadeias laterais deste peptídeo com a carga negativa do grupo carboxila (COOH).

A desestruturação no C-terminal da hélice e a conseqüente perda da anfipaticidade, sugerem que a interação com a membrana seria desfavorável, pois estes fatores são fundamentais para isso, e, como conseqüência, o EMP-AF-OH não apresenta atividade antimicrobiana ou hemolítica. O EMP-AF-NH₂, por outro lado, devido a estabilidade da estrutura de hélice- α e anfipática, interage favoravelmente com o interior hidrofóbico das membranas e sua região hidrofílica, mais precisamente a região das cargas, interage com as cabeças polares dos lipídeos.

Das simulações por dinâmica molecular em misturas TFE-água, sugerimos que a conformação do MP-I seja um hélice- α anfipática composta pelos resíduos de 3 a 13, o que é comprovado dos experimentos de dicroísmo circular. Assim como outros mastoparanos o

MP-I apresenta os resíduos 1 e 2 desestruturados, devido a uma ligação de hidrogênio entre o grupo de carga da cadeia lateral da Asp 2 com o N da cadeia principal da Lys 4, esta interação permite-nos sugerir que o ângulo polar não deve ser medido a partir de uma representação da posição dos carbonos- α e sim da real localização das cargas na conformação do peptídeo. O MP-X também apresenta uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio da cadeia lateral da Asn 2 que fica oscilando entre o N da Lys 4 e o N da Gly 5. Estas ligações de hidrogênio fazem com que o ângulo polar de ambos peptídeos tenham o mesmo valor e isso pode dificultar a compreensão nas diferenças de atividade, como sugerem outros autores (ver capítulo 1).

A ausência da atividade hemolítica para o MP-I é, usualmente, justificada pela baixa hidrofobicidade, quando comparada ao MP-X. Neste trabalho fazemos uma associação deste parâmetro com o ambiente que solvata a cadeia principal do peptídeo. O MP-X apresenta uma região, em torno de sua cadeia principal, protegida das moléculas de água, ou seja, solvatada preferencialmente por TFE. Já o MP-I, devido às cargas de suas cadeias laterais (Asp e Gln), que são curtas, permite a inserção de moléculas de água na região de sua cadeia principal. Mostramos que sua estrutura helicoidal, ainda assim, é mantida devido ao equilíbrio eletrostático destes grupos carregados e dos grupos polares.

Dados experimentais mostram que a conformação e atividade antimicrobiana do Anoplin-OH são muito dependentes da densidade de carga do ambiente. Em solventes anfipáticos e não carregados como misturas de TFE e água a carga do C-terminal interage de forma atrativa com as cargas das cadeias laterais, causando um rearranjo na estrutura do peptídeo e no solvente nas suas vizinhanças. Com isso, ocorre uma perda no teor helicoidal e na anfipaticidade da hélice e também na sua atividade antimicrobiana.

O Anoplin-NH₂ tem baixa hidrofobicidade. Do estudo da solvatação mostramos a presença de moléculas de água na região da cadeia principal que poderia perturbar as ligações de hidrogênio do tipo $n-n+4$ e a estabilidade da estrutura helicoidal. Mostramos que dois fatores contribuem para explicar a manutenção da hélice- α : o equilíbrio eletrostático devido a repulsão entre os grupos carregados das cadeias laterais e o N-terminal e que, apesar da presença maior de moléculas d'água nessa região, os átomos eletronegativos da cadeia principal (O e N) são solvatados preferencialmente pelos grupos apolares do TFE. A presença das moléculas de água na região da cadeia principal deste

peptídeo sugerem que em presença de membrana esse peptídeo não seria capaz de se “enterrar” no interior da membrana e por isso não apresentaria atividade hemolítica. Discutimos ainda que os dados de vazamento de vesículas podem ser racionalizados pelas variações no ângulo polar.

Referências Bibliográficas

- ANDREU, D. et al. Solid-phase synthesis of cecropin A and related peptides **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.80, p.6475-6479, 1983.
- ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. **Biopolymers**, v. 47, p. 415-433, 1998.
- ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. **Computer Simulation of Liquids**. Oxford: Clarendon Press, 1987.
- ARBUZOVA, A.; SCHWARZ, G. Pore-forming action of mastoparan peptides on liposomes: a quantitative analysis. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1420, p.139-152, 1999.
- ARGIOLAS, A.; PISANO, J. J. Facilitation of phospholipase A₂ activity by mastoparans, a new class of mast cell degranulating peptides from wasp venom. **J. Biol. Chem.**, v. 258, p. 13697-13702, 1983.
- ARGIOLAS, A.; PISANO, J. J. Isolation and characterization of two new peptides, mastoparan C and crabrolin, from the venom of the european hornet, *Vespa crabro*. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 10106-10111, 1984.
- BÁRÁNY-WALLJE, E. et al. A critical reassessment of penetratin translocation across lipid membranes. **Biophys. J.**, v. 89, p. 2513-2521, 2005.
- BERENDSEN, H. J. C. et al. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Comp. Phys. Comm.**, v. 91, p. 43-56, 1995.
- 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. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **J. Chem. Phys.**, v. 81, p. 3684-3690, 1984.
- BERENDESEN, H. J. C.; VAN GUNSTEREN, W. Practical algorithms for dynamics simulations. in: **Molecular dynamics simulation of statistical mechanical systems.**, Amsterdam, North-Holland Phys, 1986.
- BESSALLE, R. et al. Augmentation of antibacterial activity of magainin by positive-charge chain extension. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 36, p.313-317, 1992.
- BLONDELLE, S. E. et al. Secondary structure induction in aqueous vs membrane-like environments. **Biopolymers**, v. 42, p. 489-498, 1997.
- BLONDELLE, S. E.; HOUGHTEN, R. A. Hemolytic and antimicrobial activities of the twenty-four individual omission analogs of melittin. **Biochem.**, v. 30, p. 4671-4678, 1991a.
- BLONDELLE, S. E.; HOUGHTEN, R. A. Probing the relationships between the structure and hemolytic activity of melittin. **Pept. Res.**, v. 4, p. 12-18, 1991b.
- BOMAN, H. G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 13, p. 61-92, 1995.
- BOMAN, H. G. et al. A mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39: two antibacterial peptides from pig intestine. **Infect Immun.**, v. 61, p. 2978-2984, 1993.

- BRADBURY, A. F.; SMYTH, D. G. Peptide amidation. **Trends Biochem. Sci.**, v. 16, p. 112-115, 1991.
- BREWER, D., et al. NMR studies of the antimicrobial salivary peptides histatin 3 and histatin 5 in aqueous and nonaqueous solutions. **Biochem. Cell Biol.**, v. 76, p. 247-256, 1998.
- BROOKS, B. R., et al. A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. **J. Comput. Chem.**, v. 4, p. 187-217, 1983.
- BROOKS III, C. L. et al. **Proteins: a theoretical perspective of dynamics, structure and thermodynamics:** Advances in chemical physics. New York: John Wiley, 1988, v.71.
- BUCK, M. Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age: recent studies with peptides and proteins. **Quart. Rev. Biophys.**, v. 31, p. 297-355, 1998.
- BURKERT, U.; ALLINGER, N. L. **Molecular mechanics.** Washington: American Chemical Society, 1982.
- CABIAUX, V., et al. Secondary structure and membrane interaction of PR-39, a Pro+Arg-rich antibacterial peptide. **Eur. J. Biochem.** v. 224, p. 1019-1027, 1994.
- CHEATHAM III, T. E. et al. Molecular dynamics simulations on solvated biomolecular system: the particle mesh ewald method leads to stable trajectories of DNA, RNA, and proteins. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 117, p. 4193-4194, 1995.
- CHEN, H. C. et al. **Peptides: Chemistry, Structure and Biology.** Leiden: ESCOM Science, 1990.
- CHEN, H. C., et al. Synthetic magainin analogues with improved antimicrobial activity. **FEBS Lett.**, v. 236, p. 462-466, 1988.
- CHO, M. H. et al. The effects of mastoparan on the carrot cell plasma membrane polyphosphoinositide phospholipase C. **Plant Physiol.**, v. 107, p. 845-856, 1995.
- CHUANG, C. et al. Conformation of *vespa basalis* mastoparan-B in trifluoroethanol-containing aqueous solution. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1292, p. 1-8, 1996.
- COLE, A. et al. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of Winter Flounder. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 12008-12013, 1997.
- CORNUT, I.; THIAUDIÈRE, E.; DUFOURCQ, J. **The Amphipathic Helix**, Boca Raton, FL: CRC Press, 1993.
- DARDEN, T. et al. Particle mesh ewald – a $N \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. **J. Chem. Phys.**, v. 98, p. 10089-10092, 1993.
- DATHE, M. et al. Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayer and biological membranes. **Biochem.**, v. 35, p. 12612-12622, 1996.
- DATHE, M. et al. Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. **FEBS Lett.**, v. 403, p. 208-212, 1997.
- DATHE, M.; WIEPRECHT, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membrane and biological cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1462, p. 71-87, 1999.
- DATHE, M. et al. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. **FEBS Lett.**, v. 501, p. 146-150, 2001.

- DATHE, M. et al. General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1558, p. 171-86, 2002.
- DE VLIEG, J.; VAN GUNSTEREN, W. F. *Methods in Enzymology*. v. 268, New York: Academic Press, 1991.
- DEBER, C. M.; LI, S. C. Peptides in membranes: helicity and hydrophobicity. **Biopolym.**, v. 37, p. 295-318, 1995.
- DeGRADO, W. F. et al. Kinetics and mechanism of hemolysis induced by melittin and by a synthetic Melittin analogue. **Biophys. J.**, v. 37, p. 329-338, 1982.
- DOS SANTOS CABRERA M. P. et al. Conformation and Lytic activity of eumenine mastoparan: a new antimicrobial peptide from wasp venom. **J. Peptide Res.**, v. 64, p. 95-103, 2004.
- DOS SANTOS CABRERA M. P. Estudo da Conformação e Atividade Lítica de Peptídeos Antimicrobianos de Vespas. Tese de Doutorado. Departamento de Física –Ibilce – Unesp. São José do Rio Preto, 2006.
- DOHTSU, K. et al. Isolation and sequence analysis of peptides from the venom of *Protonectarina sylveirae* (Hymenoptera-Vespidae). **Natural Toxins**, v. 1(5), p. 271-276, 1993.
- DUCLOHIER, H.; WROBLEWSKI, H. Voltage-dependent pore formation and antimicrobial activity by alamethicin and analogues. **J. Membr. Biol.**, v. 184, p. 1-12, 2001.
- EISENBERG, D. et al. The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 81, p.140-144, 1984a.
- EISENBERG, D. et al. Analysis of membrane and surface protein sequences whit the hydrophobic moment plot. **J. Mol. Biol.**, v. 179, p. 125-142, 1984b.
- EPAND, R. M.; VOGEL, H. J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1462, p. 11-28, 1999.
- ESSMANN, U. et al. A smooth particle mesh ewald method. **J. Chem. Phys.**, v. 103, p. 8577-8593, 1995.
- EWALD, P. Die Berechnung optischer und elektrostatischer gitteerpotentiale. **Ann. Phys.**, v. 64, p. 253-287, 1921.
- FATTAL, E. et al. Pore-forming peptides iinduce rapid phospholipid flip-flop in membranes. **Biochem.**, v. 33, p. 6721-6731, 1994.
- FIORONI, M. et al. A New 2,2,2-trifluoroethanol model for molecular dynamics simulations. **J. Phys. Chem.**, v. 104, p. 12347-12354, 2000.
- FIORONI, M. et al. Solvation phenomena of a tetrapeptide in water/trifluoroethanol and water/ethanol mixtures: a diffusion NMR, intermolecular NOE, and molecular dynamics study. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 124, n. 26, p. 7737-7744, 2002.
- GIANGASPERO, A. et al. Amphipathic α -helical antimicrobial peptides: a systematic study of the effects of structural and physical properties on biological activity. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, p. 5589-5600, 2001.
- HANCOCK, R. E. W. Cationic peptide: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. **Lancet Infect. Dis.**, v. 1, p. 156-164, 2001.

- HARWIG, S. S. et al. Determination of disulphide bridges in PG-2, an antimicrobial peptide from porcine leukocytes. **J. Pept. Sci.**, v. 1, p. 207-215, 1995.
- HELMERHORST, E. J. et al. The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 7286-7291, 1999a.
- HELMERHORST, E. J. et al. A critical evaluation of the lytic activity of cationic antimicrobial peptides against *Candida albicans* cells and human erythrocytes. **FEBS Lett.**, v. 449, p. 105-110, 1999b.
- HELLMANN, N.; SCHWARZ, S. Peptide-liposome association. A critical examination with mastoparan-X. **Biochim Biophys Acta**, v. 1369, p. 267-277, 1998.
- HESS, B. et al. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **J. Comp. Chem.**, v. 18, p. 1463-1472, 1997.
- HIGASHIJIMA, T. et al. Conformational change of mastoparan from wasp venom of binding with phospholipid membrane. **FEBS Lett.**, v. 152, n. 2, p. 227-230, 1983.
- HIGASHIJIMA, T., et al. Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G Proteins). **J Biol. Chem.** v. 263, p. 6491-6494, 1988.
- HIGASHIJIMA, T. et al. Regulation of Gi and G, by mastoparan, related amphophilic peptides, and hydrophobic amines: mechanism and structural determinants of activity. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 14176-14186, 1990.
- HIGERTY, B. E. et al. Dielectric effects in biopolymers: The theory of ionic saturation revisited **Biopolym.**, v. 24, p. 427-439, 1985.
- HILL, T. L. **An Introduction to Statistical Thermodynamics**. New York: Addison-Wesley, 1960.
- HIRAI, Y. et al. A new mast cell degranulating peptide in venom of *Vespula Lewissii*. **Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)** v. 27, p. 1942-1944, 1979a.
- HIRAI, Y., et al. A new mast cell degranulating peptide homologous to mastoparan in the venom of Japanese hornet (*Vespa xanthoptera*). **Chem. Pharm. Bull.**, v. 27, p. 1945-1946, 1979b.
- HIRAI, Y. et al. A new mast cell degranulating peptide, polistes mastoparan, in the venom of *Polistes jadwigae*. **Eiomed. Res.**, v. 1, p. 185-197, 1980.
- HIRAI, Y., et al. A new mast cell degranulating peptide, mastoparan-M, in the venom of the hornet *Vespa mandarinia*. **Biomed. Res.**, v. 2, p. 447-449, 1981.
- HO, C. L.; HWANG, L. L. Structure and biological activities of a new mastoparan isolated from the venom of the hornet *Vespa basalis*. **Biochem. J.**, v. 274, p. 453-456, 1991.
- HO, C. L. et al. Comparison of the immunogenicity of wasp venom peptides with or without carbohydrate moieties. **Toxicon**, v. 36, n. 1, p. 217-221, 1998.
- HOCKNEY, R. W.; EASTWOOD, J. W. **Computer Simulation Using Particles**. New York: McGraw-Hill, 1981.
- HORI, Y. et al. Interaction of mastoparan with membranes studied by ¹H-NMR spectroscopy in detergent micelles and by solid-state ²H-NMR and ¹⁵N-NMR spectroscopy in oriented lipid bilayers. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, p. 302-309, 2001.
- IFRAH, D. et al. Structure-activity relationship study of anoplin. **J. Peptide Sci.**, v. 11, p. 113-121, 2005.

- ISRAELACHVILI, J. N. **Intermolecular and Surface Forces**, London: Academic Press, 1991.
- JOHNSTON, J. M. et al. Conformation and environment of channel-forming peptides: A Simulation Study. **Biophys J.**, v. 90, p. 1855-1864, 2006.
- KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. **Biopolym.**, v. 22, p. 2577-2637, 1983.
- KATSU, T., et al. Mechanism of membrane damage induced by the amphipathic peptides gramicidin S and melittin. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 983, p. 135-141, 1989.
- KATSU, T. et al. Interaction of wasp venom mastoparan with biomembranes. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1027, p. 185-190, 1990.
- KIKUKAWA, T.; ARAISO, T. Changes in lipid mobility associated with alamethicin incorporation into membranes. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 405, p. 214-222, 2002.
- KIYOTA, T.; LEE, S.; SUGIHARA, G. Design and synthesis of amphiphilic α -helical model peptides with systematically varied hydrophobic-hydrophilic balance and their interaction with lipid- and bio-membranes. **Biochem.**, v. 35, p. 13196-13204, 1996.
- KLINKER, J. F. et al. Mastoparan may activate GTP hydrolysis by G_i – proteins in HL-60 membranes indirectly through interaction with nucleoside diphosphate kinase. **Biochem. J.**, v. 304, p. 377-383, 1994.
- KREIL, G. Biosynthesis of melittin, a toxic peptide from bee venom. Amino-Acid Sequence of the Precursor. **Eur. J. Biochem.**, v. 33, p. 558-566, 1973.
- KOL, M. A., et al. Membrane-spanning peptides induce phospholipid flop: a model for phospholipid translocation across the inner membrane of *Escherichia coli*. **Biochem.**, v. 40, p. 10500-10506, 2001.
- KONNO, K. et al. Structure and biological activities of Eumenine Mastoparan-AF (EMP-AF), a new mast cell degranulating peptide in the venom of the solitary wasp (*Anterhynchium flavomarginatum micado*). **Toxicon**, v. 38, p. 1505-1515, 2000.
- KONNO, K. et al. Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1550, p. 70-80, 2001.
- KUSUNOKI, H. et al. G protein-bound conformation of mastoparan-X: heteronuclear multidimensional transferred nuclear overhauser effect analysis of peptide uniformly enriched with ^{13}C and ^{15}N . **Biochem.**, v. 37, p. 4784-4790, 1998.
- KWON, M. Y.; HONG, S. Y.; LEE, K. H. Structure-activity analysis of brevinin 1E amide, an antimicrobial peptide from *Rana esculenta*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1387, p. 239-248, 1998.
- LADOKHIN, A. S.; SELSTED, M. E.; WHITE, S. H. CD spectra of indolicidin antimicrobial peptides suggest turns, not polyproline helix. **Biochem.**, v. 38, p. 12313-12319, 1999.
- LASH, P.; SCHULTZ, C. P.; NAUMANN, D. The influence of poly-(L-lysine) and porin on the domain structure of mixed vesicles composed of lipopolysaccharide and phospholipid: an infrared spectroscopic study. **Biophys. J.**, v. 75, p. 840-852, 1998.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**, New York: Work Publishers, 1982.

LINDAHL, E.; HESS, B.; VAN DER SPOEL, D. Gromacs 3.0: a package for molecular simulations and trajectory analysis. **J. Mol. Model.**, v. 7, p. 306-317, 2001.

LINSE, S.; DRAKENBERG, T.; FORSÉN, S. Mastoparan binding induces a structural change affecting both the N-terminal and C-terminal domains of calmodulin A ^{113}Cd -NMR study. **FEBS Letters.**, v. 199, n. 1, p. 28-32, 1986.

LORENZI, C. C. B. Estudo estrutural de mastoparanos isolados de vespas solitárias. Dissertação de Mestrado. Departamento de Física –Ibilce – Unesp. São José do Rio Preto, 2002.

MALENCIK, D. A.; ANDERSON, S. R. High affinity binding of the mastoparans by calmodulin **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 114, p. 50-56, 1983.

MANGONI, M. L. et al. Structure-function relationships of temporins, small antimicrobial peptides from amphibian skin. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 1447-1454, 2000.

MATSUZAKI, K. et al. Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2. **Biochem.**, v. 34, p. 3423-3429, 1995a.

MATSUZAKI, K. et al. Translocation of a channel-forming antimicrobial peptide, magainin 2, across lipid bilayers by forming a pore. **Biochemistry** v. 34, p. 6521-6526, 1995b.

MATSUZAKI, K. et al. Kinetics of pore formation by an antimicrobial peptide, magainin 2, in phospholipid bilayers. **Biochem.**, v. 34, p. 12553-12559, 1995c.

MATSUZAKI, K. et al. An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. **Biochem.**, v. 35, p. 11361-11368, 1996a

MATSUZAKI, K. et al. Transbilayer transport of ions and lipids coupled with mastoparan-X translocation. **Biochem.**, v. 35, p. 8450-8456, 1996b.

MATSUZAKI K, et al. Membrane permeabilization mechanisms of a cyclic antimicrobial peptide, tachyplesin I, and its linear analog. **Biochem.**, v. 36, p. 9799-9806, 1997.

MATSUZAKI, K. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1376, p. 391-400, 1998.

MATSUZAKI, K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and Tachyplesins as archetypes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1462, p. 1-10, 1999a.

MATSUZAKI, K. et al. Interactions of an antimicrobial peptide, Magainin 2, with lipopolysaccharide-containing liposomes as a model for outer membranes of gram-negative Bacteria. **FEBS Lett.**, v. 449, p. 221-224, 1999b.

McDOWELL, L.; SANYAL, G. B.; PRENDERGAST, F. G. Probable role of amphiphilicity in the binding of mastoparan to calmodulin. **Biochem.**, v. 24, p. 2979-2984, 1985.

MENDES, M. A.; DE SOUZA, B. M.; PALMA, M. S. Structural and biological characterization of three novel mastoparan peptides from the venom of the neotropical social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure). **Toxicon**, v. 45, p. 101-106, 2005.

MIROSHNIKOV, A. I. et al. Structure and properties of histamine releasing peptides from the venom of *Vespa orientalis* hornet. **Bioorg. Khim.**, v. 7, p. 1467-1477, 1981.

MIYAMOTO, S.; KOLLMAN, P. A. SETTLE: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. **J. Comput. Chem.**, v. 13, p. 952-962, 1992.

- MOR, A. et al. Isolation, amino acid sequence and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin **Biochem.**, v. 30, p. 8824-8830, 1991.
- MORET, M. A., et al. Stochastic molecular optimization using generalized simulated annealing. **J. Comput. Chem.**, v. 19, p. 648-657, 1997.
- NAKAJIMA, T. **Handbook of Natural Toxins.**, New York: Marcel Dekker, 1984.
- NAKAJIMA T et al. Wasp venom peptides; wasp kinins, new cytotoxic peptide families and their physico-chemical properties. **Peptid.**, v. 6, n. 3, p. 425-430, 1985.
- NAKAJIMA, T. et al. Amphiphilic peptides in wasp venom. **Biopolym.**, v. 25, p. S115-S121, 1986.
- OH, J. E.; HONG, S. Y.; LEE, K. H. Structure-activity relationship study: short antimicrobial peptides. **J. Pept. Res.**, v. 53, p. 41-46, 1999.
- OKANO, Y. et al. A wasp venom mastoparan-induced polyphosphoinositide breakdown in rat peritoneal mast cells. **FEBS Lett.**, v. 188, p. 363-366, 1985.
- OREN, Z. et al. Structure and organization of the human antimicrobial peptides LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. **Biochem. J.**, v. 341, p. 501-513, 1999a.
- OREN, Z.; HONG, J.; SHAI, Y. A comparative study on the structure and function of a cytolytic α -helical peptide and its antimicrobial β -sheet diastereomer. **Eur. J. Biochem.**, v. 259, p. 260-269, 1999b.
- OREN, Z.; SHAI, Y. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. **Biopolym.**, v. 47, p. 451-463, 1998.
- PAPO, N.; SHAI, Y. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model membranes? **Peptid.**, v. 24, p. 1693-1703, 2003.
- PARK, C. B.; KIM, H. S.; KIM, S. C. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 244, p. 253-257, 1998.
- PARK, N. G. et al. Interaction of Mastoparan-B from venom of a hornet in Taiwan with phospholipid bilayer and its antimicrobial activity. **Biopolym.**, v. 36, p. 793-801, 1995.
- PATHAK, N. et al. Comparison of the effects of hydrophobicity, amphiphilicity, and α -helicity on the activities of antimicrobial Peptides. **Proteins: Struct., Funct., and Genet.**, v. 22, p. 182-186, 1995.
- PÉREZ-PAYÁ, E.; HOUGHTEN, R. A.; BLODELLE, S. E. The Role of Amphipathicity in the Folding, Self-association and Biological Activity of Multiple Subunit Small Proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 1048-1056, 1995.
- POUNY, Y. et al. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. **Biochem.**, v. 31, p. 12416-12423, 1992.
- PRESS, W. H. et al. **Numerical Recipes in Fortran.** New York: Cambridge University Press., 1992.
- RAGONA, L. et al. CD and NMR structural characterization of ceratotoxins, natural peptides with antimicrobial activity. **Biopolym.**, v. 39, p. 653-663, 1996.
- RAPPÉ, A. K.; CASEWIT, C. J. **Molecular Mechanics.**, Sausalito: University Science Books, 1997.

- ROCCATANO, D., et al. Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: a molecular dynamics study. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 99, p. 12179-12184, 2002.
- RYCKAERT, J. P. et al. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints; molecular dynamics of n-alkanes. **J. Comp. Phys.**, v. 23, p. 327-341, 1977.
- SANSOM, M. S. P. Alamethicin and related peptaibols-model ion channels. **Eur. Biophys. J.**, v. 22, p. 105-124, 1993.
- SELSTED, M. E. et al. Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 4292-4295, 1992.
- SFORÇA, M. L. et al. How C-terminal carboxyamidation alters the biological activity of peptides from the venom of the Eumenine solitary wasp. **Biochem.**, v. 43, p. 5608-5617, 2004.
- SOUZA, B. M. et al. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptid.**, v. 26, p.2157-2164.
- SHAI, Y.; OREN, Z. Diastereoisomers of cytolytins, a novel class of potent antibacterial peptides. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 7305-7308, 1996.
- SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1462, p. 55-70, 1999.
- SUBBALAKSHMI, C.; SITARAM, N. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 160, p. 91-96, 1998.
- SUBBALAKSHMI, C.; NAGARAJ, R.; SITARAM, N. Biological activities of C-terminal 15- residue synthetic fragment of melittin: design of an analog with improved antibacterial activity. **FEBS Lett.**, v. 448, p. 62-66, 1999.
- SUKUMAR, M.; HIGASHIJIMA, T. G. Protein-bound conformation of mastoparan-X, a receptor-mimetic peptide. **J. Biolog. Chem.**, v. 267(3), p. 21421-21424, 1992.
- SUKUMAR, M.; ROSS, E. M.; HIGASHIJIMA, T. A G_s -Selective analog of the receptor-mimetic peptide mastoparan binds to $G_s\alpha$ in a kinked helical conformation. **Biochem.**, v. 36, p. 3632-3639, 1997.
- TOKI, T.; YASUHARA, T.; NAKAJIMA, T. Isolation and sequential analysis of peptides on the venom sac of *Parapolybia indica*. **Jpn. J. Sanit. Zool.**, v. 39, p. 105-111, 1988.
- TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANASPERO, A. Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. **Biopolym.**, v. 55, p. 4-30, 2000.
- TSAI, H.; BOBEK, L. A. Human salivary histatins: promising anti-fungal therapeutic agents. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 9, p. 480-497, 1998.
- TURNER, J.; et al. Activities of LL-37, a Cathelin-Associated Antimicrobial Peptide of Human Neutrophils **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 2206-2214, 1998.
- UEMATSU, N.; MATSUZAKI, K. Polar angle as a determinant of amphipathic α -helix lipid interaction: a model peptide study. **Biophys. J.**, v. 79, p. 2075-2083, 2000.

- UNGER, T.; OREN, Z.; SHAI, Y. The effect of cyclization of magainin 2 and melittin analogues on structure, function and model membrane interactions: implication to their mode of action. **Biochem.**, v. 40, p. 6388-6397, 2001.
- VAN DER SPOEL, D. et al. Gromacs user Manual version 1.3. Groningen, Netherlands. Internet: <http://rugmd0.chem.rug.nl/~gmx>, 1996.
- VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Gromos-87 Manual. Biomos., Groningen, Netherlands, 1987.
- VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 29, p. 992, 1990.
- VAN GUNSTEREN, W. F. Molecular dynamics and stochastic dynamics simulation: a primer. In *Computer Simulations of Biomolecular Systems*, W. F. van Gunsteren; P. K. Weiner & A. J. Wilkinson, editors. ESCOM Science, Leiden., v. 2, p. 3-36, 1994.
- VAN GUNSTEREN, W. F. et al. Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide; vdf Hochschulverlag: ETH Zürich, Switzerland, 1996.
- VAN HIMBERGEN, J. A. J. et al. Mastoparan analogues stimulate phospholipase C- and phospholipase D-activity in *Chlamydomonas*: a comparative study. **J. Experim. Botany.**, v. 50,n. 341, p. 1735-1742, 1999.
- VAN'T HOF, W., et al. Antimicrobial peptides: properties and applicability. **Biol. Chem.**, v. 382, 597-619, 2001.
- VERLET, L. Computer experiments on classical fluids I: thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. **Phys. Rev.**, v. 159, p. 98-103, 1967.
- VETTER, R. S.; VISSHER, P. K. Bites and stings of medically important venomous arthropods. **Internat. J. Dermat.**, v. 37, p. 481-496, 1998.
- VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**, New York: John Wiley, 1995.
- WAKAMATSU, K. et al. Transferred NOE analyses of conformations of peptides as bound to membrane bilayer of phospholipid; mastoparan-X. **FEBS Lett.**, v. 162, p. 123-126, 1983.
- WAKAMATSU, K. et al. Membrane-bound conformation of mastoparan-X, a G-protein-activating peptide. **Biochem.**, v. 31, p. 5654-5660, 1992.
- WEINGARTEN, R., et al. Mastoparan Interacts with the Carboxyl Terminus of the α Subunit of G_i . **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 19, p. 11044-11049, 1990.
- WEINER, S. J., et al. An all atom force field for simulations of proteins and nucleic acids. **J. Comput. Chem.**, v. 7, p. 230-252, 1986.
- WHILES, J. A. et al. Orientation and effects of mastoparan X on phospholipid bicelles. **Biophys. J.**, v. 80, p. 280-293, 2001.
- WIEPRECHT, T. et al. Modulation of membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides by slight modifications of the hydrophobic moment. **FEBS Lett.**, v. 417, p. 135-140, 1997a.
- WIEPRECHT, T. et al. Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides. **Biochem.**, v. 36, p. 12869-12880, 1997b.
- WIEPRECHT, T. et al. Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of Magainin 2 amide in interaction with membranes. **Biochem.**, v. 36, p. 6124-6132, 1997c.

YANG, L. et al. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. **Biophys. J.**, v. 81, p. 1475-1485, 2001.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacol. Rev.**, v. 55, p. 27-55, 2003.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 84, p. 5449-5453, 1987.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, p. 389-395, 2002.

ZHANG, L.; BENZ, R.; HANCOCK, R. E. Influence of proline residues on the antibacterial and synergistic activities of alpha-helical peptides. **Biochem.**, v. 38, p. 8102-8111, 1999.

ZHANG, L.; ROZEK, A.; HANCOCK, R. E. W. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 35714-35722, 2001.

ZHAO. H. Mode of action of antimicrobial peptides. Academic Dissertation Helsinki Biophysics & Biomembrane Group - Institute of Biomedicine, Faculty of Medicine, University of Helsinki, Finland, 2003.

ZHONG, L.; JOHNSON Jr., C. Environment affects amino acid preference for secondary structure. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 89, p. 4462-4465, 1992.

Structure and lytic activity of Anoplin, a short chain antimicrobial peptide from solitary wasp venom

Marcia Perez dos Santos Cabrera^a, cabrera.marcia@gmail.com

Sabrina Thais Broggio^a, sabroggio@yahoo.com.br

Maurício L. Sforça^{b,1}, sforca@click21.com.br

Katsuhiro Konno^c, kk-gon@butantan.gov.br

Mario Sérgio Palma^d, mspalma@rc.unesp.br

Valmir Fadel^a, valmir@ibilce.unesp.br

Walter F. de Azevedo Jr.^{a,c,2}, walter.junior@puers.br

Thelma A. Pertinhez^{b,3}, thelma@unipr.it

Alberto Spisni^{b,c,3}, aspin@unipr.it

José Roberto Ruggiero^a, zerug@ibilce.unesp.br

João Ruggiero Neto^{a,c*}, joao@ibilce.unesp.br

^aDepartment of Physics, IBILCE, UNESP, R: Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000 S. José do Rio Preto, SP, Brazil.

^bCeBiME, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, C.P. 6192, 13084-971 Campinas, SP, Brasil.

^cCAT CEPID, Center for Applied Toxinology, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500 - CEP 05503-900 São Paulo, SP, Brazil.

^dCenter of Study of Social Insects, Department of Biology, Institute of Biosciences, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil.

^eDepartment of Experimental Medicine, Sect Chemistry and Structural Biochemistry, University of Parma, Italy.

*Corresponding author. Tel. +55 17 3221 2248, Fax: +55 17 3221 2247

e-mail address: joao@ibilce.unesp.br

Present address: ¹

² PUCRS-Faculdade de Biociências, Av. Ipiranga, 6681. 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

³Department of Experimental Medicine, Sect Chemistry and Structural Biochemistry, University of Parma, Italy.

Abstract

In this work we studied the mode of action of Anoplin, an antimicrobial, helical decapeptide from wasp venom. We related its lytic activity on vesicles with the structures determined by NMR in SDS micelles and by Molecular Dynamics Simulations (MD) in TFE/water mixtures. We have searched the correlation between the lytic activity and structural parameters. We propose to estimate parameters as the angle subtended by the polar face and the hydrophobic moment of the helical stretch from NMR and MD structures. The solvation profile due to amphipathic molecules around the hydrophobic and charged groups of these peptides has also been analyzed. This analysis has shown that this procedure helps to establish part of the searched correlations, however the unusual behavior observed for the carboxylated form of the peptide, specially in its lytic activity in highly charged vesicles, can not be well understood at the moment with the present data.

Key words

Antimicrobial peptide, wasp venom, NMR structure, Molecular Dynamics, polar angle

Abbreviations

Circular Dichroism, CD; Molecular Dynamics, MD; critical micellar concentration, cmc; large unilamellar vesicles, LUVs; small unilamellar vesicles, SUVs; sodium dodecyl sulfate, SDS; trifluoroethanol, TFE; Phosphate:Borate:Citrate buffer, PBC buffer; carboxyfluorescein, CF; L- α -phosphatidylcholine, PC; L- α -phosphatidyl-DL-glycerol, PG; cardiolipin, CL; Simple Point Charge, SPC; α -helix fraction, f_H ; lipid to peptide ratio, Lip/Pep; root mean square fluctuation, RMSF; run integration number, RIN.

1. Introduction

The decapeptide Anoplin (ANP), GLLKRIKTLL, is among the smallest naturally occurring antimicrobial peptides. The amidated C-terminus form (ANP-NH₂), isolated from the venom sac of pompilid wasps *Anoplius samariensis*, presents antimicrobial and mast cell degranulating activity, being non-hemolytic [27]. Its synthetic C-terminus carboxylated analog, Anoplin-OH (ANP-OH) is also non hemolytic and lost the antimicrobial and mast cell degranulating activities. These results made us believe that the biological activity is centered in the membrane lipids. The outer leaflet of the bacterial membrane is, in general, negatively charged while in mammals it is electrically neutral [30]. Cationicity and amphipathic character of most antimicrobial peptides emphasize the importance of the electrostatic interaction to drive contacts with vesicles or cells, and to modulate binding forces and subsequent activity. Previous results [27, 23] have also suggested that, besides the peptide net charge, the primary sequence and probably the secondary structure adopted upon contact with biological membranes are very important to modulate its biological activities.

Since the unique difference between these peptides is the nature of the C-terminus we studied the lytic activity of Anoplin-NH₂ and Anoplin-OH through dye leakage experiments of charged and non-charged vesicles. We related these results with their structures in sodium dodecyl sulfate (SDS) micelles and TFE/water mixture obtained by NMR and molecular dynamics (MD) simulations respectively. The aim of the MD study was to compare the conformational changes that occur when both peptides are submitted to a non-charged environment, with amphipathic characteristics, like mixtures of trifluoroethanol and water (TFE/water). Circular dichroism (CD) complemented the conformational analysis, also in the presence of zwitterionic and anionic vesicles. We have searched correlations between the lytic activity of both peptides in vesicles and their net charge, α -helical content and the angle subtended by the polar face. Instead of using the helical wheel projection, we propose to estimate the polar angle and the hydrophobic moment of the helical stretch obtained from NMR and MD structures in SDS and TFE/water respectively. We have also searched for water and TFE clusters around the hydrophobic and charged groups of these peptides. It has been shown, in the last ten years, that permeabilization efficiency is, in general, correlated with some physicochemical characteristics of antimicrobial peptides [11,14, 12], such as: net charge [13], hydrophobicity [44], helicity, hydrophobic moment and the angle subtended by the polar face [42, 45]; and also to the characteristics of the bilayer as compressibility and bending modulus and spontaneous curvature radius [1, 28, 31].

2. Materials and methods

2.1 Peptide synthesis and purification

The peptides were synthesized as described by Konno et. al. [27] by step-wise manual solid-phase synthesis using N-9-fluorophenylmethoxycarbonyl (Fmoc) strategy. The crude products were purified by reverse-phase HPLC, and the homogeneity and sequence were accessed by analytical HPLC and mass spectrometry (MALDI-TOF-MS and ESI-MS).

2.2 Vesicle preparation

Lipids and carboxyfluorescein (CF) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Zwitterionic lipid film composed by pure L- α -phosphatidylcholine (PC) and negatively charged lipid mixtures made of PC and either L- α -phosphatidyl-DL-glycerol (PG) or cardiolipin (CL) have been prepared at the following molar ratios: PCPG 70:30, PCPG 40:60, PCCL 70:30 and PCCL 40:60. Small unilamellar vesicles (SUVs) for CD measurements and large unilamellar vesicles (LUVs) for dye leakage measurements have been prepared as detailed described elsewhere [18]. Shortly, lipid films were hydrated either with Tris/H₃BO₃ 5 mM, 0.5 mM Na₂EDTA, pH 7.5 for CD experiments, or Tris/HCl 10 mM, 150 mM NaCl, 1mM Na₂EDTA, pH 7.5, containing 25 mM CF for fluorescence experiments. 50 min sonication for CD measurements and 5 min for fluorescence measurements produced respectively SUVs or LUVs, which have been used respectively within 24 hours and 48 hours of preparation. The lipid concentration was determined by phosphorus analysis [39].

2.3 Circular dichroism measurements

CD spectra were measured at several peptide concentrations either in 1 mM PBC buffer, pH 7.5, or in buffered sodium dodecylsulfate (SDS) solution above the critical micellar concentration (cmc) at 8 mM, with and without the adding of 150 mM NaF, or in the presence of anionic PCPG 70:30 SUVs. The measurement was carried out over the range of 198-260 nm, using a Jasco-710 spectropolarimeter (Tokyo, Japan). The instrument was calibrated using d-10-camphorsulfonic acid. Spectra have been acquired at 25°C using 0.5 cm path length cell, and averaged over six scans; measurement parameters, baseline correction and ellipticity calculation as indicated elsewhere [18]. Assuming a two state model the observed mean residue ellipticity at 222 nm (Θ_{222}^{obs}) was converted

into α -helix fraction (f_H) using the method proposed by Rohl and Baldwin [38] and previously described [27].

2.4 NMR spectroscopy and molecular modelling

The samples for NMR measurements were prepared by dissolving the peptides in a 200 mM SDS perdeuterated aqueous solution containing 5% of D₂O to yield a concentration of 0.8 mM, pH= 4.5. All two dimensional ¹H-NMR experiments were carried out on a Varian Unity 500 spectrometer operating at 499.730 MHz for ¹H frequency, at a temperature of 30 °C. To assign the peptide resonance peaks, standard methods were used including Double Quantum-Filtered (DQF)-COSY, Total Correlation Spectroscopy (TOCSY) and Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy (NOESY) experiments. The TOCSY spectra were acquired using a DIPSI spin-lock sequence at a field strength of 10 kHz and spin-lock evolution time of 85 ms. NOESY spectra with 200 and 300 ms mixing time were recorded. All two-dimensional experiments were acquired in the phase-sensitive mode using the method States et. al [41]. The spectra width was typically 6000 Hz and 512 τ_1 increments with 56 transients of 2048 complex points for each free induction decay were recorded, except for DQF-COSY, which 1024 τ_1 experiments were collected each with 40 transients of 8192 complex points.

Data were processed on a Silicon Graphics Octane workstation using the nmrPIPE/nmrVIEW [16] Software. To obtain distance constraints, cross-peaks volumes were estimated from the 300 ms NOESY spectra. The NOE calibration was made using the Median Methods in the NMRVIEW software. The lower bound were set to 1.8 Å.

The 3D structure of ANP-NH₂ and ANP-OH was computed using the simulated annealing methods [21] in the DYANA refine module, and energy minimized by using the DISCOVER (BYOSYM Technologies Inc., San Diego, CA.) software package, together with the INSIGHT II [24] as graphic interface.

2.6 Dye Leakage

A volume of fresh LUV suspension was injected into a cuvette containing magnetically stirred peptide solutions either at 5.0 or at 20 μ M, to give a final volume of 1.0 ml. These peptide concentrations represent the range of interest as determined in previous antimicrobial activity tests [27,23]. CF release from the vesicles was monitored at 520 nm (excited at 490 nm) on a Hitachi Fluorometer F4500 (Tokio, Japan) by measuring the decrease in self-quenching at 25°C. Percent of

dye leakage was determined after regular time intervals, and calculated as indicated in dos Santos Cabrera et al. [18]. 100 % leakage fluorescence has been corrected for the corresponding dilution factor.

2.7 MD simulations

MD simulations of the peptides were carried out in a triclinic box containing trifluoroethanol (TFE) in water (~ 30% v/v). Systems were made up of 205 TFE molecules, 1902 water molecules and 4 chlorine (Cl⁻) counterions, which neutralize 4 positive charges in ANP-NH₂, and 3 Cl⁻ counterions, which neutralize ANP-OH net charge. In both cases the N-termini were treated as a positively charged group (NH₃⁺); ANP-OH C-terminus was treated as a carboxylated group, negatively charged (COO⁻). The calculations were carried out using GROMOS 96 force field [43]; model SPC (Simple Point Charge – [6]) was used for water; for TFE molecules, the model and simulations conditions were applied as proposed by Fioroni et al. [19]. Systems optimization was carried out in 8000 steps conjugate gradient and a steepest descent cycle was performed every 500 steps. Position restriction dynamics, for solvent and ions relaxation ran for 1 ns, with a 2 fs-time step for the integration of movement equations. Afterwards constraints have been removed and the systems underwent 8 ns of MD simulations. Periodic boundary conditions have been imposed in the systems simulations with a cutoff radius of 1.4 nm. The LINCS [22] algorithm was used to constraint all bond lengths and SETTLE [35] to constraint water geometry. Simulations ran in the canonical ensemble (n, P, T) 300 K and 1 atm. Temperature and pressure were modulated using coupling techniques [4] with coupling and isothermal compressibility constants of 0.01 ps (solvent and peptide) and 6.5 x 10⁻⁵ bar⁻¹, respectively. Long range electrostatic interactions were treated using Particle Mesh Ewald method [10,8]. For Lennard-Jones interactions the cutoff radius was 1.4 nm. The atomic positions were recorded every 1.0 ps throughout each trajectory. MD calculations and trajectory analysis were made using the facilities of the GROMACS package [29].

The strategy for the MD studies of ANP-NH₂ and its analogue in TFE/water mixture (70:30 v/v) was to use the one of the 20 structures determined from NMR experiments with ANP-NH₂ in SDS. Two 8 ns MD simulations have been carried out: in the first, we kept the original C-terminus amidated chain and in the second, only the C-terminus had the amide group extracted, remaining a negatively charged carboxyl group; this strategy allows for a clearer visualization of the conformational changes induced by the environment substitution.

3. Results

3.1 CD spectroscopy

CD experimental results are summarized in Table 1. It shows that in water or PBC buffer at physiological pH, and zwitterionic vesicles ANP-NH₂ and ANP-OH are random coil. In 30% TFE/water, SDS micelles and anionic phospholipid vesicles, both the amidated and carboxylated forms of the peptide showed CD spectra with two negative dichroic bands centered at 208 and 222 nm, characteristic of helical structure. The higher α -helix fractions determined are 24% in 30% TFE, 30% in buffered SDS 8 mM, 28% in PCPG 7030 for the amidated form, while for the carboxylated form, they were smaller just in 30% TFE. These results are in good agreement with previous ones [27]. The α -helix fractions were approximately independent of the peptide concentration in TFE and SDS ruling out any aggregation process in those environments.

However, when checking the concentration dependence of the helical content in PCPG 7030 vesicles, we found out that the α -helical content of ANP-NH₂ varies with the lipid to peptide molar ratio (Lip/Pep) until the ratio of 25:1, suggesting lower binding levels of the peptides to these vesicles.

3.2 NMR Spectroscopy

Sequential resonance assignments was performed based on the combined use of two dimensional TOCSY and NOESY.

The $^3J_{\text{NH}\alpha}$ -coupling constants were estimated from the residual intensity of the antiphase cross-peak in the DQF-COSY experiment and the chemical shifts for all residues together with the NH- α CH coupling constants ($^3J_{\text{HN}-\alpha}$). Figure 1 displays the plot of the residual chemical shifts deviations for the α -protons resonances. As can be seen, from residue L2 to L9, they are all negative and intense, at least between residues 2 to 8, for ANP-NH₂, thus suggesting the existence of a helical segment extending over this region. In the case of ANP-OH this is true from residues 2 to 7.

The summary of the interresidue NOEs for the peptide is reported in Figure 2. In fact, the medium range (i,i+3) and (i,i+4) NOEs together with the intense NH-NH (i,i+1) indicate an helical folding spanning residues 3 to 10, for the ANOPLIN-NH₂ and 2 to 10 for the ANOPLIN-OH.

3.3 Molecular Modeling

A total of 135 distance constraints containing 25 medium range constraints were collected and taken into account for structure calculation using DYANA [21]. The calculation with the carboxylated peptide used 128 distance constraints with 25 medium range constraints.

Out of 100 structures that were generated, 40 structures based on the minimum target function ($0.13 \pm 0.02 \text{ \AA}^2$ for ANP-NH₂ and $0.27 \pm 0.02 \text{ \AA}^2$, for ANP-OH) were energy minimized using the DISCOVER program. After minimization, 20 structures were selected based on the low residual distance violation of backbone showing a RMSD for all residues equal to $0.14 \pm 0.06 \text{ \AA}$ for ANP-NH₂ and $0.18 \pm 0.08 \text{ \AA}$ for ANP-OH and were used to represent the solution three-dimensional structure of the peptides in 200 mM SDS at 30°C and pH 4.5 as shown in Figure 3. Table 2 shows the statistic results of RMSD and PROCHECK-NMR showing 100% of the PHI and PSI angles are in the most favored region.

3.4 Leakage experiments

The membrane permeating activity induced by ANP-NH₂ and ANP-OH was investigated through the release of CF from zwitterionic PC, and the anionic PCPG (70:30 and 40:60) and PCCL (70:30 and 40:60) LUVs.

Both peptides at 5 μM and until 20 min contact time induced less than 10% CF release from PC and from all anionic vesicles tested (data not shown). Even when the peptide concentration was increased to 10 μM for PC vesicles and 20 μM for anionic vesicles, the dye released fraction did not increase significantly within 5 minutes, as displayed in Figure 4a; due to this low lytic activity it was not possible to establish if there is some kind of cooperativity in the dose response curve. Exception is made to PCPG 4060 vesicles, displayed in Figure 4b, whose lytic activity is indicative of a cooperative process. The example shown in detail of Figure 4b was obtained with 120 μM PCPG 4060 and 20 μM peptide concentration. The low leakage efficiency observed for both peptides in anionic vesicles and even in PCPG 4060 at 5 μM peptide concentration could not be attributed just to the peptide's length. Other short chain antimicrobial peptide studied in our group (dos Santos Cabrera, PhD thesis, 2006), like the less charged undecapeptide Decoralin (SLLSLIRKLIT), presents high permeabilizing efficiency in PCPG 7030 vesicles. Nevertheless, the increase of PG or CL ratio in the vesicles composition, which increases the negative charge density, is directly related to the leakage increase. It should be noted that cardiolipin (CL) is a

dimeric form of phosphatidylglycerol, with four acyl chains and two negative charges, one at each phosphate group.

3.5 Molecular dynamics simulations and trajectory analysis.

Figure 5 shows the Root Mean Square Fluctuation (RMSF) plot for both peptides, i.e., how much each residue of the average structure deviates from the starting structure. ANP-NH₂ keeps the initial helical structure with a slight displacement of some residues at the N- and C-terminus. Its analogue, ANP-OH, undergoes a marked conformational change during the initial 400ps, with a significant decrease of its helical content at the residues 8, 9 and 10; the starting α -helix comprised residues Leu 3 to Leu 10 and it rapidly changed to Leu 2 till Lys 7. These conformational changes are well correlated with the helical content differences already found in NMR and CD experiments and with the abolishment of the biological activities of Anoplin-OH.

Analyzing the hydrogen bonding characteristic of α -helix in ANP-NH₂, we observed that the distance of 0.3 nm between the electronegative atoms involved is maintained throughout the MD simulations, except that between O from Gly 1 and N from Arg 5. The hydrogen bond between the O from Lys 7 and the NH₂ of the C-terminus, on the other hand, fluctuates, forming and breaking along the dynamics. However, the average values for the dihedral (ϕ , ψ) angles of residues 7, 8 and 9 remain within the α -helix favorable region, evidencing small distortions of helical structure commented above.

The NMR chain structures of both peptides show an amphipathic α -helix with the polar face subtending an angle of approximately 70° for the amidated peptide and 110° for the carboxylated form. This angle is centered in the helix axis and defined by the charged groups of the residues, located at the hydrophobic-hydrophilic interface. Although ANP-NH₂ maintains the starting helical conformation throughout the MD simulations in TFE/water, we found out that the side-chains of the charged residues are placed at different positions on the polar face, which increased the polar angle to approximately 160° (Figure 6a). The polar face of ANP-OH is rather different due to the unfolding of a significant portion of the helical C-terminus, that moved residues Leu 9 and Leu 10 to the polar face of the peptide structure and subtending an angle of 170° as displayed in Figure 6b. The estimate of these angles has been obtained from the average structure of the final 3 ns of the simulation time.

Integrating the pair radial distribution function (RDF), $g(r)$, from 5 to 8 ns time interval, we obtained the running integration number (RIN), $n(r)$, that indicates the number of molecules around a certain atom or group previously selected. We have chosen the center of mass of the Fluor atoms

of TFE (F) and water (W) for the apolar and polar parts of the solvent, respectively. This analysis has been used to look into the distribution of water and TFE molecules around the peptide chains and build up a scenery of their preferences in an uncharged environment.

Figure 7 shows the solvation profile found around N- and C- termini. The positively charged N-terminus is equally solvated for both peptides, i.e., the number of water molecules is greater than the number of TFE molecules at the same radius (Figure 7, panel a). This finding agrees with the fact that the N-terminus is unfolded for both peptides, presenting larger conformational freedom. It is exposed to the bulk solvent, as either indicated by the NMR results obtained in SDS micelles or the MD results obtained in TFE/water mixtures. Figure 7, panel b, displays the solvation analysis of the C-termini of ANP-NH₂ and ANP-OH. Considering the radius between 0.25 and 0.3 nm, there are 4-fold more water around the carboxyl group of ANP-OH (negatively charged) than around the amide group (polar, positive) of ANP-NH₂.

Residues Leu 9 and Leu 10 have been selected among hydrophobic residues to look into their solvation differences, due to the marked conformational transition they undergone, when comparing MD final chains for ANP-NH₂ e ANP-OH (Figures 4 and 5). These simulations show that Leu 9 kept its position at the hydrophobic-hydrophilic interface in ANP-NH₂ while it moved to the polar region in ANP-OH. Figure 7a displays RIN for Leu 9, which is the same for both peptides, despite of the conformational changes. F and W numbers are coincident, however if we take into account that the volume occupied by one TFE molecule is equivalent to the volume of 4 water molecules, we can assume that solvation by TFE prevails at the end of the side-chain. Leu 10 is kept at the center of the hydrophobic face in Anoplin-NH₂, and its solvation profile is in accordance with its location, as presented in Figure 7b, since the RIN of TFE prevails. Contrasting, ANP-OH is predominantly surrounded by water molecules (Figure 7c), corresponding to the final Leu 10 location in the hydrophilic face.

Considering the positively charged residues (Lys 4, Arg 5 and Lys 7) and the polar residue, Thr 8, RIN curves have been examined and are similar to each other and also between both peptides, showing the relative abundance of water molecules at 10:1 ratio at 0.4 nm radius. No hydrogen bonding has been found among side chains of charged and polar residues and among these residues and the backbone of both peptides, emphasizing the environment influence as the determinant of the secondary structure.

Table 3 summarizes the structural characteristics of ANPs, as obtained from calculations based on NMR and MD data. Using the program HELANAL [3] applied to the coordinates of NMR and MD structures, the average twist angle has been calculated. It was then used in the hydrophobic moment calculation, according to Eisenberg consensus scale [17], considering the helical stretches

obtained for each peptide in the charged and non-charged mimetic environments. The highly anionic charged environment deviated the twist angle to values above the theoretical of 100° , elongating the helix and the non-charged TFE environment caused the opposite effect. These differences caused an increase in the hydrophobic moment in relation to the theoretical value of 0.366 for both peptides in both conditions tested. Also the size of the helical stretch seems to have reduced influence on the antimicrobial and hemolytic activities of both peptides.

4. Discussion

CD results have shown that the amount of helical structure found for anoplin and its carboxylated analogue is strongly dependent on the environment as had been observed for other antimicrobial peptides[.,]. While in buffer and in zwitterionic vesicles the α -helix fraction is very low; in the presence of TFE or anionic micelles or vesicles this fraction increases being proportional to the amount of charged groups in the case of anionic environment. The SDS micelles provides to ANP-NH₂ strong electrostatic interaction at the micelle surface, near the charged head groups of SDS, with minimal spatial separation of its three negatively charged residues and the charged N-terminal, forming symmetrical and well defined structures (Figure 3). In these structures the hydrophobic groups could be hidden from the hydrophilic environment, i.e., inside the micellar core [7]. This condition might equally stabilize both forms of the peptide in a highly helical amphipathic structure.

Besides the effect of charged groups, the potential of the peptide to adopt helical conformation is dependent also on the individual helix propensities of the residues in a given environment [18, 7, 15, 38]. All the residues that compose these peptides have been shown to present higher helical propensities in TFE, SDS micelles and anionic phospholipid vesicles [7]. Anoplin and its carboxylated analog, in SDS solution and in PCPG 7030 vesicles, both at buffered pH 7.5, presented lower helical content as determined in CD experiments, in relation to that found in NMR and also in the MD studies. A similar apparent discrepancy was reported by Sforça et al. (2004) for EMP-AF [40] and by Chuang et al. (1996) for MP-B [9]: they also found a significantly lower helical content through CD than through NMR in 40% TFE.

The MD simulations carried out in a hydrophobic solvent (TFE/water) with Anoplin-NH₂ showed the presence of clusters of TFE around the peptide. The clusters are near the hydrophobic face in very good agreement with the results obtained by Johnston et al. [26]. The solvation profile showed the withdrawal of water molecules from the backbone and from the hydrophobic region. The hydrogen bonds between the backbone atoms are protected from water competition and the

hydrophobic region remains clustered by TFE molecules (Figure 6, panels a and b), thermodynamically favoring the α -helix. Although the helical structure is maintained, the charged groups are mutually repelled. It is important to emphasize the dependence of the polar angle with the environment. For Anoplin-NH₂ this angle is $\sim 70^\circ$ and $\sim 160^\circ$, obtained, respectively, from NMR structure in micellar SDS and from MD simulations in 30% TFE. The presence of a negative charge at the C-terminus in Anoplin-OH introduces repulsive interactions with negatively charged SDS micelles and makes its polar face broader ($\sim 110^\circ$ and $\sim 170^\circ$) than that of the amidated form of the peptide.

In hydrophobic environment (TFE) which should be more similar to zwitterionic vesicles, the polar face broadens and leakage experiments in these vesicles showed higher dye release compared to that observed for mildly charged ones (PCPG70:30). Similar results have been obtained by Wieprecht et al. (1997) [45] in PC vesicles; they found out that peptides with larger polar angle (140° - 180°) are more active than those with smaller polar angle (80° - 120°). Surprisingly, for anoplins, we did not observe the same correlation between helical fraction and lytic efficiency as observed for other peptides. PC vesicles do not induce helical conformation, although some leakage has been observed, while in PCPG (70:30) the peptide is more structured but with lower leakage. We have observed, however, that the carboxylated form is more efficient in the lysis of neutral vesicles which correlates well with the observation from the MD simulations that the polar angle is larger than that found for its amidated form.

Considering that the anionic vesicles studied provide less negatively charged environments than SDS, but more charged than TFE/water, we could expect that the polar angle in these environments would approximately vary within the range from $\sim 70^\circ$ to $\sim 160^\circ$ for Anoplin-NH₂ and within 110° to 170° for Anoplin-OH. Both forms of the peptide presented lower permeabilizing efficiency on anionic PCPG 7030 than in neutral PC vesicles. However when the amount of charged groups increased by substitution of PG by cardiolipin (30%) or increasing PG ratio to 60% the lytic activity has increased. Despite of the higher amount of anionic groups in PCCL vesicles, leakage from these vesicles was also not expressive; this could be due to cardiolipin, which is known to induce negative spontaneous curvature on bilayers [1], acting contrarily to cationic peptides that induce positive curvature. Interestingly this data emphasizes the importance of membrane curvature for leakage similar to what is observed for a pore forming peptide.

A comparison of the lytic activities of both forms of the peptide in anionic vesicles PCPG (40:60), however, shows an unexpected result. The less charged peptide, the carboxylated form, is more efficient than the amidated one. For other lytic peptides, with similar physico-chemical characteristics the C-terminus amidation contributes not only with the extra charge but also

stabilizes the helical conformation. These features, in association with a narrow hydrophilic face, have been shown to contribute for higher lytic activity in anionic vesicles [,,]. Consequently, for the carboxylated form, one would expect reduced dye release from anionic vesicles. This unexpected behavior in the leakage of anionic vesicles can not be attributed to the anoplin chain length. We have observed that the amidated form of an undecapeptide is much more efficient in dye release from anionic vesicles than the carboxylated form (manuscript in preparation). Notwithstanding the reduced lytic activity of the amidated form in anionic vesicles it presents antimicrobial activity comparable to peptides whose mode of action supports the toroidal pore model [47]. These results suggests that the presence of lipopolysaccharides in the microbial membrane is important to the high antimicrobial activity of anoplin-NH₂ is good agreement with the observations for other peptides [42, 36]. In the same way, although these peptides are not hemolytic, the correlation between PC vesicles permeabilization and hemolysis has to take into account that the cholesterol content in erythrocytes increases the stability of membranes and hampers its permeabilization [34]. Other non-hemolytic peptides like magainin and PGLa also permeate PC vesicles [42].

References

- [1] Allende D, Simon SA, McIntosh TJ. Melittin-induced bilayer leakage depends on lipid material properties: evidence for toroidal pores. *Biophys J* 2005;88:1828-37.
- [2] Andreu D, Rivas L. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 1998;47:415-33.
- [3] Bansal M, Kumar S, Velavan R. HELANAL - A program to characterize helix geometry in proteins. *JBSD* 2000;17:811-19.
- [4] Bárány-Wallje E, Keller S, Serowy S, Geibel S, Pohl P, Bienert M, Dathe M. A critical reassessment of penetratin translocation across lipid membranes. *Biophys J* 2005;89:2513–21
- [5] Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren W, Di Nola A, Haak JRJ. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* 1984;81:3684-90
- [6] Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, Hermans J. Interaction models for water in relation to protein hydration. In: Pullman B, editor. *Intermolecular Forces*, Dordrecht, The Netherlands: Reidel Publishing Co, 1981, 331-42.
- [7] Blondelle SE, Forood B, Houghten RA, Pérez-Payá E. Secondary structure induction in aqueous vs membrane-like environments. *Biopolymers* 1997;42:489-98.

- [8] Cheatham TE III, Miller JL, Fox T, Darden TA, Kollman PA. Molecular dynamics simulations on solvated biomolecular system: The Particle Mesh Ewald method leads to stable trajectories of DNA, RNA, and proteins. *J Am Chem Soc* 1995; 117:4193-94.
- [9] Chuang CC, Huang WC, Yu HM, Wang KT, Wu SH. Conformation of Vespa basalis Mastoparan-B in trifluoroethanol-containing aqueous solution. *Biochim Biophys Acta* 1996;1292:1-8.
- [10] Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh Ewald: an N-log(N) method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys* 1993;98:10089-92.
- [11] Dathe M, Wieprecht T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim Biophys Acta* 1999;1462:71-87.
- [12] Dathe M, Meyer J, Beyermann M, Maul B, Hoischen C, Bienert M. General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. *Biochim Biophys Acta* 2002;1558:171-86.
- [13] Dathe M, Nikolenko H, Meyer J, Beyermann M, Bienert M. Optimization of the antimicrobial activity of Magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett* 2001;501:146-50.
- [14] Dathe M, Wieprecht T, Nikolenko H, Handel L, Maloy WL, MacDonald DL, Beyermann M, Bienert M. Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Lett* 1997;403:208-12.
- [15] Deber CM, Li SC. Peptides in membranes: helicity and hydrophobicity. *Biopolymers* 1995;37:295-318.
- [16] Delaglio F, Grzesiek S, Vuister, GW, Zhu, G, Pfeifer, J, Bax A. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* 1995;6:277-93.
- [17] Eisenberg D, Schwarz E, Komaromy M, Wall R. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J Mol Biol* 1984;179:125-42.
- [18] dos Santos Cabrera MP, de Souza BM, Fontana R, Konno K, Palma MS, de Azevedo Jr, WF, Ruggiero Neto, J. Conformation and lytic activity of Eumenine Mastoparan: a new antimicrobial peptide from wasp venom. *J Peptide Res* 2004;64:95-103.
- [19] Fioroni M, Burger K, Mark AE, Roccatano D. A new 2,2,2-trifluoroethanol model for molecular dynamics simulations. *J Phys Chem B* 2000;104:12347-54.
- [20] Giangaspero A, Sandri L, Tossi A. Amphipathic α -helical antimicrobial peptides – A systematic study of the effects of structural and physical properties on biological activity. *Eur J Biochem* 2001;268:5589-5600.

- [21] Güntert P, Mumenthaler C, Herrmann T. DYANA User's Manual, Institut für Molekularbiologie und Biophysik, Zürich, Switzerland; 1998.
- [22] Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije JGE. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J Comp Chem* 1997;18:1463-72.
- [23] Ifrah D, Doisy X, Ryge T S, Hansen PR. Structure-activity relationship study of anoplin. *J Peptide Sci* 2005;11:113-21.
- [24] INSIGHT II User Guide version 95, Byosim Technologies, San Diego; 1995.
- [25] Johnston JM, Cook GA, Tomich JM, Sansom MSP. Conformation and environment of channel-forming peptides: a simulation study. *Biophys J* 2006;90:1855-64;
- [26] Konno K, Hisada M, Naoki H, Itagaki Y, Kawai N, Miwa A, Yasuhara T, Morimoto Y, Nakata Y. Structure and biological activities of Eumenine Mastoparan-AF (EMP-AF), a new mast cell degranulating peptide in the venom of the solitary wasp (*Anterhynchium flavomarginatum micado*). *Toxicon* 2000;38:1505-15.
- [27] Konno K, Hisada M, Fontana R, Lorenzi CCB, Naoki H, Itagaki Y, Miwa A, Kawai N, Nakata Y, Yasuhara T, Ruggiero Neto J, Azevedo Jr, WF, Palma MS, Nakajima T (2001) Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. *Biochim Biophys Acta* 2001;1550:70-80.
- [28] Lee MT, Hung WC, Chen FY, Huang HW. Many-body effect of antimicrobial peptides: on the correlation between lipid's spontaneous curvature and pore formation. *Biophys J* 2005;89:4006-16.
- [29] Lindahal E, Hess B, van der Spoel D. Gromacs 3.0: a package for molecular simulations and trajectory analysis. *J Mol Model* 2001;7:306-17.
- [30] Matsuzaki K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self defense ? *Biochem Soc Trans* 2001;29:598-601.
- [31] Matsuzaki K, Sugishita K, Ishibe N, Ueha M, Nakata S, Miyajima K, Epanand RM. Relationship of membrane curvature to the formation of pores by Magainin 2. *Biochemistry* 1998;37:11856-63.
- [32] Matsuzaki K, Yoneyama S, Murase O, Miyajima K. Transbilayer transport of ions and lipids coupled with mastoparan X translocation. *Biochemistry* 1996;35:8450-56.
- [33] Matsuzaki K, Murase O, Fujii N, Miyajima K. Translocation of a channel-forming antimicrobial peptide, Magainin 2, across lipid bilayers by forming a pore. *Biochemistry* 1995;34:6521-26.
- [34] McIntosh TJ. The 2004 Biophysical Society-Avanti Award in Lipids address: roles of bilayer structure and elastic properties in peptide localization in membranes. *Chem Phys Lip* 2004;130:83-98.

- [35] Miyamoto S, Kollman PA. SETTLE: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J Comput Chem* 1992;13:952-62.
- [36] Papo N, Shai, Y. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model membranes ? *Peptides* 2003;24:1693-1703.
- [37] Park NG, Yamato Y, Lee S, Sugihara G. Interaction of Mastoparan-B from venom of a hornet in Taiwan with phospholipid bilayer and its antimicrobial activity. *Biopolymers* 1995;36:793-801.
- [38] Rohl CA, Baldwin RL. Deciphering rules of helix stability in peptides. *Methods in Enzymol* 1998;295:1-26.
- [39] Rouser G, Fleischer S, Yamamoto A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 1970;5:494-6.
- [40] Sforça ML, Oyama Jr. S, Canduri F, Lorenzi CCB, Pertinhez TA, Konno K, Souza BM, Palma MS, Ruggiero Neto J, de Azevedo Jr. WF, Spisni A. How C-terminal carboxyamidation alters the biological activity of peptides from the venom of the Eumenine solitary wasp. *Biochemistry* 2004;43:5608-17.
- [41] States DJ, Haberkorn RA, Ruben DJ. A two-dimensional nuclear Overhauser experiment with pure absorption phase in four quadrants. *J. Magn Reson* 1982;48:286-92.
- [42] Uematsu N, Matsuzaki K. Polar angle as a determinant of amphipathic α -helix-lipid interactions: a model peptide study. *Biophys J* 2000;79:2075-83.
- [43] van Gunsteren WF, Billeter SR, Eising AA, Hünenberger PH, Krüger P, Mark AE, Scott WRP, Tironi IG. Biomolecular simulation: The GROMOS96 manual and user guide; vdf Hochschulverlang: ETH Zürich, Switzerland, 1996.
- [44] Wieprecht T, Dathe M, Beyermann M, Krause E, Maloy WL, MacDonald DL, Bienert M. Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of Magainin 2 amide in interaction with membranes. *Biochemistry* 1997;36:6124-32.
- [45] Wieprecht T, Dathe M, Epand RM, Beyermann M, Krause E, Maloy WL, MacDonald DL, Bienert M. Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides. *Biochemistry* 1997;36:12869-80.
- [46] Wishart DS, Sykes BD, Richards, FM. The chemical shift index: a fast and multiple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry* 1992;31:1647-51.
- [47] Yang L, Harroun TA, Weiss TM, Ding L, Huang HW. Barrel-stave model or toroidal model ? A case study on Melittin pores. *Biophys J* 2001;8:1475-85

[48] Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. Pharmacol Ver 2003;55:27-55.

Table 1: Molar ellipticity ($[\Theta]_{222}$, deg cm²/dmol) at 222 nm and corresponding α -helix fraction (f_H) for both peptides at 20 μ M in different environments.

	Anoplin-NH ₂		Anoplin-OH	
	$[\Theta]_{222}$ (degcm ² /dmo l)	f_H	$[\Theta]_{222}$ (degcm ² /dmo l)	f_H
Tris buffer	-1137.92	rc	-1138.40	rc
SDS 8 mM/buffer	-8649.60	0.302	-7762.81	0.315
PC	-1195.88	rc	-697.782	rc
PCPG 7030	-8124.95	0.282	-7231.21	0.293

rc = random coil

Table 2: Structure statistics for the ensemble of 20 Anoplin-NH₂ and Anoplin-OH structures.

PROCHECK – NMR	Anoplin-NH ₂	Anoplin-OH
Most favored region (%)	100	100
Additionally allowed region (%)	0	0
Generously allowed region (%)	0	0
Disallowed region (%)	0	0
RMSD ^a		
Backbone (all)	0.14 $\pm$ 0.06	0.18 $\pm$ 0.08
Backbone (residues 3-10)	0.04 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.03
Heavy atoms (all)	0.45 $\pm$ 0.19	0.82 $\pm$ 0.11
Heavy atoms (residues 3-10)	0.45 $\pm$ 0.16	0.52 $\pm$ 0.17

^a Root mean square deviation from pairwise comparison between all the structures ($\text{\AA}$).

Table 3: Structural characteristics of ANPs, as obtained from NMR and MD data. The average twist angle has been calculated with HELANAL [3] and used in the hydrophobic moment calculation, according to Eisenberg consensus scale [17].

	Anoplin-NH ₂		Anoplin-OH	
	SDS (NMR)	TFE (MD)	SDS (NMR)	TFE (MD)
helix residues	3 - 10	2 - 10	2 - 10	2 - 7
average twist angle	$105^\circ \pm 9^\circ$	$97^\circ \pm 2^\circ$	$103^\circ \pm 5^\circ$	$91^\circ \pm 12^\circ$
hydrophobic moment	0.458	0.406	0.427	0.447
polar angle	70°	160°	110°	170°

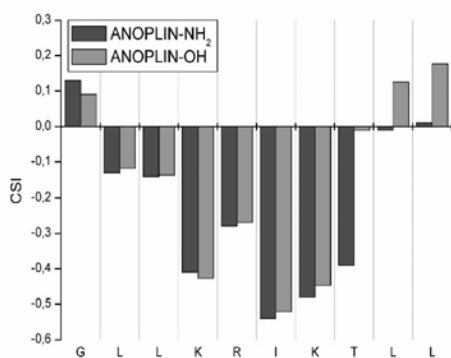


Figure 1: Chemical shift deviations for the α CH protons of Anoplin-NH₂ and Anoplin-OH (0.8 mM) in 200 mM SDS at 30°C. The chemical shift differences were calculated by subtracting the observed value of the peptide from the random coil shifts given in the literature (Wishart, 1992).

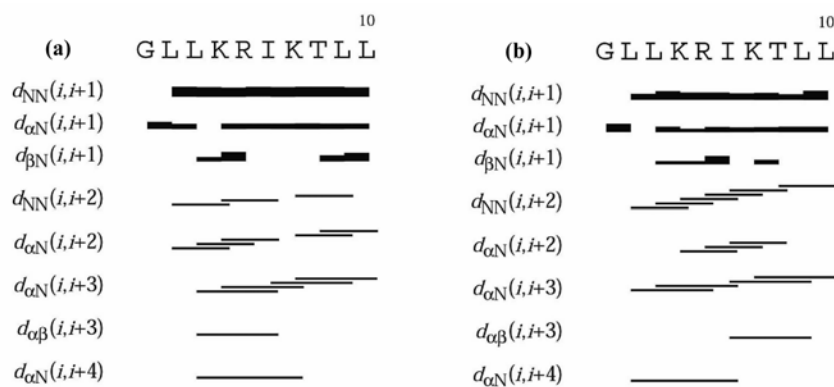


Figure 2: Summary of the sequential and medium-range NOE connectivities for (a) Anoplin-NH₂ (b) Anoplin-OH. The intensities of the observed NOEs are represented by the thickness of lines and were classified as strong, medium and weak, corresponding to upper bound constraints of 2.5, 3.5 and 5 Å, respectively.

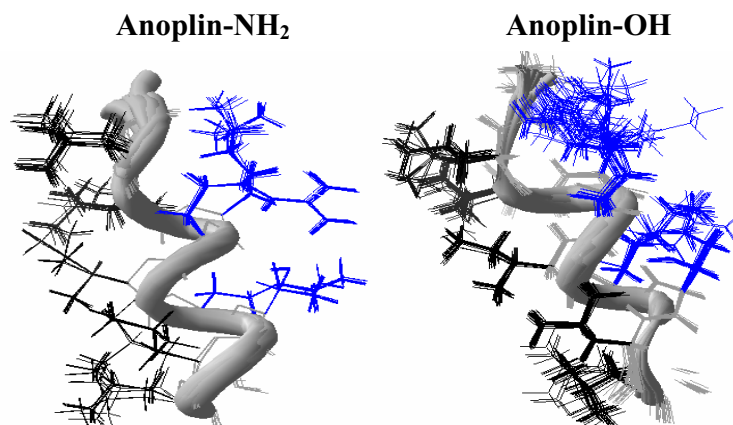


Figure 3: Superposition of final 20 calculated structures of the Anoplin-NH₂ and Anoplin-OH, based on the minimum pairwise RMSD (0.45 ± 0.16 Å, and 0.52 ± 0.17 Å, respectively) of the peptide heavy atoms spanning residues 3 to 10, displaying the hydrophobic amino acids in black and the charged in blue, in the right. The C-terminus is shown at the bottom.

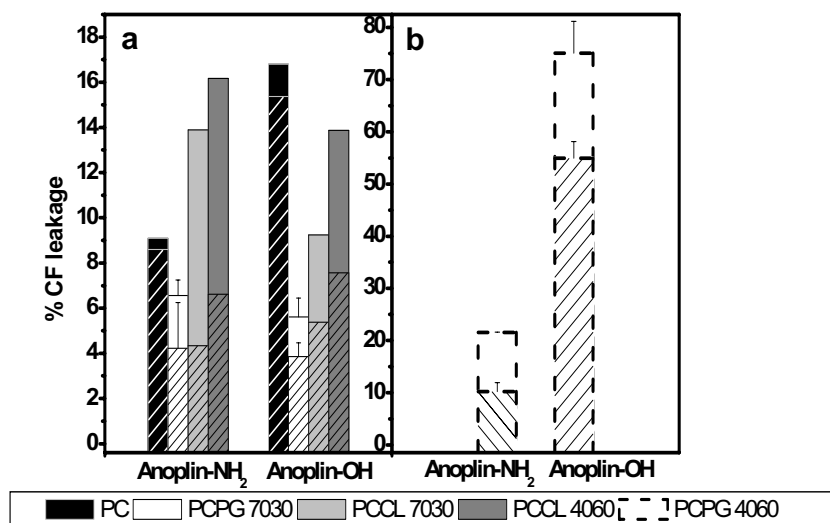


Figure 4(a): % CF leakage caused by Anoplin-NH₂ and Anoplin-OH on zwitterionic PC vesicles at 10 μM concentration, and on anionic vesicles at 20 μM. Lip/Pep ratio varied from 50 to 5. (b) % CF leakage on PCPG 4060 at 20 μM peptide and 120 μM lipid concentration. Contact time 5 minutes shown in hatched bars and 20 minutes contact time (no pattern). Error bars are shown for both peptides with PCPG 7030 vesicles and PCPG 4060.

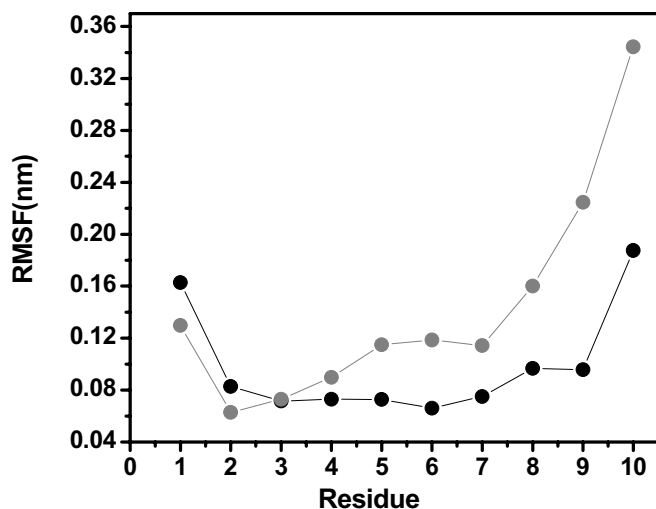


Figure 5: Root Mean Square Fluctuation (RMSF) plot, obtained from MD simulations, for Anoplin-NH₂ in black and Anoplin-OH in gray.

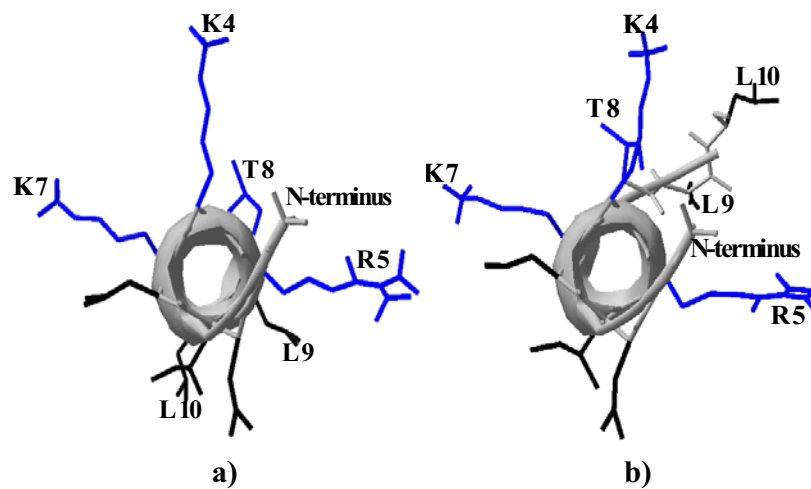


Figure 6: Anoplin-NH₂ (panel a) and Anoplin-OH (panel b) helical structures, projected on the normal plane to the helix axis, showing the polar angle between charged groups of Lys 7 and Arg 5. Side-chains of all hydrophobic residues, especially Leu 9 and Leu 10 are shown in black. Charged and polar residues are shown in blue. Structures as obtained from MD simulations in 30% TFE.

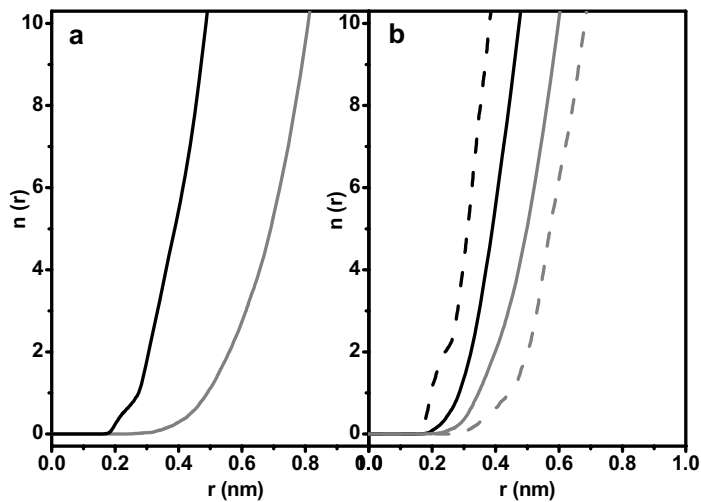


Figure 7: Running integration numbers (RIN), $n(r)$, of the pair radial distribution function (RDF) derived from MD simulations for Anoplin-NH₂ and Anoplin-OH. Panel (a) shows RIN for the N-terminus of Anoplin-NH₂, with NH₃-F in gray and NH₃-W in black. Panel (b) shows RIN for the C-termini of both peptides: Anoplin-NH₂ (straight lines), NH₂-F in gray and NH₂-W in black, and Anoplin-OH (dash lines), O-F in gray and O-W in black.

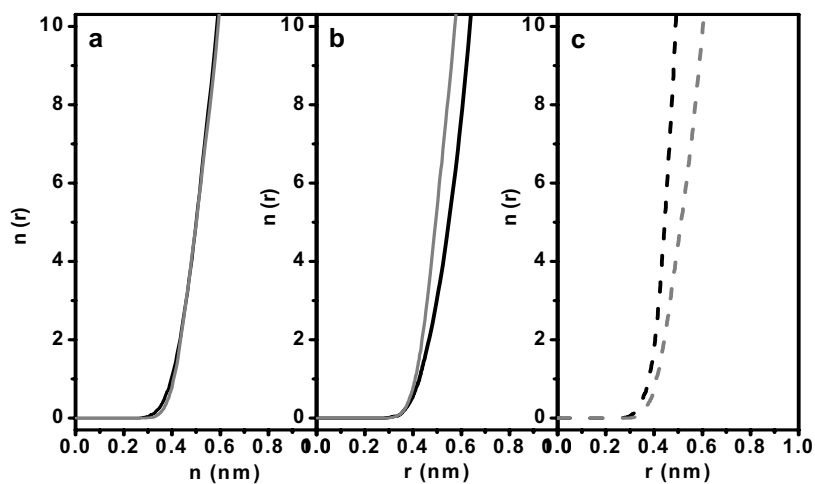


Figure 8, panel a: RIN for the side-chain of Leu 9 with F (in gray) and W (in black) for Anoplin-NH₂, which is equal to Anoplin-OH. Panel b: RIN for the side-chain of Leu 10 for Anoplin-NH₂ with F (in gray) and W (in black). Panel c: same as panel b for Anoplin-OH.