UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Gabriela Campos de Araujo

Estudo por Dinâmica Molecular e Ressonância Magnética Nuclear de Viroporinas: análise da estrutura e do mecanismo de portão da proteína SH (HRSV) e da proteína M2 (vírus Influenza)

São José do Rio Preto
2018

Gabriela Campos de Araujo

Estudo por Dinâmica Molecular e Ressonância Magnética Nuclear de Viroporinas: análise da estrutura e do mecanismo de portão da proteína SH (HRSV) e da proteína M2 (vírus Influenza)

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Profª. Drª. Fátima Pereira de Souza

São José do Rio Preto
2018

Araujo, Gabriela Campos de.
Estudo por dinâmica molecular e ressonância magnética nuclear de viroporinas : análise da estrutura e do mecanismo de portão da proteína sh (hrsv) e da proteína m2 (vírus influenza) / Gabriela Campos de Araujo. -- São José do Rio Preto, 2018
170 f. : il., tabs.

Orientador: Fátima Pereira de Souza
Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Biofísica. 3. Virologia molecular. 4. Vírus sincicial respiratório humano. 5. Proteínas virais. 6. Dinâmica molecular. 7. Ressonância magnética nuclear. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 576.858

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

Gabriela Campos de Araujo

Estudo por Dinâmica Molecular e Ressonância Magnética Nuclear de Viroporinas: análise da estrutura e do mecanismo de portão da proteína SH (HRSV) e da proteína M2 (vírus Influenza)

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular. junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Prof. Dr. Flavio Seixas
UEM – Maringá

Dr. Gabriel Gouvêa Slade
IFTM – Uberaba

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

Prof. Dr. Márcio José Tiera
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 29 de Janeiro de 2018

Aos meus pais, irmãos, tios e avós que sempre incentivaram e deram todo o suporte para minha formação e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À minha família. Aos meus pais Adilson e Vera que sempre prezaram pela minha felicidade acima de tudo, me apoiando, me advertindo e me divertindo. Aos meus irmãos Thalles e Túlio, por estarem sempre presentes, alegres, descontraídos; serem companheiros e amigos.

À minha orientadora Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza, que com toda sua sabedoria soube trilhar o início da minha vida profissional e ainda hoje me mostra os caminhos da vida acadêmica.

Ao Professor Alexandre que desde o início sempre colaborou com orientação, amizade e incentivo.

À UNESP-IBILCE por proporcionar toda infraestrutura, conhecimento e me acolher.

À Capes pela bolsa concedida e por todos os financiamentos de cursos e congressos e principalmente pela oportunidade do doutorado Sanduíche, conseguido juntamente com a bolsa PDSE.

Ao Professor Dr. Vitor Leite por ceder horas e horas do Cluster Shiva, pelas discussões e conversas.

Aos amigos de trabalho, de *happy hour*, de churrasco, do departamento de Física: Denis, Thiago, Tambonis, Fernando, Carol, Paulo, Vinícius, Nayara, Fernanda, Bentinho, Ingrid, Rafael, Daniel, Alexandre, Davi, Goiás, Josimar, Taisa, Monique, Karol, Daiane, Ricardo, Monica, Raphael, Evelyn.

Ao Laboratório Nacional de Alto Campo Magnético (MagLab), à FSU e ao Departamento de Química da FSU por me acolherem, receberem e me ensinarem.

Ao Professor Dr. Cross, pela oportunidade de me deixar fazer parte do seu grupo de pesquisa, me proporcionando conhecimento, aprendizado e experiência.

À Dra Joana Paulino por todo o apoio e ajuda na elaboração e realização do projeto com a proteína M2. Agradeço também pela sua atenção, ensinamentos, por me receber no grupo e em sua casa para fazer ciência.

À Huajung, que me ensinou e me acompanhou durante todo o preparo e obtenção das amostras para ssRMN.

Aos amigos Rongfu e a Kath que ajudaram a alegar o doutorado Sanduíche.

À Larissa, Rafael, Lídia e Robson que compartilharam momentos difíceis, alegres e engraçados se tornando cada vez mais presentes, agora também amigos.

RESUMO

As proteínas SH do HRSV e M2 do IAV são membros das viroporinas, uma família de proteínas virais pequenas de membrana. A proteína SH tem 64 resíduos de aminoácidos e uma estrutura pentamérica composta por alfa-hélice transmembranar. A proteína M2 tem 97 resíduos e forma uma estrutura tetramérica tambem composta por alfa-hélice. A função mais importante destas proteínas é a condução de prótons que é facilitada por um poro aquoso que atravessa quase completamente a membrana. O conjunto de resíduos de W41 da M2 atua como um portão, restringindo o transporte de prótons para o interior viral. Estudos recentes de ressonância magnética nuclear de estado sólido (ssNMR) mostraram que as cadeias laterais do W41 têm uma amplitude de movimento muito limitadas. No entanto, detalhes do mecanismo de portão do W41 dependentes de pH ainda não foram esclarecidos. Nossos estudos recentes sobre a proteína SH do HhSV mostraram que o pentâmero tem duas conformações, uma aberta e outra fechada. No entanto, para a elucidação do mecanismo da proteína SH, HRSV e hospedeiro durante a infecção viral, mais detalhes de sua estrutura e função são necessários. Neste estudo, descrevemos e comparamos as características estruturais da proteína SH completa e do seu peptídeo transmembranar (TM) em diferentes estados de protonação das histidinas (H22 e H51) para fornecer informações detalhadas sobre o arranjo conformacional desses dois sistemas em diferentes ambientes (POPC, DMPC, domínios de *raft* e TFE / água) usando simulação de dinâmica molecular. Para a proteína M2, a fim de proporcionar uma reavaliação estrutural dos resíduos W41 e fornecer informações detalhadas sobre o rearranjo conformacional destes aminoácidos durante a condução de próton, os marcadores isotópicos de M2 foram realizados por expressão em *Escherichia. coli*; a proteína

expressa foi purificada, reconstruída nas bicamadas DOPC:DOPE (4:1) e incorporada nos lipossomas. A análise do arranjo estrutural dos quatro resíduos W41 e a sua caracterização conformacional em pHs 5,8, 6,2 e 7,3 foram avaliadas usando ssNMR. Com os resultados obtidos, analisamos o comportamento da disposição dos resíduos de W41 durante a condução de prótons contribuindo para a compreensão deste mecanismo de portão W41. Resultados de interação proteína-bicamada mostram que o domínio TM é suficiente para interação e inserção da proteína SH, sugerindo um mecanismo livre de inserção. A análise do comprimento completo da SH e do peptídeo TM mostrou uma inclinação diferente em diferentes composições de bicamadas lipídicas, sugerindo interações entre os aminoácidos do N e C-terminal com a superfície da bicamada e influência da composição lipídica para o endereçamento dessa proteína na bicamada. A interação com a interface *raft* e não-*raft,* que também ocorre com a proteína M2, sugere um papel da SH na montagem e brotação viral. Diferentes composições lipídicas influenciam a estrutura do pentâmero da proteína SH e do peptídeo TM, assim como observado com a estrutura monomérica, mas a presença do poro aquoso não foi observado mesmo a protonações representando diferentes valores de pHs. Simulações na presença de desbalanço de carga mostraram uma propensão do peptídeo TM a formação do poro aquoso quando histidinas 22 estão protonadas e sob aplicação de uma potencial positivo. Com todos esses resultados, podemos mostrar a importância desta classe de proteínas na infecção viral e o estudo de sua estrutura encoraja a busca de novos alvos no combate a infecção viral por combinação de ferramentas experimentais e teóricas.

Palavras-chave: viroporinas, proteína SH, proteína M2, dinâmica molecular, RMN

ABSTRACT

The SH protein from HRSV and M2 from IAV are member of the viroporin, a family of membrane small viral proteins. The structures of these proteins are essential to obtain an understanding of their molecular mechanism and to develop new class of anti-viral drugs, once its presence is crucial for viral pathogenicity. SH protein has 64 residues and its pentameric structure consists of transmembrane α-helix. M2 protein has 97 residues and its tetrameric structure form an aqueous channel consists of transmembrane α-helix. The most important function of these proteins is the conduction of protons which is facilitated by an aqueous pore that crosses almost completely the membrane. The Trp41 residues from M2 act as a gate, restricting the transport of protons into the viral interior. Recent studies of solid state nuclear magnetic resonance (ssNMR) have shown that the Trp41 side chains have very limited range of motion. However, details of the gate mechanism of Trp41 pH dependent have not yet been elucidated. Our recent studies on SH protein from HRSV showed that the pentamer has two stated of conformation, an opened and another closed. However, more details of its structure and function are necessary for mechanism elucidation of the SH protein, hRSV and host during viral infection. In this study, we describe and compare structural characteristics of full SH protein and its transmembrane (TM) peptide in different protonation states of histidines (H22 and H51) to provide detailed information on the conformational rearrangement of these systems in different environments (POPC, DMPC e raft bilayers and TFE/water) using molecular dynamics simulation. For M2 protein, in order to provide a structural reassessment of the M2 Trp41 residues and to provide detailed information on the conformational rearrangement of this amino acid during proton conduction, isotopic markers of M2 were performed by expression

in E. coli; the expressed protein was purified, reconstructed on DOPC: DOPE (4:1) bilayers and incorporated into liposomes. Analysis of the structural arrangement of the four Trp41 residues and their conformational characterization at pHs 5.8, 6.2 and 7.3 were evaluated using ssNMR. With the obtained results, we analyzed the behavior of the arrangement of the residues of Trp41 during the conduction of protons, besides contributing to the understanding of this Tpr41 gate mechanism. Analysis of SH full length and TM peptide shown different tilt in different bilayers composition, suggest some specific interaction between N and C-terminal amino acids and the bilayer surface. The interaction with raft and no-raft suggest a role of SH in the viral assembly and budding. With all these results we could show the importance of this class of protein in the viral infection and the study of their structure encourage the researching of new target to virus infection by combination of experimental and theoretical tools.

Keywords: *viroporin, SH protein, M2 protein, dynamics simulation, NMR*

Este trabalho está dividido em duas partes: uma teórica utilizando modelagem e simulação de dinâmica molecular e uma experimental que compreende a técnica de expressão, purificação, preparação de amostras para RMN de estado sólido e análises de espectros de correlação carbono-carbono. A parte teórica do trabalho foi desenvolvida no Departamento de Física, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto – IBILCE/UNESP com a utilização do Cluster Shiva, cedido pelo professor Vitor Leite. A parte experimental do trabalho foi realizada no Laboratório de Química da Universidade Estadual da Flórida (FSU) e no Laboratório Nacional de Alto Campo Magnético (MagLab), localizados na cidade de Tallahassee, Flórida – USA, sob a supervisão do Prof. Dr. Timothy Cross e Dra. Joana Paulino. Todo incentivo, apoio, elaboração, discussão e aprendizado do projeto são creditados a Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza. O financiamento das bolsas foi concedido pela agência de fomento CAPES.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 15

VIROPORINAS 15

1. Introdução 15

1.1 Classificação das viroporinas 17

1.2 Função das viroporinas no ciclo viral 17

1.3 Viroporinas como alvo na busca de antivirais 20

1.4 Proteína SH 22

1.4.1 Função e Localização celular 23

1.4.2 Estrutura, oligomerização e atividade de canal 24

1.4.3 Proteína SH como alvo de inibição da infecção viral 25

1.5 Proteína M2 28

1.5.1 Estrutura e função 28

1.5.2 Proteína M2 como alvo de inibição da infecção viral 30

1.5.3 Mecanismo de condutância e o papel de "*gate*" do Trp41 31

1.6 Objetivo Geral 33

CAPÍTULO 2 35

TÉCNICAS E METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA ESTUDO DAS ESTRUTURAS E FUNÇÕES DAS VIROPORINAS SH DO HRSV E M2 DO IAV 35

2. Introdução 35

2.1 Dinâmica Molecular 37

2.1.1 A Mecânica estatística e a Dinâmica Molecular 38

2.1.2 Função de energia potencial para tratamento de moléculas biológicas 39

2.1.3 Campo de Força 40

2.1.4 GROMOS 53A6 41

2.1.5 Tratamento do Potencial Eletrostático 45

2.1.6 *Coarse-Grained* – MARTINI 46

2.1.6.1 Mapeamento 47

2.1.6.2 Interações ligadas e não-ligadas 48

2.1.6.3 Topologia básica para lipídeos e proteínas 49

2.1.6.4 Massa das partículas e escala de tempo 52

2.1.6.5 Limitações 52

2.1.7 *Condições Periódicas de Contorno* 53

2.1.8 *Integração de Movimento* 54

2.1.8.1 Algoritmo de Verlet 54
2.1.8.2 Leap-frog 55
2.1.9 *Aplicação de potencial transmembrânico* 56
2.1.10 *Parâmetros para análise das simulações* 59
2.1.10.1 RMSD e RMSF 59
2.1.10.2 Área por lipídeo 59
2.1.10.3 Espessura da bicamada lipídica 60
2.1.10.4 Parâmetro de Ordem 60
2.1.10.5 Perfil de Densidade de Massa 61
2.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR 62
2.2.1 Introdução 62
2.2.2 Pulsos de Rádio Frequência 67
2.2.3 Relaxação Longitudinal 68
2.2.4 Relaxação transversal 69
2.2.5 Equações de Bloch 69
2.2.6 Decaimento de Indução Livre (*FID – Free Induction Decay*) 71
2.2.7 Interações Anisotrópicas 72
2.2.7.1 Deslocamento Químico *(Chemical Shift)* 72
2.2.8 Experimentos básicos de RMN 73
2.2.8.1 RMN – 1D 74
2.2.8.2 RMN - 2D 75
2.3 RMN do Estado Sólido 77
2.3.1 Rotação em torno do Angulo Mágico (*MAS – Magic Angle Spinning*) 77
2.3.2 Polarização Cruzada *(Cross polarization)* 78
2.3.3 Desacoplamento Heteronuclear 79
2.3.4 Reacoplamento Homonuclear (*Homonuclear recoupling*) 80
CAPÍTULO 3 82
SH, ESTUDO ESTRUTURAL E ALVO DE BUSCA DE NOVOS INIBIDORES CONTRA HRSV 82
3. Introdução 82
3.1. Objetivos 83
3.1.1. Objetivos Específicos 83
3.2. Materiais e Métodos 84
3.2.1 Sistemas simulados 85
3.2.2 Protocolos de Simulação 85
3.2.2.1 Simulação Atomística 85

3.2.2.2 Coarse Grained ... 86
3.3. Resultados e discussões ... 86
3.3.1. SH e as viroporinas e seu mecanismo de inserção em membranas ... 86
3.3.2. Estrutura e influência dos monômeros em diferentes ambientes e composições lipídicas ... 92
3.3.3. Proteína SH e sua interação com domínio de raft ... 98
3.3.4. Estrutura pentamérica e estado de protonação das H22 e H51 ... 102
3.3.5. Análise do mecanismo de portão da proteína SH: o efeito do desbalanço de carga e do estado de protonação da H22 na ativação da atividade de canal do pentâmero do peptídeo TM ... 111
3.4. Conclusões ... 116
CAPÍTULO 4 ... 120
M2, O CANAL DE PRÓTONS DO VÍRUS INFLUENZA A: MECANISMO DE PORTÃO DO W41 ... 120
4. Introdução ... 120
4.1. Objetivos ... 121
4.1.1. Objetivo Geral ... 121
4.1.2. Objetivos específicos ... 121
4.2 Materiais e Métodos ... 121
4.2.1 Transformação ... 121
4.2.2 Expressão ... 122
4.2.3 Aminoácidos específicos marcados ... 122
4.2.4 Lise Celular e Solubilização da Proteína de membrana ... 123
4.2.5 Purificação ... 124
4.2.6 Remoção da Cauda de histidina (His-tag) com TEV *(Tobacco Etch Virus)* ... 125
4.2.7 Reconstrução da proteína em lipossomos de DOPC/DOPE ... 126
4.2.8 Espectroscopia de RMN ... 127
4.3 Resultados ... 128
4.3.1 M2FL com 13CTrp + 13C15NLeu marcados ... 128
4.3.2 M2FL com 13CTrp + 13C15N Arg marcados ... 141
4.4 Conclusões ... 144
4.5 Trabalhos e Andamento e Perspectivas Futuras ... 145
REFERÊNCIAS ... 146
Apêndice I ... 157
Tutorial I: Simulação do pentâmero inserido/próximo à bicamada lipídica para sistemas atomísticos ... 157
Tutorial II: Simulação do pentâmero inserido/próximo à bicamada lipídica para sistemas Coarse-Grained (CG) ... 164

Apêndice II 168
TABALHOS E COLABORAÇÕES FINALIZADOS E EM ANDAMENTO 168

CAPÍTULO 1

VIROPORINAS

1. Introdução

O termo viroporina foi proposto pela primeira vez em 1978, após a observação de que infecções virais induziam mudanças na permeabilidade das membranas plasmáticas das células do hospedeiro (CARRASCO, 1978). A história das viroporinas iniciou-se próximo a década de 80, quando se descobriu que o alvo de ação da amantadina, primeiro agente antiviral licenciado para tratamento de infecções causadas pelo vírus Influenza (COUCH, 1969; DAMOC et al., 2007; DAVIES et al., 1964), era a proteína M2 (HAY et al., 1985). Mais tarde sua atividade de canal foi demonstrada explicando a permeabilidade das membranas plasmáticas de células infectadas e seu papel na biologia da infecção viral começou a ser investigado (PINTO et al., 1992).

Tabela 1: Lista de viroporinas conhecidas e suas funções no ciclo de vida viral

Vírus	Viroporina	Aminoácidos	Função no ciclo de vida viral	Referencias
IAV	M2	97	Processamento e transporte de glicoproteínas Retardamento do transporte de proteínas pelo TGN Liberação viral	(GRAMBAS; HAY, 1992; HELENIUS, 1992; HENKEL et al., 2000; HENKEL; WEISZ, 1998; LAKADAMYALI et al., 2003; MARTIN; HELENIUS, 1991; ROSSMAN; JING; LESER; BALANNIK; et al., 2010; ROSSMAN; JING; LESER; LAMB, 2010; SAKAGUCHI et al., 1996)
HIV-I	Vpu	77 86	Degradação de CD4 e transporte de proteínas do envelope Liberação viral	(CHEN et al., 1993; DUBÉ et al., 2010; HSU et al., 2010; LENBURG; LANDAU, 1993; LEVESQUE et al., 2003; VINCENT et al., 1993; WILLEY et al., 1994)
HCV	P7	63	Morfogênese viral Processamento da poliproteína viral	(BROHM et al., 2009; GENTZSCH et al., 2013; JONES et al., 2007; TEDBURY et al., 2011)
CoV	E 3A	76 274	Morfogênese viral e montagem viral Liberação viral	(LU et al., 2006; VENNEMA et al., 1996; WILSON et al., 2006; YE; HOGUE, 2007; ZENG et al., 2004)
Poliovírus	2B 3A	97 87	Bloqueio do transporte do CG para RE/secreção de proteínas do hospedeiro	(DOEDENS; KIRKEGAARD, 1995; SANDOVAL; CARRASCO, 1997)
Coxsakievírus	2B	99	Inibe o transporte de proteínas pelo CG Induz apoptose	(AO et al., 2014; DE JONG et al., 2006; VAN KUPPEVELD et al., 1997; ZHOU et al., 2009)
RSV	SH	64	Inibe a apoptose celular Ativação do inflassoma	(FUENTES et al., 2007; TRIANTAFILOU et al., 2013)
Picornavírus	2B	97	Redução de Ca+ e H+ no Retículo endoplasmático e Complexo de Golgi Inibe o transporte de proteínas pelo CG Inibi a apoptose	(CROFT et al., 2017; JONG et al., 2008)
Alfavírus	6K	58-61	Aumento da permeabilidade da membrana Liberação viral	(MELTON et al., 2002)

Fonte: GONZALEZ; CARRASCO, 2003; NIEVA et al., 2012

As viroporinas, a partir de então, foram tratadas como uma classe de proteínas de membrana que possuem as seguintes características: i) são pequenas (compostas por aproximadamente 60 à 120 aminoácidos); ii) apresentam estruturas secundárias com elevado conteúdo de alfa-hélice; iii) possuem pelo menos um domínio transmembrânico (TM) altamente hidrofóbico; e iv) tem a capacidade de formar homo-oligômeros, a fim de produzir canais iônicos (GONZALEZ; CARRASCO, 2003; NIEVA et al., 2012).

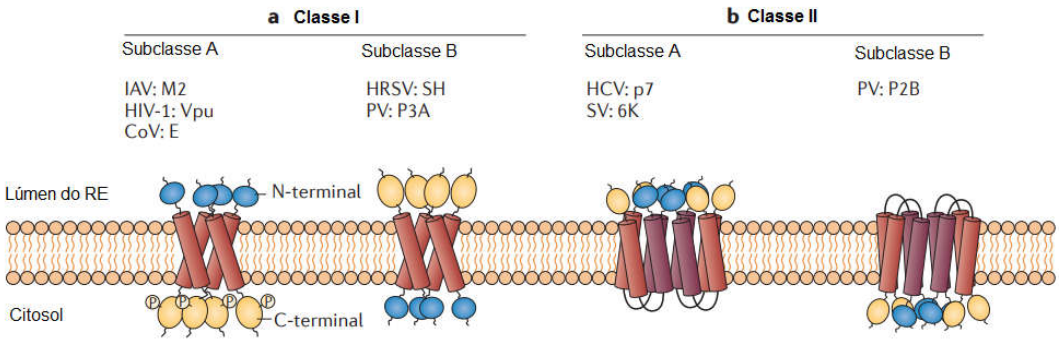
Desde a década de 90, várias proteínas codificadas por diferentes patógenos humanos como a Vpu do HIV-I (EWART et al., 1996), as proteínas 2B e 2BC do picornavírus (ALDABE et al., 1996; BARCO; CARRASCO, 1995), a proteína 6K do alfavírus (MELTON et al., 2002) e a proteína SH do paramixovírus (PEREZ et al., 1997) foram identificadas com essas mesmas características, incluindo vários vírus

de RNA e DNA (SUZUKI et al., 2010; WETHERILL et al., 2012) conforme pode ser observado na Tabela 1.

1.1 Classificação das viroporinas

Atualmente, as viroporinas são classificadas em duas grandes classes baseadas no número de domínios transmembrânicos (DTM). Viroporinas com um DTM pertencem à classe I e viroporinas com dois DTM, à classe II. Essas classes foram então subdivididas em subclasses, A e B, de acordo com a posição das regiões terminais em relação à membrana: viroporinas com N-terminal direcionado para o lúmem do retículo endoplasmático pertencem à subclasse IA, e aquelas com C-terminal direcionado para lúmen pertencem à subclasse IB. Para as subclasses IIA e IIB, ambos N- e C-terminal são direcionados para o lúmen do RE e matriz citoplasmática, respectivamente (vide Figura 1).

Figura 1: Classificação das viroporinas de acordo com o número de domínios transmembrânico (DTM) e posição das regiões terminais na membrana. A. Classe I das viroporinas com um único domínio transmembrânico. As subclasses A e B contêm as viroporinas que possuem seus N e C-terminal voltados para o lúmen do retículo endoplasmático e citosol, respectivamente. B. Classe II das viroporinas composta de hélice-volta-hélice, o N- e C-terminal para o lúmen do RE pertencem à subclasse A e com N- e C-terminal direcionados para o citosol pertencem à subclasse B. Viroporinas conhecidas de cada subclasse são mostradas. CoV, coronavírus: proteína E; HCV, vírus da Hepatite C: proteína p7; HRSV, vírus Sincicial Respiratório Humano: proteína SH; IAV, vírus Influenza A: proteína M2.



Fonte: Figura adaptada de NIEVA et al., 2012.

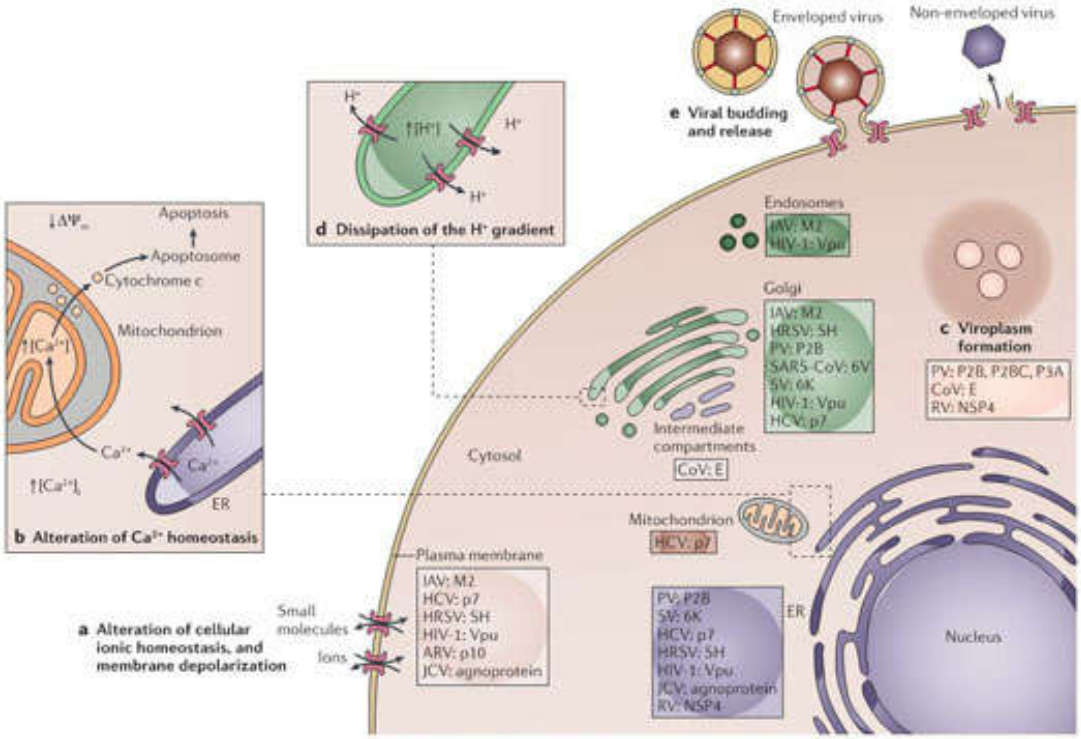
1.2 Função das viroporinas no ciclo viral

As viroporinas participam em diferentes etapas do ciclo viral, desde a sua entrada até a montagem do vírion e sua liberação a partir de células infectadas. No entanto, elas não são parte do complexo de replicação viral. Vírus com deficiência de

viroporinas são incapazes de realizar uma montagem e liberação adequadas na célula do hospedeiro (IWATSUKI-HORIMOTO et al., 2006; JONES et al., 2007; LU et al., 2006; RUIZ et al., 2010; STEINMANN; PENIN; et al., 2007; SUZUKI et al., 2010; TERWILLIGER et al., 1989).

Para desempenhar tais funções, uma das atividades utilizadas pelas viroporinas é a atividade de canal. Quando a atividade de canal das viroporinas é ativada durante a infecção viral, perturbações de permeabilidade na membrana do hospedeiro ocorrem levando à desregulação da homeostase iônica celular e, consequentemente, eventos citopáticos (vide Figura 2). Muitas viroporinas são expressas ou encontradas em complexos do retículo endoplasmático, como ocorre com a proteína SH do HRSV, 2B do enterovírus e do Coxsackievírus (DE JONG et al., 2006; RIXON et al., 2004). Essa organela estoca a maior concentração de Ca^{2+} da célula, que é um importante regulador de funções enzimáticas e processos celulares. O aumento da sua concentração pode induzir apoptose (HAJNÓCZKY et al., 2003), fenômeno observado quando proteínas virais, incluindo viroporinas, são expressas em células do hospedeiro (CHAMI et al., 2003; JACOTOT et al., 2000; MADAN et al., 2008). Além disso, a alteração nas concentrações de Ca^{2+} também pode afetar a regulação da expressão gênica viral, o processamento pós-traducional de proteína virais, a inibição do transporte de proteínas pelo TGN (rede trans do Golgi), inibição da resposta antiviral, além da maturação e liberação dos vírions (vide Figura 2) (ZHOU et al., 2009). Outra consequência do descontrole da homeostase celular durante a infecção viral é a ativação do inflassoma NLRP3 (MURAKAMI et al., 2012). O IAV é um dos vírus ativadores do inflassoma NLRP3 pela indução da maturação da caspase-1 via dsRNA e alteração da concentração iônica nas redes trans do Golgi pela atividade de canal de próton (ICHINOHE et al., 2010, 2010; KANNEGANTI et al., 2006; PIRHONEN et al., 1999; SCHRODER; TSCHOPP, 2010). Células infectadas com HRSV na presença e na ausência do gene da proteína SH mostraram que a infecção na presença da viroporina também induz a maturação da caspase-1 e a secreção do IL-1β pela atividade de canal (TRIANTAFILOU et al., 2013).

Figura 2: Efeito citopático das viroporinas e suas funções durante o ciclo de vida viral. As principais organelas das células do hospedeiro que são alvo de viroporinas, os efeitos citopáticos induzidos por elas e suas funções durante a infecção viral. A) Alteração do potencial da membrana plasmática. Viroporinas que estão localizadas na membrana celular podem dissipar gradiente iônico através da membrana levando à despolarização. B) Alteração da homeostase de Ca^{+2} celular. A viroporina 2B do polivírus (PV) forma poros no retículo endoplasmático (RE) e induz o transporte de cálcio do RE para o citosol. Absorção de cálcio pela mitocôndria pode levar à dissipação do potencial da membrana mitocondrial interna, permeabilização da membrana mitocondrial externa e finalmente a liberação do citocromo C. No citosol, o citocromo C promove a formação do apoptossoma, uma plataforma molecular que está envolvida na apoptose celular. C) Algumas viroporinas como P2B, P2BC e P3A do polivírus (PV) e a proteína do envelope E do coronavírus (CoV) induzem remodelagem da membrana intracelular para gerar novas vesículas da membrana (viroplasmas) que serve como sítio de replicação viral. D) Dissipação de gradiente de próton no complexo de golgi e na rede trans do golgi (TNG). As viroporinas M2 do IAV e P7 do HCV reduz a acidificação do compartimento vesicular pela equilibração da concentração de prótons com o citosol. Alteração do gradiente iônico intracelular em sistemas vesiculares impede o transporte de glicoproteínas. E) Durante o ciclo de replicação viral, viroporinas desempenham uma parte essencial na montagem, brotamento e liberação da progênie viral. ARV, rinovírus aviário; CoV, coronavírus: proteína E; HCV, vírus da Hepatite C: proteína p7; HRSV, vírus Sincicial Respiratório Humano: proteína SH; IAV, vírus Influenza A: proteína M2.



Fonte: Figura adaptada de NIEVA et al., 2012.

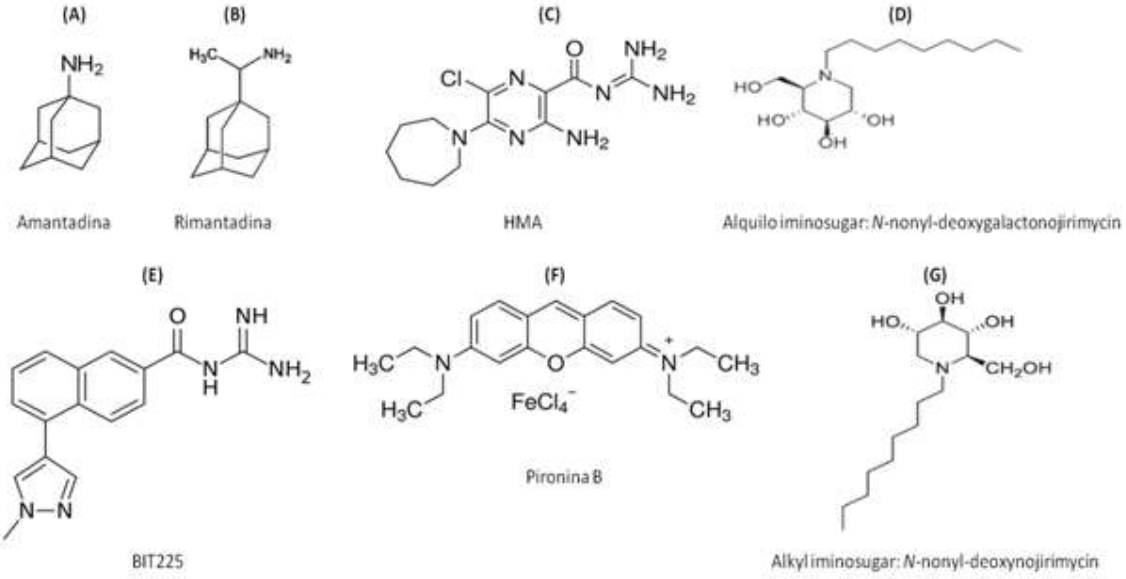
Apesar de atuarem como canais iônicos, viroporinas possuem papéis importantes que são independentes da formação do poro ou da sua habilidade de conduzir íons. Um deles é sua interação com numerosos fatores celulares, vias de sinalização para formação e morfogêneses viral e outras proteínas virais (GONZALEZ; CARRASCO, 2003; NIEVA et al., 2012). Um exemplo é a proteína M2 do vírus Influenza. Esta proteína possui um domínio citoplasmático na região C-terminal que interage com a proteína de matriz M1 ajudando na montagem de partículas virais por meio do recrutamento das proteínas virais e RNA para a membrana plasmática (CHEN et al., 2008). Estudos com a viroporina p7 do HCV também reportam sua interação com outras proteínas não-estruturais, como a NS2, e esta interação parece ser crucial para a produção de partículas virais de HCV (GOUKLANI et al., 2013; VIEYRES et al., 2013). Interações proteína-proteína entre as três proteínas de membrana do HRSV (proteína F de fusão, proteína G de adsorção e proteína SH) também foram reportadas e acredita-se que estas interações têm efeito na atividade de fusão da partícula viral com a célula do hospedeiro (FELDMAN et al., 1999; HEMINWAY et al., 1994; TECHAARPORNKUL et al., 2001).

1.3 Viroporinas como alvo na busca de antivirais

As funções das viroporinas durante o ciclo de vida viral fez dessas proteínas um alvo atrativo para terapias antivirais. O uso de inibidores clássicos de viroporinas bem como a busca por novos e mais específicos inibidores, pode potencializar a eficácia de tratamentos virais que já são utilizados. Além disso, esses inibidores não só contribuem na investigação de suas funções durante a infecção viral, mas também ajudam a monitorar seus efeitos e mecanismos nas células do hospedeiro durante o processo de infecção (GONZALEZ; CARRASCO, 2003).

Amantadina (Figura 3 A) foi a primeira molécula capaz de bloquear a liberação viral, inibindo a atividade de canal da proteína M2 (KENDAL; KLENK, 1991). Mais tarde, demonstrou-se que ela também interage com a proteína p7 do HCV em membranas artificiais (GRIFFIN et al., 2003; STGELAIS et al., 2007). No entanto, em cultura de células, a inibição do HVC mostrou-se moderada e dependente de genótipos (GRIFFIN et al., 2008) e para o IAV, o surgimento de variantes mostraram-se resistente a este inibidor (GOVORKOVA; WEBSTER, 2010).

Figura 3: Estruturas dos inibidores de viroporinas. (A) Amantadina. (B) Rimantadina. (C) HMA, amilorida 5-(N, N-hexametileno). (D) *N*N-DGJ: n-nonil-deoxigalactonojirimicine. (E) BIT-225, N-(5-(1-metil-1H-pirazol-4-y)-naftaleno-2-carbonil)-guanidina. (F) Pironina B. (G) *N*N-DNJ: N-nonil-deoxinijirimicine.



Derivados de imunoaçúcares de cadeias alquílicas longas (*N*N-DNJ: N-nonil-deoxinijirimicine; *N*N-DGJ: n-nonil-deoxigalactonojirimicine) (Figuras 3 D, G) inibiram a função de canal da proteína p7 do HCV *in vitro* e reduziram a infecção viral (FOSTER et al., 2011; JONES et al., 2007; STEINMANN; WHITFIELD; et al., 2007). No entanto, estudos clínicos de fase II não mostraram eficácia satisfatória (PAWLOTSKY et al., 2007). Outros compostos que inibiram um grupo de viroporinas foram derivados de amilorida, especificamente o amilorida 5-(N, N-hexametileno) (HMA) (Figura 3 C). Este composto apresentou atividade inibitória contra a proteína p7 do HCV (PREMKUMAR et al., 2004), Vpu do HIV (EWART et al., 2002) e proteína E (SARS-CoV) (WILSON et al., 2006), mas a concentração requerida para o bloqueio da função da proteína p7 do HCV foi tóxica em cultura de célula (GRIFFIN et al., 2008).

Pironina B (Figura 3 F) foi o primeiro composto com potencial inibitório da atividade de canal da proteína SH. Estudos de *docking* molecular e RMN foram as ferramentas utilizadas para o mapeamento do sítio de interação entre o inibidor e a

proteína, sugerindo uma ligação em uma região conservada do pentâmero, no C-terminal, final do domínio transmembrânico (LI et al., 2014) (Figura 3 F e 4).

De todos os inibidores de viroporinas, o BIT225 (Figura 3 E) apresentou-se como um potencial candidato em tratamentos contra HCV desde o início. Em 2010, testes na fase Ib/IIa resultaram em moderada redução da carga viral em pacientes infectados (KHOURY et al., 2010). Em 2016, foi publicado que 82% dos pacientes tratados com BIT225 e interferon/ribavirina (IFN/RBV) ficaram livres do vírus contra 60% daqueles tratados somente com IFN/RBV (MICHELLE MILLER, 2016). Este resultado evidencia o potencial dos inibidores de viroporinas na eficácia do tratamento de infecções virais e encoraja a busca por novos e mais específicos inibidores para o bloqueio dessa classe de proteínas.

Tabela 2: Inibidores das viroporinas descritos na literatura e sistemas de teste usados.

Viroporina (vírus)	Inibidor	Sistemas de testes usados	Referência
M2 (IAV)	Adamantinas (amantadina e rimantadina)	Membranas artificiais, cultura de células	(CADY et al., 2010; KENDAL; KLENK, 1991; STOUFFER et al., 2008)
Vpu (HIV)	HMA	Cultura de célula	(EWART et al., 2002)
	BIT225	Cultura de célula	(KHOURY et al., 2010)
p7 (HCV)	Amantadina	Membranas artificiais, cultura de célula e testes clínicos	(BOWDEN et al., 2008; GRIFFIN et al., 2003; VAN SOEST et al., 2010; STGELAIS et al., 2007)
	HMA	Membranas artificiais, cultura de célula	(GRIFFIN et al., 2008; PREMKUMAR et al., 2004)
	Derivados de iminoaçúcares de cadeias alquil longas	Cultura de célula e testes clínicos	(FOSTER et al., 2011; PAVLOVIĆ et al., 2003; PAWLOTSKY et al., 2007; STEINMANN; WHITFIELD; et al., 2007)
SH (hRSV)	Pironina B	Membranas artificiais	(LI et al., 2014)
E (CoV)	HMA	Cultura de célula	(WILSON et al., 2006)

BIT-225: N-(5-(1-metil-1H-pirazol-4-y)-naftaleno-2-carbonil)-guanidina; CoV: coronavírus; DIDS: ácido 4,4'-diisotiociano-2,2'-estilbenedissulfonico; E: pequena proteína de membrana do envelope; HCV: vírus da hepatite C; HMA: amiloride 5-(N, N-hexametileno); IAV: vírus Influenza A; M2: proteína de matriz 2; SH: pequena proteína hidrofóbica; HRSV: vírus sincicial respiratório humano; Vpu: proteína viral U.

1.4 Proteína SH

O HRSV, assim como IAV, HIV e HCV também codifica uma proteína de membrana da classe das viroporinas, a proteína SH. Sendo uma das três proteínas de

membrana codificada pelo vírus, a proteína SH possui o C-terminal orientado para lúmen e com um único domínio transmembrânico, portanto, pertencente à classe I subclasse B das viroporinas (COLLINS; MOTTET, 1993). Ela é composta por 64 (tipo viral A) ou 65 aminoácidos (tipo viral B), sendo sua sequência altamente conservada entre os subtipos A do HRSV (CHEN et al., 2000; OLMSTED; COLLINS, 1989).

Em células infectadas, a proteína SH é expressa em diferentes formas (COLLINS et al., 1990; OLMSTED; COLLINS, 1989). Essas formas são: I) forma não glicosilada (SH0) de 7,5 kDa; II) glicosilada (SHg) com massa molecular de 13-15 kDa; e a III) forma polilactosaminoglicano modificada (SHp) com massa molecular de 21-30 kDa. Evidências sugerem que a forma não glicosilada é modificada por uma glicosilação para a forma SHg, e subsequentemente modificada para a forma SHp pela adição do polilactosaminoglicano. Uma quarta forma da proteína SH também existe. Ela ocorre quando a tradução da proteína começa em uma metionina alternativa, resultando em seu tamanho truncado de 4.5 kDa (SHt) (BUKREYEV et al., 1997).

1.4.1 Função e Localização celular

O papel desempenhado pela proteína SH durante a replicação viral ainda não é claro. Estudos com células infectadas por vírus com a deleção do gene da proteína SH (HRSV-ΔSH) mostram que ela é dispensável para a entrada do vírus, seu crescimento e formação de sincício (BUKREYEV et al., 1997; FELDMAN et al., 1999; FUENTES et al., 2007; JIN et al., 2000; TECHAARPORNKUL et al., 2001). No entanto, ela pode desempenhar algum papel na invasão do sistema imune do hospedeiro, assim como outras proteínas SH de membros da família Paramixoviriade, sem ter nenhuma homologia sequencial (WILSON et al., 2006). Estudos com células infectadas com HRSV, na ausência do gene da proteína SH (HRSV-ΔSH), resultaram em maior apoptose quando comparados às células infectadas com o vírus completo, evidenciando um papel da proteína SH na regulação da morte celular (FUENTES et al., 2007). Além disso, sua importante função na patogenia viral foi descoberta quando vírus, com deleção desse mesmo gene, causou infecção atenuada em modelos de ratos e chimpanzés (BUKREYEV et al., 1997; WHITEHEAD et al., 1999).

As regiões de localização com maiores concentrações da proteína SH durante a infecção viral são compartimentos da via secretora como retículo endoplasmático (RE) e complexo de Golgi (CG). Uma quantidade significativa dessa proteína também é encontrada integrada com domínios lipídicos (*lipid-raft*), e uma presença mínima em filamentos de vírus maduro e em membranas plasmáticas (RIXON et al., 2004; TRIANTAFILOU et al., 2013).

1.4.2 Estrutura, oligomerização e atividade de canal

Collins e Mottet em 1993 mostraram, por meio de experimentos de ligação cruzada (*cross-linking)* em SDS, a formação, de pelo menos, quatro oligômeros da proteína SH: dímeros, trímeros, tetrâmeros e pentâmeros (COLLINS; MOTTET, 1993). Em 1997, Perez e colaboradores revelaram que a proteína SH quando expressa em *E. coli,* modificava a permeabilidade da membrana de bactérias para compostos com baixa massa molecular, sugerindo a formação de poros na membrana (PEREZ et al., 1997). Mais tarde, Gan e colaboradores utilizaram abordagens computacionais e experimentais para analisar o estado oligomérico do domínio transmenbrânico da proteína SH. Neste estudo, evidências experimentais revelaram que o domínio TM da proteína SH é composto por alfa-hélice. Estudos teóricos mostraram que este domínio TM se arranja de forma pentamérica com o resíduo H22 direcionado para o lúmen do poro, assim como ocorre com o resíduo H37 da proteína M2 do vírus Influenza, ou interface inter-helical, formando um canal iônico seletivo dependente de pH e independente de voltagem. Neste mesmo estudo, a condutância da SH-TM (resíduos de aminoácidos de 18-23) foi diminuída com o aumento de pH de 4,0 para 7,4. Os autores sugeriram que o aumento da condutância era devido à repulsão eletrostática das histidinas quando protonadas (GAN et al., 2008).

Em 2012, Gan e colaboradores conseguiram expressar e purificar a proteína SH fundida com His6-MBP em *E. coli* (GAN et al., 2012). Neste mesmo estudo, a proteína SH apresentou-se como um único oligômero (pentâmero) em diferentes detergentes (PFO – Ácido perfluorooctanóico; betaína C14), micelas (DPC - dodecilfosfocolina, DHPC (dihexolnoyl fosfatidilcolina), SDS (Dodecil sulfato de sódio) e lipossomos (DMPC- dimirilistoilfosfatidilcolina). No entanto, as porcentagens de estruturas secundárias foram diferentes para cada ambiente onde a proteína foi reconstituída. Além disso, a atividade de canal da proteína SH também foi

dependente do pH, sendo ativa em pH ácido e abolida quando os resíduos H22 e H51 foram mutados simultaneamente. Mutação somente na H51 não afetou a atividade de canal da proteína SH. No entanto, a mutação da histidina 22 por uma alanina (H22A) aumentou a densidade de corrente quando comparado ao tipo selvagem viral (WT), sugerindo fortemente que a protonação da H22 possui um papel na regulação da atividade do canal. A estrutura pentamérica, construída a partir dos dados de RMN em solução adquiridos neste estudo, apresentou-se em forma de funil com comprimento de 45 Å, com menor diâmetro (3,5 Å) na cadeia lateral de I36, N-terminal com 18 Å e C-terminal com 8 Å (GAN et al., 2012) (vide Figura 4 B).

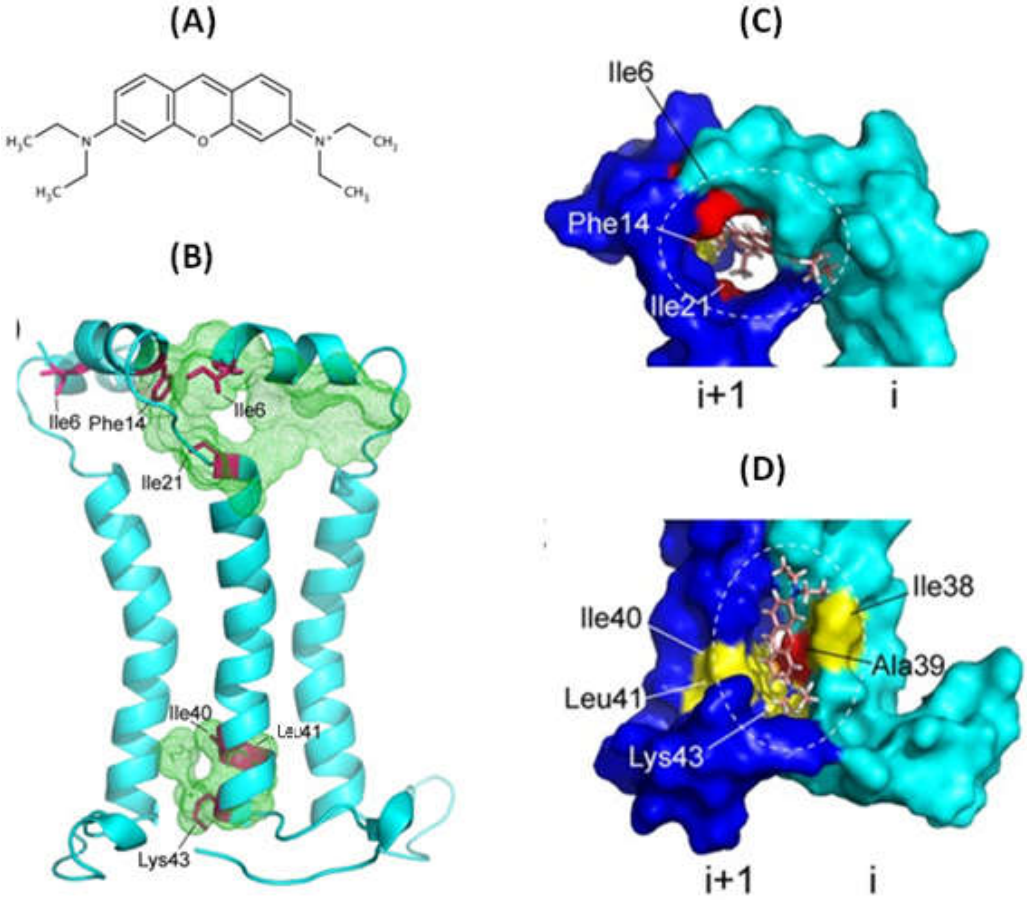
Estudos realizados pelo nosso grupo apresentaram um modelo com a arquitetura do pentâmero em forma de funil, com a região voltada para o citoplasma (N-terminal) mais aberta em relação à região direcionada ao lúmen (C-terminal)(ARAUJO et al., 2016) como foi revelado por Gan e colaboradores (GAN et al., 2012). A mesma forma funil também ocorre com a proteína M2 do influenza vírus (MIAO et al., 2015), proteína E SARS (PERVUSHIN et al., 2009) e proteína p7 do HCV (OUYANG et al., 2013). Neste mesmo estudo, o monômero por si só apresentou-se estável em bicamadas de POPC e a estrutura pentamérica, quando inserida no mesmo ambiente, aumentava o parâmetro de ordem dos lipídeos e diminuía sua área por lipídio de 61,7 $Å^2$ para 48,8 $Å^2$, indicando que sua presença na bicamada lipídica contribui para um aumento da ordem das cadeias dos fosfolipídeos. Durante toda a simulação, a estrutura pentamérica apresentou a região TM estável composta por alfa-hélices e com o resíduo H22 voltado para a região inter-helical, assim como estudos computacionais e experimentais realizados anteriormente (GAN et al., 2008, 2012). No mesmo estudo, análises de modos normais sugeriram um mecanismo de abertura e fechamento de canal, mecanismo este ainda não verificado em outras viroporinas (ARAUJO et al., 2016).

1.4.3 Proteína SH como alvo de inibição da infecção viral

Na busca de inibidores da proteína SH, pironina B foi o primeiro e o único composto testado com a proteína SH pura, reconstituída em bicamadas lipídicas planares, que mostrou inibição da atividade de canal da proteína (LI et al., 2014). Neste estudo, a concentração de 10 uM de pironina B levou a uma inibição de 60% da atividade de

canal com uma constante de afinidade de 6,8 uM. Espectros ^{1}H-^{15}N TROSY-HSQC foram utilizados para monitorar o sítio de ligação do composto e mostraram que os resíduos mais afetados pela interação eram os resíduos I6, I21 no N-terminal, A39 no C-terminal, e os resíduos I38, I40, L41 e K43. *Docking* molecular indicou dois possíveis sítios de interação da pironina B com a proteína SH: i) um na região N-terminal com F14 e I21 do monômero (i+1) com I6 do monômero anterior; e ii) na região C-terminal com os resíduos I40, L41 e K43 no monômero i+1 com os resíduos I38 e A39 do monômero anterior (Figura 4 B, C e D).

Figura 4: Sítios de interação da pironina B com a proteína SH do HRSV. **(A)** Estrutura da pironina B. **(B)** Regiões dos possíveis sítios de interação na proteína SH: N- e C-terminal com a pironina B. **(C)** Na região N-terminal destaca-se os aminoácidos F14 e I21 do monômero (i+1) com I6 do monômero anterior (i). **(D)** Na região C-terminal com os resíduos I40, L41 e K43 no monômero i+1 com os resíduos I38 e A39 do monômero anterior (i). Figura adaptada de LI et al., 2014.



Para especificar o sítio de interação e o efeito da molécula, o domínio transmembrânico da proteína SH (SH-TM) (região entre os aminoácidos 18-43) e mutantes do comprimento total da proteína nos dois sítios propostos (A39S, I21F, I21Y e H22F) foram testados. Tanto a forma truncada como os mutantes foram capazes de formarem pentâmeros. O efeito da pironina B na SH-TM foi similar ao comprimento total, sendo 40% de inibição da atividade de canal para a SH-TM e 60% para a SH completa, sugerindo que a presença do C-terminal do domínio TM (região que compreende os aminoácidos das posições 38-41) é suficiente para inibir a atividade de canal. No entanto, a mutação A39S diminuiu para 10% a taxa de inibição da atividade. Mutações no N-terminal do domínio TM (I21F, I21Y e H22F)

também apresentaram diminuição da atividade inibitória do composto (20%), mostrando que o mecanismo inibitório da atividade de canal pela pironina B pode ser do tipo alostérico, ou seja, as mutações no N-terminal pode desestabilizar o sítio de interação na região C-terminal (LI et al., 2014).

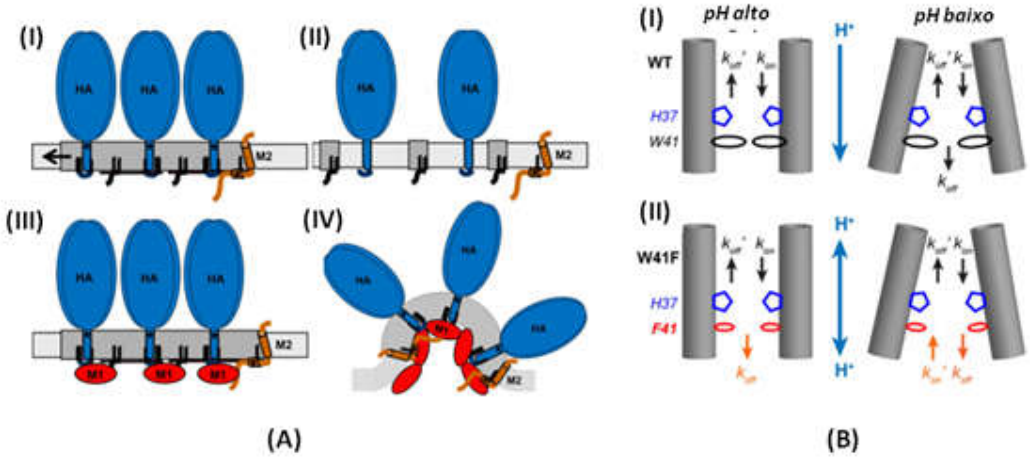
1.5 Proteína M2

A proteína M2 do vírus Influenza é uma das viroporinas mais estudas juntamente com a Vpu do HIV e p7 do HCV. Esta proteína é composta por 97 aminoácidos e é funcionalmente ativa na forma tetramérica.

1.5.1 Estrutura e função

As principais funções atribuídas à proteína M2 estão associadas à localização da sequência de seus aminoácidos. O domínio N-terminal (1-22) está relacionado ao brotamento viral, mas seu papel específico ainda é desconhecido (PARK et al., 1998). A região transmembrânica (23-43) é o componente vital para a condutância de prótons. O domínio C-terminal (47-62) forma uma hélice anfipática (NGUYEN et al., 2008; SCHNELL; CHOU, 2008; TIAN et al., 2003) a qual está associada à estabilização do domínio de condutância iônica (BETAKOVA; HAY, 2009). Estudos indicam ainda que esta região desempenha um papel no transporte e localização da proteína M2 na membrana por meio de interações com as cabeças dos fosfolipídeos e com a proteína de matriz M1 (vide Figura 5 A) (SCHRODER; TSCHOPP, 2010).

Figura 5: (A) Ilustração do mecanismo de interação da proteína M2 com fosfolipídios e a proteína de matriz M1 para auxílio do mecanismo de monstagem viral e recrutamento de proteínas e RNA virais. (B) Ilustração do papel do resíduo de W15 na atividade de canal da proteína M2 auxiliando na direção do transporte iônico.



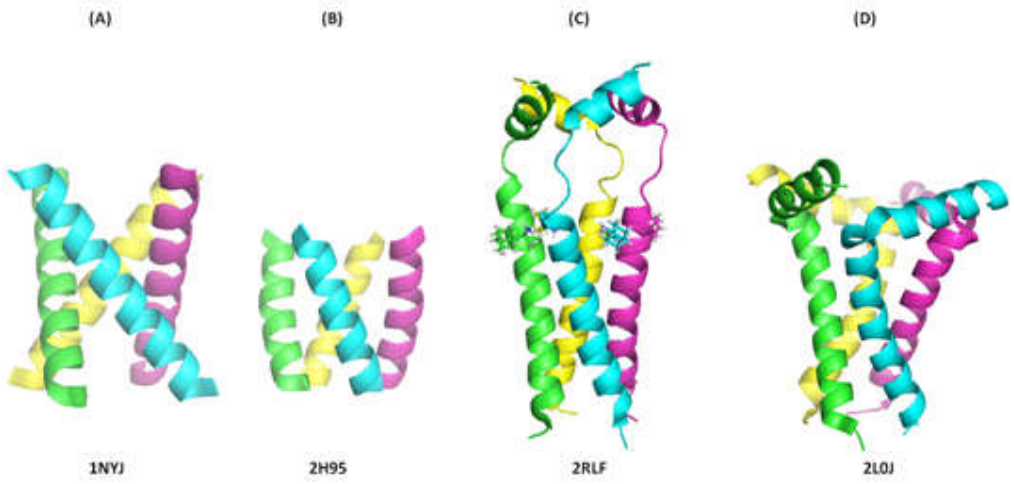
Fonte: Figura adaptada de CHEN et al., 2008; MANDALA et al., 2017.

Como vimos anteriormente, a proteína M2 pertence à classe AI das viroporinas, com seu domínio C-terminal localizado na região citoplasmática. Ela se liga à proteína de matriz (M1) para ajudar na montagem viral por meio do recrutamento das proteínas virais e RNA em direção à membrana plasmática (CHEN et al., 2008) (Figura 5 A).

A proteína M2 é umas das viroporinas com estrutura mais estudada recentemente. No PDB há mais de dez estruturas depositadas usando diferentes métodos: cristalografia de raios-X, RMN de solução, e RMN de estado sólido (HU et al., 2007; SCHNELL; CHOU, 2008; SHARMA et al., 2010; WANG et al., 2001). A primeira estrutura da proteína M2 foi publicada em 2002 (PDB: 1NYJ) (Figura 6 A). A estrutura do domínio transmembrânico (resíduos 23-43) em bicamadas de DMPC, pH 7, foi obtida por RMN de estado sólido. A segunda estrutura publicada em 2007 (PDB: 2H95) (Figura 6 B) envolve a região M2-TMD (23-43) em lipossomos de DMPC/DMPG com amantadina bloqueando o poro em pH 8,8 (HU et al., 2007). Nesta estrutura, o tetrâmero apresenta-se simétrico com alfa-hélice presente nos resíduos 26-34 com uma inclinação de 31° em relação à normal da bicamada, e os resíduos 36-43 são inclinados de 20°, com uma torção no resíduo G34. Em 2008, a estrutura da proteína M2 (18-60) em micelas de DHPC, pH 7,5, com amantadina (PDB: 2RLF) foi caracterizada utilizando RMN de solução (Figura 6 C) (SCHNELL; CHOU, 2008). Nesta estrutura, a amantadina se liga à interface proteína-lipídio, em uma razão de 4 moléculas de amantadina por tetrâmero, interagindo com os

resíduos D44 e R45 e também com a cadeia lateral do W41. Resultado este que difere de estudos prévios que diziam que este mesmo composto interagia com a região entre os resíduos V27 e H37 (WANG et al., 2001). Esta diferença nos resultados foi creditada ao fato da proteína estar em solução composta por detergente e este influenciava tanto na estrutura da proteína quanto na ligação do composto com a mesma. Em 2010, a estrutura do domínio de condutância da proteína M2 (M2-CD) (resíduos 22-62) em bicamadas de DOPC/DOPE, pH 7,5, foi obtida por RMN do estado sólido (PDB:2L0J) (Figura 6 D) (SHARMA et al., 2010). Nesta estrutura, as características do TM da proteína M2 são bem similares à estrutura 1NYJ (Figura 6 A), com uma torção observada próxima ao resíduo G34 com inclinações de 32° para o C-terminal da alfa-hélice e 22° para o N-terminal. Outro fator importante desta estrutura é o modelo para condutância de prótons: a quebra e reformulação de uma ligação de hidrogênio entre os dímeros envolvendo os resíduos H37 de cada monômero (SHARMA et al., 2010).

Figura 6: Estruturas resolvidas da proteína M2 do IAV retiradas da banco de dados PDB, com os respectivos códigos de identificação.



1.5.2 Proteína M2 como alvo de inibição da infecção viral

Devido às variadas funções durante o ciclo viral, a proteína M2 é considerada um importante alvo no bloqueio da infecção pelo vírus Influenza. Amantadina e rimantadina foram dois fármacos muito utilizados no bloqueio da condutância de prótons. O sítio de ligação dessas duas moléculas à proteína M2 está localizado na

região entre os aminoácidos V27 e H37 (STOUFFER et al., 2008). No entanto, ao longo do tempo o vírus desenvolveu resistências a estas moléculas aumentando o diâmetro do canal e a sua hidrofobicidade por meio de mutações nas regiões que revestem o interior do poro (L26, V27, A30, S31 e G34). As mutações mais comuns encontradas são S31N, V27A e L26F. Além da resistência desenvolvida pela proteína M2, amantadina e rimantadina possuem vários efeitos adversos sendo o mais comum o de afetar o sistema nervoso central causando dificuldade de concentração, nervosismo, tonturas, ataxia, depressão, sonolência e dor de cabeça (ALVES GALVÃO et al., 2014).

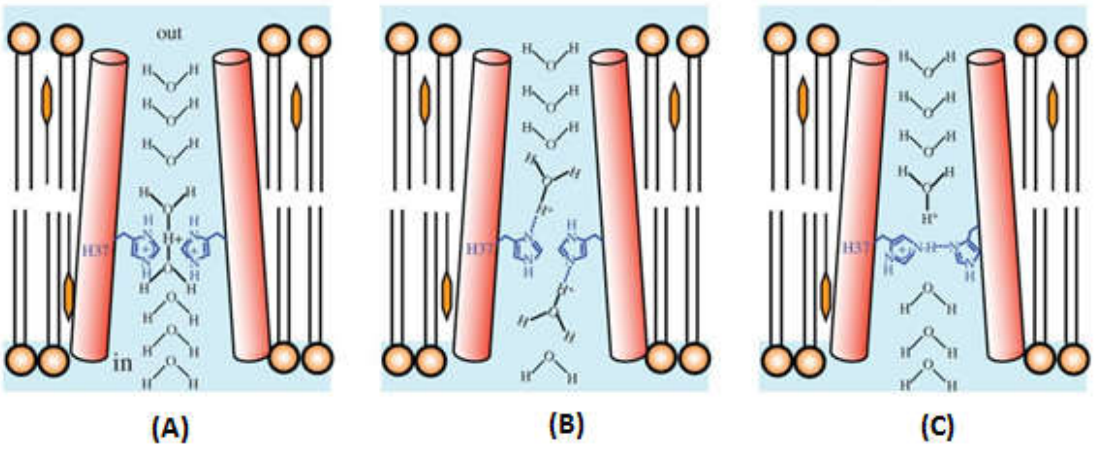
Segundo o Centro para Controle e Prevenção de Doenças (do inglês *Centers for Disease Control and Prevention – CDC*), as vacinas contra vírus Influenza são eficazes, mas se tornam não suficientes, uma vez que sua renovação tem que ser constante (o ideal seria a cada seis meses) devido à alta taxa de mutações que este vírus possui, comprometendo a reposta imune do hospedeiro. Desta forma, a busca de novos alvos está sendo realizada nos estudos de derivados de adamantina. No entanto, compreender os detalhes da característica estrutural da proteína M2 e a relação da sua estrutura com o mecanismo funcional do canal são de extrema importância.

1.5.3 Mecanismo de condutância e o papel de "*gate*" do Trp41

A função de condução de prótons da proteína M2 está localizada na sua região transmembrânica (resíduos 22-46) e possui como resíduo chave o resíduo H37 (SHARMA et al., 2010).

Três modelos são propostos para a condução de prótons: o modelo "*water wire"* ou "*shutter*" (traduziremos como modelo fio de água ou modelo persiana), o modelo "*shuttle*" (como modelo transportador) e o modelo "*dimer*" (traduziremos como modelo de dímeros) (Figura 7).

Figura 7: O resíduo principal H37 é mostrados em forma bastão. Ilustração dos três modelos de condução de prótons. Para maior clareza, apenas duas das quatro hélices são mostradas. (A) O modelo de fio de água postula que os prótons são conduzidos exclusivamente por moléculas de água sem envolvimento de H37, cuja única função é abrir a constrição dos poros nesta junção. Um cátion Zundel (H_5O_2+) é descrito aqui como um exemplo de uma possível espécie condutora. (B) O modelo de transporte postula que os prótons se ligam e desprendem da H37 e que as mudanças conformacionais de H37 são necessárias para regenerar o estado inicial para o próximo relé de prótons, sendo este o passo limitante de velocidade da condução de prótons (1 H^+/ms). (C) O modelo de dímero ligado por uma ligação de hidrogênio postula que uma H37 neutra forma uma "curta" ligação de hidrogênio com outra H37 catiônica a pH intermediário. A quebra desta ligação de hidrogênio por um íon hidrônio causa uma interação H37-W41 e posterior transferência de prótons para o interior do vírus.



Fonte: Figura adaptada de DECOURSEY; HOSLER, 2014.

No modelo "*shutter*" (Figura 7 A), o poro na região no resíduo H37 é aumentado pela repulsão eletrostática entre os grupos imidazólicos das hisitidinas, permitindo uma corrente contínua de água sobre a qual prótons "saltam" por meio do mecanismo *Grotthuss*. Neste mesmo modelo, interações cátion-π entre os resíduos W41 e H37 foram observadas. Desta forma, para o modelo "*shutter*", acredita-se que o estado protonado das histidinas para carga +3 (pH ~ 5,5) e a interação cátion-π sejam os principais fatores para ativação do canal iônico (CHEN et al., 2007; OKADA et al., 2001).

No modelo "*shuttle*" (Figura 7 B), a H37 participa ativamente no lançamento de prótons por meio da sua protonação e desprotonação. Tautomerização ou "flips" do anel restabelecem a conformação original necessária para o próximo lançamento de próton (PINTO et al., 1997). O passo de limitação deste modelo é a mudança de conformação da H37.

Um terceiro modelo, o modelo de dímero ligado (Figura 7 C), apresenta uma "curta" ligação de hidrogênio entre o grupo imidazol ($C_3N_2H_4$) de uma H37 com o imidazólio

($C_3N_2H_5$) de outra. A quebra desta ligação de hidrogênio por um íon hidrônio causa uma interação H37-W41 e posterior transferência de prótons para o interior do vírus (MIAO et al., 2015).

Embora existem várias hipóteses sobre o modelo de condutância de prótons, ainda não há clareza nas mudanças conformacionais que ocorrem tanto no domínio transmembrânico como na região da hélice anfipática.

Outro resíduo importante nessa atividade de canal é o W41. Ele é responsável por direcionar a condução de prótons do N-terminal para o C-terminal atuando como um portão ("*gate*") (Figura 5 B). Estudos sugerem que esta função se deve à inibição da protonação da H37 a partir do C-terminal, impedindo então a condução nesta direção. Já na ausência do indol do W41, a H37 pode ser protonada em ambas as direções, não havendo direção específica na condução de próton (Figura 5 B) (MANDALA et al., 2017).

O mecanismo de portão do W41, ainda não caracterizado, é possivelmente o responsável por determinar a taxa de condução de ~ $1H^+$/ms. Estudos recentes de ressonância magnética do estado sólido (ssRMN), realizados pelo grupo liderado pelo Dr. Timothy A. Cross, mostraram que as cadeias laterais do W41 possuem amplitude de movimento bastante restritas para o domínio de condutância da proteína M2 (M2-CD) (resíduos 22-62) (trabalho ainda não publicado). No entanto, detalhes do mecanismo de portão do W41 dependente do pH ainda não foram esclarecidos para a proteína completa.

1.6 Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo utilizar técnicas computacionais (simulção de dinâmica molecular e modelagem molecular) e experimentais (expressão, purifcação e ressonância magnética nuclear de estado sólido) para avaliar a estutura e os mecanismo de "*gate*" de duas viroporinas provenientes de dois vírus altamente ativos em infecções respiratórias no Brasil e no mundo: a SH, viroporina codificada pelo HRSV, e a M2, viroporina codificada pelo vírus Influenza A. As análises estruturais e do mecanismo de "gate", que controla a principal atividade dessas proteínas (a atividade de canal) têm por objetivo buscar uma melhor compreensção estrutural e funcional dessas proteínas. Pretende-se ainda buscar novos e mais

específicos inibidores de infecções causadas pelo HRSV e pelo vírus da Inlfuenza, visando elucidar os mecanismos virais e do próprio hospedeiro.

CAPÍTULO 2

TÉCNICAS E METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA ESTUDO DAS ESTRUTURAS E FUNÇÕES DAS VIROPORINAS SH DO HRSV E M2 DO IAV

2. Introdução

Para investigação das características estruturais e funcionais das viroporinas SH do HRSV e M2 do IAV (inserção e interação com membranas lipídicas, estrutura pentamérica, atividade de canal, mudança conformacional de aminoácidos chaves, mecanismo de "*portão"* do canal) é possível utilizar metodologias distintas. Atualmente, um rápido progresso é observado na obtenção de estruturas de proteínas de membrana quando comparamos a quantidade de estruturas há 30 anos atrás. Em 2012, 379 estruturas de proteínas de membranas eram encontradas no PDB. Hoje, de 133589 estruturas, 1438 são de proteínas de membranas (PDB).

Embora um avanço experimental nos estudos de proteínas de membranas é observado, três principais obstáculos ainda são encontrados: I) dificuldade de produzir proteína suficiente para amostra, uma vez que proteínas de membrana funcionais se mostram tóxicas na presença de membranas de *E. coli* (principal sistema de expressão utilizado no estudo de proteínas); II) dificuldade em encontrar detergentes apropriados para solubilização dessas proteínas, uma vez que quantidade pequenas podem não ser suficientes para a extração da proteínas da membrana e quantidade elevadas podem comprometer sua estrutura e funcionalidade; e III) dificuldades no uso das técnicas de cristalografia de raio-X e RMN, as duas técnicas mais utilizadas na resolução de estruturas de proteínas.

Para a cristalografia de raio-X, o desafio é cristalizar a proteína em seu ambiente nativo. Além disso, para os processos de cristalização, há a necessidade frequente do uso de detergentes e solventes orgânicos (CAFFREY, 2003; IWATA, 2003). Quando a técnica adotada é a RMN em solução, proteína em micelas é geralmente o sistema utilizado. No entanto, micelas não são bons miméticos de membrana e sua curvatura esférica pode distorcer a estrutura das proteínas (VOLD et al., 1997).

Outros miméticos de membranas utilizados são os lipossomos que funcionam melhores que micelas, uma vez que são capazes de formar bicamadas mais planas (SANDERS; LANDIS, 1995). Uma nova técnica é a utilização de nanodiscos que são ambientes miméticos de membrana formados por uma pequena porção de lipídeos montados com a proteína da membrana alvo, cercada por uma proteína helicoidal anfipática, denominada proteína de andaime de membrana (do inglês *membrane scallfold protein* - MSP). Como os nanodiscos são de tamanho uniforme e sofrem movimento isotrópico na escala de tempo de RMN, eles foram aplicados no estudo de RMN de solução de proteínas de membrana (GLÜCK et al., 2009; LYUKMANOVA et al., 2008). No entanto, ainda não há protocolos estabelecidos para o uso do sistema nanodisco para resolver estruturas de proteínas de membrana. Em vistas das dificuldades enfrentadas, tanto para a cristalografia quando para a RMN em solução, um terceira técnica ganhou bastante atenção no estudo de estrutura de proteínas de membrana, a RMN de estado sólido. Sua principal vantagem é a reconstrução da proteína de membrana em bicamadas lipídicas miméticas de membrana e sem a presença de detergentes. Duas técnicas de RMN de estado sólido são utilizadas no estudo de estrutura de proteínas de membrana: a amostra orientada (do inglês *Oriented Sample* - OS) e a rotação em torno do ângulo mágico (do inglês *Magic Angle spinning* – MAS). A primeira gera restrições orientacionais de alta resolução, como o ângulo de inclinação entre o eixo helicoidal e a normal da bicamada, e os ângulos de rotação que são os ângulos entre um aminoácido fixo e o resto dos aminoácidos, mas não pode determinar a embalagem relativa na estrutura terciária ou quaternária e os processos de preparação de amostras mecanicamente orientadas não são muitas vezes reproduzíveis. Já a técnica de MAS compensa as restrições da técnica de amostra orientada fornecendo informação estrutural secundária - ângulos de torção, estruturas terciárias e quaternária e até mesmo distâncias.

Juntamente com o avanço das técnicas experimentais, verifica-se que a crescente disponibilidade de estruturas de proteínas de membrana, a opção de modelos mais simplificados para estudos de sistemas com grande número de moléculas, bem como a existência de abordagens que mimetizam o ambiente dessas proteínas e o baixo custo quando comparamos aos estudos experimentais, contribuem para o avanço das metodologias computacionais relacionados a esta classe de proteínas.

No presente estudo, a proteína SH completa (SH-FL) e seu peptídeo transmembrânico (SH-TM) são analisados por dinâmica molecular com modelo simplificado (Coarse-Grained, campo de força MARTINI) e atomístico (campo de força GROMOS 53A6). O modelo simplificado é usado na análise estrutural da proteína SH em diferentes composições de bicamadas lipídicas. Dinâmica molecular atomística é utilizada na análise da estrutura e atividade de canal da proteína SH em diferentes composições lipídicas, na presença e ausência de diferença de voltagem, e em diferentes estados de protonação dos resíduos de histidinas (H22 e H51).

Técnicas experimentais também foram utilizadas no estudo do mecanismo de portão do triptofano da proteína M2 do influenza vírus, uma viroporina bastante estudada e base para o desenvolvimento de metodologias e protocolos no estudo de proteínas de membrana. A principal técnica utilizada foi a rotação em torno do ângulo mágico, onde a expressão, a purificação e a preparação de amostras para MAS foram as técnicas e metodologias adotadas.

As próximas seções são referentes às metodologias e técnicas utilizadas no estudos das viroporinas SH do HRVS e M2 do vírus Influenza.

2.1 Dinâmica Molecular

A dinâmica molecular (DM) consiste na produção de trajetórias para um determinado número de partículas a partir da integração numérica das equações clássicas de movimento. Atualmente, os avanços significativos na acurácia das descrições dos sistemas, bem como no poder computacional, concederam às simulações computacionais de DM um importante papel como experimento computacional. Esta metodologia é capaz de predizer o comportamento de sistemas moleculares de interesse, bem como fornecer informações dinâmicas a nível molecular e atômico muitas vezes não alcançados experimentalmente, seja por poder de resolução, seja por condições experimentais de difícil controle (FRENKEL; SMIT, 2001).

2.1.1 A Mecânica estatística e a Dinâmica Molecular

Sistemas clássicos são descritos pela função de coordenadas, **r**, e momento, **p**, chamada Hamiltoniana clássica, ***H***. Desta forma, a energia potencial do sistema é independente do tempo e da velocidade, e a Hamiltoniana é igual a energia total,

$$\boldsymbol{H} = H(\boldsymbol{r},\boldsymbol{p}) = K(\boldsymbol{p}) + U(\boldsymbol{r}) = \sum_i \frac{p_i}{2m_i} + U(\boldsymbol{r}) \qquad (1)$$

nnde $K(\boldsymbol{p})$ é a energia cinética, $U(\boldsymbol{r})$ a energia potencial, p_i e m_i, o momento e a massa da partícula i, respectivamente. O estado microscópio de um sistema é caracterizado por um conjunto de valores $\{\boldsymbol{r},\boldsymbol{p}\}$, que corresponde a um ponto no espaço definido pela coordenada $\boldsymbol{r}$ e momento $\boldsymbol{p}$, conhecido como espaço de fase (BECKER et al., 2001).

Para obter médias termodinâmicas para um ensemble canônico (N,V,T), é necessário conhecer a probabilidade de encontrar um sistema em cada ponto (estado) no espaço de fase. Esta distribuição de probabilidade, $\rho(\boldsymbol{r},\boldsymbol{p})$, é dada pela função de distribuição de Boltzman,

$$\rho(\boldsymbol{r},\boldsymbol{p}) = \frac{\exp\left[-H(\boldsymbol{r},\boldsymbol{p})/k_B T\right]}{Z} \qquad (2)$$

onde Z é a função de partição canônica e k_B a constante de Boltzmann. Uma vez conhecida a função de distribuição de Boltzmann, pode-se utilizá-la para calcular médias do espaço de fase de qualquer variável dinâmica ($A(\boldsymbol{r},\boldsymbol{p})$) de interesse como posição, energia total, energia cinética, flutuações, e qualquer outra que seja função de $\boldsymbol{r}$ e/ou $\boldsymbol{p}$:

$$\langle A(\boldsymbol{r},\boldsymbol{p})\rangle_Z = \int_V d\boldsymbol{r} \int_{-\infty}^{+\infty} d\boldsymbol{p}\, \rho(\boldsymbol{r},\boldsymbol{p}) A(\boldsymbol{r},\boldsymbol{p}) \qquad (3)$$

Essas médias são chamadas médias termodinâmicas. No entanto, para o cálculo dessas médias é necessário conhecer a função de distribuição de Boltzmann para cada estado o que torna o cálculo custoso computacionalmente (BECKER et al., 2001).

Uma alternativa para o cálculo dessas médias é seguir o movimento de um único estado através do espaço de fase em função do tempo e calcular as médias apenas

sobre este estado. Médias calculadas dessa forma são chamadas médias dinâmicas e o movimento desse único estado através do espaço de fase é obtido integrando as equações de movimento do sistema. Assim, as médias dinâmicas de qualquer variável dinâmica $A(\boldsymbol{r},\boldsymbol{p})$ podem ser calculadas ao longo de sua trajetória da seguinte forma:

$$\langle A(\boldsymbol{r},\boldsymbol{p})\rangle_\tau = \frac{1}{\tau}\int_0^\tau A\big(\boldsymbol{r}(t),\boldsymbol{p}(t)\big)dt \tag{4}$$

onde τ é o tempo de simulação.

Desta forma, dizemos que a média termodinâmica é a média de todos os pontos no espaço de fase em um único tempo, e a média dinâmica é a média sobre um único ponto no espaço de fase sobre todo o tempo. É esperado que o estado que está sendo dinamicamente seguido cubra todo o espaço de fase e que a média dinâmica convirja para a desejada média termodinâmica. Assim, para uma trajetória infinitamente longa, a média termodinâmica e a média dinâmica se tornam equivalentes,

$$\lim_{\tau\to\infty}\langle A(\boldsymbol{r}.\boldsymbol{p})\rangle_\tau = \langle A(\boldsymbol{r},\boldsymbol{p})\rangle_Z \tag{5}$$

Um sistema que obedece estas duas condições é teoricamente justificável para o uso de simulações de dinâmica molecular como meio de cálculo de médias termodinâmicas de um sistema molecular (BECKER et al., 2001).

2.1.2 Função de energia potencial para tratamento de moléculas biológicas

A função de energia potencial é uma equação matemática que permite que a energia potencial (*U*) de um sistema seja calculada em função das coordenadas (***r***) da sua estrutura tridimensional (PDB) (BECKER et al., 2001). A equação inclui termos que descrevem várias interações físicas que ditam estruturas e propriedades de um sistema. A energia potencial total de um sistema com uma estrutura 3D definida, $U(\mathbf{r})_{total}$, pode ser separada entre os termos de energia potencial interna, $U(\boldsymbol{r})_i$, e o de energia potencial externa, $U(\boldsymbol{r})_e$, como descrito nas equações abaixo:

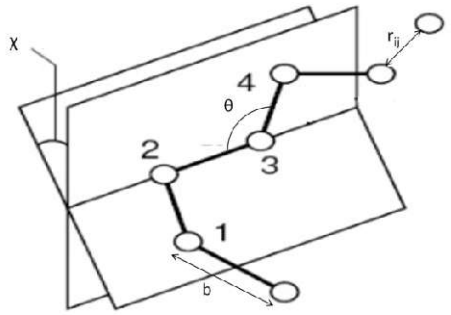
$$U(\boldsymbol{r})_{total} = U(\boldsymbol{r})_i + U(\boldsymbol{r})_e \tag{6}$$

$$U(\boldsymbol{r})_i = \sum_{ligações} U_{ligações} + \sum_{ângulos} U_{ângulos} + \sum_{diedros} U_{diedrs} \quad (7)$$

$$U(\boldsymbol{r})_e = \sum_{\substack{pares\ de\ átomos \\ não\ ligados}} \left(U_{não-ligado}\right) \quad (8)$$

0s termos internos estão associados aos átomos ligados covalentemente, enquanto que os externos representam interações não-ligadas e não-covalentes.

Figura 8: Representação dos termos obtidos da estrutura 3D: $\boldsymbol{b}$ – comprimento de ligação; $\boldsymbol{\theta}$ - ângulos de valência; $\boldsymbol{\chi}$ - diedros e ângulos de torção; $\boldsymbol{r_{ij}}$ - distância entre os átomos.



Fonte: Figura adaptada de BECKER et al., 2001.

2.1.3 Campo de Força

As equações 6-8 representam a função energia potencial que é comumente utilizada em sistemas biológicos. No entanto, a acurácia do tratamento está nos parâmetros utilizados nestas funções. A combinação desta função energia potencial com os parâmetros é chamada de campo de força (BECKER et al., 2001).

Atualmente, há uma grande quantidade de campos de força desenvolvidos e que são utilizados nos estudos de sistemas biológicos, cada qual disponível para diferentes tipos de sistemas químicos bem como tendo diferenças no seu desenvolvimento e otimização.

No presente trabalho, o campo de força utilizado para o estudo dos sistemas proteína-membrana foi o GROMOS96 com parametrização 53A6 (OOSTENBRINK

et al., 2004a). Outro campo de força também utilizado neste estudo foi o campo de força simplificado, o MARTINI (MARRINK et al., 2007). Os dois campos de forças utilizados serão detalhados nas próximas seções.

2.1.4 GROMOS 53A6

O campo de força GROMOS baseia-se na simplificação “átomo unido” (do inglês *united atom)*, que não trata os hidrogênios ligados a átomos de carbono alifático de forma explícita, ou seja, o carbono e os hidrogênios que são ligados a ele são tratados como um único átomo, reduzindo desta forma os graus de liberdade que são explicitamente simulados (OOSTENBRINK et al., 2004a).

Neste campo de força, as interações ligadas ou internas (físicas) são dadas pela soma dos termos: comprimento de ligação, ângulo de ligação, ângulo diedro harmônico (impróprio) e ângulo diedro trigonométrico (torcional). Para as interações não ligadas ou externas (espaciais), os termos são: van der Waals (Lennard-Jones, LJ) e eletrostática (Coulomb com campo de reação) (OOSTENBRINK et al., 2004a).

$$U(\boldsymbol{r})_{total} = U(\boldsymbol{r})_{ligada} + U(\boldsymbol{r})_{\text{não}-ligada} \tag{9}$$

$$U^{ligadas}(\boldsymbol{r})_{total} = U(\boldsymbol{r})_{\text{ligação}} + U(\boldsymbol{r})_{\text{ângulo}} + U(\boldsymbol{r})_{diedro} + U(\boldsymbol{r})_{torcional} \tag{10}$$

$$U^{\text{não ligadas}}(\boldsymbol{r})_{total} = U(\boldsymbol{r})_{LJ} + U(\boldsymbol{r})_{eletrostática} \tag{11}$$

A função energia potencial do campo de força GROMOS e os parâmetros utilizados para o GROMOS 53A6 estão descritos abaixo e referenciados em OOSTENBRINK et al., 2004a e em OOSTENBRINK et al., 2004b.

As interações covalentemente ligadas do campo de força GROMOS, $U(\boldsymbol{r})_{\text{ligação}}$, é calculada pela soma de todas as N_b ligações e dependente dos parâmetros k_b e b_0.

$$U(r; k_b, b_0)_{\ ligação} = \sum_{n=1}^{N_b} \frac{1}{4} k_{bn}\left[b_n^2 - {b_0}_n^2\right]^2. \tag{12}$$

O comprimento de ligação entre os átomos *i* e *j* com posições $\boldsymbol{r_i}$ e $\boldsymbol{r_j}$ é dado por $b_n = r_{ij} = \sqrt{\boldsymbol{r_{ij}}.\boldsymbol{r_{ij}}}$, onde $\boldsymbol{r_{ij}} = \boldsymbol{r_i} - \boldsymbol{r_j}$. Os parâmetros k_b e b_0 são derivados de dados de experimentos de espectroscopia e difração de raios-X, respectivamente.

Para os ângulos de ligação, a energia potencial é calculada pela soma de todos os N_θ ângulos de ligações e dependentes de k_θ e θ_0

$$U(r; k_\theta, \theta_0)_{\,\hat{a}ngulo} = \sum_{n=1}^{N_\theta} \frac{1}{2} k_{\theta_n} \left[cos\theta_n - cos\theta_{0_n}\right]^2, \tag{13}$$

onde θ_n é o valor atual do enésimo ângulo definido pelos átomos i, j, k (exemplo na Figura 8 ilustrada pelos átomos 2, 3 e 4). Os parâmetros k_θ e θ_0 são derivados de dados de experimentos de espectroscopia e difração de raios-X, respectivamente.

As interações de ângulo diedro impróprio, também chamadas harmônicas, são usadas para manter um grupo de quatro átomos em uma configuração específica. Por exemplo, para manter quatro átomos em um plano ou manter uma configuração tetraédrica em torno de um átomo de carbono hibridizado, sp3, do qual apenas três átomos adjacentes ligados são tratados explicitamente. A energia potencial devido a essas interações é novamente calculada pela soma de todos os centros de interações de diedros N_χ, com os parâmetros k_χ e χ_0.

$$U(r; k_\chi, \chi_0)_{\,diedros} = \sum_{n=1}^{N_\chi} \frac{1}{2} k_{\chi_n} \left[\chi_n - \chi_{0_n}\right]^2, \tag{14}$$

onde χ_n representa o valor atual de um ângulo diedro definido pelos átomos *i*, *j*, *k* e *l* (exemplo ilustrado na Figura 8 pelos átomos 1, 2, 3 e 4). Este ângulo é calculado a partir da posição atômica, ***r***, com:

$$\chi_n = sinal(\chi_n) arccos\left(\frac{\boldsymbol{r_{mi}}.\boldsymbol{r_{qk}}}{r_{mi} r_{qk}}\right), \tag{15}$$

onde $\boldsymbol{r_{mi}} \equiv \boldsymbol{r_{ij}} \times \boldsymbol{r_{kj}}$ **e** $\boldsymbol{r_{qk}} \equiv \boldsymbol{r_{kj}} \times \boldsymbol{r_{kl}}$ com os índices m e q definidos pelo produto cruzado e o sinal do ângulo χ_n dado por $sinal(\chi_n) = sinal(\boldsymbol{r_{ij}}.\boldsymbol{r_{qk}})$. No campo de força GROMOS, para os parâmetros k_χ e χ_0 existem apenas três tipos: um tetraedro, e dois planares com diferentes constantes de força.

Ângulos torcionais são tratados usando funções trigonométricas. A energia potencial total das interações torcionais é calculada por meio da soma de todos os ângulos torcionais N_φ, usando os parâmetros k_φ, δ e m.

$$U(r; k_\varphi, \delta, m)_{torcional} = \sum_{n=1}^{N_\varphi} k_{\varphi_n}[1 + cos(\delta_n)\cos(m_n\varphi_n)], \quad (16)$$

onde δ_n é a fase, que é fixa para 0 ou π (isto é, $cos(\delta_n) = \pm 1$); m_n é a multiplicidade do ângulo torcional; φ_n é o valor atual do ângulo diedro definido pelos átomos *i*, *j*, *k* e *l* (exemplo ilustrado na Figura 8 pelos átomos 1, 2, 3 e 4). Os termos $\cos(m_n\varphi_n)$ são escritos explicitamente como polinômios de $\cos(\varphi_n)$ até multiplicidade de 6.

No campo de força GROMOS, as interações não ligadas são calculadas pela soma das interações dos pares de átomos não ligados. Desta forma, átomos vizinhos covalentemente ligados (primeiros vizinhos) e segundos vizinhos são excluídos desta soma. O terceiro ou o quarto vizinho ligado que faz parte de algum anel aromático também é excluído das interações não ligadas. As exceções são para os átomos de hidrogênio que possuem interações de van der Waals repulsivas iguais a zero. Estes quando distantes 4 ou 5 ligações de um átomo carregado com carga oposta são excluídos dos seus átomos pesados para evitar penalidades de ligações de hidrogênio.

Além disso, a soma de todos os pares é restrita a uma distância interatômica menor que o raio de corte. Para o campo de força GROMOS, três intervalos de distâncias são considerados. O primeiro se trata dos pares localizados em uma distância menor, definida como distância de curto alcance. Estes átomos são avaliados a cada passo da simulação, a partir dos "*pairlists*" que são normalmente construídos em cada passo de tempo. Em cada tempo, os "*pairlists*" são construídos e os átomos que estão separados entre o intervalo de curto alcance e de longo alcance são avaliados também. Uma contribuição de campo de reação devido aos meios iônicos e dielétricos homogênios pode ser avaliada como uma terceira contribuição eletrostática para distâncias maiores que a distância de longo alcance.

As interações de van der Waals de átomos não ligados são calculadas pela soma de todas as interações de pares de átomos não ligados usando a função de interação de Lenard Jones 12/6 com os parâmetros $C12$ e $C6$,

$$U(r; C12, C6)_{LJ} = \sum_{pares\ i,j} \left(\frac{C12_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C6_{ij}}{r_{ij}^{6}}\right), \quad (17)$$

Os parâmetros $C12_{ij}$ e $C6_{ij}$ dependem do tipo dos átomos envolvidos e do caráter da interação. A tabela 6 da referência OOSTENBRINK et al., 2004b contém os 53

tipos diferentes de átomos (não ligados) do campo de força GROMOS 53A6. A abordagem de átomo unido é escolhida para grupos de carbonos alifáticos, onde um único átomo representa tanto o carbono como os hidrogênios alifáticos ligados a ele. Os parâmetros $C12_{ij}$ e $C6_{ij}$ para o par atômico i e j são obtidos a partir dos parâmetros $C12_{ii}$, $C12_{jj}$ e $C6_{ii}$, $C6_{jj}$, definidos para cada tipo de átomo, usando a regra de combinação geométrica:

$$C12_{ij} = \sqrt{C12_{ii}.C12_{jj}} \quad , \quad C6_{ij} = \sqrt{C6_{ii}.C6_{jj}}. \tag{18}$$

Até três diferentes parâmetros $C12$ [$C12(I)$, $C12(II)$ e $C12(III)$] são definidos dependendo do tipo de interação que os átomos i e j estão envolvidos. Por padrão, $C12(I)$ é usado. No entanto, interações iônicas e polares geralmente requerem uma forte repulsão de van der Waals do que interações entre átomos neutros. $C12(II)$ é usualmente utilizado se os átomos i e j podem formar pares aceitador e receptor de ligações de hidrogênio. Para manter grupos iônicos com cargas contrárias em distâncias apropriadas, $C12(III)$ é utilizado para pares que envolvem grupos totalmente carregados. A tabela 7 da referência OOSTENBRINK et al., 2004b lista os parâmetros $C6$, $C12(I)$, $C12(II)$ e $C12(III)$ para os diferentes tipos de átomos não ligados do campo de força GROMOS 53A6. A escolha do parâmetro $C12$ é especificada na matriz mostrada na tabela 8 da mesma referência.

Em alguns casos, o campo de força GROMOS utiliza conjuntos diferentes de parâmetros de interações de van der Waals. Para o caso de os átomos i e j estarem conectados por três ligações covalentes, os parâmetros $C12$ e $C6$ utilizados são apresentados na tabela 9 da referência OOSTENBRINK et al., 2004b. No entanto, em alguns casos, a regra de combinação mostrada acima (equação 18) não é aplicada, e as interações entre os tipos de átomos são diretamente definidas pelo chamado pares de tipo de átomo misto. Estes casos estão apresentados na tabela 10 da referência OOSTENBRINK et al., 2004b.

As interações eletrostáticas entre pares consistem de três contribuições. A primeira, utiliza a interação de Coulomb (U^c) com o parâmetro *q* definido como o carga parcial q_i em cada átomo para todos os pares de interações,

$$U^C(r;q) = \sum_{pares\ i,j} \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_1}\frac{1}{r_{ij}} \ , \tag{19}$$

onde ε_0 é a permissividade dielétrica do vácuo e ε_1 é a permissividade relativa do meio no qual os átomos estão. Em adição às interações de Coulomb diretas, uma contribuição de reação de campo (U^{RF}) para as interações eletrostáticas podem ser calculadas, representando a interação entre o átomo *i* com o campo induzido de um meio dielétrico contínuo fora do raio de corte, R_{rf}, devido à presença do átomo *j*,

$$U^{RF}(\boldsymbol{r};q) = \sum_{pares\ i,j} \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_1} \frac{-\frac{1}{2}C_{rf}r_{ij}^2}{{R_{rf}}^3} \quad , \tag{20}$$

$$C_{rf} = \frac{(2\varepsilon_1 - 2\varepsilon_2)\left(1+\kappa R_{rf}\right) - \varepsilon_2\left(\kappa R_{rf}\right)^2}{(\varepsilon_1 + 2\varepsilon_2)\left(1+\kappa R_{rf}\right) + \varepsilon_2\left(\kappa R_{rf}\right)^2} \quad , \tag{21}$$

onde ε_2 e κ são a permissividade relativa e o comprimento de Debye do meio fora do raio de corte definido por R_{rf}, respectivamente.

Finalmente a terceira contribuição é, às vezes, referida como termo de campo de reação independente da distância. Ela é uma contribuição constante (independente da configuração) para energia para cada par tratado,

$$U^{RFe}(\boldsymbol{r};q) = \sum_{pares\ i,j} \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_1} \frac{-\left(1-\frac{1}{2}C_{rf}\right)}{R_{rf}} \, . \tag{22}$$

Como o termo é independente da distância interatômica r_{ij}, não há contribuição para as forças, mas assegura uma energia eletrostática zero para átomos que estão na distância de corte R_{rf}, reduzindo, assim, o ruído na energia. As cargas utilizadas pelo campo de força GROMOS 53A6 podem ser encontradas nas tabelas 11 à 15 na referência OOSTENBRINK et al., 2004b.

2.1.5 Tratamento do Potencial Eletrostático

Ao tratar a energia potencial de uma partícula *i*, é necessário somar a contribuição de todas as partículas do sistema que interagem com ela. No caso das interações ligadas, apenas partículas próximas são consideradas (distantes até duas ligações covalentes). Já no caso das interações não ligadas, a contribuição exercida por todas as partículas presentes no sistema é considerada. Como o potencial de Lennard-Jones tende a zero rapidamente à medida que a distância entre duas

partículas aumenta, pode-se aplicar um raio de corte neste tipo de interação: se a distância entre duas partículas for maior que o raio de corte (geralmente entre 10 Å e 15 Å), a interação entre elas não é considerada. Como a avaliação das forças é a etapa limitante em simulações de dinâmica molecular, a aplicação de um raio de corte torna a simulação mais rápida, pois diminui a quantidade de interações a serem calculadas. Entretanto, se tratarmos as interações eletrostáticas com o mesmo critério, introduziremos artefatos na trajetória, pois a função que descreve esta interação decai de forma mais lenta. A fim de evitar efeitos indesejados e manter a eficiência computacional, é comum decompor a energia potencial eletrostática (φ) em um componente de curto alcance (φ_{curto}) e um componente de longo alcance (φ_{longo}). Para calcular φ_{curto}, considera-se explicitamente a interação entre partículas próximas. No caso de φ_{longo}, uma das alternativas é o uso de somas de Ewald, como no método PME (*Particle Mesh Ewald*) (ESSMANN et al., 1995). Desta forma, podemos reescrever o termo eletrostático da energia potencial como:

$$U_{coulomb} = \sum_{i,j} \varphi_{curto}(r_i - r_j) + \sum_{k} \tilde{\varphi_{longo}} |\tilde{\rho}(k)|^2, \quad (23)$$

onde $\tilde{\varphi_{longo}}$ e $\tilde{\rho}(k)$ correspondem à inversa da transformada de Fourier para o potencial eletrostático e para a densidade de carga, respectivamente. Como as somas da componente de curto alcance e da componente de longo alcance convergem rapidamente nos seus respectivos espaços, a computação do potencial eletrostático torna-se mais rápida (ESSMANN et al., 1995; TOUKMAJI; BOARD, 1996).

2.1.6 *Coarse-Grained* – MARTINI

O campo de força MARTINI foi criado sob quatro aspectos: I) velocidade de cálculos através do uso de interações de curto alcance e grandes passos de integração; II) versatilidade por poder ser aplicado a qualquer molécula mantendo algum detalhe estrutural; III) aplicabilidade por ser um campo de forças simples, de fácil uso e poucos parâmetros; e IV) precisão semiquantitativa através da reprodução de resultados dinâmicos, estruturais e termodinâmicos de simulações atomísticas (MARRINK et al., 2007).

2.1.6.1 Mapeamento

As moléculas em MARTINI são mapeadas em uma proporção 4:1. Desta forma, quatro átomos pesados (hidrogênio não são contabilizados) são transformados em apenas uma partícula (do inglês *beats*). Para moléculas com anéis, como o benzeno ou a cadeia lateral do triptofano, usa-se uma resolução superior de 2:1 (MARRINK et al., 2007; MARRINK; TIELEMAN, 2013).

Cada partícula utilizada na resolução *coarse-grained* pode representar diferentes tipos de átomos. Partículas polares (*P*) que representam grupos neutros de átomos como etanol ou acetamina. Partículas apolares (*C*) que representam grupos de átomos hidrofóbicos, como butano ou clorofórmio. Partículas não polares (*N*) que representam grupos de átomos mistos, com proporções polares e apolares como o propanol ou 1-butanol. E partículas carregadas (*Q*) que representam grupos ionizados, como é o caso de grupos colina e fosfato (MARRINK et al., 2007).

Dentro dos quatro grupos, existe ainda os subgrupos que definem melhor a natureza química da partícula. Os subgrupos para os tipo *Q* e *N* são quatro (*da*, *d*, *a*, *0*) e relacionam sua capacidade de formar ligações de hidrogênio, sendo *0* quando não possui capacidade, *a* quando é aceitador, *d* quando é doador e *da* quando for aceitador e doador. Para os tipos *P* e *C* existem cincos subgrupos: 1, 2, 3, 4 e 5. Esses subgrupos especificam seu grau de polaridade sendo 1 baixa e 5 alta polaridade (MARRINK et al., 2007).

A molécula DMPC, representada na Figura 9, apresenta o grupo colina representado por uma partícula carregada positivamente do tipo Q_0 e o grupo fosfato por uma partícula carregada negativamente do tipo Q_a. Os dois grupos glicerol são representados por duas partículas N_a e os grupos alcanos por partículas *C1*, onde duas partículas correspondem a cinco carbonos e uma (a pontada cauda) a quatro.

Figura 9: Representação da molécula de DMPC , colesterol, hélice, água, benzeno e aminoácidos em representação atomística átomo unido (sem hidrogênios) e *coarse-grained*.

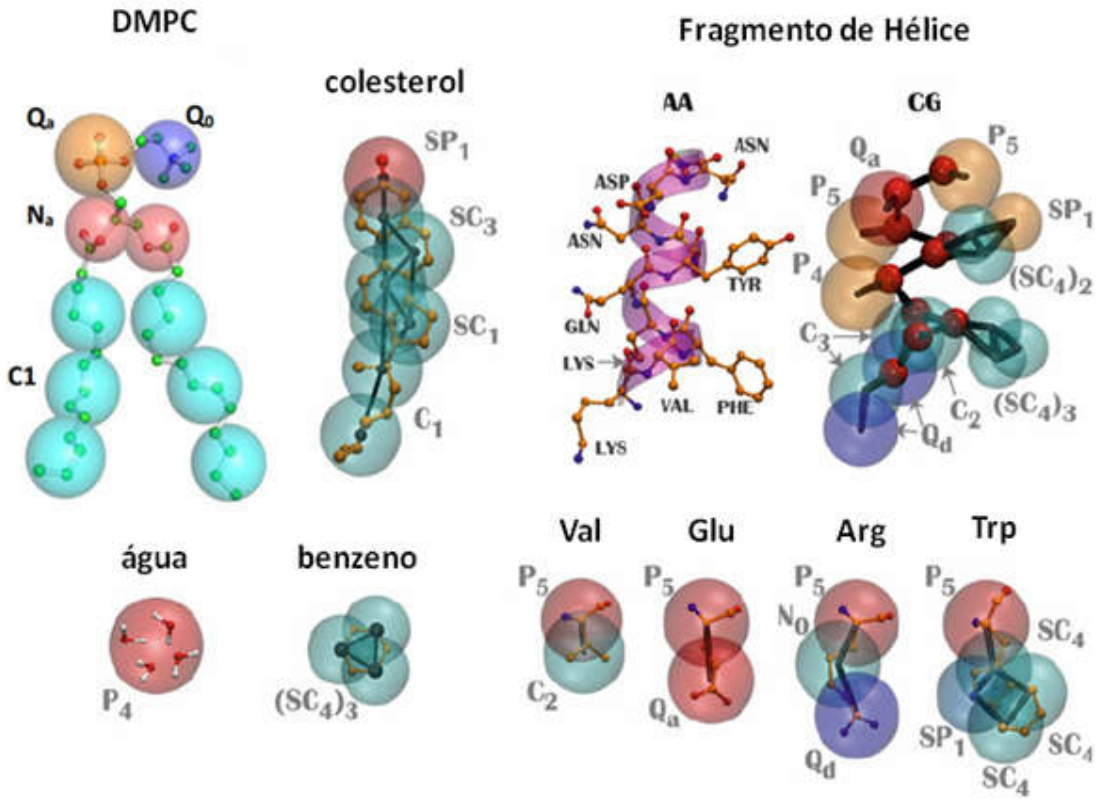


Figura adaptada de MONTICELLI et al., 2008.

2.1.6.2 Interações ligadas e não-ligadas

Todos os pares de partículas *i* e *j* a uma distância r_{ij} interagem via potencial de Lennard-Jones (LJ):

$$U^{LJ} = 4\varepsilon_{ij}\left(\left(\sigma/r_{ij}\right)^{12} - \left(\sigma/r_{ij}\right)^{6}\right). \quad (24)$$

O comprimento de interação, determinado pelo valor de ε_{ij}, depende do tipo do par de interação. Valores de ε_{ij} variam de 5,6 kJ/mol para interações entre grupos polares fortes e 2,0 kJ/mol para interações entre grupos polares e apolares, mimetizando efeito hidrofóbico (MONTICELLI et al., 2008).

Além disso, todas as partículas possuem tamanho efetivo (σ) de 0,47 nm, exceto paras as partículas que representam anéis, onde σ é igual a 0,43 nm, sendo

compensadas com um ε (termo LJ da função potencial) reduzido em 25%. Juntamente com as interações de LJ, grupos carregados (grupos Q) interagem via interações de Coulomb,

$$U^C(r;q) = \sum_{pares\ i,j} \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_{rel}} \frac{1}{r_{ij}}. \quad (25)$$

Para as interações ligadas o conjunto de funções energia potencial abaixo é utilizado:

$$U(r;k_b,b_0)_{\ ligação} = \sum_{n=1}^{N_b} \frac{1}{2} k_{bn}\left[d_n - d_{0_n}\right]^2. \quad (26)$$

$$U(r;k_a,b_0)_{\ angulo} = \sum_{n=1}^{N_b} \frac{1}{2} k_{an}[cos(\varphi_n) - cos(\varphi_{an})]^2. \quad (27)$$

$$U(r;k_d,\theta_{d0})_{\ diedro} = \sum_{n=1}^{N_b} k_{dn}[1 + cos(\theta_n - \theta_{0n})] \quad . \quad (28)$$

$$U(r;k_i,\theta_{i0})_{\ improprio} = \sum_{n=1}^{N_b} k_{in}[\theta_n - \theta_{0n})]^2. \quad (29)$$

Atuando entre os *n* pares de partículas *i, j, k* e *l* com distância de equilíbrio d_0, ângulo φ e ângulos diedros θ_{d0} e θ_{i0}. O potencial ligado é usado para partículas ligadas quimicamente e o potencial de ângulos para representar a rigidez das interações entre as partículas. O potencial de diedros próprios é introduzido apenas para manter a estrutura secundária da cadeia principal do peptídeo e o potencial de diedro impróprio é usado para prevenir distorções de grupos planares. Interações de LJ entre vizinhos próximos são excluídas (MONTICELLI et al., 2008).

2.1.6.3 Topologia básica para lipídeos e proteínas

O campo de força MARTINI foi originalmente desenvolvido para sistemas compostos por lipídeos. Para essas moléculas, muitos sistemas como micelas, monocamadas e bicamadas foram e ainda são cuidadosamente testados. Topologias disponíveis como PC (fosfatidilcolina), PE (fosfatidiletanolamina), PG (fosfatidilglicerol) e PS (fosfatidilserina) com cadeias como hexanoil, lauroil, palmitoil, oleoil, estearoil, linoleil

e araquidonoil reproduzem propriedades estruturais (área por lipídeo e espessura da bicamada), elásticas (rigidez de flexão e compressibilidade da área), termodinâmicas (temperatura de transição de fase e tensão de linha) e dinâmicas (difusão lipídica e taxa de permeação de água) (MARRINK et al., 2007; MARRINK; TIELEMAN, 2013).

Um exemplo de topologia para uma molécula de DMPC é mostrada na Figura 9. As cadeias hidrofóbicas consistem de partículas tipo *C1*, a porção de glicerol de partículas *Na* de polaridade intermediária, cabeças de grupos carregados negativamente, como o fosfato, por partículas *Qa* e grupos positivos, como o grupo colina, por partículas *Q0*. Dupla ligações na cadeia são efetivamente modeladas por grupos ligeiramente menos hidrofóbicos (*C2,C3*) juntamente com uma mudança no potencial angular que governa a rigidez e orientação da cadeia lipídica.

Para as proteínas, a versão 2.1 utilizou comparação entre coeficiente de partição em meios água/óleo para avaliar quais eram os melhores tipos e subtipos de partículas para diferentes cadeias laterais. Os diferentes aminoácidos estão representados na Figura 10 (MONTICELLI et al., 2008).

Nesta versão, as cadeias laterais dos aminoácidos apolares (Leu, Pro, Ile, Val, Cys e Met) estão representadas por partículas do tipo *C*, dos aminoácidos polares (Thr, Ser, Asn e Gln) por partículas do tipo *P* e para os aminoácidos carregados (Glu, Asp, Lys e Arg) as cadeias laterais são representadas por partículas *Q*. Aminoácidos com cadeias laterais em anel estão representadas por três (His, Phe e Tyr) ou quatro (Trp) partículas especiais, *SC* ou *SP* variando de 1 a 4 de acordo com a polaridade. Os aminoácidos menores, (Gly e Ala) não possuem cadeia lateral sendo representados apenas pela partícula da cadeia principal. Os aminoácidos estão representados na Figura 10 de acordo com o tipo de partícula (MONTICELLI et al., 2008).

Figura 10: Representação atomística (sem hidrogênios) e *Corase-Grained* (CG) do modelo de aminoácidos MARTINI, colorido pelo tipo de partícula.

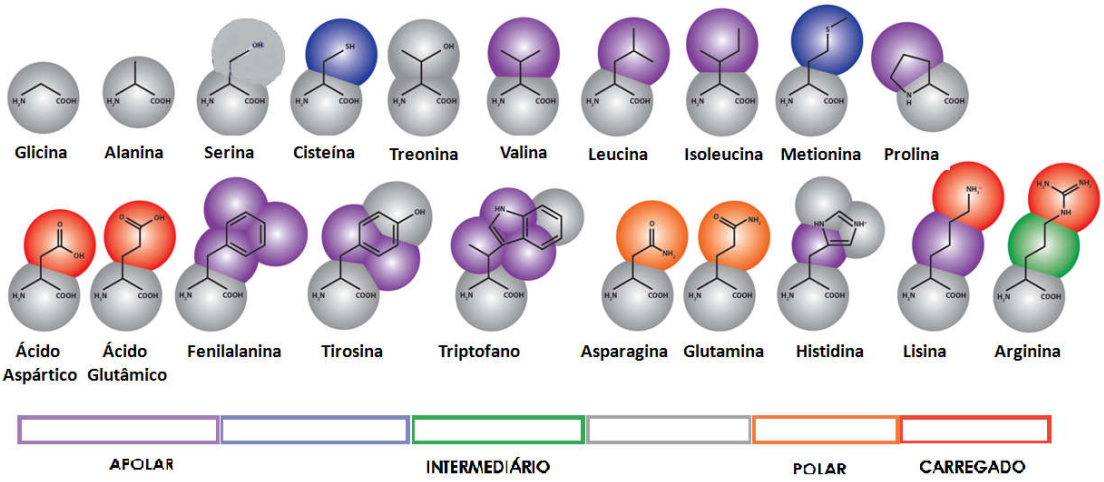


Figura Adaptada de BRADLEY; RADHAKRISHNAN, 2013.

Para as partículas da cadeia principal, a representação da partícula é baseada na estrutura secundária: *coil* ou volta para partícula do tipo *P5*, hélice por *N0* e folha-beta por *Nda*. Início e fim de hélice são representados por *Nd* e *Na*, respectivamente.

Por fim, as análises dos parâmetros para todas as estruturas secundárias e para todos os tipos de aminoácidos seguem que:

- Parâmetros da cadeia principal (ligações, ângulos e diedros) envolvem apenas partículas (*beats*) da cadeia principal, dependentes da estrutura secundária e independentes do tipo de aminoácidos;

- Se as ligações ocorrerem entre partículas com estruturas secundárias diferentes, os valores dos parâmetros serão iguais ao menor valor das duas estruturas secundárias. (EX: o ângulo entre duas partículas, uma em hélice e outra em *coil*, é escolhido pelos valores de ângulo e da constante de força da estrutura em *coil*).

- Os diedros são definidos somente quando quatro partículas seguidas possuírem estrutura em hélice ou folha-beta;

- Os parâmetros entre a cadeia principal e a cadeia lateral, ou entre cadeias laterais, são independentes da estrutura secundária, mas variam conforme os aminoácidos;

- Os ângulos entre duas partículas da cadeia principal e uma da cadeia lateral ou uma da cadeia principal e duas da cadeia lateral são independentes tanto da estrutura secundária quanto do aminoácido;

Para as moléculas de água, o conjunto de quatro moléculas atomísticas é representado por uma única partícula do tipo *P4* (Figura 9).

2.1.6.4 Massa das partículas e escala de tempo

Para maior eficiência computacional a massa de todas as partículas do campo de forças MARTINI é igual à massa de quatro águas (m = 72 amu), exceto para as partículas em anel que possuem massa reduzida (m = 45 amu). Desta forma, a dinâmica do sistema é afetada e passos de integração de 20-40 fs podem ser utilizados (MARRINK et al., 2010).

Além disso, devido a um menor número de graus de liberdade e ao tamanho das partículas, a interação entre elas são mais suaves. Com isso, há uma menor fricção efetiva e uma superfície de energia menos rugosa, aumentando em até 8 vezes a amostragem do espaço conformacional. Desta forma, a escala de tempo nas simulações usando MARTINI precisa ser interpretada cuidadosamente (MONTICELLI et al., 2008).

2.1.6.5 Limitações

Embora há muitas facilidades em utilizar o campo de forças MARTINI, existem também algumas limitações que devemos nos atentar:

- O campo de forças foi parametrizado para a fase condensada/líquida, portanto simulações com sistemas em estado gasoso ou em estado sólido não são recomendadas (MARRINK et al., 2007);

- O campo de forças MARTINI foi parametrizado considerando as energias livres de partição, mas devido à resolução reduzida, a entropia é maior, sendo por sua vez, a entalpia menor para compensar. Isso altera a dependência pela temperatura das simulações, devendo-se usar temperaturas próximas da temperatura de parametrização (270-330 K) (MARRINK et al., 2007);

- O cálculo de interações eletrostáticas é apenas entre partículas a uma distância de 1,2 nm entre si (equivalente de duas a três partículas), não refletindo com precisão as interações eletrostáticas de longo alcance. Isto, aliado ao *screening* implícito torna as interações de moléculas polares ou carregadas pouco corretas,

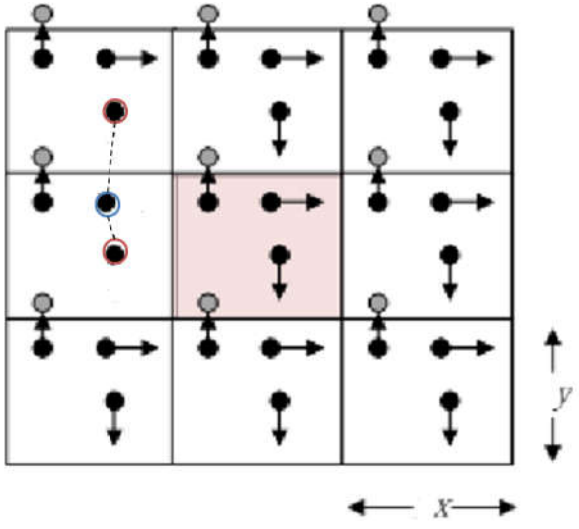
principalmente em solventes não polarizáveis, como a água MARTINI normal (*P4*) (MARRINK et al., 2007);

- A estrutura secundária em peptídeos ou proteínas é distinguida pela adição e fixação dos diedros entre as partículas, de modo que não se pode esperar alterações conformacionais usando o campo de forças MARTINI (MARRINK et al., 2007).

2.1.7 *Condições Periódicas de Contorno*

Em geral, os sistemas simulados possuem tamanhos limitados. Desta forma, efeitos de borda têm influência significativa em seus comportamentos. A fim de minimizar tais efeitos nos limites do sistema, condições periódicas de contorno (PBC, do ingles *periodic boundary conditions*) são comumente aplicadas. Sendo assim, a simulação pode ser realizada dentro de uma célula (ou caixa) envolta por réplicas suas em todas as direções (WHITE et al., 2008). Como a posição relativa de cada partícula dentro da caixa é a mesma em todas as réplicas, quando uma partícula sai da caixa por uma lateral, a sua réplica correspondente entra pela lateral oposta (Figura 11).

Figura 11: Condições periódicas de contorno (PBC: *periodic boundary condition*). A simulação é realizada com réplicas idênticas do sistema ao longo dos eixos x, y e z. Uma partícula que sai do sistema por uma das laterais é considerado como entrando pela lateral oposta (círculos pretos com setas). Utilizando a convenção de imagem mínima, distância entre duas partículas deve ser a menor possível, considerando as suas réplicas. Sendo assim, se há duas distâncias possíveis entre estas duas partículas (representada em azul e vermelho), uma considerando apenas os limites da caixa de simulação (caixa azul) e outra considerando-se as replicas, esta última distância, a menor, é que deve ser considerada ao calcular as interações entre estas duas partículas



Fonte: Figura adaptada de HE, 2011.

Na prática, apenas uma caixa é simulada e é empregada a convenção de imagem mínima para tratar as interações entre partículas. Esta convenção estabelece que a distância entre duas partículas deve ser a menor possível, descontando as dimensões da caixa (Figura 11). O uso de condições periódicas de contorno permite simular um sistema como se este tivesse dimensões infinitas e torna essencial o uso de raios de corte menores que metade do tamanho da caixa, evitando a interação de uma partícula com a sua própria imagem.

2.1.8 *Integração de Movimento*

2.1.8.1 Algoritmo de Verlet

Integrar numericamente as equações de movimento é a próxima etapa após o cálculo das funções potenciais de cada partícula. Por ser reversível no tempo e causar um baixo desvio da energia total do sistema em simulações longas, o algoritmo mais usado para esse fim é o Verlet (VERLET, 1967). Neste algoritmo, definidas as posições de uma partícula e a força exercida sobre ela em um dado instante, $\boldsymbol{r}(\boldsymbol{t})$ e $\boldsymbol{F}(\boldsymbol{t})$, as posições no instante seguinte $(t + dt)$ são derivadas da expansão de Taylor das posições da partícula em $(t + dt)$ e $(t - dt)$, de forma que, a sua posição no instante seguinte $(t + dt)$ é obtida pela equação:

$$\boldsymbol{r}(t + dt) = 2\boldsymbol{r}(t) - \boldsymbol{r}(t - dt) + \frac{\boldsymbol{F}}{m} dt^2 + O\partial t^4 \,, \tag{30}$$

$$F(t) = -\frac{\partial U(\boldsymbol{r})}{\partial r(t)} \,, \tag{31}$$

onde $U(\boldsymbol{r})$ é a função de energia potencial dada a posição $\boldsymbol{r}$ da partícula e m é a massa da partícula.

O intervalo de tempo entre dois instantes da simulação ou passo de integração (dt) deve ser pequeno o suficiente para amostrar o evento mais rápido que pode ocorrer no seu sistema, assegurando, dessa forma, a conservação da energia do sistema. No entanto, um dt muito pequeno torna a simulação computacionalmente custosa.

Em sistemas biológicos, utiliza-se um dt de 2fs (10^{-15} segundos), para simulações atomísticas, que corresponde ao período de vibração dos átomos da molécula de água (BECKER et al., 2001). Ao usar o algoritmo Verlet, as velocidades das partículas, necessárias para o cálculo da energia cinética do sistema, podem ser obtidas subtraindo a expansão de Taylor das posições da partícula em $(t + dt)$ e $(t - dt)$. Desta forma a velocidade é dada pela equação:

$$v(t) = \frac{r(t + dt) - r(t - dt)}{2dt} + O\partial t^2 . \quad (32)$$

Como qualquer outro algoritmo, o algoritmo de Verlet apresentam vantagens e desvantagens. As vantagens são: 1) a integração da posição é bem precisa (erros da ordem de $O\partial t^4$) e é independente da propagação da velocidade, isso simplifica a integração da posição e reduz a necessidade de memória; 2) o algoritmo requer apenas um única estimativa de força por ciclo de integração (cálculo este bastante custoso computacionalmente); 3) Sua formulação que é baseada na expansão do termo anterior e posterior, garante reversibilidade do tempo (uma propriedade da equação de movimento). No entanto, há também as desvantagens: 1) A propagação da velocidade é sujeita a erros relativamente grandes, na ordem de $O\partial t^2$, lembrando que os erros atribuídos a velocidade são transmitidos ao cálculo da energia cinética, Além disso, o cálculo das coordenadas anteriores e posteriores a $v(t)$, é necessária para seu cálculo; 2) O algoritmo não é auto-iniciante, uma expansão de Taylor de menor ordem é usado para iniciar a propagação; 3) Deve ser modificado para incorporação de forças dependente de velocidade ou escalas de temperatura (BECKER et al., 2001; VERLET, 1967).

2.1.8.2 Leap-frog

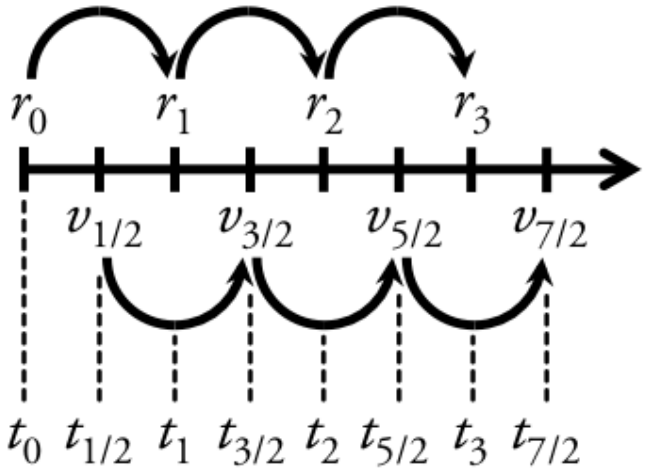
Com o objetivo de minimizar as desvantagens do algoritmo de Verlet, principalmente melhorando o cálculo da velocidade, modificações neste algoritmo foram propostas. Uma destas modificações é o algoritmo *Leap-frog* (HOCKNEY, 1970). Neste algoritmo, a velocidade é calculada no meio ponto da posição e vice-versa:

$$r(t+dt) = r(t) + v\left(t+\frac{1}{2}dt\right).dt\,, \tag{33}$$

$$v\left(t+\frac{1}{2}dt\right) = v\left(t-\frac{1}{2}dt\right) + \frac{\boldsymbol{F}}{m}.dt\,. \tag{34}$$

Desta forma. O algoritmo envolve três etapas: 1) usa a posição no tempo t (r(t)) para calcular a força em t($\boldsymbol{F}$); 2) Usa a força $\boldsymbol{F}$ e a velocidade do meio tempo anterior $v(t-\frac{1}{2}dt)$ para calcular a próxima velocidade $v(t+\frac{1}{2}dt)$, 3) Usa a posição r(t) e $v(t+\frac{1}{2}dt)$ para calcular $r(t+dt)$ (Figura 12).

Figura 12: Representação esquemática do algoritmo *Leap-frog*, o pulo do sapo. O calculo da posição é intercalado com o calculo da velocidade e vice-versa.



A velocidade $v(t)$, que é necessária para o cálculo da energia cinética é calculada como:

$$v(t) = \frac{v\left(t+\frac{1}{2}dt\right) + v\left(t-\frac{1}{2}dt\right)}{2}. \tag{35}$$

2.1.9 *Aplicação de potencial transmembrânico*

Diferenças nas concentrações de íons entre o interior e exterior celular geram o que chamamos de potencial transmembrânico. Experimentalmente, essa diferença pode ser alcançada por desbalanço iônico explícito gerado por diferentes concentrações de espécies carregadas entre os meios intra e extracelular (experimentos de *clamp*

de voltagem) (PERKINS, 2006), ou pela reorganização dos eletrólitos estimulados por um pulso de voltagem transmembrânica (experimentos de *pacth clamp*) (PETERSEN, 2017). Em simulações de dinâmica molecular, gerar esta diferença fica um pouco mais trabalhosa, uma vez que há as condições periódicas de contorno onde ocorre a interação do meio externo com o meio interno. Sendo assim, protocolos alternativos foram gerados para contornar tal dificuldade.

O protocolo do campo elétrico utiliza a aplicação de um campo elétrico uniforme ***E*** ao longo da direção normal à membrana (CROZIER et al., 2001; TIELEMAN et al., 2001; ZHONG et al., 1998). Neste método, a diferença de voltagem V é dada por:

$$V = |E|.L_z\,, \tag{36}$$

onde L_z é o tamanho médio da dimensão da caixa no eixo normal a bicamada (neste caso, o eixo z). Na prática, este campo é implementado aplicando-se uma força $\boldsymbol{F} = \boldsymbol{E}.q_i$ em todos os átomos *i* com carga *q*. Apesar de constituir um método bem aceito e de simples implementação, mesmo com o uso das condições periódicas de contorno (PBC), a aplicação sistemática de forças pode ter efeitos na distribuição de cargas e/ou orientação de dipolos no interior da proteína por exemplo. Além disso, se lembrarmos que a diferença de potencial em membranas celulares são geradas pelo desbalanço de cargas entre a região externa e interna da célula, a aplicação do campo elétrico constitui um método artificial para gerar diferenças de potencial eletrostático (ROUX; SCHULTEN, 2004).

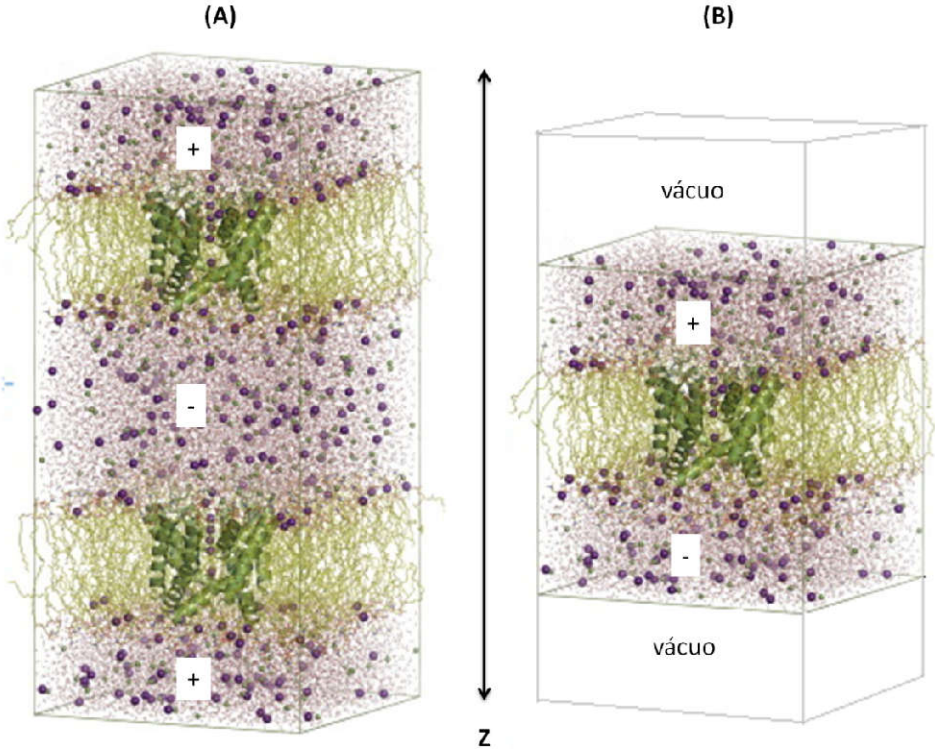
Uma alternativa que possibilita gerar uma diferença de potencial mais próximo com o real é o desbalanço explícito de íons através da membrana, mantendo as condições periódicas de contorno (PBC) em todas as dimensões. Para essa segunda alternativa, dois métodos são propostos:

I) As voltagens transmembrânicas são produzidas em um sistema formado por uma célula unitária contendo três compartimentos de água e duas bicamadas lipídicas (SACHS et al., 2004) (Figura. 13, A).

II) As voltagens transmembranicas são produzidas em um sistema formado por uma célula unitária contendo uma bicamada lipídica acrescida de duas interfaces água/vácuo (Figura 13, B).

A vantagem do método II é que a adição da interface de vácuo evita o aumento significativo do número de átomos simulados quando comparamos com o método I.

Figura 13: Sistemas com desbalanço de cargas. (A) O banho central é isolado do banho das extremidades pelas bicamadas lipídicas. (B) A membrana adicional é substituída por uma interface água/vácuo produzida pela extensão da caixa de simulação na coordenada z. Em ambos os casos, a diferença de potencial é gerada pelo desbalanço explícito de íons de um banho para outro.



Fonte: Figura adaptada de KUTZNER et al., 2016.

No presente estudo, o método II de desbalanço de carga foi utilizado nas análises da atividade de canal da proteína SH. Para estas simulações, inicialmente o sistema é simulado em uma amostra NPT, com interação entre banhos internos e externos, para equilibração dos eletrólitos e área por fosfolipídio. Em seguida, a dimensão normal à membrana é aumentada, gerando uma interface banho-vácuo e as simulações passam a ser realizadas a volume constante (NVT), de modo a manter a separação entre os banhos das suas imagens. Essa interface banho-vácuo deve ser grande o suficiente para impedir a interação entre os banhos internos e externos. Vale destacar também que essas simulações devem ser curtas para evitar a dispersão das moléculas de água. Com essa configuração inicial é possível impor uma diferença de potencial por desbalanço explícito de íons sem o custo

computacional pelo aumento significativo de número de átomo como ocorre pelo método I. No presente estudo, o desbalanço de carga aplicado foi de 12e.

2.1.10 *Parâmetros para análise das simulações*

2.1.10.1 RMSD e RMSF

O valor do desvio da raiz média quadrática (RMSD) é a medida da distância média entre os átomos de uma estrutura de uma molécula em relação a uma estrutura de referência, podendo esta ser a estrutura inicial. No estudo de conformações de proteína o RMSD é calculado através da sobreposição de uma estrutura qualquer com uma estrutura de referência. Esta sobreposição pode ser com todos os átomos ou somente com os átomos da cadeia principal (N, C_α e C). O RMSD pode ser calculado pela ferramenta *gmx rms* do pacote GROMACS, utilizando a seguinte equação:

$$RMSD(t_1, t_2) = \left[\frac{1}{M}\sum_{i=1}^{N} m_i \|r_i(t_1) - r_i(t_2)\|^2\right]^{\frac{1}{2}}, \tag{37}$$

onde $m = \sum_{i=1}^{N} m_i$ e $r_i(t)$ é a posição do átomo i no tempo t.

A flutuação da raiz média quadrada (RMSF) calcula a flutuação das posições atômicas durante a trajetória. A partir do cálculo do RMSF é possível obter um arquivo .pdb com valores de RMSF convertidos em valores do fator beta. O fator beta representa, por meio de um espectro de cores, qual região flutua mais ou menos durante a simulação, sendo as regiões que flutuam menos (menor valor de RMSF) representadas em azul e as regiões que flutuam mais (maiores valores de RMSF) em vermelho.

2.1.10.2 Área por lipídeo

Os lipídeos possuem uma área superficial determinada principalmente pela cabeça polar. Em simulações de membranas, quando o sistema está equilibrado, o valor da área de uma monocamada da bicamada dividido pelo número de lipídeos em cada monocamada tende a permanecer constante. Desta forma, essa área é considerada

um parâmetro de equilibração. Para o cálculo da área por lipídeo para os sistemas contendo a proteína SH, foi utilizado a ferramenta de análises de membrana GridMAT-DM (ALLEN et al., 2009)

2.1.10.3 Espessura da bicamada lipídica

A espessura da bicamada em geral é medida pela distâncias entre as cabeças dos fosfolipídeos da monocamada superior em relação a monocamada inferior. No presente trabalho a espessura das bicamadas simuladas foram medidas construindo-se arquivos (utilizando a ferramenta do GROMACS gmx *make_ndx*) com os átomos de fósforo da camada superior e inferior. Logo depois o cálculo da distância entre esses dois grupos foi realizado, utilizando a ferramenta gmx *g_dist*, o cálculo dos valores médios e seus respectivos valores de desvio padrão foram realizados utilizando a ferramenta gmx *g_analyze*. O mesmo protocolo foi utilizado para o cálculo do comprimento hidrofóbico da bicamada lipídica, mas agora construindo arquivos para os carbonos C2 das cadeias alcilas das monocamadas superior e inferior.

2.1.10.4 Parâmetro de Ordem

O Parâmetro de Ordem (P.O.) é um parâmetro normalizado que indica o grau de organização do seu sistema. No presente estudo este parâmetro foi calculado, utilizando a ferramenta *gmx g_order*, para as cadeias hidrofóbicas (Palmitoil e/ou Oleoil) das moléculas de POPC e DMPC para análise do seu alinhamento. Quanto mais próximo de zero for o P.O., menor o alinhamento das cadeias alifáticas, sendo 1 o valor para o estado ordenado absoluto. A expressão usada para o cálculo do parâmetro de ordem está representada na equação abaixo:

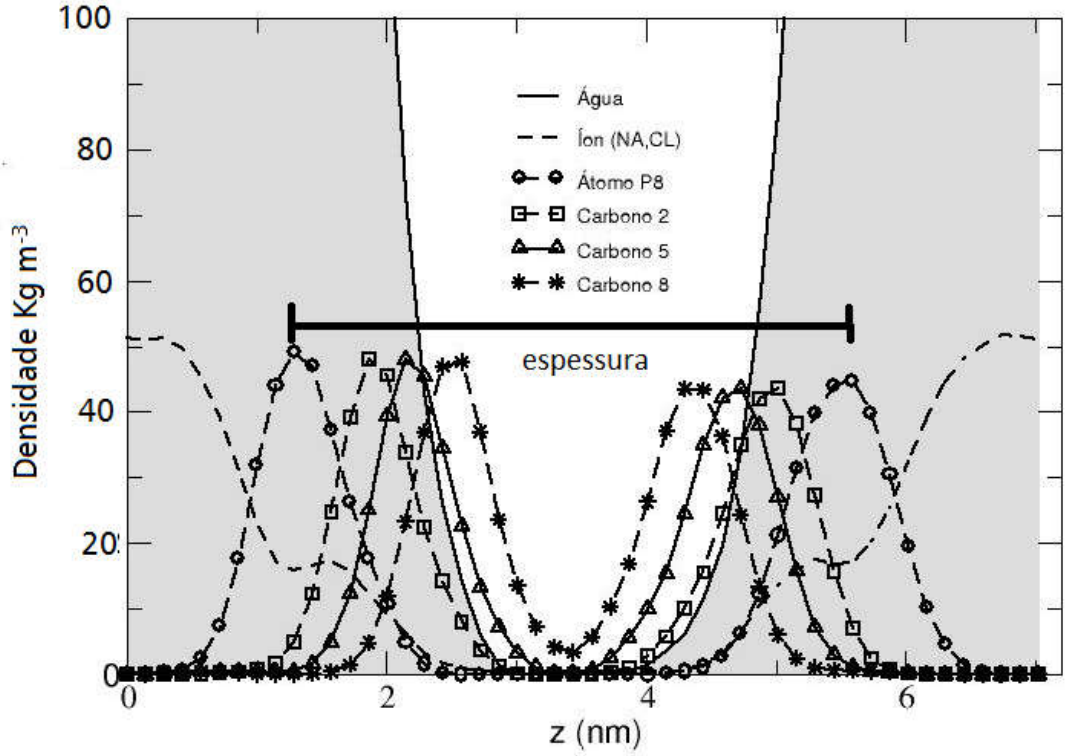
$$S_{CD_i} = \frac{1}{2}\langle 3cos^2\theta_i - 1\rangle\,, \tag{38}$$

sendo θ_i o ângulo entre o vetor da ligação CH_i e a direção do vetor normal ($\vec{N}$) à bicamada. O parâmetro de ordem definido desta maneira pode ser diretamente comparado com o parâmetro de ordem medido por RMN de deutério, e é então denotado como parâmetro de ordem do deutério (S_{CD}).

2.1.10.5 Perfil de Densidade de Massa

Através de uma varredura ao longo do eixo z (eixo normal à membrana) é detectada a quantidade de massa de cada molécula presente em cada ponto que faz parte do sistema. Este mapeamento gera um perfil de densidade de massa (PDM). Desta forma, pode-se determinar a região ocupada pelo solvente, a região ocupada pela membrana e a região ocupada pelos resíduos da proteína SH e carbonos dos fosfolipídeos.

Figura 14: Perfil de densidade de massa para uma bicamada solvatada. A espessura da bicamada é calculada pela distância P-P entre as monocamadas.



A espessura da bicamada pode também ser calculada pela distância fósforo-fósforo (Figura 15). Para gerar o perfil de densidade de massa, a ferramenta *gmx g_density*, foi utilizada. Os carbonos 2, 5 e 8 representam o segundo, quinto e oitavo carbono da cadeia oleoil do fofolipídio, respectivamente.

2.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

2.2.1 Introdução

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica de espectroscopia que estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria. Esta interação ocorre quando o núcleo de um átomo, na presença de um campo magnético externo (**B_0**), é exposto a uma radiação eletromagnética com frequência específica. No entanto, não são todos os núcleos que possuem essa característica, pois essa interação só ocorrerá se eles possuírem uma propriedade chamada spin.

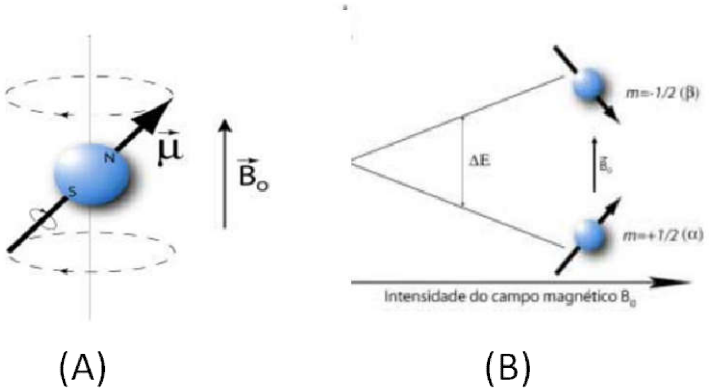
Spin é uma propriedade fundamental natural como carga elétrica ou massa. Podemos dizer que é uma outra forma de momento angular, simplesmente referido como spin ou spin nuclear com magnitude ***L*** e direção *m*. A magnitude ***L*** é dada por:

$$L = \hbar\sqrt{I(I+1)}\,, \tag{39}$$

onde $\hbar = h/2\pi$, sendo h a constante de Plank $(6{,}6256.10^{-34} J.s)$, I o número quântico do spin que varia de ½ em ½.

A projeção do vetor do momento angular do spin possui valores discretos de acordo com m, uma vez que núcleos possuidores de spin, quando colocados na presença de um campo magnético, comportam-se como pequenas barras magnéticas devido as suas composições de cargas (vide Figura 15).

Figura 15: Posição do momento angular do spin. Quando uma campo magnético externo é aplicado, B_0, As possíveis orientações do vetor do momento angular dependerá do seu número quântico magnético $\boldsymbol{m}$.



Estes pequenos magnetos, na presença de um campo externo $\boldsymbol{B_0}$, possuem energias, de acordo com sua orientação. Essas possíveis orientações são quantizadas de acordo com seu número quântico magnético m, o qual é dado por $m = (-I, -I+1, \ldots, I-1, +I)$ (vide Figura 15). Assim, podemos descrever o núcleo como sendo uma partícula carregada girando ao redor de um eixo e produzindo, desta forma, uma corrente elétrica e, consequentemente, comportando-se como um pequeno magneto possuidor de um momento de dipolo magnético dado por:

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \boldsymbol{L}\,, \tag{40}$$

onde γ é a razão giromagnética, característica de cada núcleo, podendo ser positiva ou negativa. Núcleos com $I = 0$, o ^{12}C, por exemplo, embora ele possua uma abundância natural alta (98,9%), não possui momento magnético e, portanto não pode ser observado em espectroscopia de RMN. Propriedades magnéticas de isótopos de interesse para RMN de biomoléculas estão relacionados na Tabela 3.

Tabela 3: Propriedade magnética dos isótopos de maior interesse para RMN de biomolecular

Núcleo	I	Razão Giromagnética (10^7 rad T^{-1} s^{-1})	Abundancia Natural (%)	Frequência de RMN (MHz) (B_0=2,3488 T)	Sensibilidade relativa *
^{1}H	½	26,752	99,985	100,0	1
^{2}H	1	4,1066	0,015	15,351	$1{,}45.10^{-6}$
^{3}H	½	28,5350	-	106,663	1,21
^{12}C	0	-	98,9	-	-
^{13}C	½	6,7283	1,108	25,144	$1{,}76.10^{-4}$
^{14}N	1	1,9338	99,63	7,224	$1{,}0.10^{-3}$
^{15}N	½	-2,712	,037	10,133	$3{,}85.10^{-6}$
^{17}O	½	-3,6279	0,037	13,561	$1{,}08.10^{-5}$
^{19}F	½	25,181	100	94,077	0,834
^{23}Na	3/2	7,08013	100	26,466	9,26.10-2
^{13}P	½	10,841	100	40,481	6,65.10-2

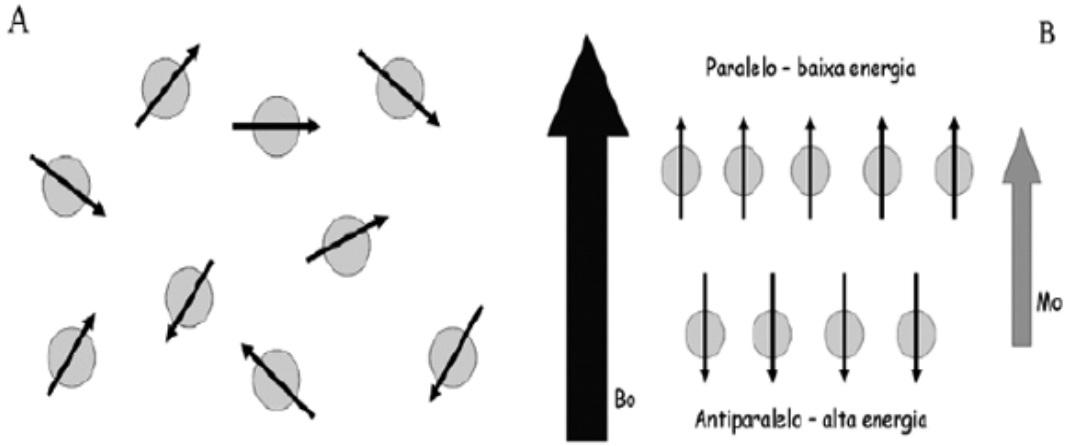
*Sensibilidade é a medida de quão fácil é de adquirir um sinal de RMN para um núcleo específico Y, comparado com outro, X. Para um mesmo campo e igual número de núcleos a sensibilidade relativa R^X é o produto da abundância natural (%) pela sensibilidade absoluta à RMN [|γ3|I(I+1)] onde γ é a razão giromagnética e I é o número de spin.

Quando pensamos em uma amostra, os momentos de dipolo de cada núcleo individualmente são somados e dão origem ao vetor magnetização do todo o conjunto, **M**.

$$\boldsymbol{M} = \sum \boldsymbol{\mu} \, . \tag{41}$$

Na ausência de um campo aplicado, os momentos magnéticos de cada núcleo estão orientados aleatoriamente e sua soma resulta em um vetor magnetização nulo ($\boldsymbol{M} = 0$). Na presença de um campo magnético externo, os núcleos são alinhados na mesma direção ou uma direção contrária ao campo aplicado, gerando uma magnetização $\boldsymbol{M} \neq 0$ (vide Figura 16) .

Figura 16: Representação dos momentos magnéticos de cada spin em uma amostra na (A) ausência e na (B) presença de um campo magnético externo B_0.



Portanto, na presença de um campo magnético, os núcleos se orientaram a favor, ou contra o campo aplicado e a componente z do momento angular (ao longo da direção do campo magnético aplicado, ***B***) se iguala a $m\hbar$. No entanto, quando não há a presença de campo magnético, dizemos que esses núcleos estão nos seus estados nucleares fundamentais degenerados. A degenerescência deste estado fundamental é dada por $2I + 1$ níveis de energia nuclear. Assim, se $I = 1/2$, como acontece no caso do ^{1}H, ^{13}C e ^{15}N, teremos dois níveis de energia iguais a:

$$E = \pm\mu_z . B_0 \, . \tag{42}$$

A diferença de energia entre esses níveis de energia dada por:

$$\Delta E = h\upsilon \, , \tag{43}$$

onde υ é a frequência do fóton (Hz ou s^{-1}).

Com base na equação 42, podemos escrever a energia do estado de um spin nuclear como:

$$E = -\mu . B = -\mu_z . B_0 = -\gamma m\hbar B_0 \, . \tag{44}$$

Substituindo e considerando os núcleos com $I = 1/2$, temos que a diferença de energia entre os dois níveis é:

$$\Delta E = -\gamma\left(-\frac{1}{2}\right)\hbar B_0 - \gamma\left(\frac{1}{2}\right)\hbar B_0 = \gamma\hbar B_0 \, . \tag{45}$$

Desta forma, a condição de ressonância é definida igualando as equações 43 e 45, obtendo o que chamamos de frequência de *Larmor*, ou frequência de precessão:

$$\mathrm{h}\nu = \gamma\hbar B_0 \rightarrow \upsilon_L = \frac{\gamma . B_0}{2\pi}. \qquad (46)$$

Vale ressaltar ainda que, como a frequência de *Larmor* varia com o campo aplicado e com a razão giromagnética (γ), a diferença de energia também é expressa em função destas duas variáveis. Para um mesmo campo aplicado (***B***), a diferença de energia entre os níveis de energia nuclear para o ^{1}H é quatro vezes maior que o ^{13}C e dez vezes maior que ^{15}N. Esta diferença de energia combinada com sua alta abundância natural faz desse núcleo um possuidor de um sinal muito mais pronunciado do que os outros núcleos.

Até o momento vimos que, núcleos que possuem spin e quando estão na presença de um campo magnético, cada spin se alinha em uma das duas possíveis orientações, a favor do campo magnético, no estado de menor energia, ou contra o campo magnético, no estado de maior energia. E é essa diferença no número populacional dos dois estados que resulta o vetor magnetização **M**, a grandeza medida no experimento de RMN. Se não há diferença populacional, não há **M** resultante e, portanto, não há sinal de RMN.

De acordo com a estatística de Boltzmann, no equilíbrio para uma amostra de RMN, a razão entre a população de spins no estado de maior energia e a de menor energia é:

$$\frac{N^-}{N^+} = e^{\frac{-\Delta E}{KT}}, \qquad (47)$$

onde ΔE é a diferença de energia entre os estados dos spins, *k* é a constante Boltzmann, $1{,}3805x10^{-23}\ J/K$, e *T* é a temperatura em *Kelvin*.

Em temperatura ambiente e na presença de um campo magnético externo ***B***, o número de spins no nível de menor energia (alinhado na direção e sentido do campo) N^+, ultrapassa ligeiramente o número de spins que ocupa o nível de maior energia, N^-. Esta diferença de energia é da ordem de 10^6, comumente denominada de partes por milhão (ppm).

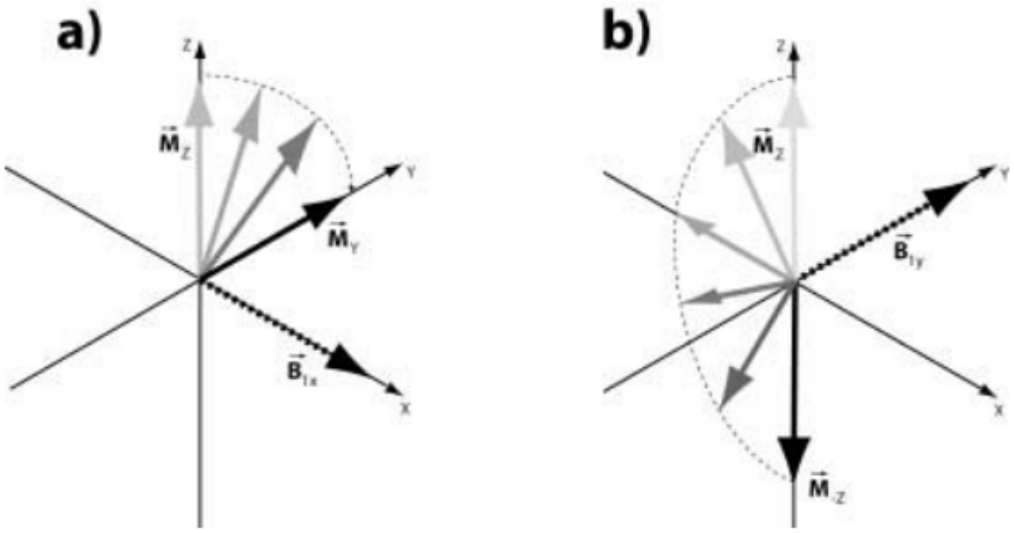
2.2.2 Pulsos de Rádio Frequência

A existência do vetor magnetização resultante, ***M***, não é suficiente para que ele seja detectado. Além da sua existência, há a condição de que ele precise variar com o tempo. Convencionalmente, nos referimos a direção longitudinal de ***B*** como a direção “Z”, e “X” e “Y”, ao passo que “X” e “Y” correspondem a direção transversal. Uma forma de conseguirmos variar ***M*** com o tempo é desviando-o da direção longitudinal, gerando componentes oscilantes nas direções transversais “X” e “Y”. Estes dipolos oscilantes, quando inseridos em um anel condutor geram correntes pelo Princípio da Indução de Faraday, onde essas correntes são os sinais detectados por RMN.

Para que ocorra o desvio da direção do vetor magnetização, um segundo campo $\boldsymbol{B_1}$ é aplicado em uma orientação perpendicular ao vetor ***M***, provocando sua rotação seguindo a regra da mão direita na direção do campo resultante. A intensidade e a duração desse segundo campo determinam o ângulo de rotação do vetor ***M*** e, enquanto que sua direção (fase) determina a direção de rotação de ***M***. Quando o segundo campo $\boldsymbol{B_1}$ é desligado, o vetor magnetização começa a precessionar ao redor de ***B*** até retorna a sua posição inicial. Toda essa mudança de direção na rotação do vetor magnetização só pode ser possível se o campo aplicado $\boldsymbol{B_1}$ tiver intensidade comparável ao campo ***B***. Isso pode ser alcançável com campos magnéticos ressonantes, ou seja, que possuem radiação eletromagnética com a mesma frequência de precessão de ***M*** ao redor de ***B***. Sendo a frequência de rotação na faixa de radiofrequência (10-100MHz) e o tempo de atuação de $\boldsymbol{B_1}$ limitado, chamamos o segundo campo aplicado, $\boldsymbol{B_1}$, como pulsos de radiofrequência (RF).

Na maioria dos experimentos de RMN, esses pulsos de RF são pulsos de 90° ou 180°. O pulso de 90° coloca o vetor magnetização **M** no plano transversal, e o de 180°, inverte seu sentido (vide Figura 17).

Figura 17: Movimento da Magnetização durante a aplicação de um pulso de rádio frequência (RF). (A) Pulso de 90°$_X$: o campo B_{1x} é aplicado durante o tempo necessário para que a magnetização inicial M_z gire ao redor do eixo X, até a direção Y. (B) Pulso de 180°$_X$: o campo B_{1Y} é aplicado durante o tempo necessário para que a magnetização inicial M_z gire a redor do eixo Y, até a direção de –Z.



Cessado o pulso de radio frequência, ou seja, quando $\boldsymbol{B_1}$ é desligado, o vetor magnetização retorna para sua posição de equilíbrio. A constante de tempo que descreve como a magnetização longitudinal, $\boldsymbol{M_Z}$, retorna ao seu valor de equilíbrio é chamada de tempo de relaxação spin-rede ou relaxação longitudinal, T_1. A constante de tempo que descreve como a magnetização transversal, $\boldsymbol{M_{xy}}$, retorna ao equilíbrio é chamada de tempo de relaxação spin-spin ou relaxação transversal, T_2.

2.2.3 Relaxação Longitudinal

Uma vez que a energia potencial do sistema é definida pela orientação da magnetização com o campo externo aplicado, quando um sinal de RF é aplicado e muda a orientação do vetor magnetização, há uma mudança na energia potencial devido ao ambiente (rede). Quando este campo é cessado, a magnetização, $\boldsymbol{M_Z}$, retorna para o seu valor de equilíbrio $\boldsymbol{M_0}$, determinado pela distribuição de Boltzmann, restaurando a população de equilíbrio dos níveis energéticos. Devido a esta troca de energia com o ambiente (rede), este processo também é chamado de relaxação spin-rede e a equação que descreve o comportamento de $\boldsymbol{M_Z}$, em função do tempo, depois de cessado o pulso de RF, é:

$$M_z = M_0 \left(1 - e^{-t/T_1}\right). \quad (48)$$

2.2.4 Relaxação transversal

Sabemos que a magnetização total é a soma dos momentos magnéticos dos dipolos individuais. No entanto, estes acabam experimentando um campo magnético ligeiramente diferente devido às interações mútuas e, portanto, começam a precessionar com frequências levemente distintas, defasando com o tempo e fazendo a magnetização transversal se anular. Por esta razão, a relaxação transversal é também conhecida como relaxação spin-spin e as equações que descrevem o comportamento de $\boldsymbol{M_x}$ e $\boldsymbol{M_y}$ em função do tempo, depois de cessado o pulso de RF, são:

$$M_x = M_{x0}.e^{-t/T_2}. \quad (49)$$

$$M_y = M_{y0}.e^{-t/T_2}. \quad (50)$$

2.2.5 Equações de Bloch

As equações de Bloch são as equações responsáveis por descrever e dar informações sobre muitos processos da RMN. Elas descrevem a dependência da magnetização com tempo durante o experimento de RMN. Como vimos anteriormente essa é a principal atividade observada durante os experimentos de RMN.

Como já foi mostrado anteriormente, os spins nucleares, na presença de um campo magnético, precessam ao redor de seu eixo com uma frequência característica chamada frequência de *Larmor*:

$$\omega_l = \gamma \boldsymbol{B}. \quad (51)$$

Vimos também que existe uma magnetização total que é dada pela soma dos momentos de dipolo de cada núcleo individualmente,

$$\boldsymbol{M} = \sum \mu_i = \gamma \boldsymbol{L}. \quad (52)$$

A interação dessa magnetização com o campo magnético aplicado gera um torque sobre o sistema dado, ou seja:

$$\boldsymbol{\tau} = \boldsymbol{M} \times \boldsymbol{B} \,. \tag{53}$$

Assumindo todas as relações já tradadas e as seguintes descrições:

$$\tau = \frac{dL}{dt} = M \times B \,. \tag{54}$$

$$\frac{dM}{dt} = \gamma \frac{dL}{dt} = \gamma (M \times B) \,, \tag{55}$$

onde

$$\begin{aligned} M \times B &= \begin{vmatrix} \hat{\imath} & \hat{\jmath} & \hat{k} \\ M_x & M_y & M_z \\ B_x & B_y & B_z \end{vmatrix} \\ &= \left(M_y B_z - M_z B_y\right)\hat{\imath} + (M_z B_x - M_x B_z)\hat{\jmath} + \left(M_x B_y - M_y B_x\right)\hat{k} \,, \end{aligned} \tag{56}$$

podemos descrever a dependência de tempo da magnetização em termos de componentes individuais da seguinte forma:

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma\left(M_y B_z - M_z B_y\right) . \tag{57}$$

$$\frac{dM_y}{dt} = \gamma (M_z B_x - M_x B_z) \,. \tag{58}$$

$$\frac{dM_z}{dt} = \gamma\left(M_x B_y - M_y B_x\right) . \tag{59}$$

Quando um campo magnético estático é aplicado ao longo de Z, temos que $B_z \neq 0$ e $B_x = B_y = 0$. Logo as equações de Bloch podem ser escritas como segue:

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma\left(M_y B_z\right) , \tag{60}$$

$$\frac{dM_y}{dt} = -\gamma (M_x B_z) \,, \tag{61}$$

$$\frac{dM_z}{dt} = 0 \,, \tag{62}$$

Para o estado de precessão livre (na ausência de relaxação e pulsos de RF), as resoluções dessas equações são:

$$M_x(t) = M_x \cos \omega t + M_y \sin \omega t \,, \tag{63}$$

$$M_y(t) = M_y \cos \omega t - M_x \sin \omega t \,. \tag{64}$$

Combinando as equações diferencias para a precessão e ***M*** causada por $\boldsymbol{B_0}$ com as relações de relaxação apresentadas acima, temos um conjunto de equações diferenciais acopladas chamadas de Equações de Bloch para um estado que chamamos de precessão livre incluindo as relaxações transversais e longitudinais:

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma M_y B_0 - \frac{M_x}{T_2}, \tag{65}$$

$$\frac{dM_y}{dt} = -\gamma M_x B_0 - \frac{M_y}{T_2}, \tag{66}$$

$$\frac{dM_z}{dt} = -\frac{(M_z - M_0)}{T_1}. \tag{67}$$

As soluções das equações acima são dadas por:

$$M_x(t) = \left[M_x(0)\ \cos \omega t - M_y(0) \sin \omega t\right] e^{-t/T_2} \,, \tag{68}$$

$$M_y(t) = \left[M_y \cos \omega t - M_x \sin \omega t\right] e^{-t/T_2} \,, \tag{69}$$

$$M_z(t) = M_0 + [M_z(0) - M_0] 0 e^{-t/T_1} \,, \tag{70}$$

onde $\boldsymbol{M_0}$ é a magnetização de equilíbrio na direção Z; ω representa a frequência de precessão; T_1 e T_2 os tempos de relaxação spin-rede e spin-spin, respectivamente.

2.2.6 Decaimento de Indução Livre (*FID – Free Induction Decay*)

A detecção efetuada pelo espectrômetro mede a magnetização transversal $\boldsymbol{M_{xy}}$ que, por oscilar sob o efeito de $\boldsymbol{B_0}$, induz num solenóide um sinal de fase variável cuja amplitude decai com o tempo com uma constante temporal T_2. Esta evolução de ***M*** com o tempo é designada por FID (*free induction decay*) e geralmente corresponde à soma de várias frequências (interferograma) devido aos efeitos já referidos de desvio químico e de acoplamento nuclear indireto.

2.2.7 Interações Anisotrópicas

2.2.7.1 Deslocamento Químico *(Chemical Shift)*

Os elétrons que orbitam ao redor dos núcleos atômicos comportam-se como pequenos eletromagnetos. Quando estes elétrons são colocados na presença de um campo magnético externo, o movimento destes elétrons é perturbado de modo a induzir um campo magnético que se opõe ao campo magnético externo de modo que:

$$B_{interno} = -\chi \, . \, B_{externo} \, , \tag{71}$$

onde χ é a susceptibilidade magnética da amostra.

A susceptibilidade magnética é uma grandeza macroscópica negativa para materiais diamagnéticos e positiva para materiais paramagnéticos. Além deste efeito de blindagem provocada sobre o núcleo atômico pelos seus elétrons, a presença de anéis nas cadeias laterais de aminoácidos também perturba fortemente o campo magnético externo, da mesma forma que as distorções na distribuição eletrônica intrínseca dos átomos, ou provocadas por ligações químicas. Assim, por efeito de diferentes posições geométricas ou densidade eletrônica dentro de uma molécula, diferentes núcleos sentem localmente campos magnéticos levemente diferentes, refletindo em frequências distintas de ressonância para os mesmos. Esta diferença na frequência de ressonância é chamada de deslocamento químico e a frequência de *Larmor* do spin *j*, em um sistema de múltiplos spins é dada por:

$$\omega_{0j} = \gamma B_0 \left(1 - \sigma_j\right) . \tag{72}$$

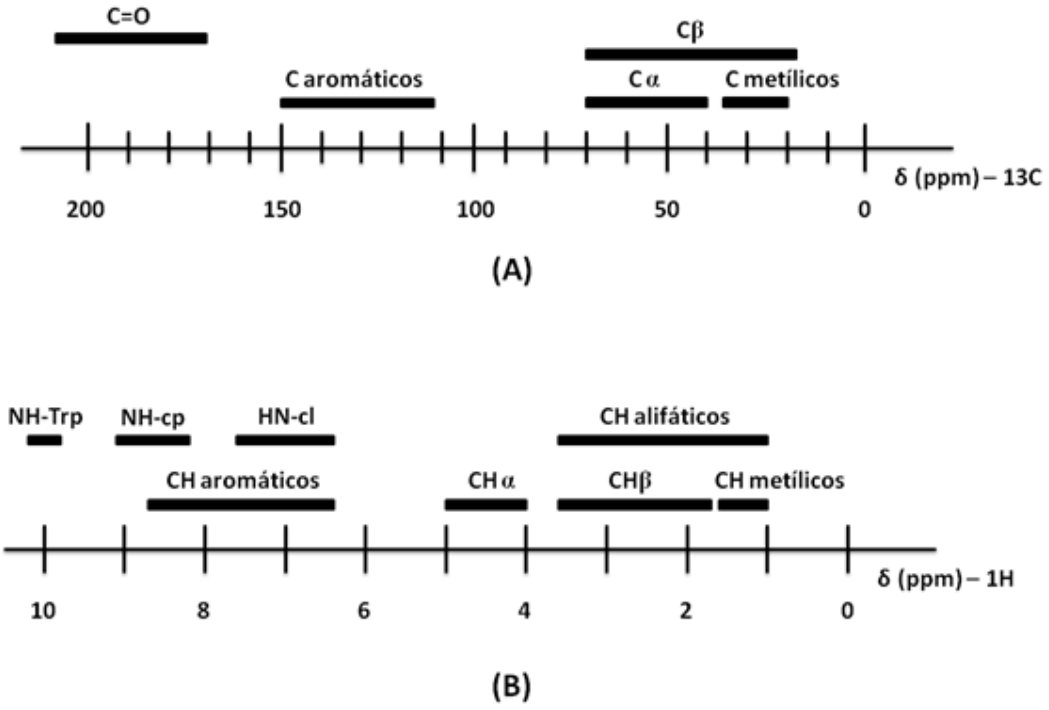
O deslocamento químico é, portanto, dependente do valor do campo externo $\boldsymbol{B_0}$. Frequentemente, os deslocamentos químicos são indicados em ppm (partes por milhão), e medidos em referência a um composto padrão para indicar o zero da escala, de modo que temos:

$$\begin{aligned} \delta = 10^6 . \frac{\upsilon_{amostra} - \upsilon_{referência}}{\upsilon_{referência}} = 10^6 . \frac{\sigma_{amostra} - \sigma_{referêcnia}}{1 - \sigma_{referêcnia}} \\ \approx 10^6 \left(\sigma_{referêcnia} - \sigma_{amostra}\right) , \end{aligned} \tag{73}$$

com o deslocamento químico, δ, independente do campo.

Para macromoléculas, os valores de deslocamento químico são extremamente complicado. No entanto, valores extraídos de tabelas de referência (ULRICH et al., 2008) ajudam a localizar os diferentes grupos com diferentes ressonâncias ao longo do espectro. A Figura 18, mostra como a ressonância de diferentes grupos estão localizadas ao longo do espectro, tanto para o ^{1}H como para o ^{13}C.

Figura 18: Deslocamentos químicos para os diferentes grupos de biomoléculas para (A) 13C e (B) 1H.



2.2.8 Experimentos básicos de RMN

Inicialmente, experimentos de RMN são executados pelo alinhamento da magnetização com um campo externo $\boldsymbol{B_0}$. Para realizar tal tarefa, uma sequência de pulsos de RF, em intervalos de tempo, é aplicada a fim de detectar a magnetização de um determinado núcleo (^{1}H ou ^{13}C, por exemplo).

A magnetização é captada como um sinal magnético induzido em uma bobina que evolui temporalmente *S(t)*, no domínio do tempo, que é chamado de FID (do inglês *Free Induction Decay*). Este sinal pode ser transformado em um sinal no domínio de frequências *S(v)* pela aplicação de uma transformada de Fourier (FT):

$$S(v) = \int_{-\infty}^{+\infty} S(t) e^{-2\pi i v t} dt \,, \qquad (74)$$

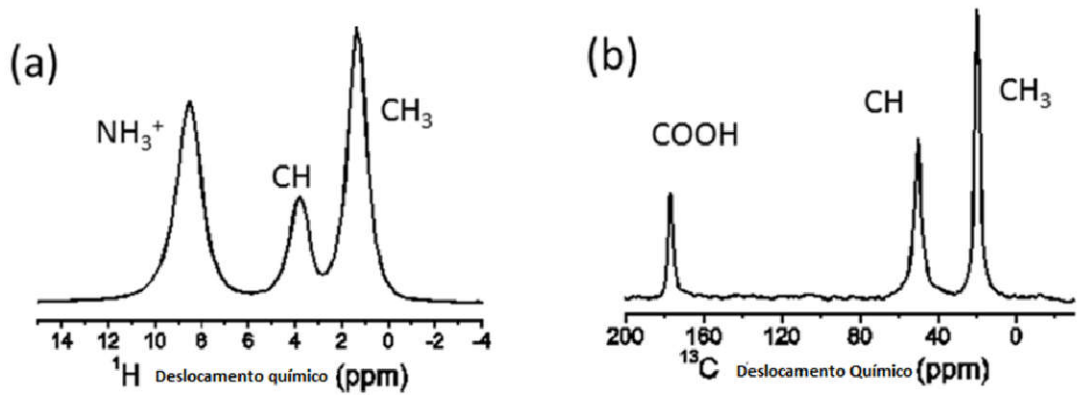
onde o sinal de cada spin, com diferentes sequências, pode ser isolado. Propriedades matemáticas que se aplicam às funções originais e as transformam numa transformada de Fourier podem auxiliar no tratamento matemático dos dados obtidos sem perda de conteúdo e informação.

2.2.8.1 RMN – 1D

Em experimentos de RMN em uma dimensão, os núcleos são excitados com um pulso de RF e os sinais de RMN são captados durante a evolução temporal após a aplicação deste pulso.

Nos espectros 1D, todas as informações estão contidas em duas dimensões: frequência e intensidade. Na Figura 19, podemos observar um espectro 1D dos deslocamentos químicos obtidos da quantidade de ressonâncias presente em função das intensidades.

Figura 19: Espectro 1D de RMN do (A) ^{1}H e do (B) ^{13}C com os diferentes grupos em diferentes deslocamentos químicos.



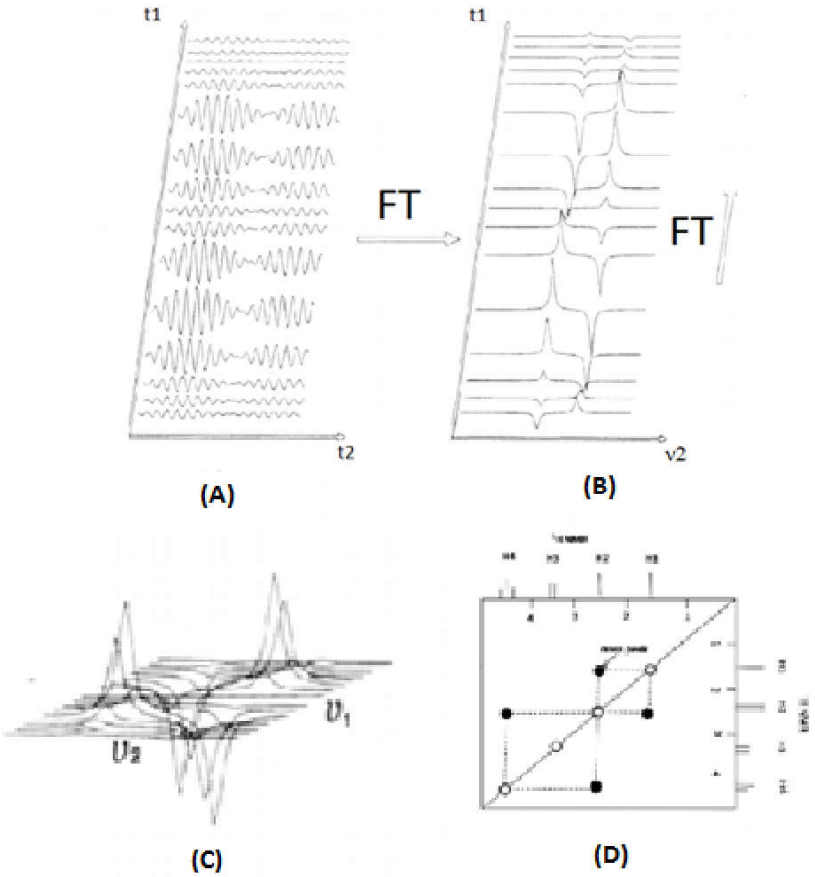
As propriedades da magnetização que geram o sinal captado durante a fase de aquisição são dependentes da maneira como ela foi excitada. Desta forma, existe uma grande quantidade de sequências de pulsos que são utilizadas com diferentes objetivos.

2.2.8.2 RMN - 2D

Quando analisamos espectros 1D de moléculas biológicas, dependendo do tipo da amostra preparada podemos observar uma grande quantidade de spins presentes nos espectros. Esta grande quantidade de spins pode resultar na sobreposição de ressonâncias e impossibilitar uma análise quantitativa. Assim, análises 2D ajudam a elucidar e aumentam a resolução de alguns experimentos envolvendo grande quantidade de spins.

Em um espectro 2D, dois eixos de frequências são obtidos, aplicando-se a transformada de Fourier bidimensional no domínio do tempo, com os dois eixos temporais ortogonais. Desta forma, torna-se necessária a aquisição de um sinal em função de duas variáveis temporais. Este sinal em função de duas variáveis é conseguido pela modulação de um espectro normal de RMN-1D em função de uma variável de intervalo de tempo (t1), que é o tempo de separação entre dois pulsos.

Figura 20: No espectro de RMN 2D, uma série de FIDs são coletados como uma função do tempo de evolução, t1, para obter sinais, S (t1, t2). (A) Cada uma desses FIDs é transformado por Fourier em relação a t2 para dar um conjunto de espectros de RMN 1D, S (t1, F2). Esta série de espectros está codificada com informações sobre o que aconteceu durante o período de evolução.(B) A informação pode ser decodificada fazendo uma segunda transformação de Fourier em relação ao período de evolução, t1. Os pontos correspondentes nos espectros de RMN, S (t1, F2) são plotados contra t1. Os interferogramas resultantes são transformados por Fourier para dar uma trama empatada bidimensional (C) ou mapa de contorno (D), S (F1, F2).

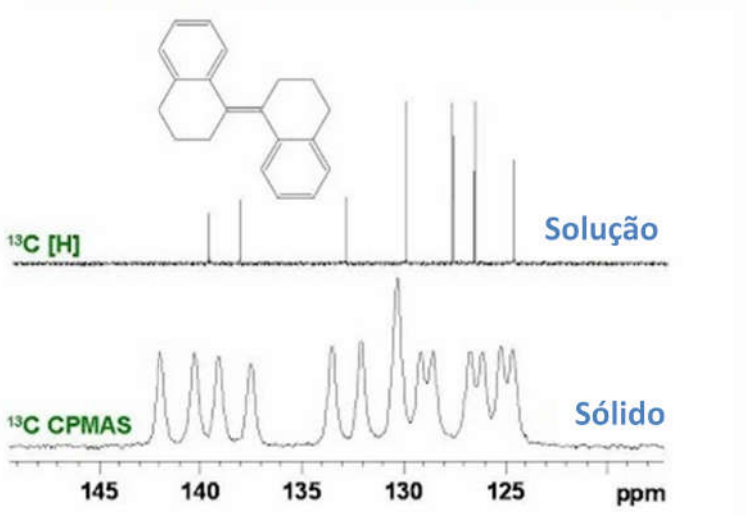


Enquanto que para compor um espectro 1D, o FID adquirido é composto por N pontos e uma transformada de Fourier é efetuada, em um experimento 2D, N1 diferentes espectros 1D são adquiridos, um para cada t1 diferente, com N2 pontos cada. Para conseguir o espectro final, primeiramente é necessário efetuar N1 Transformadas de Fourier (FTs) de N2 pontos cada e, posteriormente, N2 Transformadas de Fourier (FTs) de N1 pontos (vide Figura 20). Comparado com um espectro 1D, para a obtenção de um espectro 2D é necessário muito mais tempo, tanto na aquisição dos dados como no processamento desses mesmos dados.

2.3 RMN do Estado Sólido

Para o caso de líquidos que possuem baixa viscosidade, somente os termos isotrópicos são mensuráveis, resultando em um espectro de alta resolução. No caso dos sólidos, para que seja possível a obtenção de um espectro de alta resolução, é necessária a redução das anisotropias das interações que alargam os espectros (deslocamento químico, interações dipolares) (vide Figura 21). Desta forma, técnicas são utilizadas em RMN de estado sólido a fim de aumentar a resolução de um espectro. No presente trabalho, as técnicas utilizadas forão: Rotação da Amostra em Torno do Ângulo Mágico *(Magic Angle Spinning* – MAS); Desacoplamento Heteronuclear (*Decoupling* – DEC); e Polarização Cruzada (*Cross Polarization* – CP).

Figura 21: Diferenças de espectros de RMN de solução e RMN de estado sólido.

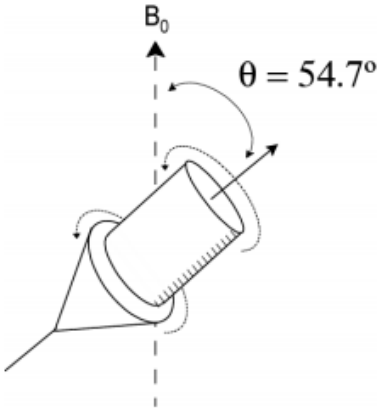


2.3.1 Rotação em torno do Angulo Mágico (*MAS – Magic Angle Spinning*)

Uma vez que muitas das interações de spin (acoplamento dipolar, deslocamento químico, etc.) são dependentes de orientação, quando amostras não estão orientadas e não possuem tombamento isotrópico, os espectros gerados geralmente resultam em padrões de linhas mais amplos (vide Figura 21). Essa dependência de orientação é devido aos termos anisotrópicos. Esses termos possuem, além uma dependência geométrica $(3cos^2\theta - 1)$, uma dependência oscilatória com o tempo. Uma forma de eliminar esta dependência é girar a amostra, a uma alta frequência em trono de um ângulo de tal forma que se anule estes termos. Este ângulo é

chamado de ângulo mágico e seu valor é $\theta = 54{,}74°$ (Figura 22) (BUHAI et al., 2004).

Figura 22: O valor do ângulo mágico é 54,47°. Este ângulo esta entre a direção do campo magnético externo e o eixo de qualquer amostra que está sob rotação.



2.3.2 Polarização Cruzada *(Cross polarization)*

A polarização cruzada (CP) (PINES et al., 1972) é um dos método mais utilizado na RMN de estado sólido para o aumento de sinal. Neste método, a magnetização de um spin abundante I, como por exemplo 1H, é transferida ao spin menos abundante S, o 13C ou 15N. A sequência de pulsos de CP padrão utilizada é mostrada na Figura 23. Primeiro, um pulso de 90° é aplicado sobre o canal de próton ao longo do eixo X, o qual move a magnetização do próton da direção Z para a direção Y (plano XY), seguido por um tempo de contato durante o qual a magnetização do 1H gira ao longo do eixo Y, deslocando a direção do campo de RF do 1H da direção X para a direção Y, enquanto um campo de RF no spin S é aplicado ao mesmo tempo. Durante esse tempo de contato, o spin abundante I transfere polarização para o spin raro S. Finalmente, os sinais do spin S são adquiridos sob o desacoplamento de banda larga de alta potencia do 1H para obtenção do espectro. Para que ocorra a transferência máxima de magnetização, a condição de Hartman-Hahn precisa ser satisfeita durante o tempo de contato. Normalmente, dois spins heteronucleares ressoam cada um em suas respectivas frequências:

$$\omega_I = \gamma_I . B_0 \, , \tag{75}$$

$$\omega_S = \gamma_S . B_0 \, . \tag{76}$$

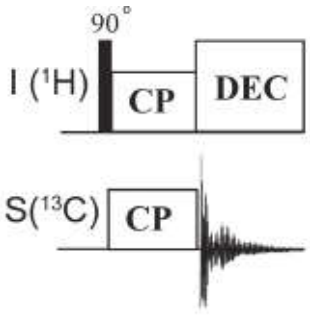
Quando campos ressonantes são aplicados para I e para S, suas frequências de precessão são:

$$\Omega_I = \gamma_I . B_{1I} \, , \tag{77}$$

$$\Omega_S = \gamma_S . B_{1S} \, . \tag{78}$$

Para fazer as frequências de precessã se corresponderem para que a transferência de magnetização ocorra, pode-se ajustar a frequência de $\boldsymbol{B_1}$ para os núcleos I e S. Em geral, existem duas vantagens para o uso de CP: (1) a sensibilidade é reforçada por um fator de γ_I/γ_S, onde γ_I e γ_S são as razões giromagnéticas dos spins I e S, respectivamente; (2) reduz significativamente o atraso de reciclagem usado entre as acumulações de sinal sendo agora ~ 5 vezes o T_1 do ^1H do spin S.

Figura 23: Sequência de pulso para a polarização causada utilizada na técnica de rotação sob o ângulo mágico (MAS) de RMN de estado sólido. Primeiro, um pulso de 90° é aplicado sobre o próton ao longo do eixo X que move a magnetização do próton da direção Z para a direção Y (plano XY), seguido por um tempo de contato durante o qual a magnetização do 1H gira ao longo do eixo Y, deslocando a direção do campo de RF do 1H da direção X para a direção Y, enquanto um campo de RF no spin S é aplicado ao mesmo tempo. Durante esse tempo de contato, o spin abundante I transfere polarização para o spin raro S. Finalmente, os sinais do spin S são adquiridos sob o desacoplamento do 1H para obtenção do espectro.



2.3.3 Desacoplamento Heteronuclear

Para núcleos com spin ½, as interações de spin nuclear relevantes são os deslocamentos químicos e as interações dipolares homo e heteronucleares. No caso

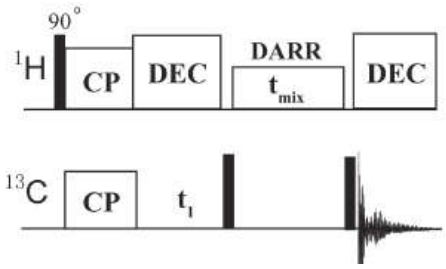
específico de ^{13}C, cuja abundância natural é de ~1%, a interação dipolar homonuclear pode ser desprezada, restando o deslocamento químico e a interação dipolar heteronuclear, ^{1}H-^{13}C. Geralmente, a interação dipolar heteronuclear predomina no espectro, tornando-se extremamente impossível a observação de padrões de deslocamento químico para ^{13}C quando a interação dipolar ^{1}H-^{13}C está presente. No entanto, existem técnicas tradicionais capazes de eliminar ou reduzir drasticamente os efeitos da interação dipolar ^{1}H-^{13}C. Dentre essas técnicas, a mais utilizada é o método de desacoplamento heteronuclear por irradiação contínua. A técnica de Desacoplamento Dipolar Heteronuclear (DEC) foi proposta originalmente por Sarles e Cotts (SARLES; COTTS, 1958). O desacoplamento é feito por meio da redução do $\boldsymbol{B_{eff}}$, produzido pelo dipolo magnético do núcleo I (abundante) ao longo da direção Z, a partir da aplicação de uma RF (seletiva). A interação para o caso do ^{13}C (abundância ~1%), é do tipo heteronuclear ^{1}H-^{13}C diretamente ligados ou próximos. O desacoplamento de núcleos diretamente ligados ^{1}H-^{13}C (da ordem de 100-300 kHz) é incompleta, mas é total para núcleos separados (da ordem de 1-10 Hz).

2.3.4 Reacoplamento Homonuclear (*Homonuclear recoupling*)

As técnicas de reacoplamento dipolar de homonucleares de banda larga podem refazer acoplamentos dipolares de rotações por meio de uma ampla gama de mudanças químicas, permitindo a geração de espectros de correlação ^{13}C-^{13}C de estado sólido, relacionados com os espectros de NOESY e TOCSY em RMN solução. A espectroscopia de correlação 2D ^{13}C-^{13}C é uma das ferramentas mais importantes para estabelecer a conectividade das redes de rotação e obter restrições de distância carbono-carbono na determinação estrutural de proteínas. A Figura 24 mostra a sequência de pulso geral usada para experimentos de correlação 2D ^{13}C-^{13}C. No início da sequência, os sinais ^{13}C são aumentados pelo ^{1}H por CP padrão. Então, essas mudanças químicas do ^{13}C evoluem na dimensão t1 (ou dimensão indireta) sob o desacoplamento ^{1}H de alta potência. No final da dimensão t1, um pulso de 90° é aplicado para virar a magnetização ^{13}C para o eixo Z, seguido de um tempo de mistura (*mixing time*) durante o qual ocorre a difusão de spin ^{13}C-^{13}C. A difusão de spin é baseada em acoplamentos dipolares através do espaço e, portanto, a magnetização ^{13}C de um sítio será transferida para outros sítios ^{13}C

durante o *mixing time*. Em geral, a difusão de spin ^{13}C-^{13}C é relativamente lenta. Portanto muitos métodos foram desenvolvidos para melhorar a taxa de difusão de rotação. Por exemplo, a difusão de rotação impulsionada por prótons (PDSD) (BLOEMBERGEN, 1949), Ressonância Rotacional Assistida Dipolar (DARR) (TAKEGOSHI et al., 2001) e Recuperação por Radiofreqüência (RFDR) (BENNETT et al., 1998). DARR usa pulso ^{1}H de baixa potência durante o período de mistura. Quando a amplitude da RF de ^{1}H coincide com a taxa de rotação da amostra, os acoplamentos dipolares ^{1}H-^{13}C são parcialmente recuperados para facilitar a difusão do spin ^{13}C-^{13}C. A configuração do *mixing time* pode ser de até 1-2 s, dependendo das distâncias ^{13}C-^{13}C a serem investigadas. Após o tempo de mistura, outro pulso de 90° é aplicado para que a magnetização ^{13}C volte ao plano transversal para observação sob um desacoplamento ^{1}H de alta potência na dimensão t2 (ou a dimensão de observação direta).

Figura 24: Sequência de pulso de experimento de correlação ^{13}C-^{13}C (DARR). Primeiramente os sinais de 13C são aumentados por CP, seguido pela evolução das mudanças químicas de 13C durante t1. Após o término de t1 um pulso é aplicado em 13C durante um tempo de mistura (*mixing time*) no qual ocorre difusão 13C-13C. Após o *mixing time*, um pulso de 90° é aplicado para que a magnetização volte ao plano transversal para sua observação durante o desacoplamento de 1H.



CAPÍTULO 3

SH, ESTUDO ESTRUTURAL E ALVO DE BUSCA DE NOVOS INIBIDORES CONTRA HRSV

3. Introdução

Trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa da Professora Dra. Fátima Pereira de Souza têm foco na busca de inibidores de infecções respiratórias causadas pelo vírus sincicial respiratório humano (HRSV). O grande esforço do grupo em busca de novos inibidores de infecções respiratórias causadas por HRSV se deve ao fato dele ser o principal causador de infecções respiratórias agudas (IRAs), principalmente em crianças, idosos e imunocomprometidos (FAUROUX et al., 2017; SHI et al., 2017). Em países em desenvolvimento, 3,4 milhões de indivíduos são internados (com destaque para crianças de seis meses ou menos de idade) havendo a morte de 66 mil a 199 mil pessoas (RODRIGUEZ; RAMILO, 2014; SHI et al., 2017). No entanto, mesmo o HRSV sendo o causador maioritário das IRAs, os tratamentos com antivirais utilizados (a ribavirina, o palivizumabe e o motavizumabe) envolvem consideráveis efeitos adversos, além de elevado custo.

Muitos estudos de viroporinas são descritos na literatura, principalmente para as proteínas M2 do vírus Influenza, P7 do HCV, e Vpu do HIV. No entanto, apesar destes serem alvo de tantos estudos, suas funções e mecanismos não foram completamente elucidados. Em contrapartida, o inibidor BIT225 encontrado para a viroporina p7 mostra eficácia em tratamento de infecções virais, o que encoraja a busca por novos e mais específicos inibidores virais. Como a estrutura das viroporinas determina como a droga pode se ligar e causar sua inibição, estudos estruturais dessas proteínas são de importância fundamental. Além disso, a regulação da homeostase celular pode fornecer informações importantes sobre alguns processos específicos do vírus e do hospedeiro, como transporte pela membrana, apoptose e ativação de inflassomas. Desta forma, explorar a estrutura, bem como a atividade do canal iônico da proteína SH, é altamente relevante para a elucidação de alguns mecanismos do hRSV e do próprio hospedeiro.

3.1. Objetivos

O presente estudo teve como objetivo explorar a estrutura da proteína SH em seu estado monomérico e pentamérico, a sua atividade de canal e o mecanismo de portão envolvido, a fim de buscar informações estruturais e funcionais importantes em processos específicos do vírus e até mesmo do hospedeiro.

3.1.1. Objetivos Específicos

- Avaliar o mecanismo de interação da proteína SH completa com bicamadas lipídicas por alinhamento sequencial e por simulação computacional na presença de bicamadas lipídicas compostas por POPC;

- Avaliar as características estruturais da proteína SH completa e do peptídeo transmembrânico em diferentes composições lipídicas (POPC, DMPC e domínios de *raft*);

- Avaliar a estrutura do pentâmero da proteína SH completa e do domínio transmembrânico em diferentes estados de protonação das histidinas H22 e H51 e em bicamadas de POPC e DMPC;

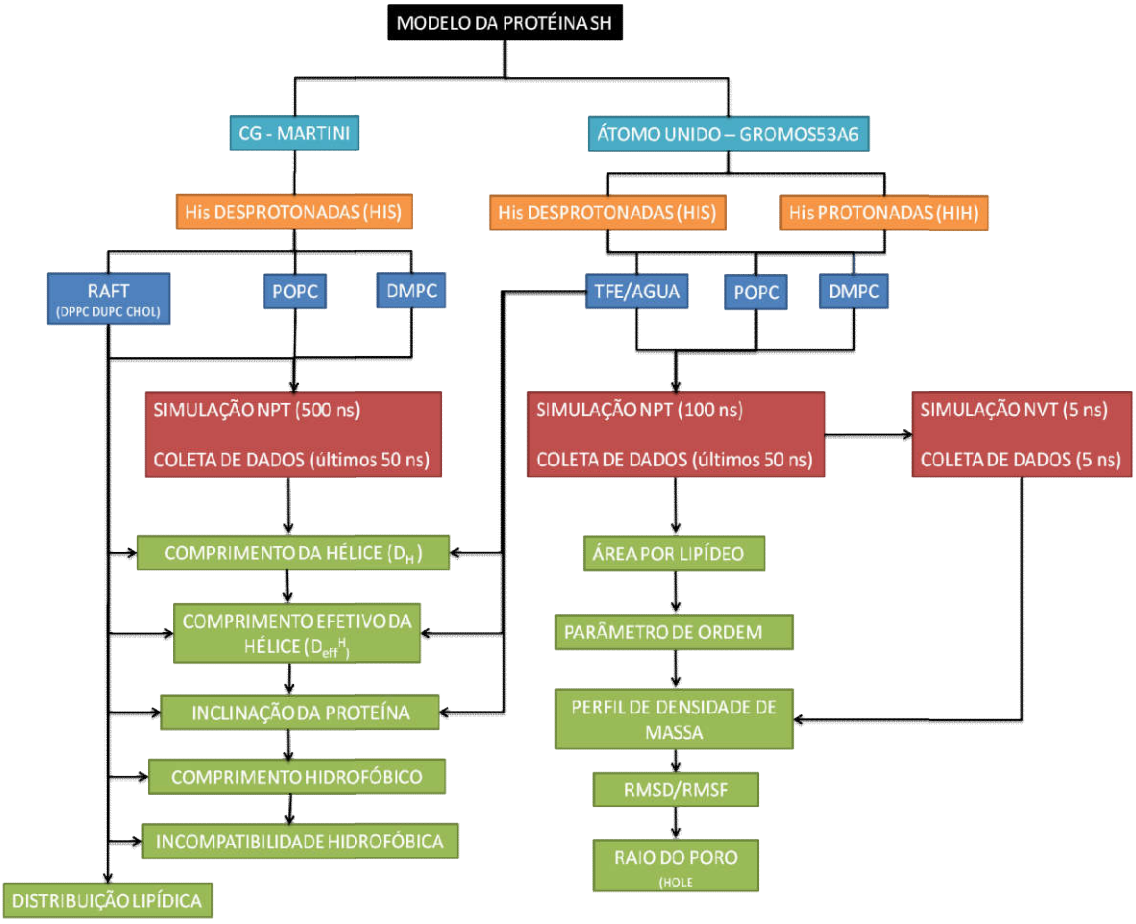
- Avaliar e caracterizar a atividade de canal da proteína em ambiente onde a concentração de íons mimetiza a concentração salina em células;

- Avaliar e caracterizar qual o tipo de mecanismo de portão que a proteína SH apresenta para a atividade de canal;

- Avaliar o papel das regiões transmembrânica (TM), N e C-terminal da proteína SH.

3.2. Materiais e Métodos

Figura 25: Desenho experimental do projeto. Os quadros laranjas, azuis, vermelhos e verdes representam,respectivamente, as etapas de preparação dos sistemas, os diferentes ambientes de simulação, tempos e parâmetros das simulações de dinâmica molecular e analises realizadas. Em ciano é a metodologia adotada, os campos de força utilizados.



A dinâmica molecular foi a principal técnica abordada no estudo da proteína SH. As simulações foram realizadas utilizando o pacote GROMACS, versão 4.5.5. As estruturas utilizadas nas simulações foram cedidas por Gan e colaboradores (GAN et al., 2012). Todas as simulações foram realizadas no Instituto de Biociências Letras e Ciências exatas (IBILCE) utilizando o *cluster* do Professor Vitor Leite (FAPESP: 2011/17658-3).

3.2.1 Sistemas simulados

Os sistemas simulados compreendem a estrutura monomérica da proteína SH completa (SH) e sua região transmembrânica (SH-TM), além da estrutura pentamérica do canal iônico da proteína completa (SH) e do peptídeo transmembrânico (SH-TM) nas conformações com os resíduos e aminoácidos H22 e H51 protonados e desprotonados. Estes sistemas foram inseridos em membranas fosfolipídicas, hidratadas, com uma solução iônica de 150 mM. Além disso, contraíons foram adicionados para manter o sistema neutro (Figura 25). Detalhes da preparação e composição dos sistemas estão detalhados no Apêndice I.

3.2.2 Protocolos de Simulação

3.2.2.1 Simulação Atomística

As estruturas 3D utilizadas neste estudo são estruturas da proteína SH obtidas por RMN de solução na presença de micelas de DMPC fornecidos por Gan e colaboradores (GAN et al., 2012). Todas as simulações foram conduzidas no programa de dinâmica molecular GROMACS versão 4.5.5 (PRONK et al., 2013). Nose-Hoover foi empregado para manter constante a temperatura de 37°C (310 K) e a pressão em 1 atm. Condições periódicas de contorno (PBC) foram aplicadas nos eixos x, y, e z, a fim de evitar efeitos de borda nos limites do sistema. O algoritmo *leap-frog* foi utilizado para a integração das equações de movimento, com um passo de integração de 2 fs. Interações de curto e longo alcance foram computadas a cada 1 e 2 passos de integração, respectivamente. As ligações químicas entre os hidrogênios e os demais átomos do sistema foram restringidas a seu valor de equilíbrio com o algoritmo SHAKE. Interações eletrostáticas de longo alcance foram computadas pelo algoritmo PME (do inglês *Particle Mesh Ewald*) (ESSMANN et al., 1995). As simulações empregaram o campo de força Gromos53A6 para proteínas e lipídeos (OOSTENBRINK et al., 2004a). Os íons utilizados foram Na+ e Cl-, com carga +1 e -1, respectivamente. Moléculas de água são descritas pelo modelo SPC (BERENDSEN et al., 1981). Imagens dos sistemas moleculares foram preparadas com os programas *Visual Molecular Dynamics* (VMD), PyMOL e *UCSF Chimera*.

3.2.2.2 Coarse Grained

Todas as simulações foram realizadas usando GROMACS versão 4.5.5 (PRONK et al., 2013). Os parâmetros *coarse grained* (CG) utilizados para lipídeos (DPPC, DUPC, CHOL, POPC e DMPC), íons, moléculas de água e aminoácidos são os descritos por Marrink et al (MARRINK et al., 2007; RISSELADA; MARRINK, 2008). Para todas as simulações CG, a lista vizinha não vinculada foi atualizada a cada 10 etapas. Todas as simulações foram realizadas a temperatura, pressão e número de partículas constantes. As temperaturas da proteína, lipídeos e solvente foram, cada uma, acopladas ao banho separadamente usando o algoritmo de Berendsen (BERENDSEN et al., 1984) em 310 K, com uma constante de acoplamento 1 ps. A pressão do sistema foi anisotropicamente acoplada usando o algoritmo Berendsen em 1 bar, com uma constante de acoplamento de 1 ps. O tempo de integração utilizado foi 40 fs e as coordenadas foram salvas a cada 400 ps para análise subsequente. As análises foram realizadas usando ferramentas GROMACS. Imagens dos sistemas moleculares foram preparadas com o programa *Visual Molecular Dynamics* (VMD).

3.3. Resultados e discussões

3.3.1. SH e as viroporinas e seu mecanismo de inserção em membranas

A correta localização das viroporinas é crítica para que elas possam desempenhar sua função corretamente. Estudos indicam que os princípios e as forças que descrevem seu caminho e levam sua inserção em membranas são os mesmos desempenhados pelas proteínas de membranas celulares (MARTINEZ-GIL; MINGARRO, 2015).

Um dos caminhos que leva a inserção de proteína de membrana à membrana é a inserção dirigida por sequência sinal (SS) ou segmento transmembrânico (TM). A sequência sinal (SS) é uma sequência de aminoácidos hidrofóbicos (de 6 a 20) com um ou mais resíduos básicos nas extremidades localizada na região N-terminal da proteína. O segmento transmembrânico é normalmente composto por 20 a 30 aminoácidos, na sua grande maioria, hidrofóbicos, como a alanina, leucina e isoleucina. Os extremos do segmento TM podem conter resíduos carregados, os

quais interagem com a cabeça polar dos fosfolipídeos da bicamada lipídica (VON HEIJNE, 1988).

Sequências de viroporinas pertencentes à Classe I (M2 do vírus Influenza, Vpu do HIV, proteína E do coronavírus e a proteína SH do hRSV) foram analisadas com objetivo de identificar a presença de sequência sinal (SS).

Figura 26: Sequências das viroporinas SH do HRSV, M2 do vírus Influenza, Vpu do HIV e proteína E do coronavírus. A região sublinhada representa a região transmembrânica (TM).

```
                                  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                           10         20         30         40         50
tr|X5FML2|X5FML2_9MONO Small h   ---------- --------ME NTS--ITIEF SSK-FWPYFT LIHMITTIIS
tr|Q9DH68|Q9DH68_9MONO SH prot   ---------- --------MG NTS--ITIEF TSK-FWPYFT LIHMILTLIS
sp|P59637|VEMP_CVHSA Envelope    ---------- ----MYSFVS EETGTLIVNS VLL-FLAFVV FLLVTLAILT
tr|X2GKV1|X2GKV1_9INFA Matrix    MSLLTEVETP TRNGWECKCS DSSDPLVIAA SIIGILHLIL WILDRLFFKC
sp|P05919|VPU_HV1H2 Protein Vp   ---------- ---------Q PIPIVAIVAL VVAIIIAIVV WSIVIIEYRK

                                  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                           60         70         80         90        100
tr|X5FML2|X5FML2_9MONO Small h   LLI--IISIM IAILN-KLCE YNVFHNKTFE -LPRA-RVNT ----------
tr|Q9DH68|Q9DH68_9MONO SH prot   LLI--IITIM IAILN-KLSE HKTFCNKTLE -QGQMYQINT ----------
sp|P59637|VEMP_CVHSA Envelope    ALR--LCAYC CNIVNVSLVK PTVYVYSRVK NLNSSEGVPD LLV-------
tr|X2GKV1|X2GKV1_9INFA Matrix    IYR--RLKYG LKRGPSTEGV PESMREEYRQ EQQNAVDVDD GHFVNIELE-
sp|P05919|VPU_HV1H2 Protein Vp   ILRQRKIDRL IDRLIERAED SGNESEGEIS ALVEM-GVEM GHHAPWDVDD

                                  .

tr|X5FML2|X5FML2_9MONO Small h   -
tr|Q9DH68|Q9DH68_9MONO SH prot   -
sp|P59637|VEMP_CVHSA Envelope    -
tr|X2GKV1|X2GKV1_9INFA Matrix    -
sp|P05919|VPU_HV1H2 Protein Vp   L
```

Analisando as sequências das viroporinas na Figura 26, podemos identificar uma grande quantidade de resíduos hidrofóbicos, como leucina (L), isoleucina (I), valina (V), alanina (A) e glicina (G), principalmente no domínio transmembrânico (DTM) (região sublinhada na Figura 26). Para as viroporinas analisadas, a região TM está a pelo menos 18 aminoácidos distante do N-terminal. Para a Vpu, o início do TM ocorre no sexto aminoácido da sua sequência. No entanto, não observamos a presença de aminoácidos básicos na extremidade N-terminal. Estas análises corroboram com os estudos de Martinez e Mingarro, que sugerem que a alta quantidade de resíduos hidrofóbicos, principalmente leucinas e isoleucinas, é o que faz dessa classe de viroporinas ser capaz, com um único domínio TM, de interagir e ancorar com a membrana, sem a necessidade de proteínas reconhecedoras de sinal (PRS) (MARTINEZ-GIL; MINGARRO, 2015).

A porcentagem de resíduos carregados e os valores de pI das viroporinas selecionadas estão apresentado na Tabela 4. A proteína M2 do vírus Influenza, juntamente com a proteína Vpu do HIV possuem mais resíduos carregados, 27% e 29%, respectivamente. Já a proteína SH do hRSV, são 14% para o tipo A e 10,8% para o tipo B, e a para proteína E do CoV, 10,4%. Destes resíduos carregados, todas as viroporinas listadas apresentam a região N-terminal com menor quantidade de resíduos carregados (SH-HRSVA: 5%, SH-HRSVB: 3%, E-CoV: 3%, M2-INF: 6%, Vpu-HIV: 0.0%) quando comparadas com a região C-terminal (SH-HRSVA: 8%, SH-HRSVB: 7%, E-CoV: 8%, M2-INF: 20%, Vpu-HIV: 28%). Aminoácidos carregados nas regiões terminais, juntamente com aminoácidos aromáticos, possuem uma grande influência sob a orientação de segmentos transmembrânicos, uma vez que suas interações com a membrana são muito mais específicas do que as dos aminoácidos hidrofóbicos (HOLT; KILLIAN, 2010).

Tabela 4: Viroporinas pertencentes à Classe 1 (SH do HRSV, E do coronavírus, M2 do vírus Influenza, Vpu do HIV) com o número de aminoácidos e posição da região transmembrânica, porcentagem de resíduos carregados nas regiões N-terminal, transmembrânica (TM) e C-terminal, posição dos resíduos de histidinas e valor do ponto isoelétrico (pI).

viroporinas	Número de aminoácidos (posição TM)	Resíduos carregados (%)			Resíduos de HIS (posição na Figura 26)	pI
		N-terminal	TM	C-terminal		
SH (HRSV-A)	64 (18-43)	5 %	1%	8%	H22 (43) H51(75)	7,9
SH (HRSV-B)	65 (18-43)	3%	1%	7%	H22 (43) H (71)	7,9
E (CoV)	76 (17-37)	3%	-	8%	-	6,0
M2 (IAV)	97 (23-43)	6%	1%	20%	H37 (37) H90 (92)	4,94
Vpu (HIV)	81 (6 -28)	0%	1%	28%	H72 (92) H73 (93)	4,64

Os valores do ponto isoelétrico das viroporinas também se diferenciam para os mesmos dois grupos: M2 e Vpu com pI igual a 4,94 e 4,64, e SH e E com valores de pI de 7,9 e 6,0, respectivamente (vide Tabela 4). Não há estudo que relata o pI das viroporinas como uma propriedade importante para sua função ou até mesmo para a sua estrutura. Mas vale lembrar a importância dessa propriedade, principalmente na sua produção por biologia molecular, uma vez que este valor estabelece a

metodologia empregada nos seus protocolos de expressão e purificação. Além disso, diferentes compartimentos celulares e diferentes estados celulares apresentam pHs característicos, podendo o pI das viroporinas influenciar a sua estrutura e função dependendo do ambiente e estado celular em que elas estiverem presentes.

Os resíduos de histidinas das viroporinas são relatados na literatura como altamente importantes para a atividade de canal dessas proteínas devido a seus estados de protonação (GAN et al., 2012; MANDALA et al., 2017). A proteína SH possui dois resíduos, um localizado no início da região TM (H22- posição 43 na Figura 26) e outro localizado próximo à região C-terminal (H51- posição 75 na Figura 26). Estudos de atividade de canal do pentâmero da proteína SH completa ou somente do peptídeo TM sugerem a H22 como um resíduo importante para este mecanismo, e relatam um papel mais estrutural para a H51 (GAN et al., 2008, 2012). A proteína M2 também possui dois resíduos de histidinas, a H37 localizada na região TM (posição 37 na Figura 26) que é a principal responsável pela atividade de canal dessa protéina, e a H90 (posição 92 na Figura 26) localizada no C-terminal da proteína. Para a proteína M2, a condução de prótons acontece quando o conjunto formado pelos quatro resíduos de H37, cada um proveniente de cada monômero, apresenta-se com carga +3 (CHEN et al., 2007; OKADA et al., 2001). A proteína E não apresenta nenhuma histidina ao longo de toda a sua sequência, e a Vpu também não possui resíduos de histidinas no domínio TM, mas ambas também possuem atividade de canal (EWART et al., 1996; YE; HOGUE, 2007).

Outro resíduo chave para o mecanismo de canal da proteína M2 do vírus Influenza é o resíduo de W41 (posição 41 na Figura 26). Ele é responsável pelo controle da protonação da H37 (posição 37 na Figura 26) pelo C-terminal do domínio TM e assim, direcionar o fluxo de prótons para o interior viral (MANDALA et al., 2017) (Figura 5 B). As proteínas SH e Vpu também apresentam resíduos de triptofano no domínio TM. Para a proteína SH, o resíduo de triptofano está localizado na região N-terminal do domínio TM (W15 - posição 36 na Figura 26), enquanto que para a Vpu, ele está na região C-terminal do domínio TM (W31 - posição 41 na Figura 26), que é a mesma região do W41 da proteína M2. No entanto, não há resíduos de histidinas no domínio TM da Vpu e para a proteína SH, o resíduo de histidina do domínio TM

encontra-se mais afastado em relação ao tirptofano (WxxxxxxH) quando comparado com a proteína M2 (HxxxW) (Figura 26).

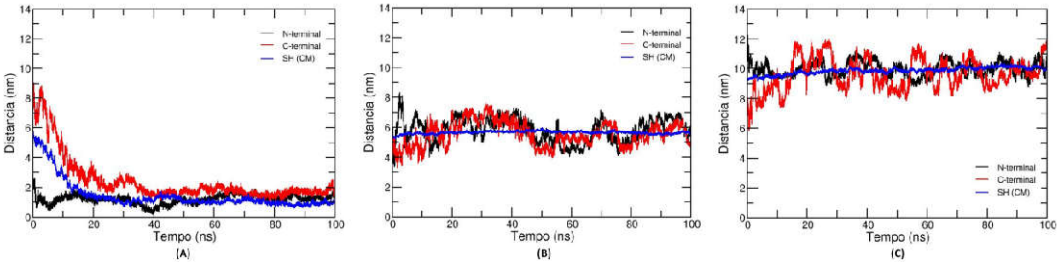
Embora a principal característica das viroporinas é formar oligômeros capazes de transportar íons ou pequenas moléculas, suas diferenças de estrutura e de sequência indicam também diferentes mecanismos de ativação desta atividade transportadora e diferentes funções ou localizações para estas proteínas durante o ciclo viral.

Um segundo mecanismo de interação e inserção em membranas, é quando a proteína é dirigida e inserida na membrana sem o auxílio de nenhuma outra proteína ou partícula, assim como ocorre, por exemplo, com o citocromo b5, que demonstra a possibilidade da existência de um mecanismo de inserção livre (BRAMBILLASCA et al., 2006).

Com base na possibilidade de um mecanismo de interação com membrana livre de outra proteína ou partícula e considerando a grande quantidade de resíduos hidrofóbicos, principalmente na região TM, simulações da proteína SH completa e SH-TM na presença de bicamadas de POPC foram realizadas com o objetivo de verificar possíveis mecanismos de interação com a membrana e analisar a influência das regiões terminais neste processo.

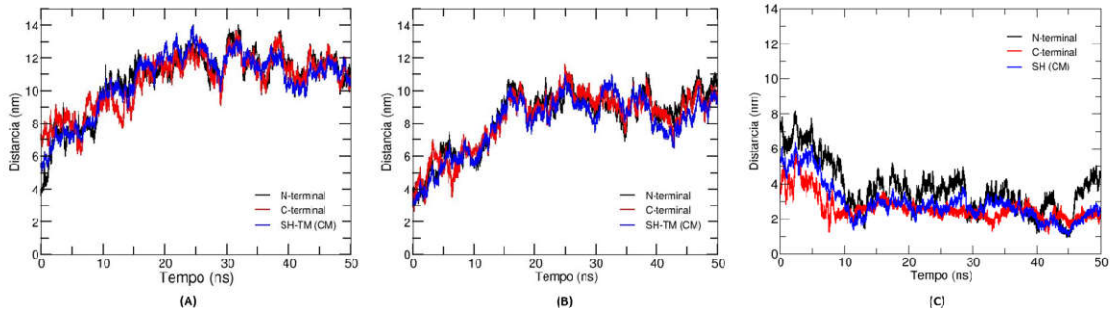
A Figura 27 mostra a evolução das distâncias entre o primeiro (N-terminal) e o último (C-terminal) resíduo da proteína SH com o grupo fosfato (PO4) da molécula de POPC. Para o tempo de simulação realizado (100 ns), o modelo com o N-terminal direcionado para a bicamada mostrou uma preferência de interação com a superfície da bicamada. Para as outras posições, a proteína não mostrou dirigir-se para a superfície lipídica. No entanto, no final do gráfico (B) da Figura 27, inicia-se uma tendência em diminuir a distância entre o N e C terminal da proteína com a superfície da bicamada. Devemos lembrar também que 100 ns de simulação pode não ser suficiente para que tal evento seja observado.

Figura 27: Distancia entre o centro de massa do resíduo M1 (N-terminal) em vermelho, do resíduo Y64 (C-terminal) em preto e da proteína (SH-CM) em azul em relação ao grupo fosfato PO4. A estrutura da proteína SH foi direcionada em diferentes posições: (A) com o N-terminal orientado para a bicamada; (B) Paralela a bicamada e (C) com o C-terminal orientado para a bicamada.



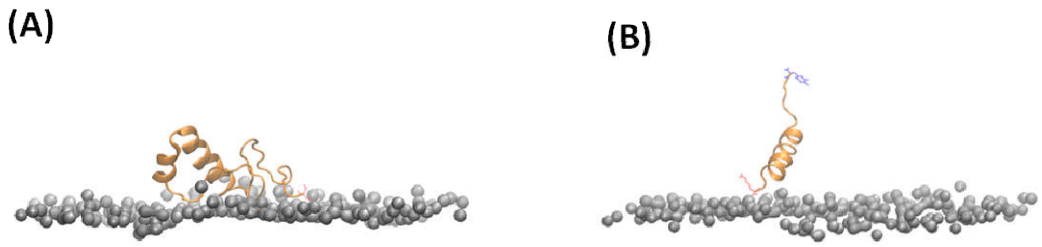
Os mesmos sistemas foram simulados (50 ns) para o peptídeo TM da proteína SH (Figura 28). Neste caso, podemos observar a interação do peptídeo com a membrana quando ele estava direcionado com a região C-terminal para a bicamada (vide Figura 28 C).

Figura 28: Distância entre o centro de massa do resíduo 17 (N-terminal) em vermelho, do resíduo 43 (C-terminal) em preto e do peptídeo TM (SH-CM) em azul em relação ao grupo fosfato PO4. A estrutura do peptídeo TM foi direcionado em diferentes posições: (A) com o N-terminal orientado para a bicamada; (B) Paralela a bicamada e (C) com o C-terminal orientado para a bicamada.



Na Figura 29, podemos visualizar o último frame das simulações com a proteína SH completa e o peptídeo TM que apresentaram interação com a bicamada.

Figura 29: Visualização da estrutura do ultimo frame da (A) proteína SH completa e (B) do peptídeo TM em interação com a bicamada de POPC.



Estudo de interação e inserção de proteínas em membranas é ainda um grande desafio tanto para as abordagens computacionais como para as experimentais. O ambiente celular é um ambiente bastante complexo, além de ser repleto de mecanismos ainda não desvendados. No entanto, vale ressaltar algumas características funcionais e estruturais que podem ser analisadas em sistemas mais simples, como o mostrado nesta seção.

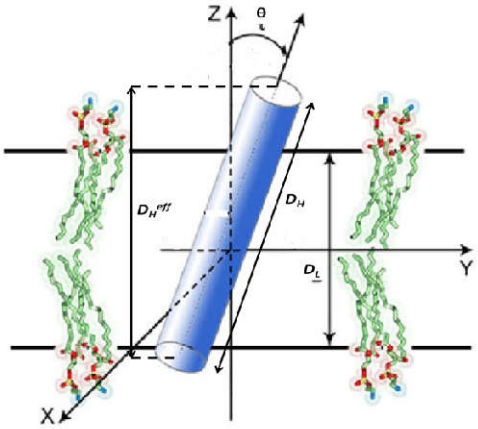
3.3.2. Estrutura e influência dos monômeros em diferentes ambientes e composições lipídicas

Analisando o banco de dados de estruturas (PDB), uma grande diferença nas estruturas terciárias de proteínas é obervada quando se muda a solução ou o meio onde ela foi obtida. Um exemplo desta diversidade de estruturas é encontrado para a proteína M2 do vírus Influenza (Figura 6). Além disso, sabe-se que a atividade funcional de muitas proteínas de membrana depende das propriedades da membrana, como composição lipídica e espessura (ANDERSEN; KOEPPE, 2007; CYMER et al., 2012; HOLT; KILLIAN, 2010). Portanto, o ambiente da membrana é especulado como modulador da função das proteínas de membrana, determinando não só suas estruturas terciárias e quaternárias, mas também sua dinâmica e função.

Com o objetivo de avaliar como as estruturas monoméricas da proteína SH completa (SH) e do peptídeo TM (SH-TM) se comportam em diferentes ambientes e composições lipídicas, simulações desses monômeros foram realizadas em bicamada de POPC, DMPC, miméticos de *raft* (DPPC:DUPC:CHOL, na proporção 4:3:3) e em solução de TFE/água (50:50). Para análise estrutural do monômero, foram analisadas três propriedades: I) o comprimento da hélice (D_H), medido pelo

cálculo da distância entre o centro geométrico dos quatro primeiro e dos quatro últimos resíduos que compõem a hélice TM; II) o comprimento efetivo da hélice (D_H^{eff}), que é dado pela componente z do vetor comprimento da hélice; e III) inclinação da hélice (θ), que é o angulo de inclinação do vetor comprimento da hélice ($\boldsymbol{D_H}$) em relação ao eixo perpendicular (eixo z) da bicamada (vide Figura 30).

Figura 30: Representação das propriedades calculadas para análise das conformações dos monômeros em diferentes ambientes. D_H: comprimento da hélice TM medido por meio do calculo da distância entre o centro de massa dos quatro primeiro e os quatro últimos resíduos que compõem a hélice TM; D_H^{eff}: o comprimento efetivo da hélice TM, componente z do vetor comprimento da hélice; θ: inclinação da hélice TM em relação ao eixo perpendicular (eixo z) da bicamada; D_L: espessura hidrofóbica da bicamada..



Fonte: Figura adaptada de (BENJAMINI; SMIT, 2013)

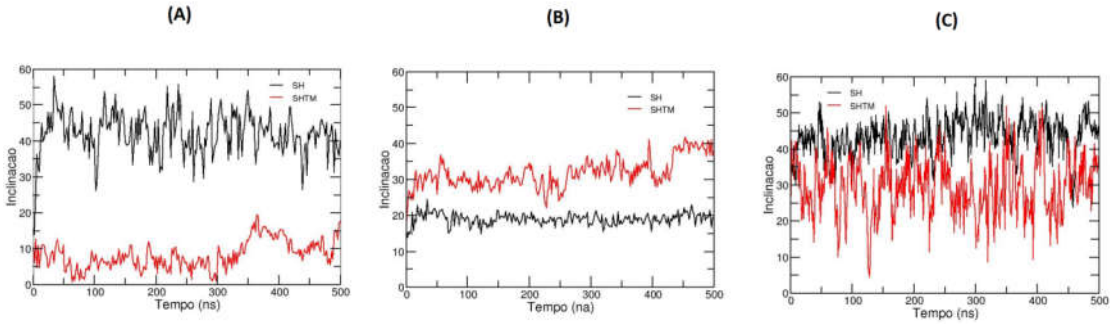
A Tabela 5 mostra os valores do comprimento da hélice TM (D_H), do comprimento efetivo da hélice TM (D_H^{eff}) e da inclinação da hélice TM (θ) para cada sistema simulado durante 500 ns. Os valores do D_H, tanto para a proteína completa como para o domínio transmembrânico mostraram-se próximos, independente do ambiente (POPC, DMPC, RAFT ou TFE/água). Analisando os valores do comprimento efetivo da hélice TM, observamos que eles são maiores para a proteína completa e menores para o peptídeo TM para os sistemas simulados em bicamada de POPC e domínio de *raft*. Já para as simulações em DMPC, o contrário é observado. A inclinação da hélice TM mostra-se maior para a proteína completa quando comparado ao peptídeo TM em bicamadas de POPC e miméticos de domínio de *raft* e o resultado inverso é observado para a simulação em DMPC.

Tabela 5: Valores do comprimento da hélice TM (D_H), comprimento efetivo da hélice TM (D_H^{eff}) e inclinação da hélice TM da proteína SH completa e do peptídeo TM em diferentes ambientes: DMPC, RAFT, POPC e água/TEF (50:50)

	Comprimento da hélice (D_H)	**Comprimento efetivo da hélice (D_H^{eff}) (nm)**	**Inclinação (θ) (graus)**	**Incompatibilidade hidrofóbica ($D_H - D_L$) (nm)**
SH-POPC	2,92 ± 0,07 nm	2,21 ± 0,13 nm	40,31 °	-0,17 ± 0,06 nm
SH-DMPC	2,86 ± 0,04 nm	2,67 ± 0,39 nm	19,90°	0,37 ± 0,03 nm
SH-RAFT	2,95 ± 0,07 nm	2,15 ± 0,26 nm	41,26°	-0,22 ± 0,06 nm
SH-TFE	2,88 ± 0,10 nm	-	-	-
TM-POPC	2,90 ± 0,06 nm	2,82 ± 0,06 nm	11,06°	-0,17 ± 0,05 nm
TM-DMPC	2,82 ± 0,06 nm	2,17 ± 0,06 nm	39,00°	0,33 ± 0,05 nm
TM-RAFT	2,89 ± 0,06 nm	2,43 ± 0,22 nm	27,61°	-0,28 ± 0,05 nm
TM-TFE	2,90 ± 0,14 nm	-	-	-

Os resultados de inclinação da hélice para os sistemas em bicamadas de POPC e miméticos de domínio de *raft* foram 40,31° e 41,26°, respectivamente. Já o peptídeo TM apresentou-se mais suscetível ao ambiente lipídico, apresentando-se mais inclinado no ambiente composto por DMPC (39,0°) e menos inclinado no sistema composto por POPC (11,06°). Ao longo de toda a simulação, podemos observar uma característica similar entre os sistemas simulados em POPC e miméticos de *raft* (Figura 31 A e C), onde a proteína SH completa apresenta uma maior inclinação da hélice comparada com peptídeo TM. O oposto é observado para os sistemas simulados em bicamadas de DMPC (Figura 31 B).

Figura 31: Inclinação da hélice da proteína SH completa (SH) em preto, e do peptídeo transmembrânico (SH-TM) em vermelho, ao longo da simulação para os sistemas compostos por bicamada de (A) POPC, (B) DMPC e (C) miméticos de domínios de *raft*.



Um fator chamado incompatibilidade hidrofóbica (do inglês h*ydrophobic mismatch*) avalia a perturbação do ambiente ao redor da hélice hidrofóbica pelo tamanho da hélice TM e pela espessura hidrofóbica da bicamada. A incompatibilidade hidrofóbica é medida pela diferença entre o comprimento da hélice TM (D_H) e a espessura hidrofóbica da bicamada (D_L):

$$\Delta d = D_H - D_L \qquad 79$$

Dependendo se a incompatibilidade hidrofóbica é positiva ($D_H > D_L$), negativa ($D_H < D_L$) ou nula ($D_H = D_L$), isso indica o quanto a hélice hidrofóbica está acomodada na bicamada lipídica. Dependendo do tamanho da hélice e da espessura da bicamada, diferentes mecanismos podem ser adotados pela proteína, a fim de se adaptar a bicamada lipídica: mudança da configuração da hélice (inclinar, dobrar, esticar ou torcer), agregação da hélice ou deformação da bicamada.

Para as bicamadas POPC, DMPC e mimético de *raft*, os valores do comprimento hidrofóbico (medido pela distância entre C2 das cadeias alcilas das monocamadas superior e inferior) foram 3,09 ± 0,03 nm, 2,49 ± 0,03 nm e 3,17 ± 0,03 nm, respectivamente. Com os valores de D_L e D_H, a incompatibilidade hidrofóbica (Δd) foi calculada para cada sistema simulado. Os resultados estão transcristos na Tabela 5.

Podemos observar que os sistemas simulados em DMPC possuem uma incompatibilidade hidrofóbica positiva (0,37 ± 0,03 nm e 0,33 ± 0,05 nm para a proteína completa (SH) e peptídeo TM, respectivamente), enquanto que os sistemas simulados em bicamadas de POPC e miméticos de RAFT apresentam

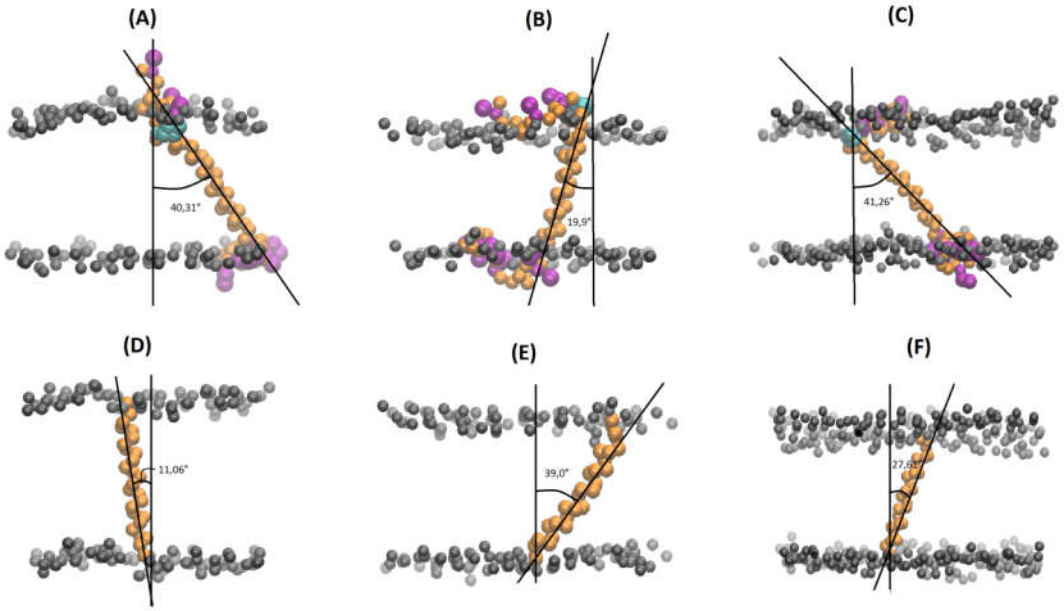
incompatibilidade hidrofóbica negativa (- 0,17 ± 0,06 nm para SH-POPC, -0,22 ± 0,06 nm para SH-RAFT, -0,17 ± 0,05 nm para SHTM-POPC e -0,28 ± 0,05 nm SHTM-RAFT). Estes resultados evidenciam a influência da espessura do comprimento hidrofóbico das bicamadas na acomodação dos monômeros e explica a diferença dos resultados obtidos para os sistemas simulados em bicamadas de DMPC.

Os resultados obtidos indicam que a proteína SH possui comprimento de hélice TM em torno de 2,89 ± 0,03 nm e este comprimento se mostra estável em diferentes composições lipídicas, independente da presença das regiões terminais da proteína SH. Essa análise indica que não ocorre estiramento ou encurtamento da hélice nos diferentes ambientes lipídicos. Além disso, mudanças na inclinação da hélice sugere esta como uma das estratégias utilizadas pela proteína SH para se acomodar à bicamada. Os resultados da Tabela 5 mostram diferentes inclinações para o monômero completo (POPC: 40,31°; DMPC: 19,9 °, RAFT: 41,26°) quando comparado ao peptídeo TM (POPC: 11,06°; DMPC: 39,00°, RAFT: 27,61°) (Figura 32). Estes valores indicam um papel das regiões terminais neste processo de “acomodação” da hélice TM na membrana. Ao mesmo tempo, os dados da incompatibilidade hidrofóbica, mostram a influência da composição lipídica na inclinação da hélice, sugerindo que a composição da membrana seja um fator importante na acomodação da hélice TM da proteína SH na bicamada, como já foi observado em estudos anteriores (BENJAMINI; SMIT, 2013; HOLT; KILLIAN, 2010).

A divergência de comportamento para o sistema simulado em bicamadas de POPC, DMPC e RAFT para a proteína SH, indica que as cadeias alifáticas dos fosfolipídeos da bicamada também contribuem para acomodação dos seus monômeros. Mesmo que as cabeças dos fosfolipídeos (POPC, DMPC, DUPC e DPPC) sejam as mesmas, o número de carbonos das cadeias alifáticas e o número de insaturações são diferentes. Para o fosfolipídio POPC há 16 carbonos para a cadeia palmitoil saturada e 18 para a cadeia oleoil com uma insaturação; para o DMPC, ambas cadeias são saturadas e possuem 14 carbonos; para DPPC ambas cadeias são saturadas e com 16 carbonos cada e DUPC são 18 carbonos e duas insaturações para cada cadeia. A presença de insaturações nas cadeias de POPC e DUPC confere um caráter menos hidrofóbico, juntamente com uma mudança na rigidez e orientação destas cadeias, gerando um ambiente menos ordenado. No entanto, a

presença de colesterol nos miméticos de *RAFT* pode influenciar neste processo de acomodação da hélice, justificando as diferenças dos resultados obtidos entre os sistemas POPC e RAFT. Esses diversos fatores, composição e espessura da bicamada e presença das regiões C e N-terminal da proteína SH, contribuem para a acomodação da hélice TM da proteína SH em diferentes ambientes lipídicos.

Figura 32: Estrutura final (último frame das simulações de 500 ns) da proteína SH completa e do peptídeo TM em: (A, D) bicamada de POPC; (B, E) bicamadas de DMPC; e (C e F) miméticos de *raft*. Os grupos fosfatos estão representados por esferas cinza, o W15 em azul ciano, os resíduos carregados em roxo e os resíduos hidrofóbicos e as histidinas em laranja.



Um resíduo de aminoácido importante para a adaptação de proteínas de membrana em membranas lipídicas é o triptofano. Este aminoácido mantém uma determinada localização e orientação na interface membrana/água assegurando uma adequada orientação da hélice TM (MARTINEZ-GIL; MINGARRO, 2015). A proteína SH completa apresenta o W15 na região N-terminal, antes do começo da região TM (posição 36 na Figura 26), e resíduos carregados nas regiões terminais conforme é observado na sequência de aminoácidos na Figura 26 e Tabela 4 e, estruturalmente, na Figura 32 (HOLT; KILLIAN, 2010). Já o peptídeo TM não possui nem o resíduo de W15 nem as regiões terminais, ficando a hélice ausente das interações desses resíduos com a superfície lipídica e, portanto, mais livre, resultando em diferentes inclinações (Figura 32 e Tabela 5). Para os sistemas simulados em bicamadas de POPC e mimético de RAFT, sugere-se que as regiões terminais interajam com a

superfície lipídica e que o resíduo de W15 posiciona-se entre a cabeça do fosfolipídio (representado pelo grupo fosfato) e a região hidrofóbica da membrana (região compreendida entre os carbonos C2 das cadeias alcilas da monocamada inferior e superior). Para os sistemas simulados em bicamadas de DMPC, observa-se também que as regiões terminais interagem com a superfície lipídica. No entanto, o W15 apresenta-se em regiões mais expostas, acima do grupo fosfato (vide Figura 32).

Deve-se ressaltar também, que as diferenças nas inclinações das hélices podem acarretar diferentes arranjos oligoméricos. Estudos estruturais experimentais e computacionais mostram que o pentâmero formado apenas pelo peptídeo TM já é suficiente para que a proteína SH tenha sua atividade de canal, mesmo que um pouco mais reduzida quando comparada à proteína completa (GAN et al., 2008). Embora, as regiões terminais sejam dispensáveis para a atividade de canal, elas podem ser importantes para a estabilização da região TM, contribuindo para uma maior eficiência da atividade de canal da proteína SH e também para as interações com outras proteínas, tanto do HRSV como do próprio hospedeiro.

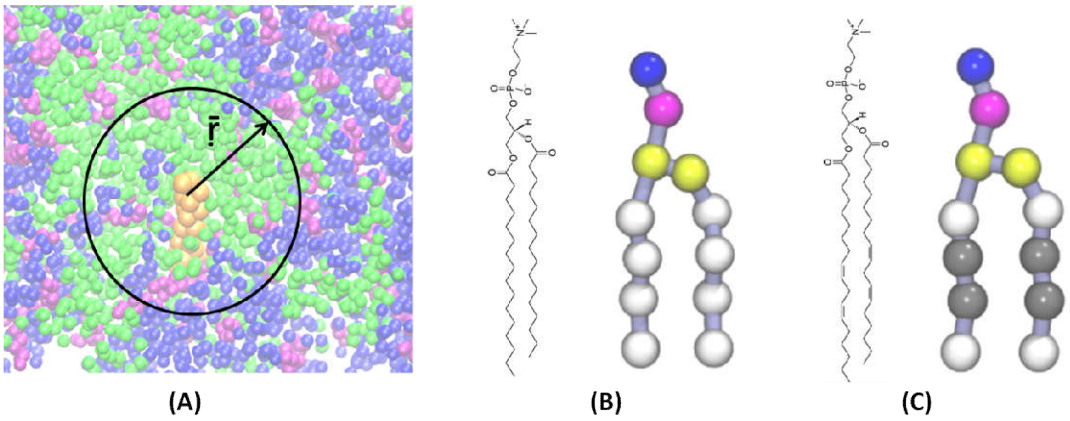
3.3.3. Proteína SH e sua interação com domínio de raft

Células infectadas por HRSV e analisadas por microscopia de fluorescência com marcação na proteína SH do retículo endoplasmático (RE), do complexo de Golgi e CTX-B (marcador usado para detectar domínios de *raft*) mostraram a presença da proteína SH na via secretora do complexo de Golgi que contém *raft* lipídico GM1. No mesmo estudo, para comprovar sua interação com domínio de *rafts*, testes de solubilização em diferentes detergentes foram realizados. Como resultado, uma grande porção da proteína SH foi encontrada na fração solúvel, sugerindo que uma porção desta proteína também reside em sistemas de membranas de não-*raft* (RIXON et al., 2004; TRIANTAFILOU et al., 2013).

Com base nos estudos realizados por Rixon e Triantafilou, a proteína SH mostrou-se presente em domínio de *raft* e *não-raft*. A fim de melhor compreender essa preferência de localização da proteína SH, uma bicamada composta por DPPC, DUPC e colesterol nas proporções (4:3:3) e na presença da proteína SH completa ou do peptídeo TM foram simuladas por 600 ns.

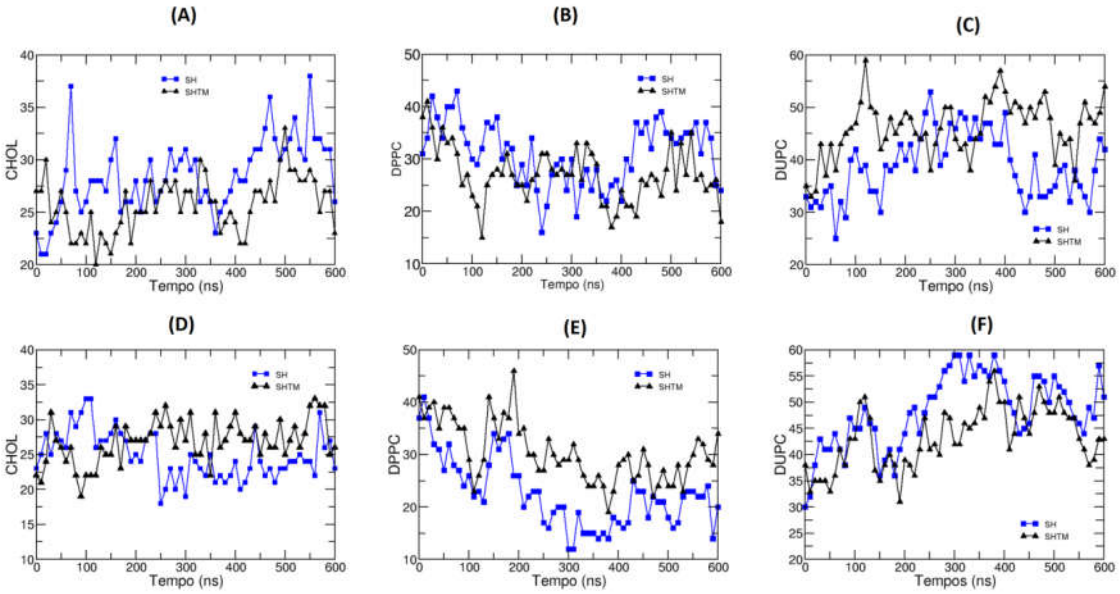
A escolha dessa composição lipídica para mimetizar domínio de *raft* - DPPC, DUPC e colesterol nas proporções (4:3:3) - foi escolhida por se tratar de um sistema com as propriedades já estudadas e analisadas na referência RISSELADA; MARRINK, 2008.

Figura 33: Representação dos modelos *corase-grained* da proteína SH em miméticos de domínio de *raft*. (A) representação de como o raio de corte foi utilizado nas análises de contagem de lipídeos, proteína SH em laranja, DPPC em azul, DUPC em verde e colesterol e roxo. Modelos atômicos e *coarse-grained* dos lipídeos (B) DPPC e (C) DUPC, com os grupos colina em azul, fosfato em roza, glicerol e amarelo, grupos alcanos com cadeia satura em branco e com cadeias insaturadas em cinza.



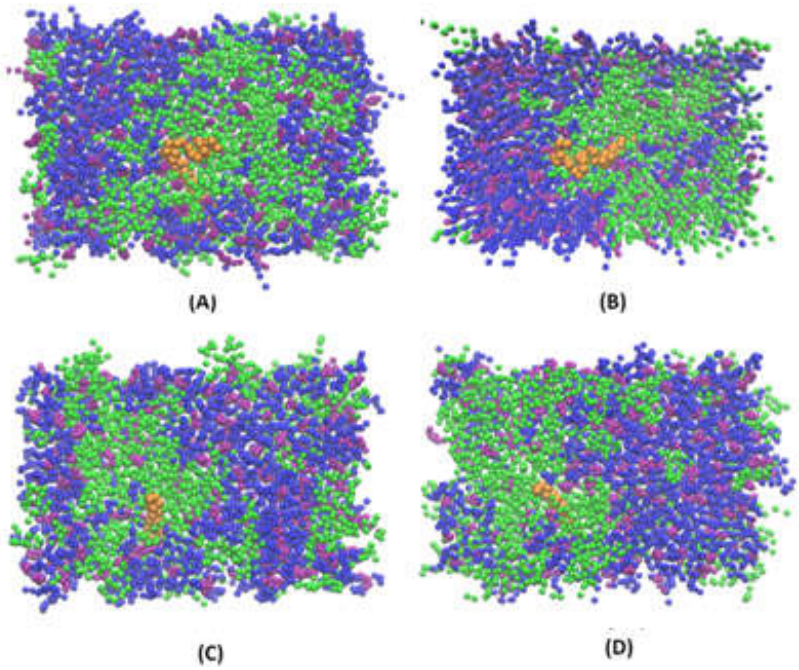
Os gráficos da Figura 34 mostram a quantidade de DPPC, DUPC e colesterol em um raio de 30 Å do centro de massa da primeira e da ultima volta da hélice da proteína SH e do peptídeo TM ao longo de 600 ns de simulação. Desta forma, podemos avaliar o número de fosfolipídeos e de colesterol em cada monocamada, superior e inferior.

Figura 34: Quantidade de colesterol (CHOL), DPPC e DUPC em um raio de 30 Å do centro de massa da primeira e última volta da hélice TM da proteína completa e do peptídeo TM ao longo da simulação. Número de moléculas de (A) CHOL, (B) DPPC e (C) DUPC para a monocamada superior e número de (D) CHOL, (E) DPPC e (F) DUPC para a monocamada inferior para os sistemas contendo a proteína SH (azul) e o peptídeo TM (preto).



Analisando a quantidade de fosfolipídeos, podemos observar diferenças na quantidade de fosfolipídeo e colesterol tanto para a proteína SH completa como para o peptídeo TM (Figura 34). Após 200 ns, para a monocamada superior (Figura 34 A, B e C), onde esta localizada a região N-terminal da proteína SH e peptídeo TM, observa-se uma maior quantidade de colesterol para a proteína SH, e quantidades variáveis de DPPC e DUPC para a proteína SH e o peptídeo TM. Já para o monocamada inferior (Figura 34 D , E e F), que corresponde à região C-terminal da proteína SH e peptídeo TM, a quantidade de colesterol e DPPC é menor e a de DUPC é maior para a proteína SH. O oposto é observado para o peptídeo TM. A proteína SH completa apresenta as regiões N e C-terminal com resíduos carregados e a presença do triptofano W15 na região N-terminal. Já o peptídeo TM não apresenta nem o W15 nem os resíduos carregados das regiões terminais, podendo a presença das regiões terminais ter influência na distribuição lipídica próxima à proteína SH. As configurações dos sistemas após 200 e 600 ns estão apresentadas na Figura 35.

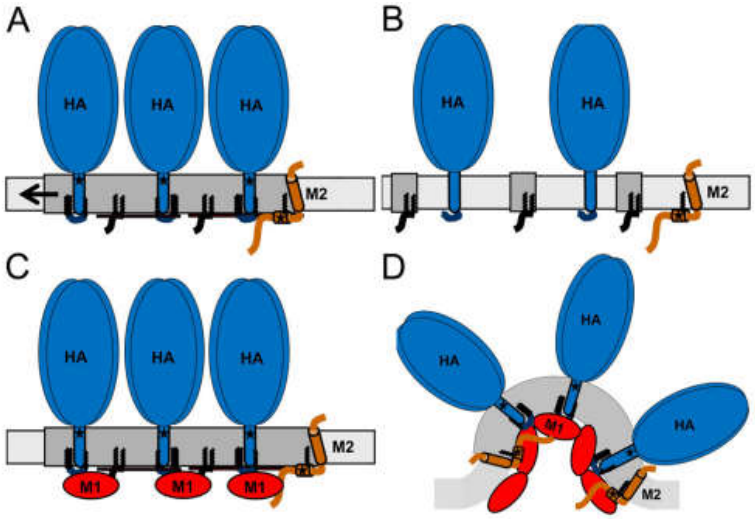
Figura 35: Proteína SH completa (SH) e peptídeo trabsmembrânico (SH-TM) inseridos em bicamadas miméticas de domínios lipídicos (*raft*) ao longo de 600 ns de simulação. (A) proteína SH completa após 200 ns e (B) 600 ns de simulação. Peptídeo TM após (C) 200 ns e (D) 600 ns de simulação. As moléculas de DPPC, DUPC, CHOL e proteína estão representadas em azul, verde, roxo e laranja, respectivamente.



As simulações indicam que tanto a proteína completa como o peptídeo TM tiveram preferência pela fase desordenada composta pelo lipídeo DUPC (verde) e colesterol (roxo), mas também ficaram próximas aos domínios mais ordenados (DPPC e colesterol) (Figuras 34 e 35). A preferência por regiões vizinhas aos domínios ordenados (verde e roxo) e desordenados (roxo e azul) corrobora com os estudos realizados por Rixon e Triantafilou, no qual a proteína SH foi encontrada tanto em compartimento de *raft* como em domínios de *não-raft*.

A mesma característica foi observada para a proteína M2 do IAV, ou seja, uma preferência por regiões entre domínio de *raft* e não-*raft*. Neste estudo, os autores relatam que a S-acilação e a região de interação com colesterol na hélice anfifílica buscam o domínio de *raft*, mas como as regiões de *raft* são mais espessas e ordenadas, a região TM da proteína M2 busca as regiões mais desordenadas, justificando a localização da proteína em interfaces *raft* e *não-raft*. Além disso, esta região é uma região de colocalização com a proteína HA e M1. Como consequência, há uma hipótese que a proteína M2 estaja envolvida na coalescência do *raft* e no brotamento de partículas virais (SCHROEDER et al., 2005).

Figura 36: Representação hipotética do papel da proteína M2 do IAV na montagem e brotamento viral. Para o caso do HRSV, em laranja seria a proteína SH, em vermelho a proteína M e em azul as proteínas G ou F.



Os resultados obtidos indicam a preferência da proteína SH e do peptídeo TM por interfaces de domínio de *raft* e *não-raft*, assim como acontece com a proteína M2. Diferenças no números de fosfolipídeos e colesterol indicam que essa localização pode ser dependente das regiões terminais. Além disso, a proteína completa apresentou maior número de colesterol do que o peptídeo TM (Figura 34 A e D). Há também evidências de interação da proteína SH com outras proteínas de superfície do HRSV, como a proteína de fusão F e a de adsorção G (FELDMAN et al., 1999; HEMINWAY et al., 1994; TECHAARPORNKUL et al., 2001). No entanto, esses sistemas foram simulados utilizando um campo de força mais simplista, portanto, não podemos confirmar a influência de interações mais específicas entre proteína e bicamada. De qualquer maneira, estes resultados preliminares sugerem um papel da proteína SH na montagem e brotamento viral, assim como acorre com outras viroporinas (NIEVA et al., 2012).

3.3.4. Estrutura pentamérica e estado de protonação das H22 e H51

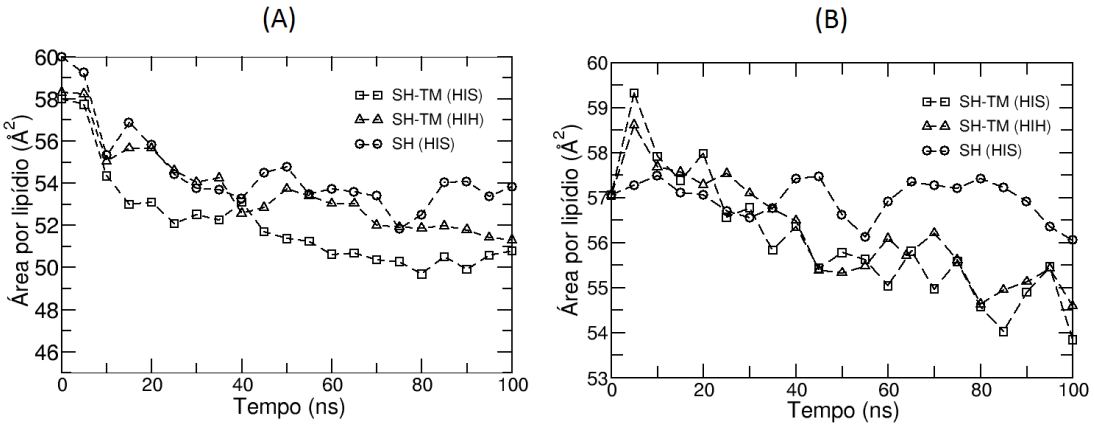
Conforme foi avaliado no item 3.3.1, a maioria das viroporinas contém resíduos de histidinas e estes têm mostrado papel importantíssimo na atividade de canal dessas viroporinas. Estudos de atividade de canal da proteína SH mostram que apenas o seu domínio TM é suficiente para a formação do pentâmero e para o funcionamento do canal. No entanto, diferenças de atividade da estrutura pentamérica são

observadas em diferentes valores de pHs, em diferentes ambientes e conformações do pentâmero (GAN et al., 2008, 2012).

Com o objetivo de avaliar como a protonação dos resíduos de H22 e H51 e o ambiente lipídico influenciam na atividade de canal e na estrutura do pentâmero, quatro sistemas foram construídos em cada uma das composições de bicamadas (POPC e DMPC): (I) pentâmero formado pela proteína SH completa com os resíduos de histidinas protonados (SH (HIH)) e (II) desprotonados (SH (HIS)); (III) pentâmero formado somente pelo peptídeo TM da SH com as histidinas protonadas (SH-TM (HIH)) e (IV) desprotonadas (SH-TM (HIS)). O sistema pentamérico da proteína SH completa com as histidinas H22 e H51 protonadas (SH-HIH), tanto em bicamada de POPC como em bicamada de DMPC, não foram analisadas por problemas na montagem e simulação do sistema.

Analisando primeiramente as propriedades da bicamada nos sistemas simulados em POPC e DMPC, podemos verificar uma menor área por lipídeo para a estrutura pentamérica da proteína SH completa com os resíduos de histidinas desprotonados (SH (HIS)), seguido pelo pentâmero do peptídeo também desprotonado (SH-TM (HIS)) e por último o pentâmero do peptídeo TM protonado (SH-TM (HIH)) (Figura 37).

Figura 37: Área por lipídeo do pentâmero da proteína SH completa sem a protonação dos resíduos H22 e H51 (SH-HIS), do pentâmero do peptídeo TM sem a protonação dos resíduos H22 (TM-HIS) e do pentâmero do peptídeo TM com a protonação dos resíduos H22 (TM-HIH) em bicamada de **(A)** POPC e **(B)** DMPC.

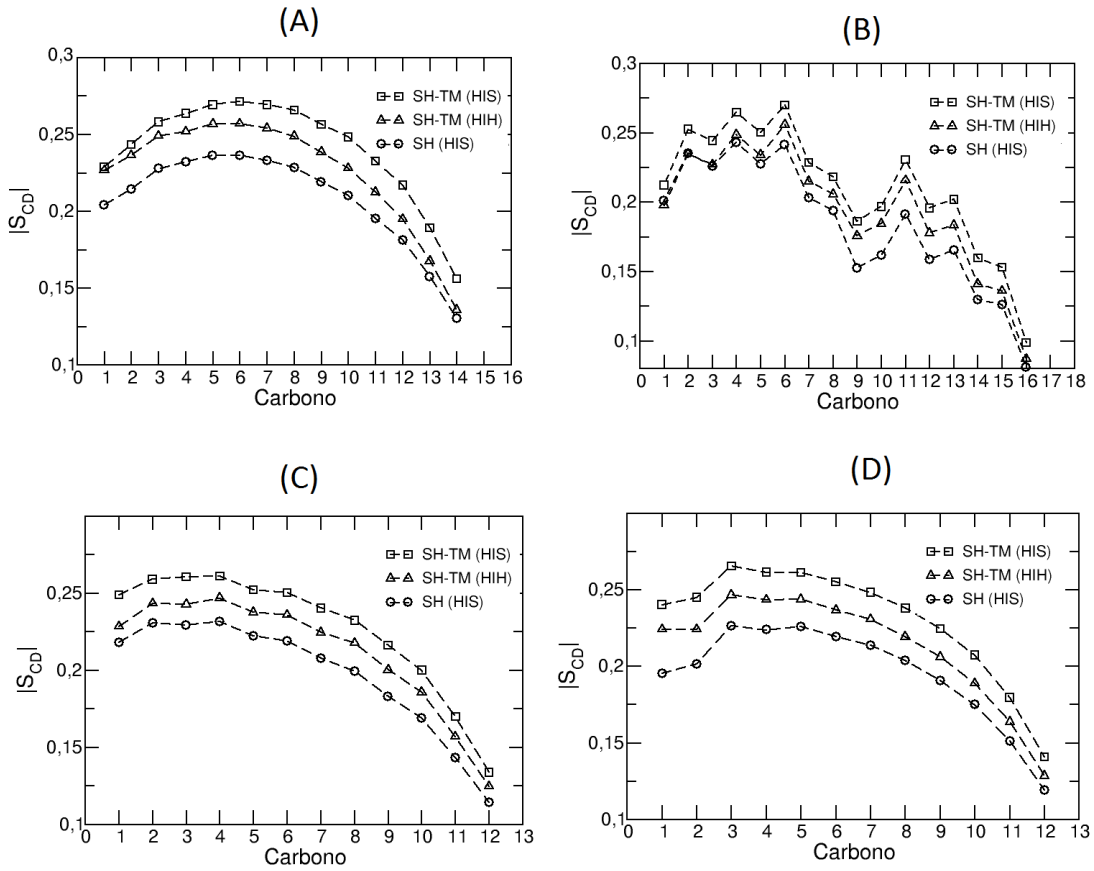


-

A Figura 38 mostra o parâmetro de ordem das cadeias dos fosfolipídeos para os diferentes sistemas. Os resultados obtidos tanto em bicamada de POPC como em

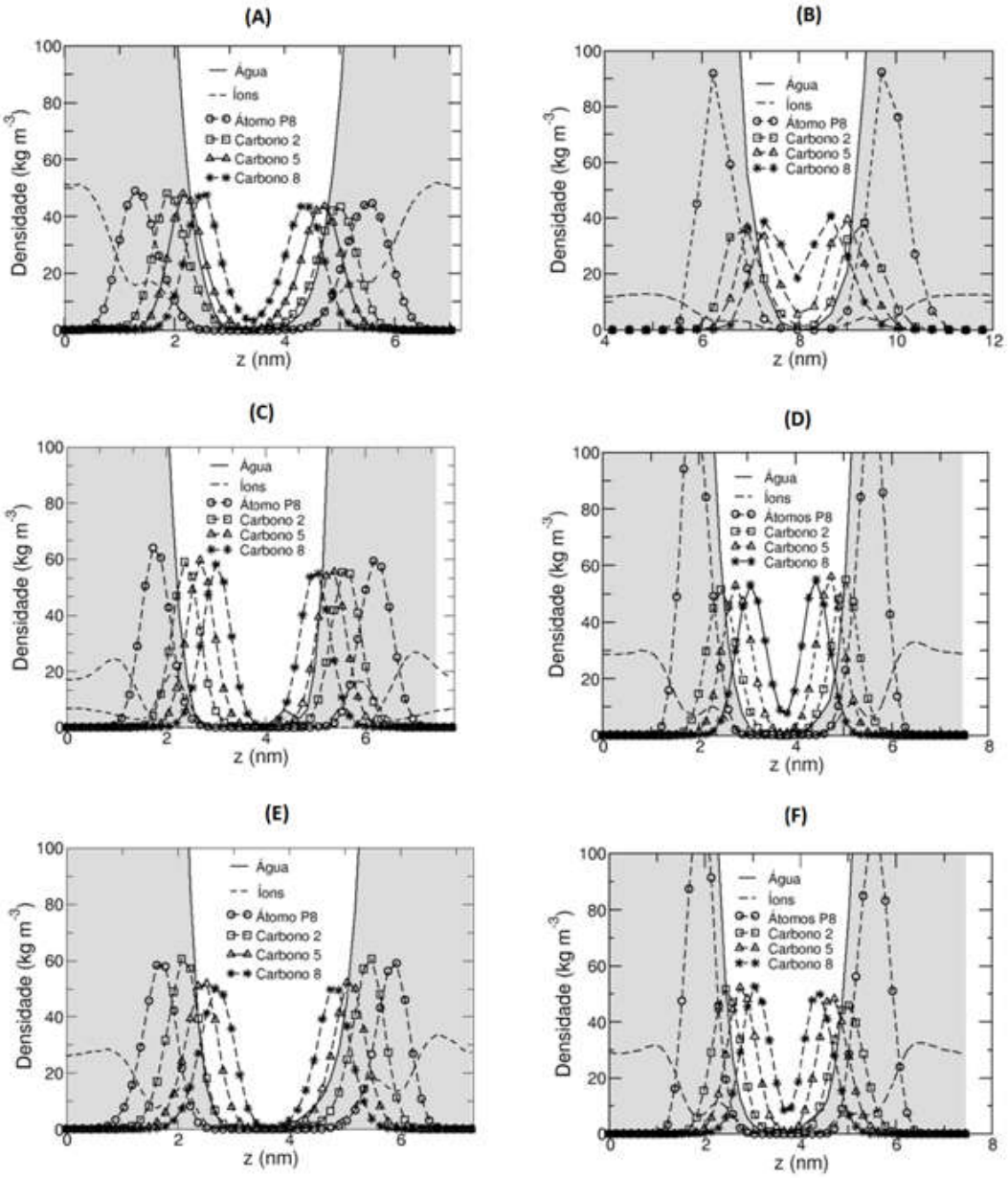
bicamada de DMPC indicam que a estrutura pentamérica do peptídeo TM com os resíduos de histidinas desprotonados (SH-TM(HIS)) apresentou-se mais ordenada seguida pela estrutura pentamérica do peptídio TM com as histidinas protonadas (SH-TM(HIH)) e pela estrutura pentamérica da proteína completa com os resíduos de histidinas desprotonados (SH (HIS)) (Figura 38). Estes resultados corroboram com os resultados obtidos para área por lipídeo dos mesmos sistemas (vide Figura 37).

Figura 38: Parâmetro de ordem das cadeias **(A)** saturadas e **(B)** insaturadas da bicamada de POPC e parâmetro de ordem da **(C)** cadeia 1 e **(D)** cadeia 2 da bicamada de DMPC.



Os perfis de densidade dos sistemas, calculados após a equilibração dos sistemas (últimos 50 ns), mostram uma diferença na densidade de água para os sistemas do pentâmero da proteína completa (SH-(HIS)) e do pentâmero do peptídeo TM (SH-TM(HIH) e SH-TM(HIS)) (vide Figura 39).

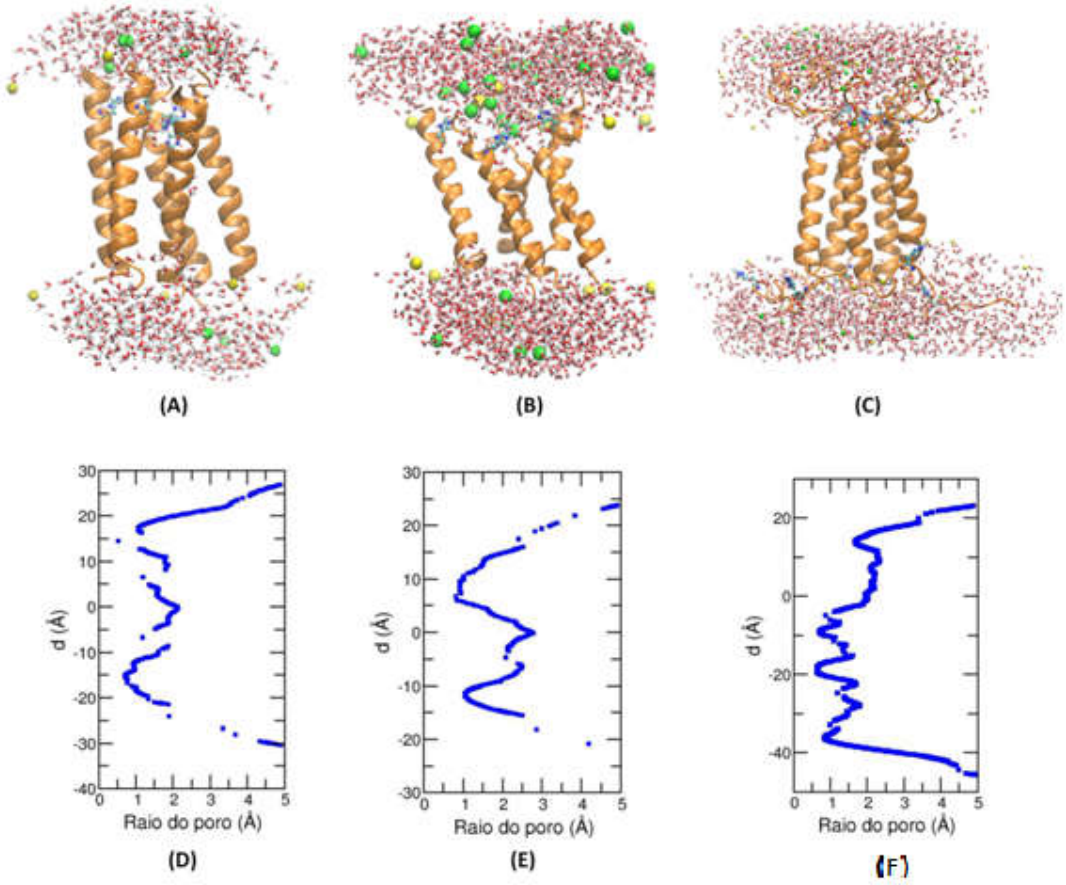
Figura 39: Perfis de densidade dos sistemas: POPC: (A) pentâmero do peptídeo TM com as H22 desprotonadas (SH-TM(HIS)); (B) pentâmero do peptídeo TM com as H22 protonadas (SH-TM(HIH)); (C) pentâmero da proteína SH com as H22 e H51 desprotonadas. DMPC: (D) pentâmero do peptídeo TM com as H22 desprotonadas (SH-TM(HIS)); (E) pentâmero do peptídeo TM com as H22 protonadas (SH-TM(HIH)); (F) pentâmero da proteína SH com as H22 e H51 desprotonadas em bicamada de DMPC.



Para os sistemas em bicamadas de POPC (Figura 39 – A, C e E), os sistemas pentaméricos apresentaram perfis de densidade de água similares, com uma maior inclinação no N-terminal do peptídeo. Observa-se também um aumento na

inclinação da densidade de água para os valores de z entre 4 a 6 nm para o sistema do peptídeo SH-TM (HIH) (Figura 39- C) quando comparamos com o sistema do peptídeo SH-TM(HIS) (Figura 39 – A). As mesmas características são observadas nos sistemas em bicamadas de DMPC (Figura 39 – B, D e F). Estudos realizados com a proteína M2 do vírus Influenza sugerem que a protonação das histidinas gera uma repulsão eletrostática causando uma maior abertura do poro (PINTO et al., 1997). Esse mesmo processo é sugerido para a protéina SH e estaria de acordo com os perfis de raio dos poros para os sistemas com as H22 protonada (Figuras 40 E e 43 E).

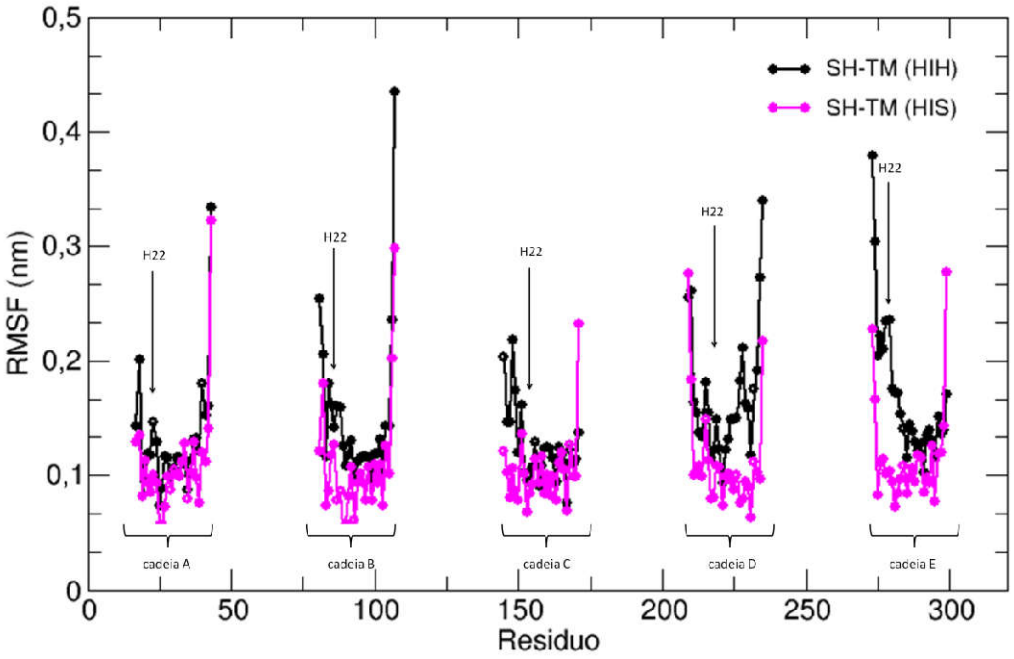
Figura 40: Estrutura do pentâmero do peptídeo TM da proteína SH (em laranja) com as histidinas desprotonadas (A), protonadas (B) e proteína SH completa com as histidinas H22 e H51 desprotonadas (SH-HIS). Os resíduos das H22 e H51 estão representados por esferas e tubos com carbonos em azul ciano, nitrogênio em azul, hidrogênio em branco e oxigênio em vermelho. Íon NA em amarelo e Cl em verde. Raio do poro formado pelo: (C) pentâmero do peptídeo TM com as HIS22 desprotonadas (SH-TM(HIS)); (D) pentâmero do peptídeo TM com as HIS22 protonadas (SH-TM(HIH)); (E) pentâmero da proteína SH com as HIS22 e HIS51 desprotonadas.



Analisando as Figuras 41 e 44 (A e B), verifica-se uma mudança na conformação das cadeias laterais das histidinas H22 quando comparamos os seus dois estados de protonação. O pentâmero SH-TM (HIS) apresenta as H22 direcionadas mais para o centro do poro (Figuras 41 e 44 A), enquanto que para o sistema SH-TM (HIH) as histidinas estão direcionadas para os fosfolipídeos (Figura 41 e 44 B). Esta possível interação com as cabeças dos fosfolipídeos, devido à protonação das histidinas, pode ser a causa do aumentando da dimensão do raio do poro, justificando o aumento da inclinação no perfil de densidade da estrutura e aumento do raio do poro (Figuras 39, 40 E e 43 E) para esses sistemas com as H22 protonadas. Além disso,

ocorre uma diminuição do comprimento do poro quando comparamos os sistemas SH-TM(HIS) (Figuras 40 e 43, A e D) e SH-TM (HIH) (Figuras 40 e 43, B e E), indicando uma abertura maior das extremidades do canal protonado e uma diminuição do comprimento hidrofóbico do poro.

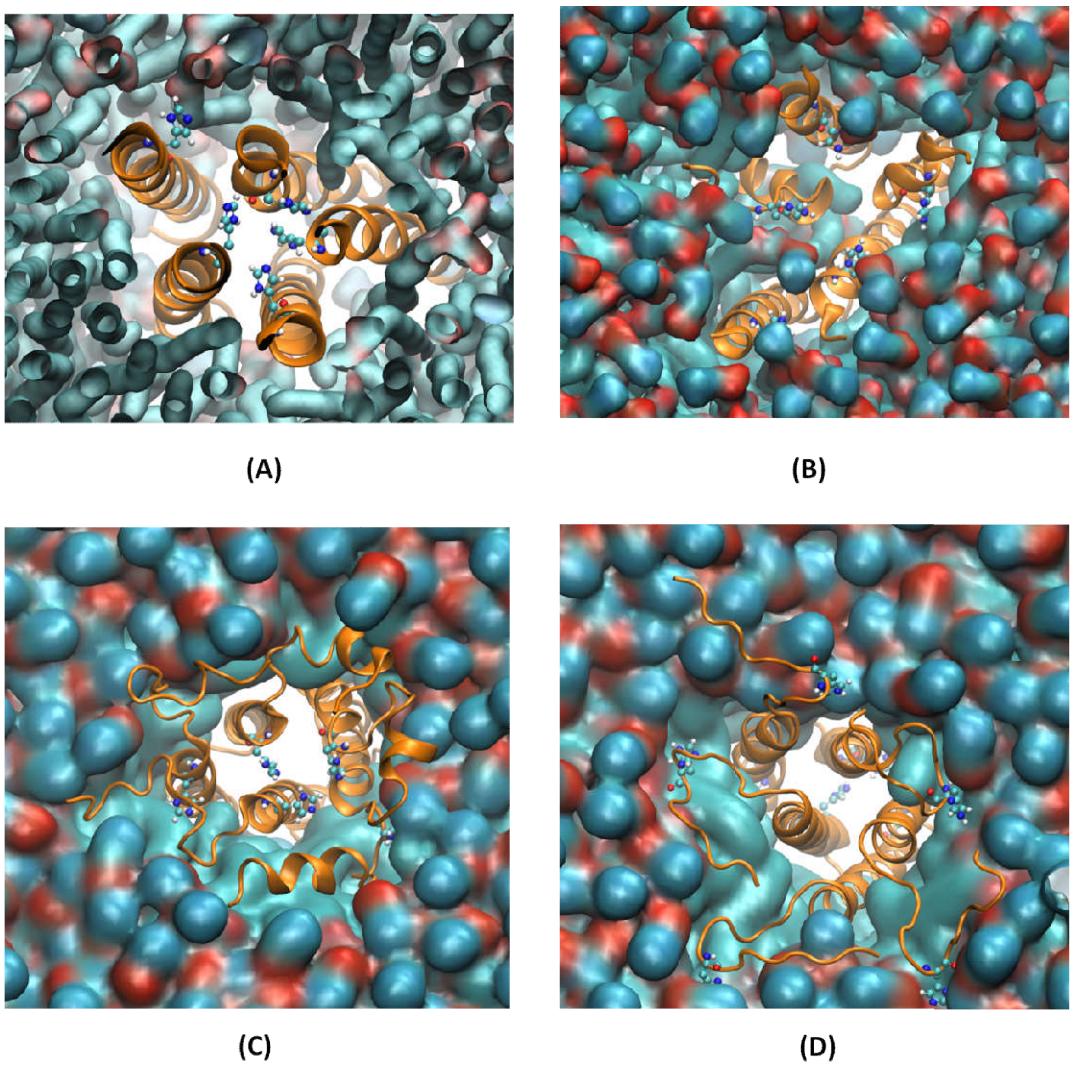
Figura 41: RMSF dos resíduos do peptídeo TM da proteína SH calculado para os últimos 50 ns de simulação. Em rosa está representado o RMSF do sistema pentamérico com as histidinas desprotonadas e em preto o sistema pentamérico com as H22 protonadas.



A perturbação na estrutura causada pela protonação dos resíduos de histidinas também pode ser avaliada pelo menor parâmetro de ordem (vide Figura 38) e uma maior área por lipídeo (Figura 37) observado para este sistema quando comparamos com o pentâmero SH-TM (HIS).

O RMSF calculado para os resíduos dos dois sistemas também apresenta um maior valor de RMSF para os resíduos que compõem o sistema protonado, principalmente aqueles próximos aos resíduos H22 (Figura 41), indicando que a protonação dos resíduos de histidinas influenciam na conformação estrutural da proteína SH.

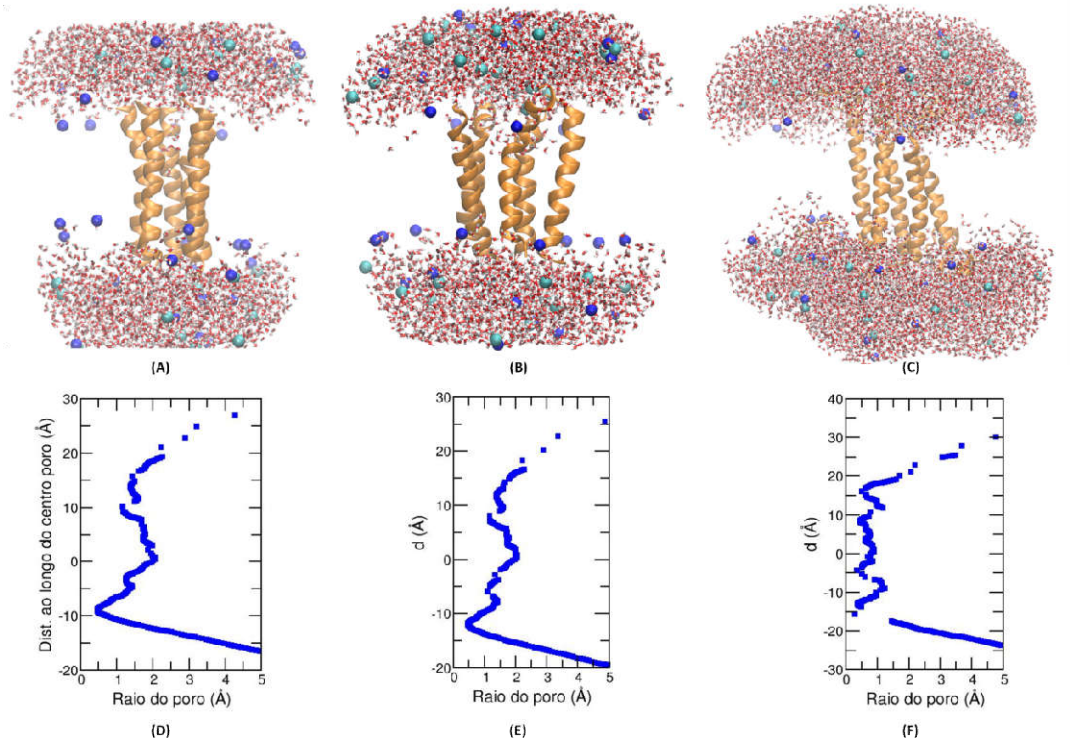
Figura 42: Estrutura do pentâmero do peptídeo TM com as histidinas H22 desprotonadas (A) e protonadas (B) e a proteína SH completa com as histidinas H22 e H51 desprotonadas vista da região N-terminal (C) e C-terminal (D). Os resíduos das H22 e H51 estão representados por esferas e tubos com carbonos em azul ciano, nitrogênio em azul, hidrogênio em branco e oxigênio em vermelho, a proteína SH em laranja e os lipídeos em superfície.



Analisando a estrutura pentamérica do sistema SH (HIS), tanto em bicamada de POPC (Figura 40 C e Figura 42 C e D) como em DMPC (Figura 43 C e Figura 44 C), o pentâmero possui a região TM estruturada e as cadeias laterais das histidinas H22 orientadas para a interface inter-helical ou para o lúmen poro. Ao contrário da estrutura proposta por Gan e colaboradores, que apresenta uma estrutura simétrica com as hélices levemente curvadas (Figura 5), a estrutura pentamérica apresenta suas hélices TM mais alinhadas e levemente inclinadas, mas conserva o perfil funil

com a região N-terminal mais aberta e a C-terminal mais fechada (Figuras 40 e 43 C e F).

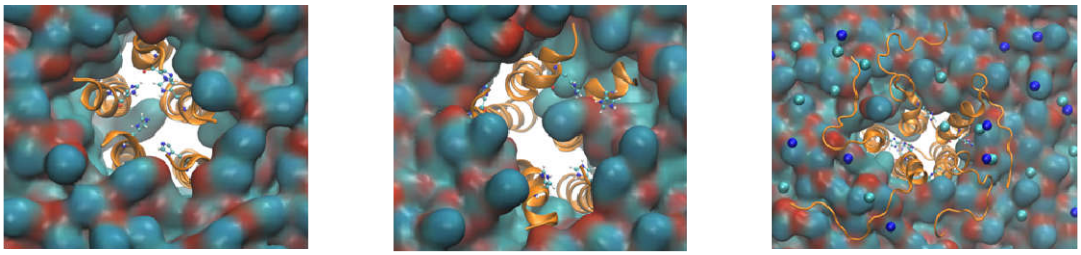
Figura 43: Estrutura pentamérica e raio do poro da proteína SH e peptídeo TM em bicamadas de DMCP.Estrutura do pentâmero do peptídeo TM da proteína SH (em laranja) com as histidinas desprotonadas SH-TM (HIS) (A), protonadas SH-TM (HIH) (B) e proteína SH completa com as histidinas H22 e H51 desprotonadas (SH-HIS). Os resíduos das H22 estão representados por esferas e tubos com carbonos em azul ciano, nitrogênio em azul, hidrogênio em branco e oxigênio em vermelho. Íon NA em azul e CL em ciano. Raio do poro formado pelo: (C) pentâmero do peptídeo TM com as HIS22 desprotonada, SH-TM(HIS); (D) pentâmero do peptídeo TM com as HIS22 protonadas, SH-TM(HIH); (E) pentâmero da proteína SH com as HIS22 e HIS51 desprotonadas.



Estudos realizados pelo nosso grupo mostraram, por meio de análises de modos normais, um movimento de abertura e fechamento do pentâmero da proteína SH completa quando os resíduos de histidinas estão protonados: quando o N-terminal está aberto, o C-terminal está fechado e vice-versa (ARAUJO et al., 2016). Tanto o perfil de densidade como o do raio do poro corroboram com o movimento proposto pelo grupo, independente do ambiente lipídico. No entanto, só obervamos o movimento de abertura da região N-terminal para os sistemas com o peptídeo TM. A visualização desse único evento pode ser atribuído ao tempo de simulação não ser suficiente para observar o movimento completo de abre-fecha do sistema. Neste

trabalho, o motivo do movimento abre-fecha é a protonação dos dois resíduos de histidinas, H22 e H51. Estudos demonstram que o resíduo H22 teria um caráter mais funcional enquanto que o resíduo H51 desempenharia funções mais estruturais. Novas análises por modos-normais, somente com o peptídeo TM em estado protonado e desprotonado, poderiam ajudar a compreender de maneira mais eficiente o papel desses resíduos de histidina na estrutura e função da proteína SH.

Figura 44: Estrutura do pentâmero do peptídeo TM com as histidinas H22 desprotonadas (A) e protonadas (B) e a proteína SH completa com as histidinas H22 e H51 desprotonadas vista da região N-terminal (C). Os resíduos das H22 e H51 estão representados por esferas e tubos com carbonos em azul ciano, nitrogênio em azul, hidrogênio em branco e oxigênio em vermelho, a proteína SH em laranja e os lipídeos em superfície.



(A) (B) (C)

Nos sistemas analisados foram considerados os dois extremos de protonação: ou todas as histidinas estão protonadas ou todas as histidinas estão desprotonadas. Para a proteína M2 do vírus Influenza, a protonação que ativa a atividade de canal e ocorre quando o arranjo das histidinas do tetrâmero atinge carga +3. Assim, para um maior detalhamento da dependência de protonação das histidinas para proteína SH, sistemas intermediários (+1, +2, +3 e +4) também teriam que ser avaliados.

3.3.5. Análise do mecanismo de portão da proteína SH: o efeito do desbalanço de carga e do estado de protonação da H22 na ativação da atividade de canal do pentâmero do peptídeo TM

Canais de membrana são dotados de mecanismos moleculares capazes de abrir e fechar o caminho de permeação e, portanto, controlar o fluxo de íons. A mudança conformacional que leva à abertura e ao fechamento desses canais, conhecida como "*gatting*" (traduziremos como mecanismo de "portão"), pode ser regulada por

diferentes estímulos. Canais que são controlados por qualquer tipo de portão são caracterizados por: no seu estado fechado, não serem capazes de conduzir íons; no seu estado aberto, serem capazes de conduzir íons; e no estado inativo, mesmo com o portão aberto eles não são capazes de conduzir íons (MILLER, 1992).

Além disso, os canais podem ser classificados segundo duas características biofísicas fundamentais: i) o tipo de íon que é seletivamente transportado, e ii) o tipo de estímulo que regula esse processo, podendo ser dependentes de pH e/ou voltagem, por exemplo (MILLER, 1992).

Três características bastante interessantes foram observadas na sequência da proteína SH (Figura 26): i) a presença de resíduos carregados nas regiões terminais, ii) presença de resíduos de histidinas e iiI) a presença de um conjunto de resíduos hidrofóbicos na região TM.

Estudos mostram que a atividade de canal da proteína SH está diretamente relacionada aos estados de protonação dos resíduos de H22 e H51 (GAN et al., 2008, 2008, 2012), evidenciando sua dependência com o pH. No entanto, somente as mudanças dos estados de protonoção não foram suficientes para observar qualquer tipo de passagem de água ou íon pelo poro nos sistemas simulados, sugerindo a existência de outro tipo de estímulo que deve ocorrer para a ativação dessa atividade de canal, ou seja, que mantenha sua conformação aberta e ativa.

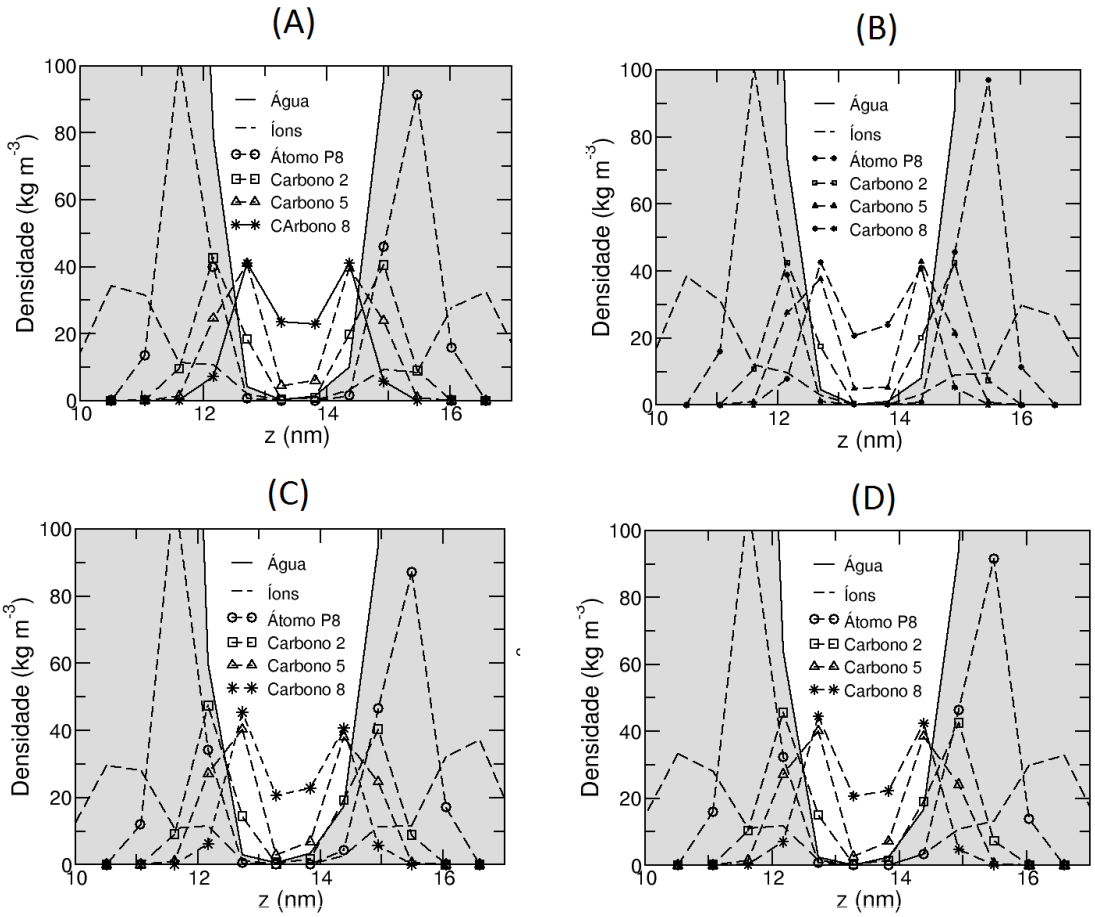
Os aminoácidos carregados nas regiões terminais sugerem um mecanismo dependente de voltagem, enquanto que o conjunto de resíduos hidrofóbicos corroboram com o chamado portão hidrofóbico, um mecanismo bastante intrínseco de controle de condução em muitos canais de proteínas de membrana (ZHENG et al., 2018).

Com o objetivo de compreender melhor a atividade de canal da proteína SH e verificar qual o tipo de portão é responsável pela ativação da sua atividade iônica, as caixas das simulações, somente dos sistemas do peptídeo TM, foram aumentadas na direção de z, gerando uma interface banho-vácuo, de modo a manter a separação entre os banhos das suas imagens (conforme ilustrado na Figura 13, capítulo 2), e estendidas por mais 5 ns a volume constante (NVT). Com essa configuração inicial e com uma diferença de potencial por desbalanço explícito de íons (no presente estudo, o desbalanço foi de 12e), os sistemas foram nomeados da

seguinte forma: i) potencial positivo (ΔV>0) os sistemas que foram retirados 12 íons NA da interface inferior da bicamada (Figura 46 - A e C); e ii) de potencial negativo (ΔV<0) os sistemas que foram retirados 12 íons NA da interface superior (Figura 46 - B e D).

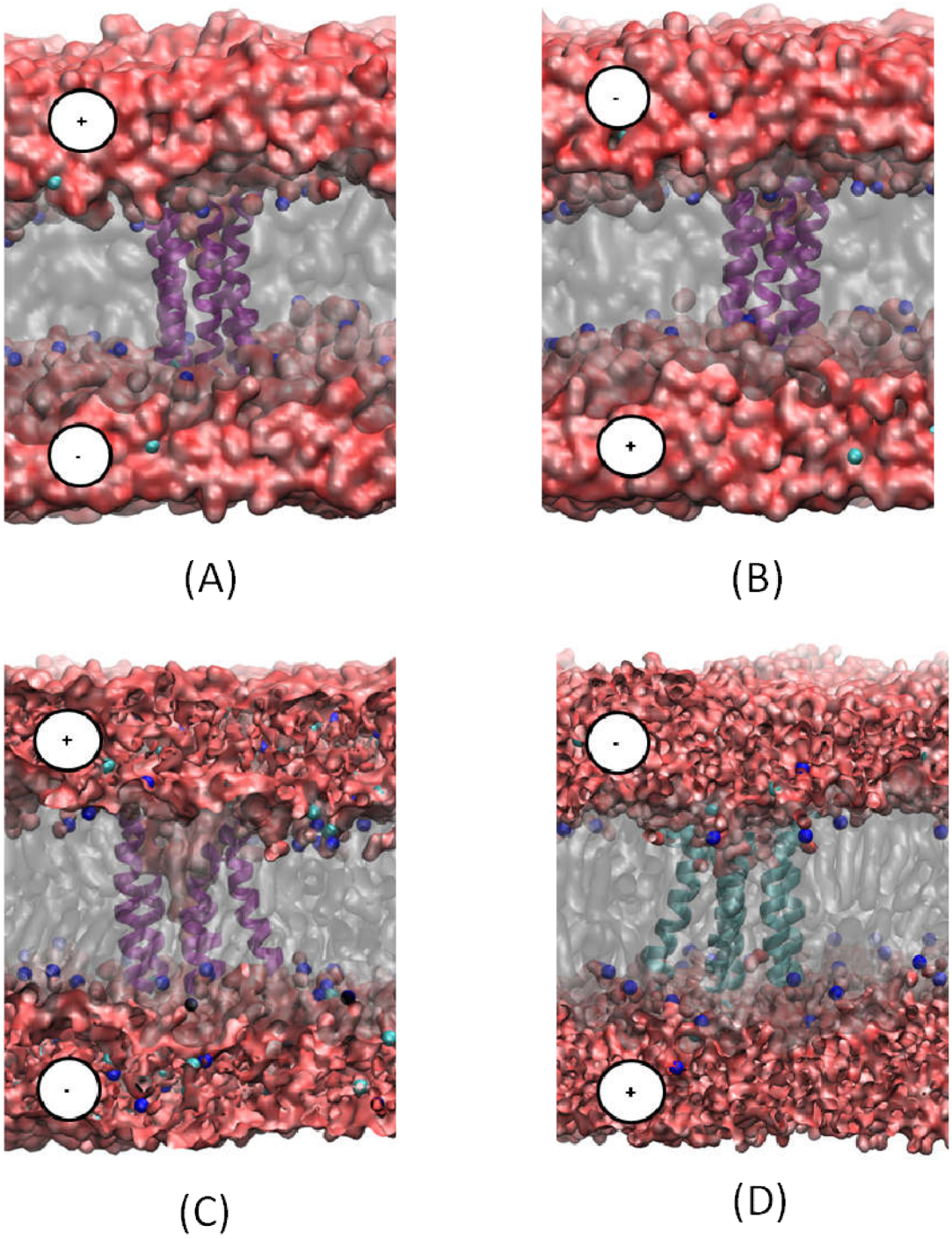
A Figura 45 apresenta os perfis de densidade de massa do pentâmero com as histidinas desprotonadas (SH-TM(HIS)), representando um pH mais alto (pH~7,0), com ΔV > 0 (Figura 45 A) e ΔV < 0 (Figura 45 B) , o pentâmero com as histidinas protonadas (SH-TM(HIH)), representando um pH~3,0, com ΔV>0 (Figura 45 C) e ΔV < 0 (Figura 45 D). Novamente podemos ver a mudança do perfil em relação ao estado de protonação das histidinas, sendo que os pentâmeros com as histidinas H22 protonadas apresentam uma maior inclinação da região N-terminal (Figura 45 C e D). No entanto, não observamos diferenças nos perfis de densidade de massa quando comparamos aos diferentes estímulos de ΔV (Figura 45).

Figura 45: Perfis de densidade dos sistemas: (A) pentâmero do peptídeo TM com as H22 desprotonadas (SH-TM(HIS)) e desbalanço de carga de 12e e ΔV> 0; (B) pentâmero do peptídeo TM com as H22 desprotonadas (SH-TM(HIS)) e desbalanço de carga de 12e e ΔV < 0; (C) pentâmero da proteína SH com as H22 protonadas (SH-TM(HIH)) e desbalanço de carga de 12e e ΔV > 0; (E) pentâmero da proteína SH com as H22 protonadas (SH-TM(HIH)) e desbalanço de carga de 12e e ΔV < 0.



A região mais fechada do poro é composta quase que totalmente por resíduos hidrofóbicos, corroborando com a sugestão de um portão hidrofóbico. No entanto, só a ΔV não foi suficiente para vencer a barreira imposta por esses resíduos, ou o tempo observado foi muito curto, uma vez que podemos visualizar uma grande porção de água em alguns frames do sistema do pentâmero com H22 protonada e ΔV>0 (Figura 46 - C).

Figura 46: Representação do poro formado pelo peptídeo TM da proteína SH em bicamada de DMPC com diferentes estímulos. (A) pentâmero do peptídeo TM com as H22 desprotonadas (SH-TM(HIS)) e desbalanço de carga de 12e e ΔV> 0; (B) pentâmero do peptídeo TM com as H22 desprotonadas (SH-TM(HIS)) e desbalanço de carga de 12e e ΔV < 0; (C) pentâmero da proteína SH com as H22 protonadas (SH-TM(HIH)) e desbalanço de carga de 12e e ΔV > 0; (E) pentâmero da proteína SH com as H22 protonadas (SH-TM(HIH)) e desbalanço de carga de 12e e ΔV < 0.



O tempo de simulação pode ser uma das limitações para não conseguirmos observar a formação da corrente de água, mas este resultado também sugere que a atividade de canal da proteína SH pode ter uma dependência iônica. Muitos canais iônicos de proteínas de membrana eucariota e procariota possuem um filtro de seletividade (FS) a íons, por exemplo, a KcsA possui uma sequencia, TVGYG, que é conservada em cada segmento TM e é seletivo a K^+ (HEGINBOTHAM et al., 1994). Esse filtro também é responsável por ativar a mudança de estado do canal de fechado para aberto como ocorre com a NavAb (PINHEIRO, 2013). Outro tipo de estímulo é a influência das composições lipídicas da membrana (ANDERSEN; KOEPPE, 2007). As simulações apresentadas foram realizadas utilizando os íons NA^+ e CL^- e bicamada composta por DMPC. Simulações com íons K^+ e Ca^{+2} e membranas com diferentes composições lipídicas também podem ajudar na elucidação da atividade de canal e o tipo de portão envolvido na atividade iônica não só da proteína SH, mas também de outras viroporinas.

3.4. Conclusões

- A proteína SH, assim como outras viroporinas e proteínas de membrana celulares, apresenta a região TM altamente composta por resíduos hidrofóbicos, principalmente leucinas e isoleucinas em posições correspondentes à região mais fechada do poro formado pela estrutura pentamérica.

- Simulações do pentâmero em diferentes estímulos (estados de protonação e ΔV) corroboram com a análise da estrutura primária da proteína SH e sugerem um mecanismo de portão ("*gate*") hidrofóbico para a proteína SH;

- Simulações da proteína SH e do seu peptídeo TM mostraram interação dos seus monômeros com bicamadas de POPC, sugerindo para a SH um mecanismo livre de interação com membranas, onde a região TM é a principal região responsável por direcionar a proteína à bicamada, uma vez que a presença apenas do peptídeo TM, foi suficiente para mostrar interação com a superfície da bicamada mesmo sem as regiões terminais da proteína;

- Composições lipídicas diferentes resultaram em diferentes inclinações da hélice transmembrânica do peptídeo TM da proteína SH (11,06° para POPC, 39,0° para DMPC e 27,6° para *raft*), e da proteína completa (40,31° para POPC, 29,90° para

DMPC e 41,26° para *raft*), porém não mostrou influenciar no tamanho da hélice (~2,9 nm), sugerindo a inclinação como uma estratégia de acomodação da proteína SH em diferentes composições lipídicas;

- Os resíduos carregados (E2, E9, K13, E46, K53, E56 e R59) e aromáticos (F15, W15, Y17, Y47, F50, F25) nas regiões terminais da proteína SH podem ser os responsáveis por interações mais específicas destas regiões terminais com a superfície lipídica, favorecendo a maior estabilidade do monômero da proteína completa em diferentes composições lipídicas;

- Diferentes composições lipídicas geraram diferentes valores de incompatibilidade hidrofóbica, indicando que o ambiente lipídico possa ser um fator importante para acomodação da proteína SH em bicamadas lipídicas.

- Diferentes inclinações das hélices transmembrânicas podem acarretar diferentes conformações oligoméricas. Lembrando que a estrutura está diretamente relacionada com a função da proteína, diferentes conformações oligoméricas podem influenciar na sua função durante a infecção viral.

- Sendo as regiões terminais importantes para a conformação da hélice TM e, consequentemente, para a formação do oligômero, cuidados nos protocolos de produção e purificação destas proteínas são necessários, uma vez que uma das estratégias bastante utilizadas na produção de proteínas transmembrânicas é a inserção de genes de proteínas como GST que facilitam na obtenção destas proteínas;

- Os resultados das simulações de *raft* revelaram a preferência tanto da proteína SH completa como do peptídeo TM por regiões de fronteira entre a região ordenada (DPPC e CHOL) e desordenada (DUPC e CHOL), justificando resultados obtidos por Rixon e colaboradores, que mostram a presença da proteína SH em região de *raft* e também não-*raft*. Em analogia com a proteína M2, além da preferência por regiões entre *raft* e não-*raft*, a proteína SH possui interações com outras proteínas de superfície do HRSV como as proteínas F e G, indicando também um papel desta proteína na montagem e brotamento viral, hipótese esta que ainda precisa ser investigada;

- Pentâmeros do peptídeo da proteína SH com diferentes estados de protonação da H22 apresentaram diferenças estruturais, principalmente nas regiões terminais. Além

disso, o pentâmero com as H22 protonadas apresentou maior desordem, com as cadeias laterais das H22 direcionadas para a interface lipídica. No entanto, nenhuma atividade de canal foi observada nestes dois estados de protonação, fazendo-se necessária a análise de sistemas intermediários para uma melhor compreensão dessa atividade de canal e verificar quais os mecanismos necessários para que a estrutura pentamérica esteja em seu estado ativo;

- O perfil de densidade da estrutura pentamérica do peptídeo TM com as histidinas protonadas indicou um perfil mais aberto na região N-terminal colaborando com o mecanismo de abre-fecha proposto pelo grupo da Profa. Fátima para a proteína completa. No entanto, o estudo deste mecanismo somente para o peptídeo TM seria essencial para confirmar a hipótese deste mecanismo e verificar a influência das regiões terminais;

- A estrutura pentamérica da proteína SH completa após 100 ns de simulação em bicamadas de POPC e DMPC, apresentou-se ligeiramente diferente da estrutura proposta por Gan e colaboradores. A hélice transmembrânica apresenta-se mais alinhada e levemente inclinada e não curvada como Gan e colaboradores propuseram. Esta diferença estrutural pode ser atribuída às diferentes metodologias para o estudo estrutural e também aos diferentes ambientes onde a proteína foi analisada, sugerindo, novamente, a influência do meio e das interações entre oligômeros com a estrutura pentamérica e monomérica da proteína SH e a importância do estudo estrutural dessa classe de proteínas;

- Simulações do pentâmero formado pelo peptídeo TM sob diferentes estímulos (pH e ΔV) indicam a aplicação do potencial como um estímulo necessário à ativação do canal, mas simulações maiores e com diferentes íons são necessárias para mais detalhes do tipo de portão ("*gate*") que a proteína SH possui e quais os tipos de estímulos, além da protonação das histidinas, ou seja, da dependência de pH, são necessárias para alcançar seu estado aberto e ativo;

- A abordagem computacional por dinâmica molecular atomística e simplificada se mostrou altamente eficiente no estudo das conformações estruturais da proteína SH, na análise da atividade de canal e no mecanismo de portão em diferentes composições lipídicas, em diferentes estados de protonação das histidinas e na presença de desbalanço iônico, fornecendo maiores informações sobre a estrutura e função desta proteína e da suas regiões TM, N e C-terminal.

3.5 Trabalhos em Andamento e Perspectivas Futuras

Ao contrário do que acontece com a proteína M2 do vírus Influenza, pouco se sabe sobre a estrutura e sobre as funções da proteína SH. No presente estudo, abordagem sobre mecanismos de interação da proteína SH com bicamdas, análises estruturais e funcionais em diferentes ambientes e bicamadas lipídicas, análise funcional com base nos estados de protonação dos residuos de histidinas e especulações sobre o mecanismo de portão para a atividade de canal e sobre as regiões terminais dessa proteína foram abordadas. No entanto, maiores detalhes da estrutura da proteína SH ainda são necessários para o próximo passo do trabalho que é a visualização do seu mecanismo de transporte, mecanismo este ainda não vizualisada em abordagens computacionais, e a busca por inibidores para auxiliar no entendimento não só do mecanismo da proteína SH, mas também dos mecanismo virais e do hospedeiro na infecção por HRSV.

CAPÍTULO 4

M2, O CANAL DE PRÓTONS DO VÍRUS INFLUENZA A: MECANISMO DE PORTÃO DO W41

4. Introdução

As pesquisas realizadas no grupo do Professor Dr. Timothy A. Cross possuem como foco o mecanismo de condução de prótons que é ativado pela acidificação do endossomo durante a infecção viral. A acidificação resulta na formação de um estado protonado 3+ do grupo de 4 resíduos de H37. O que tem sido muito surpreendente é a extrema heterogeneidade estrutural dos resíduos de H37 como avaliado por espectroscopia de ssRMN de Rotação em torno do Ângulo Mágico (MAS, do termo em inglês Magic Angle Spinning) (MIAO et al., 2015). Quando um dos resíduos HIS é desprotonado por uma água do interior aquoso da partícula viral, processo que ocorre na escala de tempo de microssegundos, há a possibilidade da condutância ocorrer; porém, a condução de prótons se dá na escala de tempo de milissegundos. O mecanismo de portão de W41, ainda não characterizado, é possivelmente o responsável por determinar a taxa de condução de ~ 1000 H+/s. A frequência de troca de prótons com água e de prótons com His_{37} foram avaliadas usando uma nova sequência de pulsos de MAS ssRMN desenvolvida no NHMFL (FU et al., artigo submetido).

Parte da heterogeneidade observada na H37 parece estar associada com a heterogeneidade da pseudo-simetria da estrutura tetramérica de M2. Mudanças na simetria do canal foram observadas ao se estudar os pares His+--His devido ao fato de que mudanças na simetria do canal alteram o comprimento das ligações de hidrogenio feitas pelos pares de H37 e as frequências das ressonâncias observadas são extremamente sensíveis a alterações nesses comprimentos em frações de um angstrom (MIAO et al., 2015).

4.1. Objetivos

4.1.1. Objetivo Geral

Fazer uma reavaliação estrutural dos resíduos W41 de M2, à luz dos recentes estudos da dinâmica destes resíduos, a fim de fornecer informações detalhadas sobre o rearranjo conformacional dos W41 durante a condução de prótons.

4.1.2. Objetivos específicos

- Marcar isotopicamente a proteína M2, por meio da expressão em *E. coli*;
- Purificar e reconstituir a proteína em bicamada lipídica;
- Incorporar a proteína M2 em lipossomos;
- Determinar o arranjo estrutural dos quatro resíduos de W41 nesta proteína tetramérica;
- Determinar se os quatro resíduos W41 em M2 têm uma conformação homogênea ou se eles exibem uma heterogeneidade considerável;

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Transformação

O fragmento de DNA que codifica a proteína M2 foi clonado em vetor pTBSG, no qual uma cauda de histidina foi adicionada no N-terminal da proteína. A expressão da proteína M2 foi em cepas de *E. coli BL21DE3-RP codon plus* (Stratagene). Para transformação dos plasmídeos, as seguintes etapas foram realizadas: i) células *E. coli BL21DE3-RP codon plus* competentes foram descongeladas do freezer -80°C em gelo; ii) em um tubo de 1,5 ml, também localizado no gelo, foram transferidos 20 µl de células competentes e 1 µl do vetor, ambos foram misturados cuidadosamente; iii) a mistura foi mantida em gelo por 30 minutos seguido por 1 minuto a 37°C para choque térmico e novamente em gelo por 2 minutos; iv) após o choque térmico, 1 ml de meio LB (Luria-Bertani) foi adicionado a mistura e as células foram incubadas a 37°C por uma hora sob agitação de 250 rpm; v) finalmente 100 µl de células incubadas foram adicionadas a placa contendo meio LB sólido com Ampicilina (100 mg/ml). As placas foram incubadas *overnight* a 37°C.

4.2.2 Expressão

Células transformadas foram coletadas e crescidas em 100 ml de meio LB líquido contendo Ampicilina (100 mg/ml) a 37°C, 250 rpm, *overnight*.

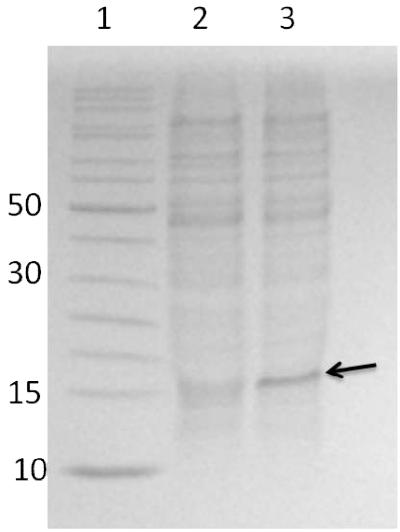
4.2.3 Aminoácidos específicos marcados

Para expressão da proteína M2 com os aminoácidos triptofano ($^{13}C/^{15}N$), leucina (^{15}N e ^{13}C) e arginina (13C15N) marcados foram seguidas as etapas abaixo:

Primeiramente 100 ml de cultura foram transferidos para 2L de meio LB (50 ml para cada 1L de LB com 100 mg/ml de Ampicilina) e mantidos a 37°C, 250 rpm até a bactéria atingir seu estágio de crescimento logaritmo ($D.O._{.600}$ ~ 0,6). Após atingir a D.O. necessária, 2L de cultura foram centrifugados a 6500g por 6 minutos à temperatura ambiente. Os pellets foram lavados cada um com 15 ml de meio M9 (0,68 g Na_2HPO_4, 0,3 g KH_2PO_4, 0,05 g NaCl) e centrifugados novamente a 6500*g* por 6 minutos. O sobrenadante foi removido e o pellet ressuspendido em meio M9. Para a Leucina marcada, 1L de meio M9 continha 100 mg UL-13C,15N-Leucina mais os aminoácidos não marcados (500 mg de Glu, Asp, Gln, Asn, 300 mg de Ala, Leu e Ile, 200 mg de Tyr, Phe, Trp, Cys, Met, Gln, Thr, Lys, Arg, His, Asn, Pro, Ser, Gly), 6,8 g Na_2HPO_4, 3,0 g KH2PO4, 0,5 g NaCl, 0,1 mg/mL de Ampicillina. Para o triptofano marcado, cada 1L de meio M9 continha 100 mg UL-13C/15N-Triptofano adicionado somente antes da indução mais os aminoácidos não marcados (500 mg de Glu, Asp, Gln, Asn, 300 mg de Ala, Gly, Thr, Phe, Tyr, Ser, 200 mg de Val, Leu, Ile, Cys, Met, Lys, Arg, His, Pro), 6,8 g Na_2HPO_4, 3,0 g KH2PO4, 0,5 g NaCl, 1,0 g NH4Cl, 2 mM MgSO4, 0,1 mM CaCl, 0,1 mg/mL de Ampicillina. Para a Arginina marcada, 1L de meio M9 continha 100 mg UL-13C,15N-Arginina mais os aminoácidos não marcados (500 mg de Asp, Ser, Gly, Ala, Val, 300 mg de Leu, Ile, Glu, Gln, Phe, Pro, 200 mg de Tyr, Trp, Cys, Met, Asn, Thr, Lys, His), 6,8 g Na_2HPO_4, 3,0 g KH2PO4, 0,5 g NaCl, 2 mM MgSO4, 0,2 mM CaCl, 0,1 mg/mL de Ampicillina. A cultura foi então crescida a 37°C, 250 rpm por 0,5 hora antes de adicionar IPTG (0,4 M) e induzida por, no máximo, 1,5 horas. Após a indução, o meio foi centrifugado a 6500*g* por 10 minutos a 25°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 50 ml de tampão (20mM Tris pH 8,0, 400 mM NaCl),

dividido em dois tubos falcon de 50 ml (25 ml cada) e estocados a -20°C. Amostra da cultura antes e depois da indução, estão presentes na Figura 47.

Figura 47: SDS-PAGE evidenciando a expressão da proteína M2FL com His-tag. 1 Marcador de massa molecular, 2 amostra da cultura antes da expressão, 3 amostra cultura após 1,5 h de indução. M2FL com His-tag apresenta um pouco mais de 15kDa.



4.2.4 Lise Celular e Solubilização da Proteína de membrana

As células estocadas a -20°C foram descongeladas em banho térmico e 3 µl de benzonaze nuclease (Novagen) foram adicionados a cada 25 ml de alíquota celular. As células foram sonicadas no gelo por alguns segundo até atingir a homogeneidade. O processo de prensa francesa foi realizado 3 vezes para cada amostra para garantir que as células foram lisadas. Para separar a membrana do corpo de inclusão, as células lisadas foram centrifugadas a 6000*g* por 20 minutos. O sobrenadante foi ultracentrifugado a 55 krpm por 1 hora, a 8°C para separar a fração de membrana. Para solubilizar as proteínas de membrana, cada *pellet* foi ressuspendido com 25 ml de tampão (20 mM Tris pH 8,0; 400 mM NaCl) com 3% de detergente Empigen, sonicado em banho e mantido *overnight* sob rotação a 4°C. Em seguida, os dois sobrenadantes (uma amostra de cada aminoácido marcado – ver tabela 6 para as combinações propostas) foram combinados e ultracentrifugados a 55 krmp por 1 hora a 8°C. Após a ultracentrifugação, os sobrenadantes foram filtrados com filtro de 0,2 µm. Após filtrados, foram adicionados 20 mM de imidazol aos sobrenadantes.

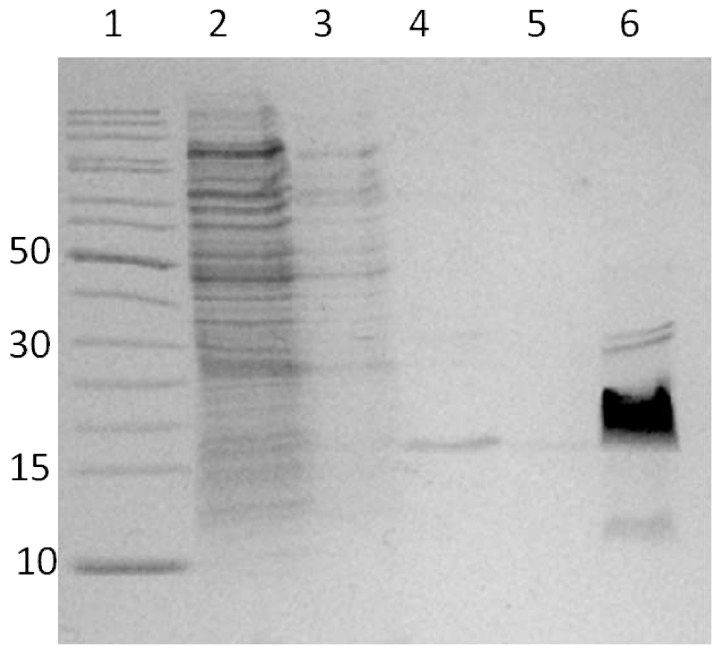
Tabela 6: Combinação dos aminoácidos marcados para preparação das amostras.

Amostras	Combinação
1	13C,15NLeu-13CTpr
2	13C,15NArg-15NTpr

4.2.5 Purificação

Para a purificação da proteína M2 foi utilizado o sistema AKTA-FPLC (*GE Healthcare*) e 5 ml de coluna *HIS-FastFlow* (*GE Healthcare*). A proteína foi lavada com água e equilibrada com 20 mM de Tris pH 8,0, 400 mM NaCl, 2,5 % de Empigen e 20 mM de imidazol. Em seguida, o sobrenadante filtrado foi aplicado à coluna. A coluna foi subsequentemente lavada em três etapas com os seguintes tampões: (1) 20 mM Tris, 400 mM NaCl, 2,5% de Empigen, 20 mM imidazol, pH 8,0; (2) 20 mM Tris, 400 mM NaCl, 0,7% de Empigen, 60 mM, pH 8,0; e (3) 20 mM Tris, 400 mM NaCl, 0,5% Octil-β-D-glucopiranósido (OG) pH 8,0. Finalmente a proteína foi eluída com 20 mM Tris, 400 mM NaCl, 0,5% OG, 400 mM imidazol , pH 8,0. Figura 48 do gel mostra a proteína após a purificação.

Figura 48: SDS-PAGE evidenciando a purificação da proteína M2-FL: 1 Marcador de massa molecular(kDa), 2 flow, 3, 4 e 5 lavagens, 6 proteína M2-FL pura acima de 15 kDa.



4.2.6 Remoção da Cauda de histidina (His-tag) com TEV *(Tobacco Etch Virus)*

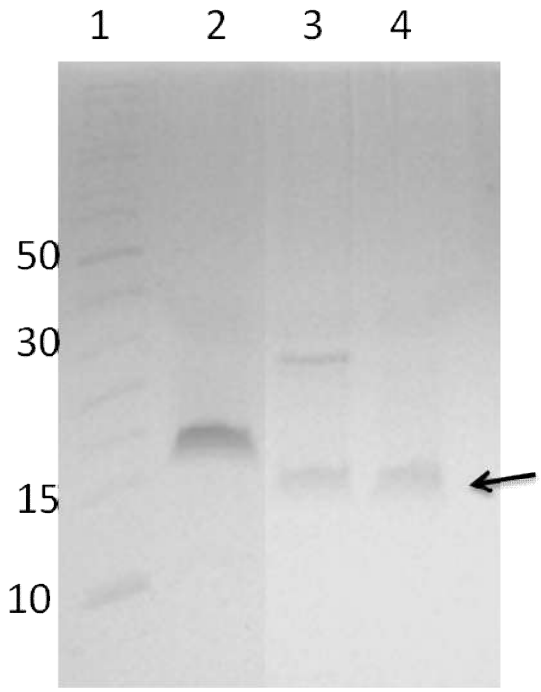
Para a remoção da His-tag, a digestão foi realizada por meio de encubação da proteína M2 após purificação com TEV em uma proporção 10:1 (mol:mol). A solução M2/TEV foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 2 horas para clivagem completa da His-tag, e então dialisada em membrana de 3,5 kDa com 1L tampão (300 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8,0, 0,5% OG) duas vezes, por duas horas (uma hora cada) para remover o imidazol.

Após a diálise para remoção do imidazol, a solução de proteína foi encubada com 4 ml de resina de níquel, lavada com água destilada e deionizada e equilibrada com 20 mM Tris, 400 mM NaCl, 0.5%OG, pH8,0. Em seguida, a solução foi agitada a 4°C *overnight* para garantir a adsorção das His-tags e da TEV (que também possui uma cauda de histidina) na resina.

Após *overnight* sob agitação, a solução que contém a proteína M2 sem a cauda de histidina foi coletada, seguida pela lavagem da coluna com o mesmo tampão de equilibração (20 mM Tris, 400 mM NaCl, 0.5% OG, pH 8,0) até a certeza de que toda

proteína M2 sem a His-tag foi coletada. A Figura 49 ilustra a proteína M2FL após a clivagem da His-tag.

Figura 49: SDS-PAGE evidenciando a clivagem da His-tag pela protease TEV: 1 marcador de massa molecular(kDa), 2 M2FL+his-tag, 3 M2FL + TEV após 4 h de clivagem, 4 M2FL pura ~15kDa.



4.2.7 Reconstrução da proteína em lipossomos de DOPC/DOPE

A proteína M2 foi reconstruída em lipossomo DOPC/DOPE (4:1 = mol:mol) em uma razão molar proteína (monômero):lipídeo de 1:20. Para preparação dos filmes lipídicos, quantidades calculadas de DOPC e DOPE foram encubadas em um balão de vidro em clorofórmio e o solvente foi primeiramente removido com fluxo de N_2, seguido por bomba de vácuo *overnight*. Os filmes lipídicos foram ressuspendidos em sonicação de banho com tampão (20 mM Tris, 400 mM NaCl, 2% OG pH 8,0) até se atingir o aspecto translúcido. A proteína M2 foi adicionada a solução lipídica e incubada sob agitação em temperatura ambiente por uma hora. A amostra contendo proteína+lipídeo+detergente foi transferida a uma membrana de diálise de 3,5kDa e dialisada em 2L de tampão a 28°C para remover todo detergente. As trocas de tampão foram feitas a cada 12 horas.

Para todos os pHs, a amostra contendo proteína+lipídeo+detergente foi dialisada em tampão 10 mM de Tris pH 8,0 até que todo detergente fosse removido e o

proteolipossomo fosse formado. Nas duas últimas trocas, 2 mg de Amberlite foram adicionados. Após a formação do proteolipossomo, as diálises seguiram as seguintes etapas, diferindo para determinados valores de pHs. Para pH 7,3, as quatro trocas de tampão foram feitas em 10 mM Tris pH 7,3. Para pH 6,2, a quatro ultimas etapas foram realizadas com tampão 10 mM Fosfato pH 6,2. Para pH 5,8 as quatro trocas foram feitas em tampão 10 mM Citrato pH 5,8.

Após a remoção do detergente e ajuste do pH das amostras, as amostras contendo os proteolipossomos foram ultracentrifugadas a 100 *kxg* por 18 horas a 8°C. O pellet contendo os proteolipossomos com aproximadamente 10 mg de proteína M2FL, foi transferido para o rotor de parede fina de 3,2 mm (36 µl de volume de amostra).

4.2.8 Espectroscopia de RMN

Os espectros de RMN do estado sólido para a técnica utilizada, Rotação em torno do Angulo Mágico (do inglês MAS – *Magic Angle Spin*), foram adquiridos no espectrômetro de RMN de 600 MHz da Brucker Avance usando uma sonda de MAS de 3,2 mm.

A rede correspondente a de RF de 1H / 13C / 15N foi otimizada para produzir alta eficiência de energia do 13C com 69,5 KHz/$W^{1/2}$ (100 kHz B1 a 144 W de potência de entrada). A sensibilidade dos experimentos de CP também é auxiliada pela homogeneidade do campo B1 de alto desempenho da sonda em todo o seu volume de amostra de 36 µL, com queda de amplitude de $A_{180°}/A_{90°}$ iguais a 0,95, 0,89, 0,81 nos canais 1H, 13C e 15N, respectivamente. A rotação das amosras foi controlada por uma unidade MAS Bruker pneumática a 12,2 kHz. A magnetização do 13C foi aprimorada pela polarização cruzada em rampas (CP) com 38 a 56 kHz do campo B1 do 13C e um tempo de contato de CP de 1 ms. O campo de *spinlock* do 1H usado foi de 50 kHz. O comprimento do pulso de 90 °do 13C foi de 3,2 µs. Para o desacoplamento do 1H durante as dimensões t1 e t2, uma sequência de dissociação SPINAL64 foi implementada usando um campo B1 do 1H de 78KHz. TPPI foi utilizado para detecção de quadratura em dimensão t1. As condições experimentais utilizadas em várias amostras estão listadas abaixo. Todos os espectros foram processados com uma função de janela Gaussiana (Gaussian Windown) (LB = -40 Hz e GB = 0,05) em ambas as dimensões. Todos os dados foram preenchidos de

zero até 1024 × 1024. As matrizes antes da transformação de Fourier 2D e deslocamentos químicas do 13C foram referenciadas externamente a uma amostra de glicina cristalina cujo sinal do carbonilo foi ajustado para 178,4 ppm em relação ao DSS.

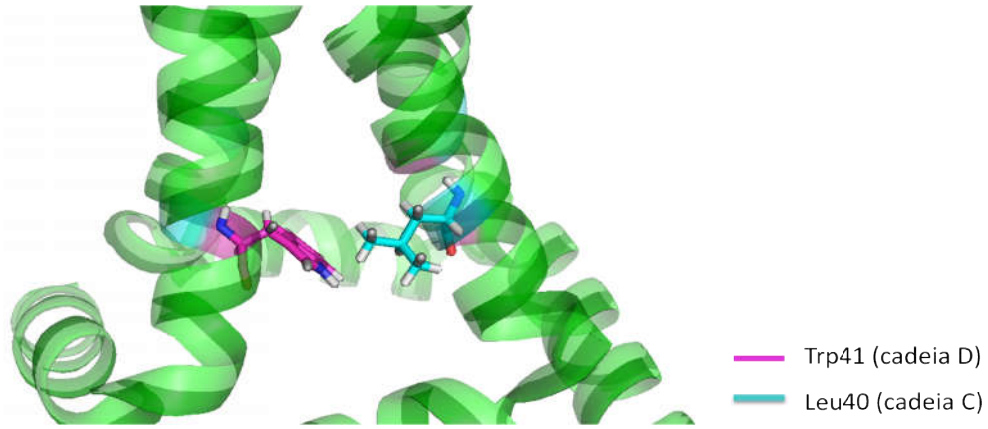
Para o experimento DARR de 100 ms, 200 ms e 500 ms na amostra uniforme de lipossomas M2FL marcados com [13C, 15N] – leucina/arginina e [13C]- triptofano a pH 7,3, 6,2 e 5,8, os tempos de aquisição para dimensões diretas e indiretas foram de 6 e 10 ms, respectivamente.

4.3 Resultados

4.3.1 M2FL com 13CTrp + 13C15NLeu marcados

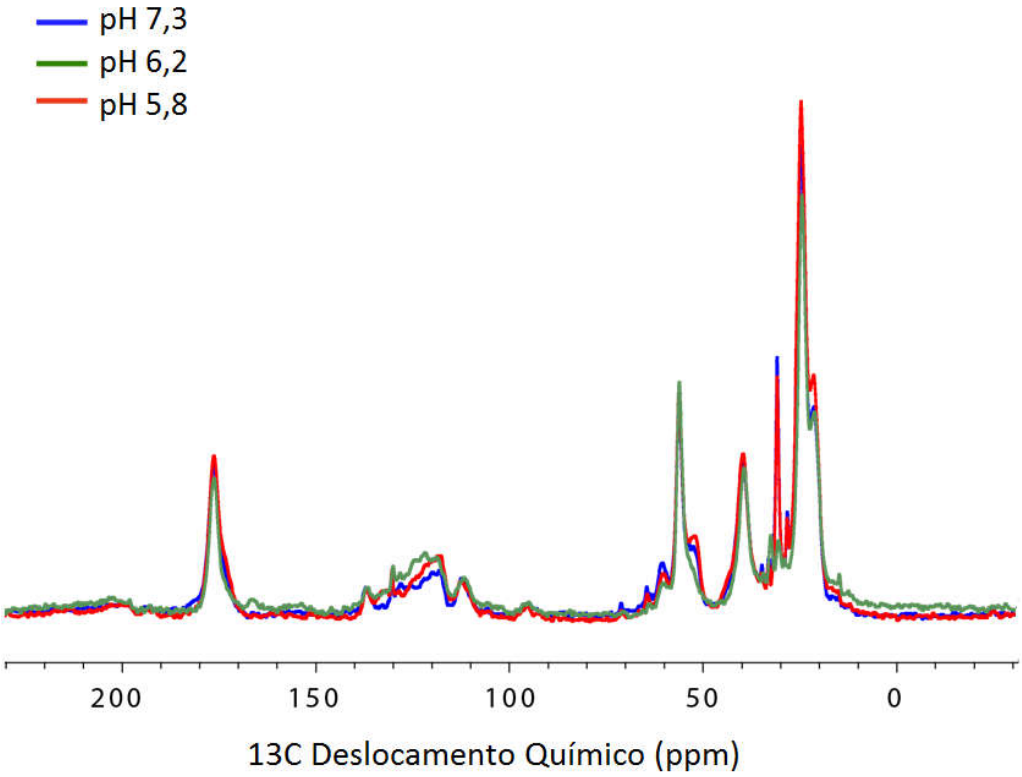
A amostra M2FL com 13CTrp + 13C15NLeu marcados foi a primeira amostra proposta para o estudo do comportamento do W41 em diferentes pHs (7,3, 6,2 e 5,8) devido a proximidade entre esses resíduos na estrutura tetramérica (PDB ID: 2L0J). Na Figura 50 pode ser observada a proximidade entre esses resíduos.

Figura 50: Estrutura tridimensional da proteína M2 (PDB ID: 2L0J) com os resíduos W41 (em rosa) e Leu 40(em azul) mostrando a proximidade espacial entre estes resíduos.



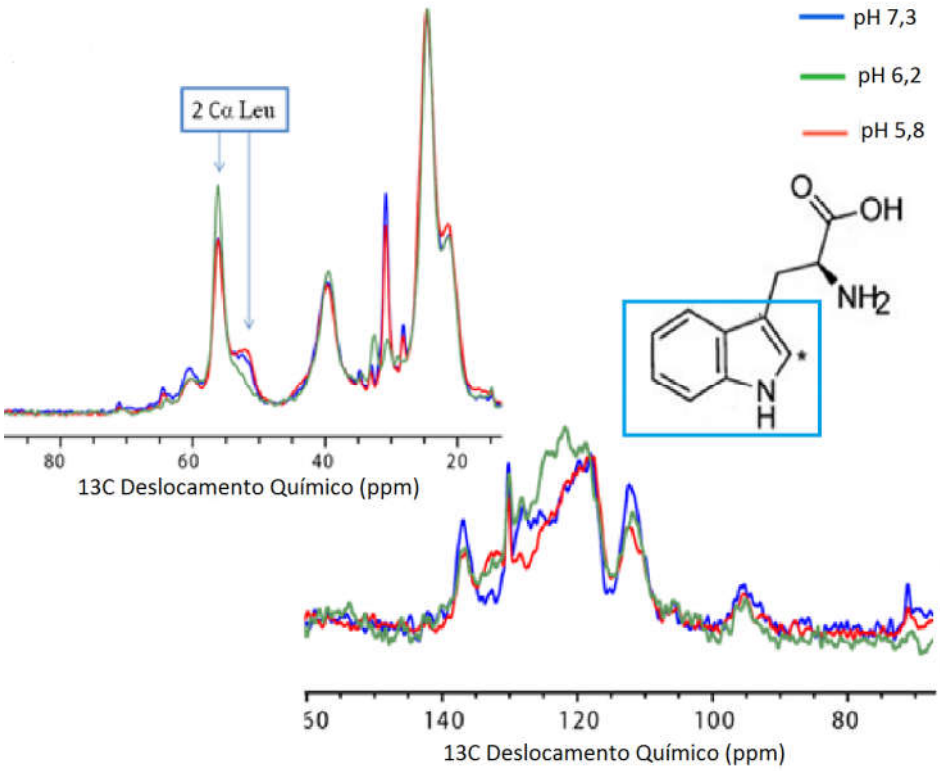
Espectros 1D da amostra M2FL(13C Trp +13C15N Leu) para os pHs 7,35, 6,2 e 5,8 estão apresentados na Figura 51. Analisando o espectro, podemos observar algumas diferenças nos picos da região dos carbonos aromáticos (região entre 100-150 ppm) e dos carbonos alifáticos (10-50 ppm) para os diferentes valores de pHs.

Figura 51: Experimentos 1D do 13C da amostra M2FL com os aminoácidos marcados 13C Trp + 13C15N Leu reconstruídos em bicamadas de DOPC:DOPE(4:1), na proporção monômero/lipídeo 1:20. Mudança dos picos e formas são observadas na região dos carbonos aromáticos (100-150 ppm) e dos carbono alifáticos (10-50 ppm) para os pHs 7,3 em azul, 6,2 em verde e 5,8 em vermelho.



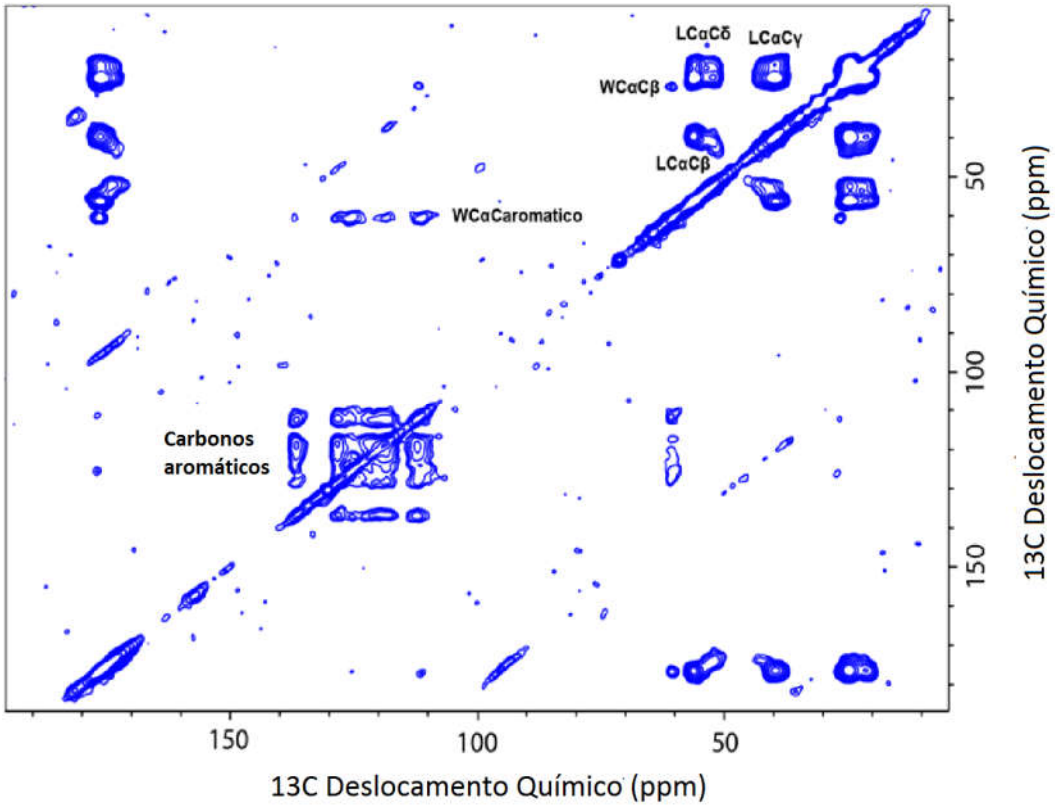
Na região dos carbonos alifáticos, observa-se a presença de dois picos, um a 56 ppm e outro a 52 ppm, os quais indicam a presença de 2 Cα para a leucina. A região dos aromáticos também apresenta diferenças nas intensidades dos picos, principalmente na região entre 120 ppm e 140 ppm (Figuras 51 e 52).

Figura 52: 1D do 13C da amostra M2FL com os aminoácidos marcados 13C Trp + 13C15N Leu indicando os 2 Cα para a leucina em 56 ppm e um 52 ppm e a diferença nas intensidades dos picos para os carbonos aromáticos Cδ1, Cδ2, Cζ e Cγ para os valores de pHs 7,3 em azul, 6,2 em verde e 5,8 em vermelho.



Baseando-se no espectro 2D de correlação carbono-carbono da amostra M2FL com os aminoácidos marcados 13C Trp + 13C15N Leu, foi possível identificar o assinalamento químico dos carbonos, tanto para a leucina como para o triptofano (vide Figura 53).

Figura 53: Espectro de correlação carbono-carbono da proteína M2 com os aminoácidos marcados 13C Trp + 13C15N Leu para o pH7,3 e *mixing time* de 100 ms. Os picos cruzados entre os carbonos dos resíduos de Trp e Leu estão destacados.



Os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos dos resíduos W e L estão listados na Tabela 7. Conforme observado no espectro 1D, o espectro de correlação também mostrou a presença de dois Cα para a leucina.

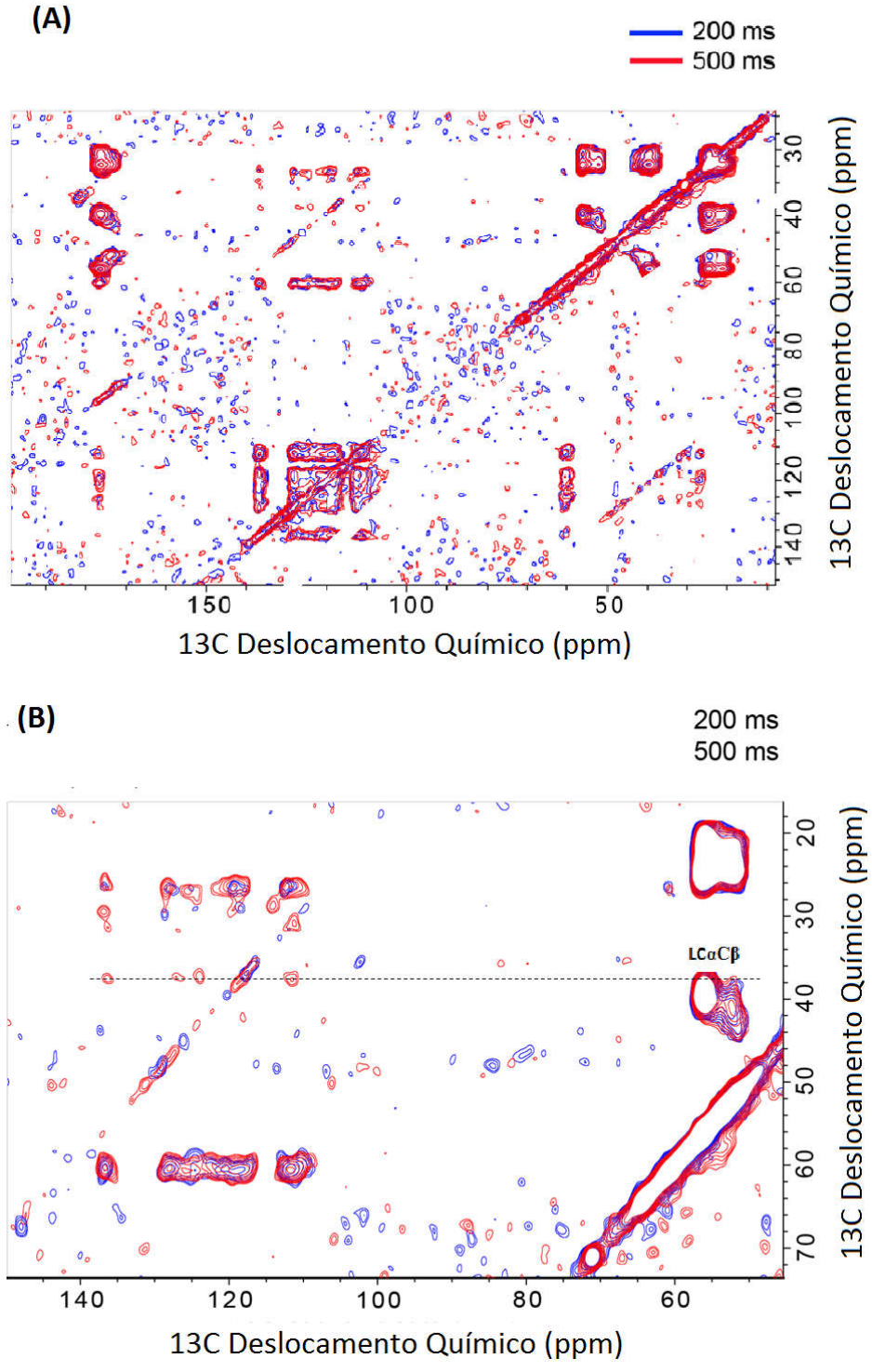
Tabela 7: Assinalamento químico em ppm dos carbonos dos resíduos de triptofano e leucina da M2.

	Cα	Cβ	Cγ	Cδ1	Cδ2	Cε2	Cε3	Cζ2	Cζ3
W	60 ppm	27 ppm	111 ppm			136 ppm			
L	52/56 ppm	35 ppm	24 ppm	21 ppm	21 ppm	-	-		-

Os picos dos carbonos do W41 apresentam menor intensidade quando comparados aos picos dos resíduos de Leu no espectro de correlação carbono-carbono (Figura 53), uma vez que a quantidade de resíduos de triptofano presente na sequência da proteína M2 é apenas 1 contra 10 resíduos de leucina. Além disso, para *mixing time*

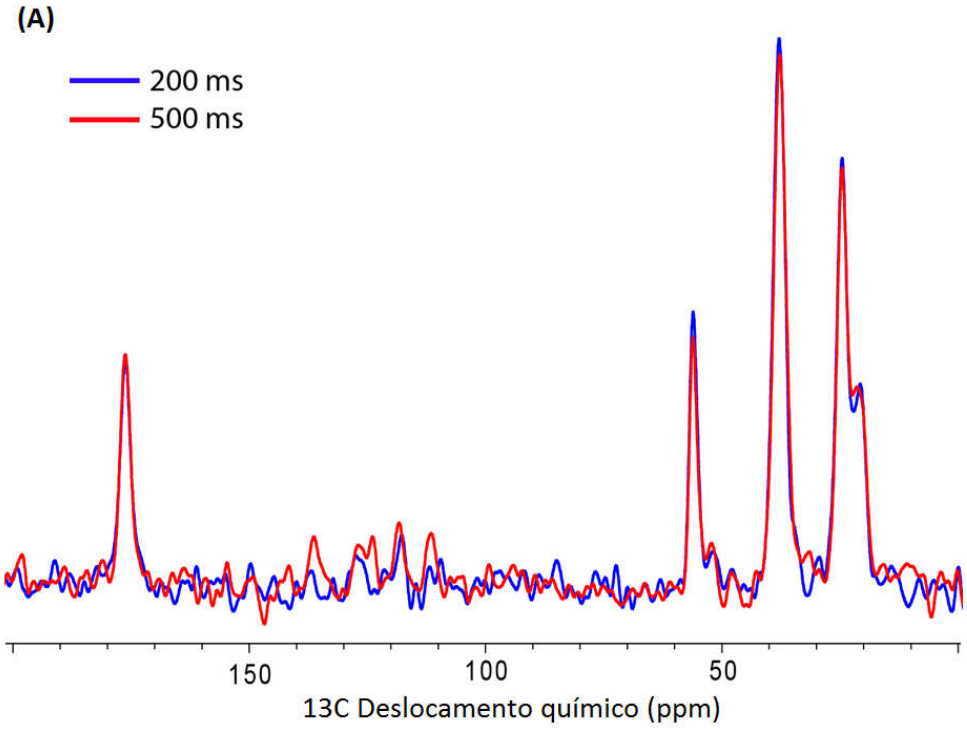
de 100 ms e pH 7,3, nenhum pico cruzado entre carbonos de W41 com carbonos de L foi observado. No entanto, quando aumentamos esse tempo para 500 ms (Figura 54), picos cruzados entre os carbonos aromáticos do W41 e os carbonos Cα e Cβ da L40 podem ser observados, conforme podemos visualizar na Figura 54.

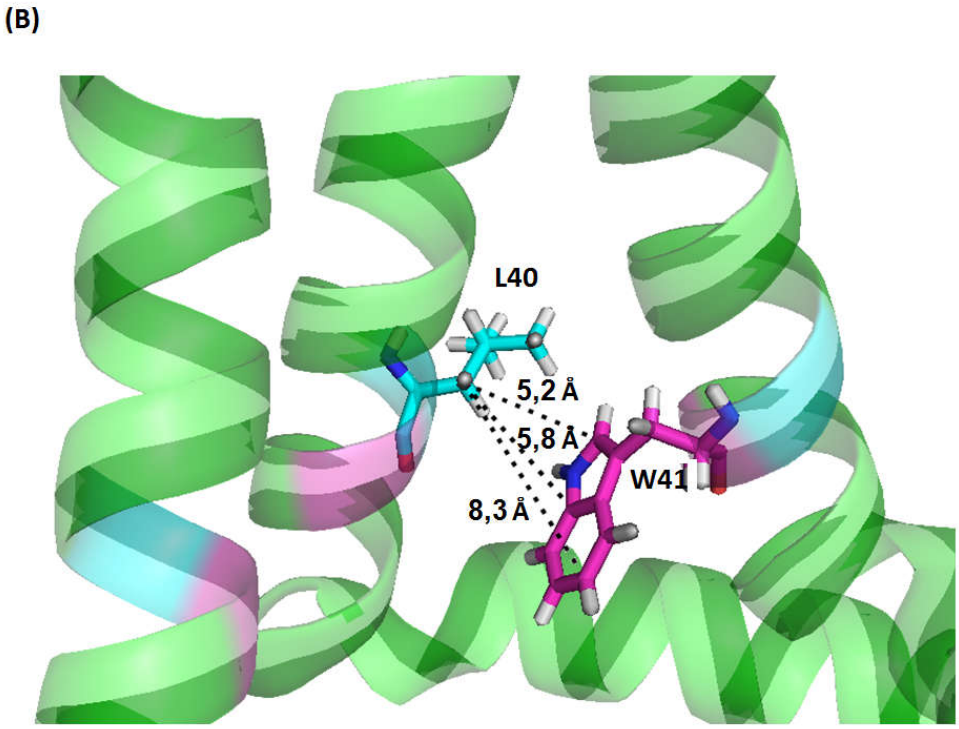
Figura 54: Espectro de correlação carbono-carbono da proteína M2 com os aminoácidos 13C Trp +13C15N Leu marcados reconstruída em lipossomos de DOPC:DOPE (4:1) na proporção monômero:lipídeo (1:20) em pH 7,3, com *mixing time* de 200 ms em azul e 500 ms em vermelho. (A) Visão geral do espectro 2D e (B) Espectro 2D ampliado na região dos picos cruzados entre os carbonos aromáticos do W41 com Cα e Cβ da L40.



Os picos cruzados obervados entre os carbonos aromáticos do W41 e os carbonos Cα e Cβ da L40 em 500 ms estão próximos ao ruído. Para verificar se os picos cruzados em 500 ms não são ruídos, foi realizado um corte horizontal do espectro 2D na região dos picos cruzados e as intensidades dos picos foram analisadas. O espectro do corte mostra diferenças nas intensidades dos picos para os carbonos Cβ, Cγ e Cδ da L40 e Cγ, Cζ2, Cδ1 e Cδ2 do W41 indicando a presença de picos cruzados entre esses carbonos em 500 ms (vide Figura 55).

Figura 55: (A) Corte horizontal do espectro 2D na região de picos cruzados da amostra M2 com os aminoácidos 13C Trp +13C15N Leu marcados em pH7,3 com marcação da região dos resíduos que apresentaram diferenças nas intensidades de picos em de 200 ms em zul para 500 ms em vermelho. (B) Ilustração das distâncias dos carbonos da L40 (azul) com o W41 (rosa) que apresentaram picos cruzados em 500 ms.

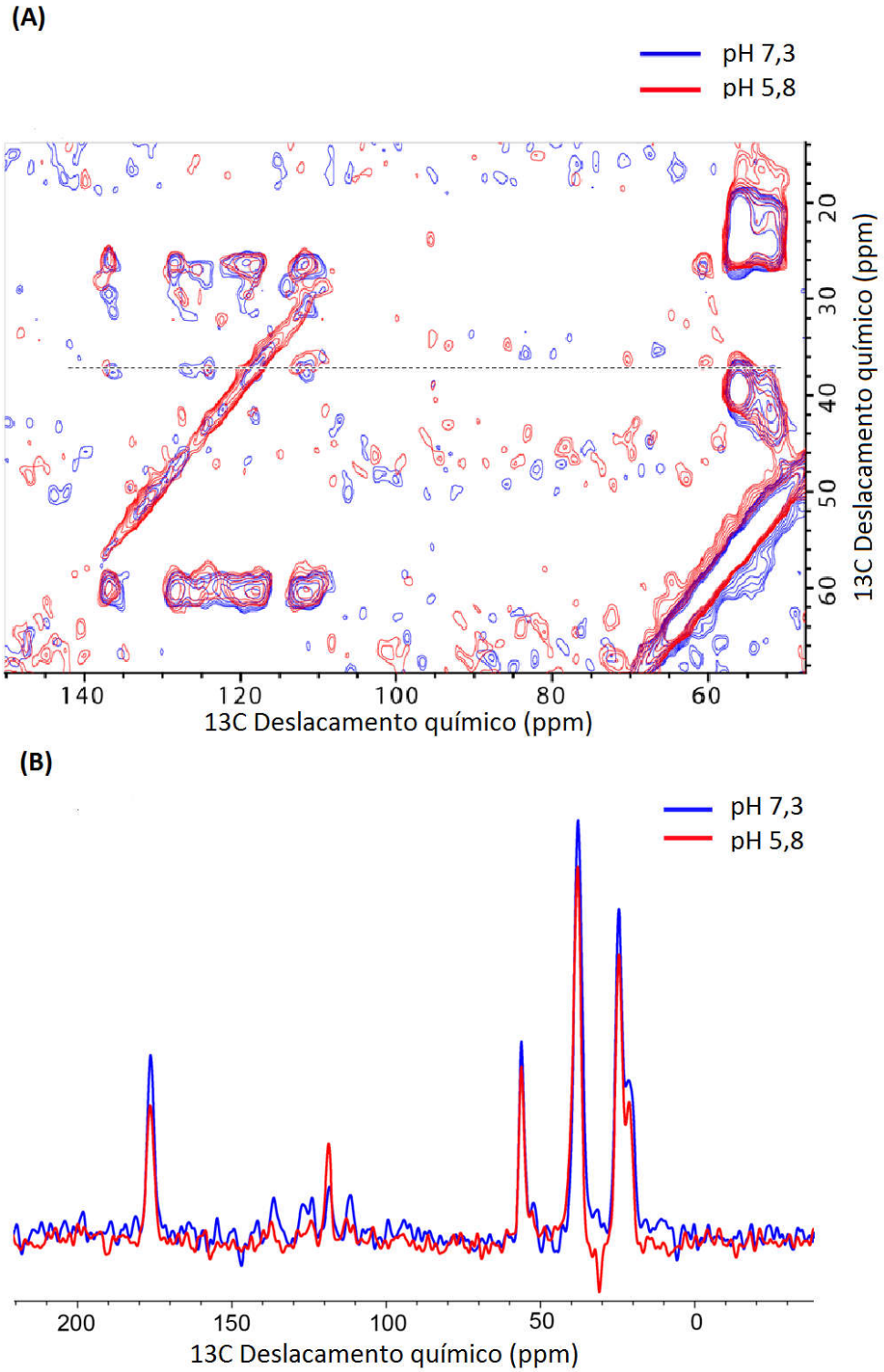




Com *mixing time* de 500 ms distâncias interatômicas entre 2,5-7,5 Å podem ser observadas. A estrutura da proteína M2 (PDB ID: 2L0J) apresenta distâncias entre Cβ da L40 com Cδ2 e CH2 do W41 de 5,8 e 8,3 Å, respectivamente. Estes dados corroboram com os dados obtidos pelos espectros de correlação carbono-carbono para *mixing time* de 500 ms, onde não há a presença de diferença de intensidade do pico do CH_2 do W41 (distância maior que 7,5 Å). No entanto, verifica-se a presença do pico cruzado com o carbono Cδ2 do W41 (distância entre 2,5-7,5 Å) (Figura 54-B).

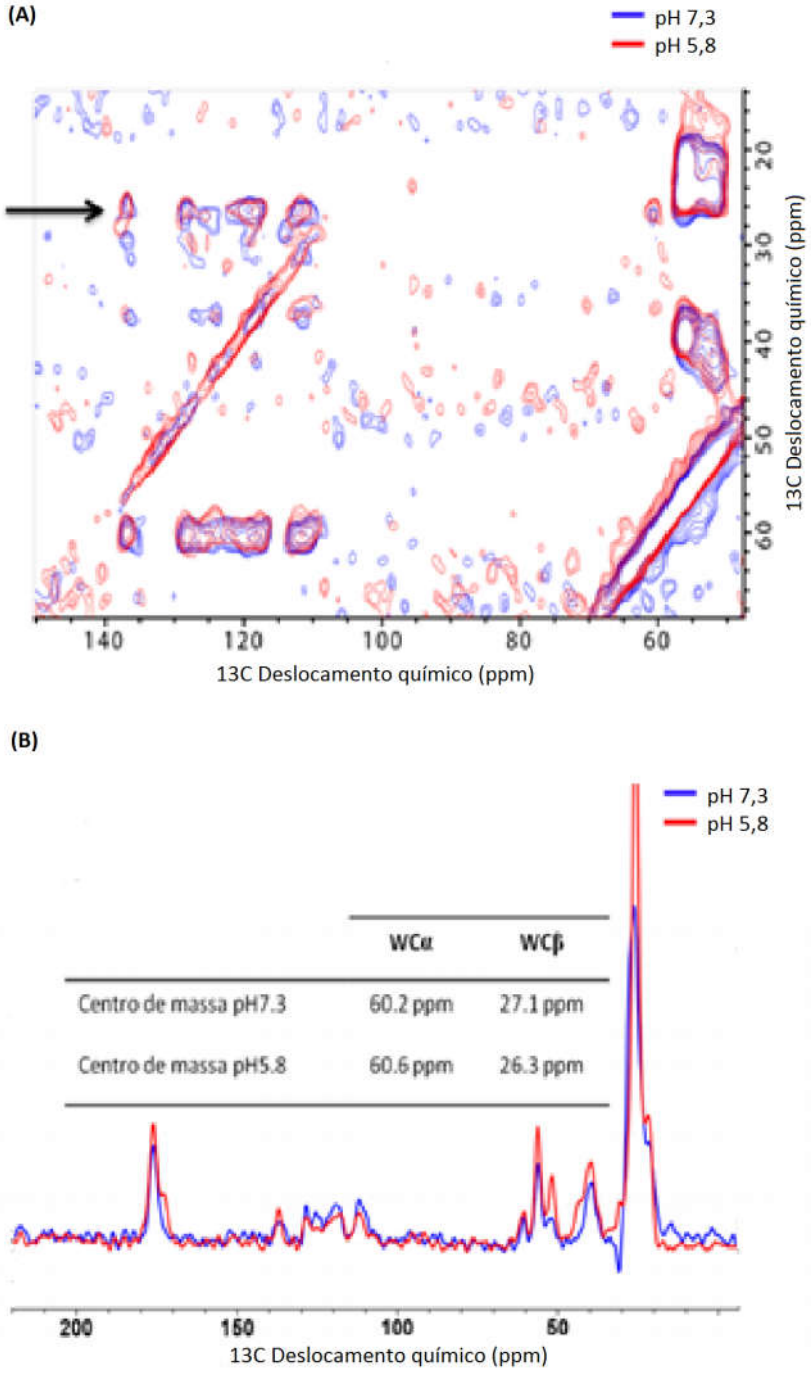
Para pH 5,8, que é o estado protonado e aberto do canal de condutância, não há picos cruzados na região dos aromáticos do W41 com a região dos Cα e Cβ da L40, mesmo para *mixing time* de 500 ms (Figura 55 - A e B). Estes resultados sugerem que a distancia entre W41 e L40 aumenta, indicando uma mudança na cadeia lateral desses aminoácidos com a alteração do pH ou que há uma dinâmica desses aminoácidos com o aumento da protonação, explicando também a ausência desses picos cruzados (vide Figura 56).

Figura 56: (A) Espectro de correlação carbono-carbono da M2 (13C Trp + 13C15N Leu) na região dos carbonos aromáticos do W41 com os Carbonos Cα e Cβ da L40 para pH 7,3 (vermelho) e 5,8 (azul) e *mixing time* de 500 ms. **(B)** Corte horizontal do espectro 2D da M2 (13C Trp + 13C15N Leu) na região de picos cruzados mostrando diferenças nas intensidades dos picos dos carbonos nos diferentes pHs.



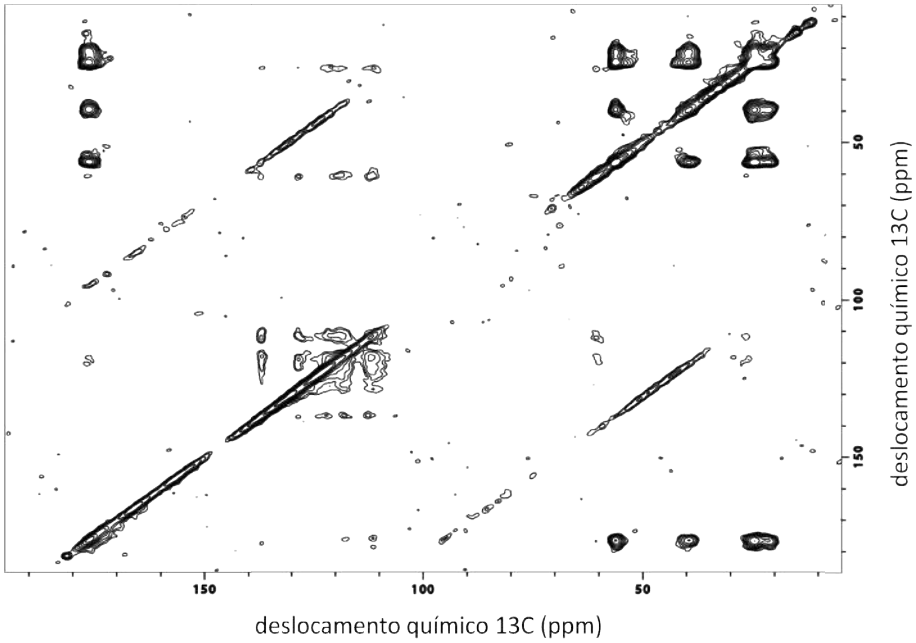
Diferenças nos picos cruzados dos carbonos aromáticos do W41 com seus Cα e Cβ também foram verificados (Figura 57). Em pH 7,3 os picos cruzados entre os carbonos aromáticos e o Cα foram em 60,2 ppm, enquanto que, em pH 5,8, o deslocamento químico do mesmo pico cruzado foi de 60,4 ppm. O mesmo ocorreu com os carbonos aromáticos do W41 e Cβ de 27,1 para 26,3 ppm para os pHs 7,3 e 5,8, respectivamente (vide Figura 57).

Figura 57: Espectros da proteína M2 com 13C Trp + 13C15N Leu marcados, em lipossomos composto por DOPC:DOPE (4:1) e proporção monômero:lipídeo (1:20) para os pHs 7,3 em azul e 5,8 em vermelho e *mixing time* de 500 ms.**(A)** Espectro de correlação carbono-carbono da M2 (13C Trp + 13C15N Leu) na região dos carbonos aromáticos do W41 com os Carbonos Cα e Cβ do W41 para pH 7,3 (vermelho) e 5,8 (azul) e *mixing time* de 500 ms. **(B)** Corte horizontal do espectro 2D da M2 (13C Trp + 13C15N Leu) na região de picos cruzados mostrando deslocamentos dos picos dos carbonos Cα e Cβ do W41 nos diferentes pHs.



O espectro de correlação carbono-carbono da M2 (13C Trp + 13C15N Leu) em pH 6,2 não apresentou picos cruzados entre os carbonos dos resíduos W41 e L40 (Figura 58). A ausência de pico cruzado pode indicar a dinâmica das cadeias desses aminoácidos neste pH, onde a atividade de canal da proteína M2 está ativo.

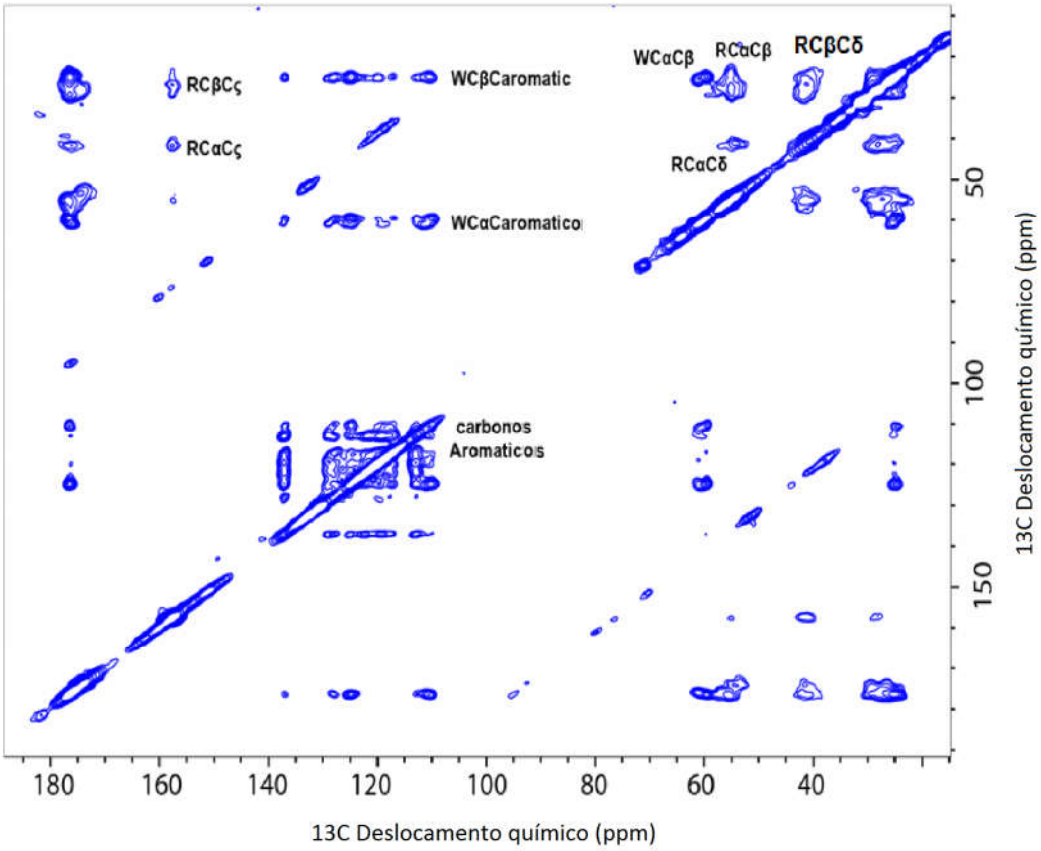
Figura 58: Espectro de correlação carbono-carbono da M2 (13C Trp + 13C15N Leu) para pH 6,2 e *mixing time* de 500 ms. Nenhum pico cruzado entre os carbonos do W41 com os carbonos da L40 são apresentados.



4.3.2 M2FL com 13CTrp + 13C15N Arg marcados

Analisando o espectro de correlação carbono-carbono da M2 com 13C Trp +13C15N Arg obtido em pH 7,3 e *mixinig time* 100 ms, podemos identificar os picos cruzados dos carbonos Cα e Cβ do W41 e da R (Figura 59). Assim como para a amostra M2(13C Trp+13C15N Leu), os picos dos resíduos de arginina apresentam maior intensidade quando comparados com os picos do W41, visto que há seis R contra um W na sequência da proteína M2FL. No entanto, a concentração do W é maior quando comparamos com as amostras da M2 (13CTrp +13C15NArg) (Figura 53).

Figura 59: Espectro de correlação carbono-carbono da M2 (13C Trp +13C15N Arg) em pH 7,3 e *mixing time* de 100 ms.



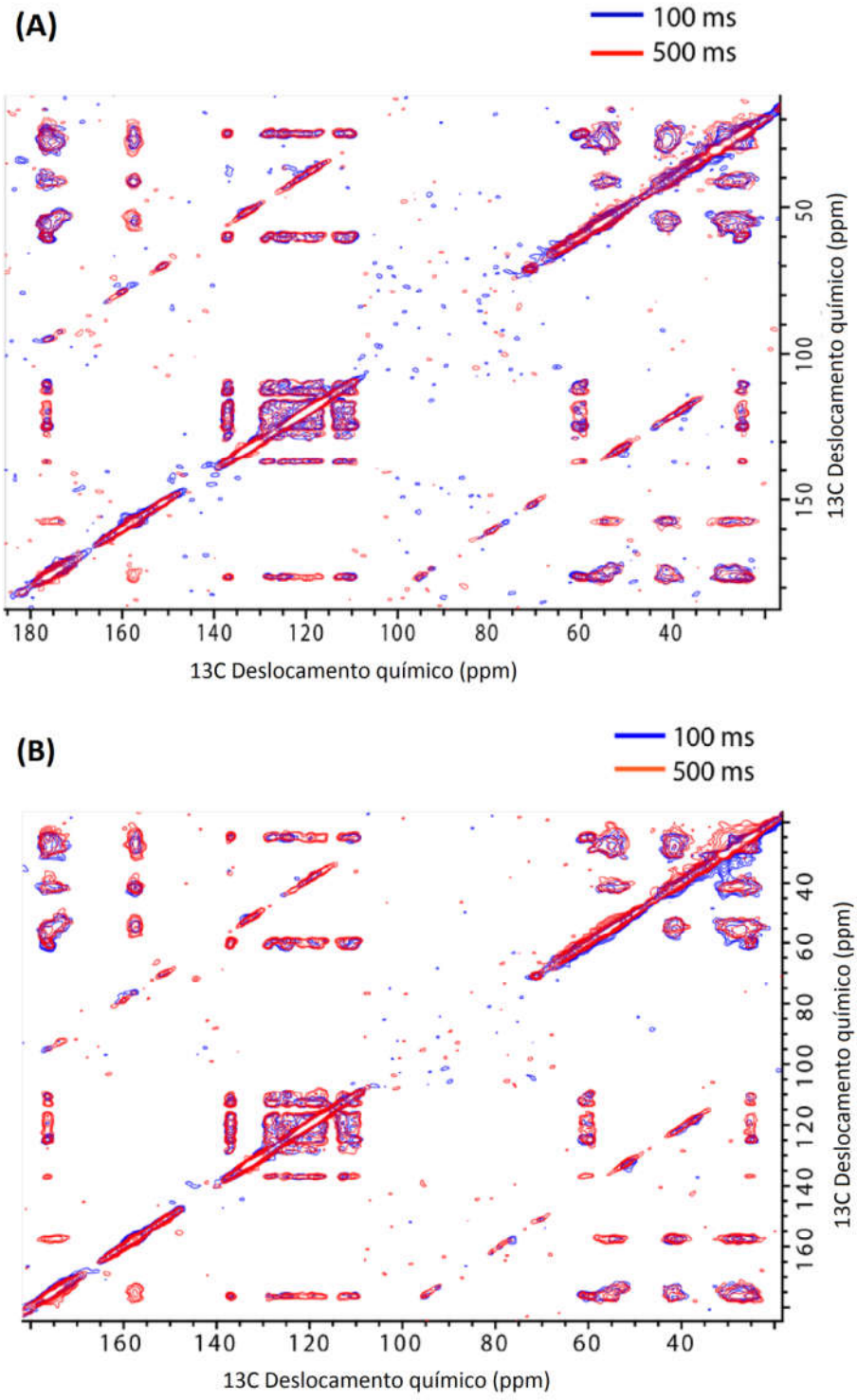
Os deslocamentos químicos dos carbonos do W41 e R também foram marcados para a amostra M2 (13C Trp +13C15N Arg). Na tabela 8 estão listados os valores encontrados para os deslocamentos químicos dos carbonos dos dois aminoácidos.

Tabela 8: Deslocamentos químicos em ppm dos carbonos do W41 e R da M2(13C Trp+13C15N Arg)

	Cα	**Cβ**	**Cγ**	**Cδ1**	**Cδ2**	**Cε2**	**Cε3**	**Cζ2**	**Cζ3**
Arg	55 ppm	27 ppm	24 ppm	41 ppm	-	-	-	157 ppm	-
Trp	60 ppm	27 ppm	111 ppm			136 ppm			

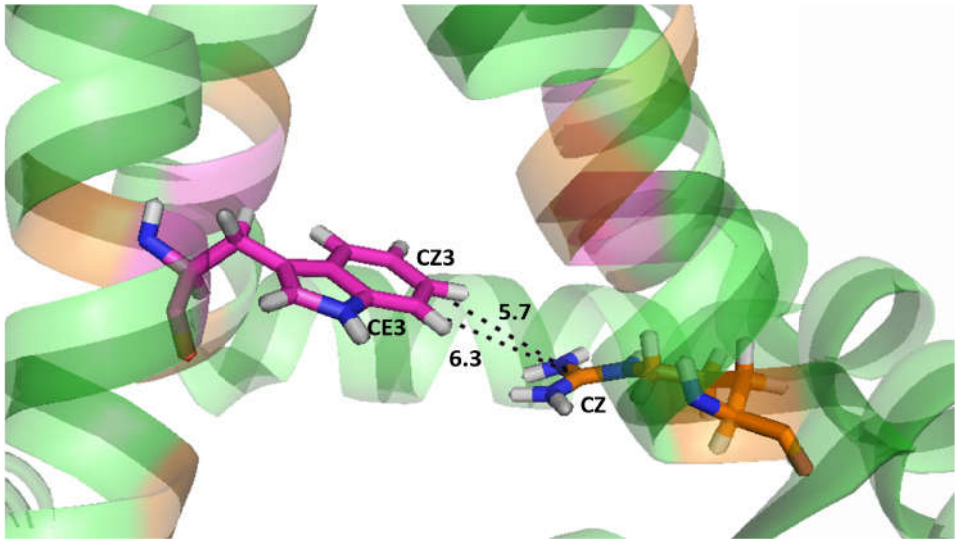
No pH7,3 e *mixing time* de 100 ms nenhum pico cruzado entre os carbonos do W41 com os da R foi encontrado. A ausência de pidos curzados também ocorreu para *mixing times* maiores (200 ms e 500 ms) e para o pH de 5,8, onde a atividade do canal de condutância é ativo (Figura 60).

Figura 60: Espectro de correlação da M2(13C Trp + 13C15N Arg) em lipossomos de DOCP:DOPE (4:1), proporção monômero:lipídeo 91:20, para **(A)** pH7,3 e **(B)** pH 5,8. *Mixing time* de 100 ms em azul e 500 ms em vermelho.



As distâncias entre os carbonos do W41 e R45 foram medidas a partir da estrutura 2L0J. As distâncias medidas entre Cζ3-W e Cζ-R e Cη3-W e Cζ-R são 5,7 Å e 6,3 Å, respectivamente (vide Figura 61). Estas distâncias estão dentro do intervalo de distâncias alcançado para *mixing time* de 500 ms (2,5-7,5 Å). No entanto picos cruzados não são observados entre esses carbonos (Figura 60).

Figura 61: Ilustração das distâncias dos carbonos da R45 (azul) com o W41 (rosa) que apresentaram picos cruzados em 500 ms na estrutura tetramérica da proteína M2 (PDB ID: 2L0J).



Estes resultados sugerem uma conformação diferente das cadeias laterais do W41 e A45 para a proteína M2 no seu comprimento total de 97 aminoácidos quando comparada com as conformações destes mesmos aminoácidos para o comprimento de condutância (22-62).

4.4 Conclusões

- A proteína M2 foi altamente expressa em *E. Coli* e purificada (~ 30 mg/L) tanto para M2 (13C Trp + 13C15N Leu) quanto para M2 (13C Trp + 13C15N Arg);

- A reconstituição das amostras foram feitas em lipossomos DOPC:DOPE(4:1) com ~ 10 mg para cada pH. As amostras apresentaram bom sinal/ruído, concluindo que os protocolos para os aminoácidos Trp, Leu e Arg marcados foram determinados para os processos de expressão e purificação utilizados;

- O arranjo do W41 em pH 7,3 mostra-se estático em relação ao aminoácido L40. No entanto, sua conformação em relação a R45 não mostrou ser aquela resolvida para a estrutura tetramérica (PDB ID:2L0J).

- Em pH 6,2 e 5,8 a cadeia lateral do W41 mostrou um comportamento dinâmico, não apresentando picos cruzados em espectros de correlação carbono-carbono com a L40;
- Deslocamentos químicos dos Cα e Cβ do W41 foram diferentes para os pH 7,3 e 5,8, mostrando diferenças conformacionais desse resíduo nestes dois estados de protonação das H37, confirmando sua influencia na atividade de canal da proteína M2;
- A presença de apenas um único pico de Cα e Cβ para W41 indica uma conformação homogênia na estrutura tetramérica da proteína M2;
- As amostras M2 (13C Trp + 13C15N Leu) e M2 (13C Trp + 13C15N Arg) mostraram as diferentes características da estrutura do resíduo W41 em função do pH, bem como apresentaram importantes informações sobre a estrutra das cadeias do W41 e R45 que mostram ser diferentes das informações estruturais apresentadas na estrutura apenas do canal de condutância (2L0J);
- A técninda de MAS (Rotação em torno do ângulo Mágico) se mostrou altamente eficiente no esutudo das conformações estruturais do W41 em diferentes pHs. No entanto, amostras com diferentes aminoácidos marcados ainda são necessárias para se obter uma maior informação sobre o mecanismo de "*gate*" do W41.

4.5 Trabalhos e Andamento e Perspectivas Futuras

Com o objetivo de analisar as mudanças conformacionais da cadeia lateral do W41, ou seja, se ele possui interação direta com a histidna, como esta interação ocorre e qual a sua dependência com o pH, amostras da proteína M2 com os resíduos W41 e H37 marcadas foram produzidas. Experimentos de RMN do estado sólido, utilizando a metodologia DARR, estão sendo realizadas. Este estudo possibilitará a melhor compreensão do mecanismo de "*gate*" do W41.

REFERÊNCIAS

ALDABE, R.; BARCO, A.; CARRASCO, L. Membrane permeabilization by poliovirus proteins 2B and 2BC. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 38, p. 23134–23137, 1996.

ALLEN, W. J.; LEMKUL, J. A.; BEVAN, D. R. GridMAT-MD: a grid-based membrane analysis tool for use with molecular dynamics. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 12, p. 1952–1958. doi: 10.1002/jcc.21172, 2009.

ALVES GALVÃO, M. G.; ROCHA CRISPINO SANTOS, M. A.; ALVES DA CUNHA, A. J. L. Amantadine and rimantadine for influenza A in children and the elderly. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, , n. 11, p. CD002745. doi: 10.1002/14651858.CD002745.pub4, 2014.

AMANTADINE AND INFLUENZA. .**The Lancet**, v. 294, n. 7629, p. 1055–1056. doi: 10.1016/S0140-6736(69)90654-0, 1969.

ANDERSEN, O. S.; KOEPPE, R. E. Bilayer thickness and membrane protein function: an energetic perspective. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 36, p. 107–130. doi: 10.1146/annurev.biophys.36.040306.132643, 2007.

AO, D.; SUN, S.-Q.; GUO, H.-C. Topology and biological function of enterovirus non-structural protein 2B as a member of the viroporin family. **Veterinary Research**, v. 45, n. 1. doi: 10.1186/s13567-014-0087-6, 2014.

ARAUJO, G. C.; SILVA, R. H. T.; SCOTT, L. P. B.; et al. Structure and functional dynamics characterization of the ion channel of the human respiratory syncytial virus (hRSV) small hydrophobic protein (SH) transmembrane domain by combining molecular dynamics with excited normal modes. **Journal of Molecular Modeling**, v. 22, n. 12, p. 286. doi: 10.1007/s00894-016-3150-6, 2016.

BARCO, A.; CARRASCO, L. A human virus protein, poliovirus protein 2BC, induces membrane proliferation and blocks the exocytic pathway in the yeast Saccharomyces cerevisiae. **The EMBO journal**, v. 14, n. 14, p. 3349–3364, 1995.

BECKER, O. M.; JR, A. D. M.; ROUX, B.; WATANABE, M. (EDS.). **Computational Biochemistry and Biophysics**. 1 edition ed. New York: CRC Press, 2001.

BENJAMINI, A.; SMIT, B. Lipid mediated packing of transmembrane helices – a dissipative particle dynamics study. **Soft Matter**, v. 9, n. 9, p. 2673–2683. doi: 10.1039/C2SM27165F, 2013.

BENNETT, A. E.; RIENSTRA, C. M.; GRIFFITHS, J. M.; et al. Homonuclear radio frequency-driven recoupling in rotating solids. **The Journal of Chemical Physics**, v. 108, n. 22, p. 9463–9479. doi: 10.1063/1.476420, 1998.

BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; GUNSTEREN, W. F. VAN; DINOLA, A.; HAAK, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 8, p. 3684–3690. doi: 10.1063/1.448118, 1984.

BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; GUNSTEREN, W. F. VAN; HERMANS, J. Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. In: B. Pullman (Ed.); **Intermolecular Forces**, The Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry. p.331–342. Springer Netherlands. Retrieved December 15, 2014, from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-015-7658-1_21, 1981.

BETAKOVA, T.; HAY, A. J. Stability and function of the influenza A virus M2 ion channel protein is determined by both extracellular and cytoplasmic domains. **Archives of Virology**, v. 154, n. 1, p. 147–151. doi: 10.1007/s00705-008-0283-7, 2009.

BLOEMBERGEN, N. On the interaction of nuclear spins in a crystalline lattice. **Physica**, v. 15, n. 3, p. 386–426. doi: 10.1016/0031-8914(49)90114-7, 1949.

BOWDEN, T. A.; CRISPIN, M.; HARVEY, D. J.; et al. Crystal Structure and Carbohydrate Analysis of Nipah Virus Attachment Glycoprotein: a Template for Antiviral and Vaccine Design. **Journal of Virology**, v. 82, n. 23, p. 11628–11636. doi: 10.1128/JVI.01344-08, 2008.

BRADLEY, R.; RADHAKRISHNAN, R. Coarse-Grained Models for Protein-Cell Membrane Interactions. . Retrieved January 7, 2018, from http://www.mdpi.com/2073-4360/5/3/890/htm, 2013, April 26.

BRAMBILLASCA, S.; YABAL, M.; MAKAROW, M.; BORGESE, N. Unassisted translocation of large polypeptide domains across phospholipid bilayers. **The Journal of Cell Biology**, v. 175, n. 5, p. 767–777. doi: 10.1083/jcb.200608101, 2006.

BROHM, C.; STEINMANN, E.; FRIESLAND, M.; et al. Characterization of determinants important for hepatitis C virus p7 function in morphogenesis by using trans-complementation. **Journal of Virology**, v. 83, n. 22, p. 11682–11693. doi: 10.1128/JVI.00691-09, 2009.

BUHAI, B.; HAKIMOV, A.; ARDELEAN, I.; KIMMICH, R. NMR acceleration mapping in percolation model objects. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 168, n. 1, p. 175–185. doi: 10.1016/j.jmr.2004.02.013, 2004.

BUKREYEV, A.; WHITEHEAD, S. S.; MURPHY, B. R.; COLLINS, P. L. Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse. **Journal of Virology**, v. 71, n. 12, p. 8973–8982, 1997.

CADY, S. D.; SCHMIDT-ROHR, K.; WANG, J.; et al. Structure of the Amantadine Binding Site of Influenza M2 Proton Channels In Lipid Bilayers. **Nature**, v. 463, n. 7281, p. 689–692. doi: 10.1038/nature08722, 2010.

CAFFREY, M. Membrane protein crystallization. **Journal of Structural Biology**, v. 142, n. 1, p. 108–132, 2003.

CARRASCO, L. Membrane leakiness after viral infection and a new approach to the development of antiviral agents. **Nature**, v. 272, n. 5655, p. 694–699, 1978.

CHAMI, M.; FERRARI, D.; NICOTERA, P.; PATERLINI-BRÉCHOT, P.; RIZZUTO, R. Caspase-dependent Alterations of Ca2+ Signaling in the Induction of Apoptosis by Hepatitis B Virus X Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 34, p. 31745–31755. doi: 10.1074/jbc.M304202200, 2003.

CHEN, B. J.; LESER, G. P.; JACKSON, D.; LAMB, R. A. The Influenza Virus M2 Protein Cytoplasmic Tail Interacts with the M1 Protein and Influences Virus Assembly at the Site of Virus Budding. **Journal of Virology**, v. 82, n. 20, p. 10059–10070. doi: 10.1128/JVI.01184-08, 2008.

CHEN, H.; WU, Y.; VOTH, G. A. Proton transport behavior through the influenza A M2 channel: insights from molecular simulation. **Biophysical Journal**, v. 93, n. 10, p. 3470–3479. doi: 10.1529/biophysj.107.105742, 2007.

CHEN, M. D.; VAZQUEZ, M.; BUONOCORE, L.; KAHN, J. S. Conservation of the respiratory syncytial virus SH gene. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 182, n. 4, p. 1228–1233. doi: 10.1086/315829, 2000.

CHEN, M. Y.; MALDARELLI, F.; KARCZEWSKI, M. K.; WILLEY, R. L.; STREBEL, K. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces degradation of CD4 in vitro: the cytoplasmic domain of CD4 contributes to Vpu sensitivity. **Journal of Virology**, v. 67, n. 7, p. 3877–3884, 1993.

COLLINS, P. L.; MOTTET, G. Membrane orientation and oligomerization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus. **The Journal of General Virology**, v. 74 (Pt 7), p. 1445–1450, 1993.

COLLINS, P. L.; OLMSTED, R. A.; JOHNSON, P. R. The small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus: comparison between antigenic subgroups A and B. **The Journal of General Virology**, v. 71 (Pt 7), p. 1571–1576, 1990.

COUCH, R. B. Use of amantadine in the therapy and prophylaxis of A2 influenza. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 41, n. 3, p. 695–696, 1969.

CROFT, S. N.; WALKER, E. J.; GHILDYAL, R. Picornaviruses and Apoptosis: Subversion of Cell Death. **mBio**, v. 8, n. 5, p. e01009–17. doi: 10.1128/mBio.01009-17, 2017.

CROZIER, P. S.; HENDERSON, D.; ROWLEY, R. L.; BUSATH, D. D. Model channel ion currents in NaCl-extended simple point charge water solution with applied-field molecular dynamics. **Biophysical Journal**, v. 81, n. 6, p. 3077–3089, 2001.

CYMER, F.; VEERAPPAN, A.; SCHNEIDER, D. Transmembrane helix-helix interactions are modulated by the sequence context and by lipid bilayer properties. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1818, n. 4, p. 963–973. doi: 10.1016/j.bbamem.2011.07.035, 2012.

DAMOC, E.; FRASER, C. S.; ZHOU, M.; et al. Structural Characterization of the Human Eukaryotic Initiation Factor 3 Protein Complex by Mass Spectrometry. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 6, n. 7, p. 1135–1146. doi: 10.1074/mcp.M600399-MCP200, 2007.

DAVIES, W. L.; GRUNERT, R. R.; HAFF, R. F.; et al. ANTIVIRAL ACTIVITY OF 1-ADAMANTANAMINE (AMANTADINE). **Science (New York, N.Y.)**, v. 144, n. 3620, p. 862–863, 1964.

DECOURSEY, T. E.; HOSLER, J. Philosophy of voltage-gated proton channels. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 11, n. 92, p. 20130799. doi: 10.1098/rsif.2013.0799, 2014.

DOEDENS, J. R.; KIRKEGAARD, K. Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. **The EMBO journal**, v. 14, n. 5, p. 894–907, 1995.

DUBÉ, M.; BEGO, M. G.; PAQUAY, C.; COHEN, É. A. Modulation of HIV-1-host interaction: role of the Vpu accessory protein. **Retrovirology**, v. 7, p. 114. doi: 10.1186/1742-4690-7-114, 2010.

ESSMANN, U.; PERERA, L.; BERKOWITZ, M. L.; et al. A smooth particle mesh Ewald method. **The Journal of Chemical Physics**, v. 103, n. 19, p. 8577–8593. doi: 10.1063/1.470117, 1995.

EWART, G. D.; MILLS, K.; COX, G. B.; GAGE, P. W. Amiloride derivatives block ion channel activity and enhancement of virus-like particle budding caused by HIV-1 protein Vpu. **European biophysics journal: EBJ**, v. 31, n. 1, p. 26–35, 2002.

EWART, G. D.; SUTHERLAND, T.; GAGE, P. W.; COX, G. B. The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels. **Journal of Virology**, v. 70, n. 10, p. 7108–7115, 1996.

FAUROUX, B.; SIMÕES, E. A. F.; CHECCHIA, P. A.; et al. The Burden and Long-term Respiratory Morbidity Associated with Respiratory Syncytial Virus Infection in Early Childhood. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 6, n. 2, p. 173–197. doi: 10.1007/s40121-017-0151-4, 2017.

FELDMAN, S. A.; HENDRY, R. M.; BEELER, J. A. Identification of a Linear Heparin Binding Domain for Human Respiratory Syncytial Virus Attachment Glycoprotein G. **Journal of Virology**, v. 73, n. 8, p. 6610–6617, 1999.

FOSTER, T. L.; VEROW, M.; WOZNIAK, A. L.; et al. Resistance mutations define specific antiviral effects for inhibitors of the hepatitis C virus p7 ion channel. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 54, n. 1, p. 79–90. doi: 10.1002/hep.24371, 2011.

FRENKEL, D.; SMIT, B. **Understanding Molecular Simulation, Second Edition: From Algorithms to Applications**. 2 edition ed. San Diego: Academic Press, 2001.

FUENTES, S.; TRAN, K. C.; LUTHRA, P.; TENG, M. N.; HE, B. Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. **Journal of Virology**, v. 81, n. 15, p. 8361–8366. doi: 10.1128/JVI.02717-06, 2007.

GAN, S. W.; NG, L.; LIN, X.; GONG, X.; TORRES, J. Structure and ion channel activity of the human respiratory syncytial virus (hRSV) small hydrophobic protein transmembrane domain. **Protein Science : A Publication of the Protein Society**, v. 17, n. 5, p. 813–820. doi: 10.1110/ps.073366208, 2008.

GAN, S.-W.; TAN, E.; LIN, X.; et al. The small hydrophobic protein of the human respiratory syncytial virus forms pentameric ion channels. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 29, p. 24671–24689. doi: 10.1074/jbc.M111.332791, 2012.

GENTZSCH, J.; BROHM, C.; STEINMANN, E.; et al. hepatitis c Virus p7 is critical for capsid assembly and envelopment. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 5, p. e1003355. doi: 10.1371/journal.ppat.1003355, 2013.

GLÜCK, J. M.; WITTLICH, M.; FEUERSTEIN, S.; et al. Integral Membrane Proteins in Nanodiscs Can Be Studied by Solution NMR Spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 34, p. 12060–12061. doi: 10.1021/ja904897p, 2009.

GONZALEZ, M. E.; CARRASCO, L. Viroporins. **FEBS letters**, v. 552, n. 1, p. 28–34, 2003.

GOUKLANI, H.; BEYER, C.; DRUMMER, H.; et al. Identification of specific regions in hepatitis C virus core, NS2 and NS5A that genetically interact with p7 and co-ordinate infectious virus production. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 20, n. 4, p. e66–e71. doi: 10.1111/jvh.12004, 2013.

GOVORKOVA, E. A.; WEBSTER, R. G. Combination Chemotherapy for Influenza. **Viruses**, v. 2, n. 8, p. 1510–1529. doi: 10.3390/v2081510, 2010.

GRAMBAS, S.; HAY, A. J. Maturation of influenza A virus hemagglutinin--estimates of the pH encountered during transport and its regulation by the M2 protein. **Virology**, v. 190, n. 1, p. 11–18, 1992.

GRIFFIN, S. D. C.; BEALES, L. P.; CLARKE, D. S.; et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. **FEBS letters**, v. 535, n. 1-3, p. 34–38, 2003.

GRIFFIN, S.; STGELAIS, C.; OWSIANKA, A. M.; et al. Genotype-dependent sensitivity of hepatitis C virus to inhibitors of the p7 ion channel. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 48, n. 6, p. 1779–1790. doi: 10.1002/hep.22555, 2008.

HAJNÓCZKY, G.; DAVIES, E.; MADESH, M. Calcium signaling and apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 304, n. 3, p. 445–454, 2003.

HAY, A. J.; WOLSTENHOLME, A. J.; SKEHEL, J. J.; SMITH, M. H. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. **The EMBO Journal**, v. 4, n. 11, p. 3021–3024, 1985.

HE, C. **MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION BASED ON HADOOP MAPREDUCE**, 2011.

HEGINBOTHAM, L.; LU, Z.; ABRAMSON, T.; MACKINNON, R. Mutations in the K+ channel signature sequence. **Biophysical Journal**, v. 66, n. 4, p. 1061–1067, 1994.

VON HEIJNE, G. Transcending the impenetrable: how proteins come to terms with membranes. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 947, n. 2, p. 307–333, 1988.

HELENIUS, A. Unpacking the incoming influenza virus. **Cell**, v. 69, n. 4, p. 577–578, 1992.

HEMINWAY, B. R.; YU, Y.; TANAKA, Y.; et al. Analysis of respiratory syncytial virus F, G, and SH proteins in cell fusion. **Virology**, v. 200, n. 2, p. 801–805. doi: 10.1006/viro.1994.1245, 1994.

HENKEL, J. R.; GIBSON, G. A.; POLAND, P. A.; et al. Influenza M2 proton channel activity selectively inhibits trans-Golgi network release of apical membrane and secreted proteins in polarized Madin-Darby canine kidney cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 148, n. 3, p. 495–504, 2000.

HENKEL, J. R.; WEISZ, O. A. Influenza virus M2 protein slows traffic along the secretory pathway. pH perturbation of acidified compartments affects early Golgi transport steps. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 11, p. 6518–6524, 1998.

HOCKNEY, R. W. POTENTIAL CALCULATION AND SOME APPLICATIONS. **Methods Comput. Phys. 9: 135-211(1970).** Retrieved February 15, 2018, from https://www.osti.gov/biblio/4079632, 1970.

HOLT, A.; KILLIAN, J. A. Orientation and dynamics of transmembrane peptides: the power of simple models. **European biophysics journal: EBJ**, v. 39, n. 4, p. 609–621. doi: 10.1007/s00249-009-0567-1, 2010.

HSU, K.; HAN, J.; SHINLAPAWITTAYATORN, K.; DESCHENES, I.; MARBÁN, E. Membrane potential depolarization as a triggering mechanism for Vpu-mediated HIV-1 release. **Biophysical Journal**, v. 99, n. 6, p. 1718–1725. doi: 10.1016/j.bpj.2010.07.027, 2010.

HU, J.; ASBURY, T.; ACHUTHAN, S.; et al. Backbone Structure of the Amantadine-Blocked Trans-Membrane Domain M2 Proton Channel from Influenza A Virus. **Biophysical Journal**, v. 92, n. 12, p. 4335–4343. doi: 10.1529/biophysj.106.090183, 2007.

ICHINOHE, T.; PANG, I. K.; IWASAKI, A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, p. 404–410. doi: 10.1038/ni.1861, 2010.

IWATA, S. **Methods and Results in Crystallization of Membrane Proteins**. Internat'l University Line, 2003.

IWATSUKI-HORIMOTO, K.; HORIMOTO, T.; NODA, T.; et al. The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. **Journal of Virology**, v. 80, n. 11, p. 5233–5240. doi: 10.1128/JVI.00049-06, 2006.

JACOTOT, E.; RAVAGNAN, L.; LOEFFLER, M.; et al. The HIV-1 Viral Protein R Induces Apoptosis via a Direct Effect on the Mitochondrial Permeability Transition Pore. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 1, p. 33–46, 2000.

JIN, H.; ZHOU, H.; CHENG, X.; et al. Recombinant Respiratory Syncytial Viruses with Deletions in the NS1, NS2, SH, and M2-2 Genes Are Attenuated in Vitro and in Vivo. **Virology**, v. 273, n. 1, p. 210–218. doi: 10.1006/viro.2000.0393, 2000.

JONES, C. T.; MURRAY, C. L.; EASTMAN, D. K.; TASSELLO, J.; RICE, C. M. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. **Journal of Virology**, v. 81, n. 16, p. 8374–8383. doi: 10.1128/JVI.00690-07, 2007.

JONG, A. S. DE; MATTIA, F. DE; DOMMELEN, M. M. V.; et al. Functional Analysis of Picornavirus 2B Proteins: Effects on Calcium Homeostasis and Intracellular Protein Trafficking. **Journal of Virology**, v. 82, n. 7, p. 3782–3790. doi: 10.1128/JVI.02076-07, 2008.

DE JONG, A. S.; VISCH, H.-J.; DE MATTIA, F.; et al. The coxsackievirus 2B protein increases efflux of ions from the endoplasmic reticulum and Golgi, thereby inhibiting protein trafficking through the Golgi. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 20, p. 14144–14150. doi: 10.1074/jbc.M511766200, 2006.

KANNEGANTI, T.-D.; BODY-MALAPEL, M.; AMER, A.; et al. Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 48, p. 36560–36568. doi: 10.1074/jbc.M607594200, 2006.

KENDAL, A. P.; KLENK, H. D. Amantadine inhibits an early, M2 protein-dependent event in the replication cycle of avian influenza (H7) viruses. **Archives of Virology**, v. 119, n. 3-4, p. 265–273, 1991.

KHOURY, G.; EWART, G.; LUSCOMBE, C.; MILLER, M.; WILKINSON, J. Antiviral Efficacy of the Novel Compound BIT225 against HIV-1 Release from Human Macrophages. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 835–845. doi: 10.1128/AAC.01308-09, 2010.

VAN KUPPEVELD, F. J.; HOENDEROP, J. G.; SMEETS, R. L.; et al. Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. **The EMBO journal**, v. 16, n. 12, p. 3519–3532. doi: 10.1093/emboj/16.12.3519, 1997.

KUTZNER, C.; KÖPFER, D. A.; MACHTENS, J.-P.; et al. Insights into the function of ion channels by computational electrophysiology simulations. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, New approaches for bridging computation and experiment on membrane proteins., v. 1858, n. 7, Part B, p. 1741–1752. doi: 10.1016/j.bbamem.2016.02.006, 2016.

LAKADAMYALI, M.; RUST, M. J.; BABCOCK, H. P.; ZHUANG, X. Visualizing infection of individual influenza viruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 16, p. 9280–9285. doi: 10.1073/pnas.0832269100, 2003.

LENBURG, M. E.; LANDAU, N. R. Vpu-induced degradation of CD4: requirement for specific amino acid residues in the cytoplasmic domain of CD4. **Journal of Virology**, v. 67, n. 12, p. 7238–7245, 1993.

LEVESQUE, K.; ZHAO, Y.-S.; COHEN, E. A. Vpu exerts a positive effect on HIV-1 infectivity by down-modulating CD4 receptor molecules at the surface of HIV-1-producing cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 30, p. 28346–28353. doi: 10.1074/jbc.M300327200, 2003.

LI, Y.; TO, J.; VERDIÀ-BAGUENA, C.; et al. Inhibition of the Human Respiratory Syncytial Virus Small Hydrophobic Protein and Structural Variations in a Bicelle Environment. **Journal of Virology**, v. 88, n. 20, p. 11899–11914. doi: 10.1128/JVI.00839-14, 2014.

LU, W.; ZHENG, B.-J.; XU, K.; et al. Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus 3a protein forms an ion channel and modulates virus release. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 33, p. 12540–12545. doi: 10.1073/pnas.0605402103, 2006.

LYUKMANOVA, E. N.; SHENKAREV, Z. O.; PARAMONOV, A. S.; et al. Lipid−Protein Nanoscale Bilayers: A Versatile Medium for NMR Investigations of Membrane Proteins and Membrane-Active Peptides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 7, p. 2140–2141. doi: 10.1021/ja0777988, 2008.

MADAN, V.; CASTELLÓ, A.; CARRASCO, L. Viroporins from RNA viruses induce caspase-dependent apoptosis. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 437–451. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.01057.x, 2008.

MANDALA, V. S.; LIAO, S.-Y.; KWON, B.; HONG, M. Structural Basis for Asymmetric Conductance of the Influenza M2 Proton Channel Investigated by Solid-State NMR Spectroscopy. **Journal of Molecular Biology**, v. 429, n. 14, p. 2192–2210. doi: 10.1016/j.jmb.2017.05.015, 2017.

MARRINK, S. J.; PERIOLE, X.; TIELEMAN, D. P.; VRIES, A. H. DE. Comment on “On using a too large integration time step in molecular dynamics simulations of coarse-grained molecular models” by M. Winger, D. Trzesniak, R. Baron and W. F. van Gunsteren, Phys. Chem. Chem. Phys., 2009, 11, 1934. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, n. 9, p. 2254–2256. doi: 10.1039/B915293H, 2010.

MARRINK, S. J.; RISSELADA, H. J.; YEFIMOV, S.; TIELEMAN, D. P.; DE VRIES, A. H. The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 27, p. 7812–7824. doi: 10.1021/jp071097f, 2007.

MARRINK, S. J.; TIELEMAN, D. P. Perspective on the Martini model. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 16, p. 6801–6822. doi: 10.1039/C3CS60093A, 2013.

MARTINEZ-GIL, L.; MINGARRO, I. Viroporins, Examples of the Two-Stage Membrane Protein Folding Model. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3462–3482. doi: 10.3390/v7072781, 2015.

MARTIN, K.; HELENIUS, A. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. **Cell**, v. 67, n. 1, p. 117–130, 1991.

MELTON, J. V.; EWART, G. D.; WEIR, R. C.; et al. Alphavirus 6K proteins form ion channels. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 49, p. 46923–46931. doi: 10.1074/jbc.M207847200, 2002.

MIAO, Y.; FU, R.; ZHOU, H.-X.; CROSS, T. A. Dynamic Short Hydrogen Bonds in Histidine Tetrad of Full-Length M2 Proton Channel Reveal Tetrameric Structural Heterogeneity and Functional Mechanism. **Structure (London, England : 1993)**, v. 23, n. 12, p. 2300–2308. doi: 10.1016/j.str.2015.09.011, 2015.

MICHELLE MILLER, B. Biotron Phase 2 Hepatitis C Trial Success. **Biotron Phase 2 Hepatitis C Trial Success**. Retrieved September 25, 2017, from http://www.prnewswire.com/news-releases/biotron-phase-2-hepatitis-c-trial-success-300237625.html, 2016, March 17.

MILLER, C. Ionic channels of excitable membranes. Second edition: By Bertil Hille. Sunderland, Massachusetts: Sinauer. (1991). 607 pp. $46.95. **Cell**, v. 69, n. 4, p. 579. doi: 10.1016/0092-8674(92)90220-7, 1992.

MONTICELLI, L.; KANDASAMY, S. K.; PERIOLE, X.; et al. The MARTINI Coarse-Grained Force Field: Extension to Proteins. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 5, p. 819–834. doi: 10.1021/ct700324x, 2008.

MURAKAMI, T.; OCKINGER, J.; YU, J.; et al. Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 28, p. 11282–11287. doi: 10.1073/pnas.1117765109, 2012.

NGUYEN, P. A.; SOTO, C. S.; POLISHCHUK, A.; et al. pH-Induced Conformational Change of the Influenza M2 Protein C-Terminal Domain. **Biochemistry**, v. 47, n. 38, p. 9934–9936. doi: 10.1021/bi801315m, 2008.

NIEVA, J. L.; MADAN, V.; CARRASCO, L. Viroporins: structure and biological functions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 8, p. 563–574. doi: 10.1038/nrmicro2820, 2012.

OKADA, A.; MIURA, T.; TAKEUCHI, H. Protonation of histidine and histidine-tryptophan interaction in the activation of the M2 ion channel from influenza a virus. **Biochemistry**, v. 40, n. 20, p. 6053–6060, 2001.

OLMSTED, R. A.; COLLINS, P. L. The 1A protein of respiratory syncytial virus is an integral membrane protein present as multiple, structurally distinct species. **Journal of Virology**, v. 63, n. 5, p. 2019–2029, 1989.

OOSTENBRINK, C.; VILLA, A.; MARK, A. E.; VAN GUNSTEREN, W. F. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1656–1676. doi: 10.1002/jcc.20090, 2004a.

OOSTENBRINK, C.; VILLA, A.; MARK, A. E.; VAN GUNSTEREN, W. F. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1656–1676. doi: 10.1002/jcc.20090, 2004b.

OUYANG, B.; XIE, S.; BERARDI, M. J.; et al. Unusual architecture of the p7 channel from hepatitis C virus. **Nature**, v. 498, n. 7455, p. 521–525. doi: 10.1038/nature12283, 2013.

PARK, E. K.; CASTRUCCI, M. R.; PORTNER, A.; KAWAOKA, Y. The M2 ectodomain is important for its incorporation into influenza A virions. **Journal of Virology**, v. 72, n. 3, p. 2449–2455, 1998.

PAVLOVIĆ, D.; NEVILLE, D. C. A.; ARGAUD, O.; et al. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, v. 100, n. 10, p. 6104–6108. doi: 10.1073/pnas.1031527100, 2003.

PAWLOTSKY, J.-M.; CHEVALIEZ, S.; MCHUTCHISON, J. G. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. **Gastroenterology**, v. 132, n. 5, p. 1979–1998. doi: 10.1053/j.gastro.2007.03.116, 2007.

PEREZ, M.; GARCÍA-BARRENO, B.; MELERO, J. A.; CARRASCO, L.; GUINEA, R. Membrane Permeability Changes Induced inEscherichia coliby the SH Protein of Human Respiratory Syncytial Virus. **Virology**, v. 235, n. 2, p. 342–351. doi: 10.1006/viro.1997.8696, 1997.

PERKINS, K. L. Cell-attached voltage-clamp and current-clamp recording and stimulation techniques in brain slices. **Journal of neuroscience methods**, v. 154, n. 1-2, p. 1–18. doi: 10.1016/j.jneumeth.2006.02.010, 2006.

PERVUSHIN, K.; TAN, E.; PARTHASARATHY, K.; et al. Structure and Inhibition of the SARS Coronavirus Envelope Protein Ion Channel. **PLOS Pathogens**, v. 5, n. 7, p. e1000511. doi: 10.1371/journal.ppat.1000511, 2009.

PETERSEN, C. C. H. Whole-Cell Recording of Neuronal Membrane Potential during Behavior. **Neuron**, v. 95, n. 6, p. 1266–1281. doi: 10.1016/j.neuron.2017.06.049, 2017.

PINES, A.; GIBBY, M. G.; WAUGH, J. S. Proton-Enhanced Nuclear Induction Spectroscopy. A Method for High Resolution NMR of Dilute Spins in Solids. **The Journal of Chemical Physics**, v. 56, n. 4, p. 1776–1777. doi: 10.1063/1.1677439, 1972.

PINHEIRO, C. G. DO A. Mecanismo de ativação de canais iônicos dependentes de voltagem, Kv e Nav, e a interação com anestésicos gerais. . Retrieved January 22, 2018, from http://repositorio.unb.br/handle/10482/13084, 2013.

PINTO, L. H.; DIECKMANN, G. R.; GANDHI, C. S.; et al. A functionally defined model for the M2 proton channel of influenza A virus suggests a mechanism for its ion selectivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 21, p. 11301–11306, 1997.

PINTO, L. H.; HOLSINGER, L. J.; LAMB, R. A. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. **Cell**, v. 69, n. 3, p. 517–528, 1992.

PIRHONEN, J.; SARENEVA, T.; KURIMOTO, M.; JULKUNEN, I.; MATIKAINEN, S. Virus infection activates IL-1 beta and IL-18 production in human macrophages by a caspase-1-dependent pathway. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 162, n. 12, p. 7322–7329, 1999.

PREMKUMAR, A.; WILSON, L.; EWART, G. D.; GAGE, P. W. Cation-selective ion channels formed by p7 of hepatitis C virus are blocked by hexamethylene amiloride. **FEBS letters**, v. 557, n. 1-3, p. 99–103, 2004.

PRONK, S.; PÁLL, S.; SCHULZ, R.; et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. **Bioinformatics**, p. btt055. doi: 10.1093/bioinformatics/btt055, 2013.

RISSELADA, H. J.; MARRINK, S. J. The molecular face of lipid rafts in model membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 45, p. 17367–17372. doi: 10.1073/pnas.0807527105, 2008.

RIXON, H. W. M.; BROWN, G.; AITKEN, J.; et al. The small hydrophobic (SH) protein accumulates within lipid-raft structures of the Golgi complex during respiratory syncytial virus infection. **The Journal of General Virology**, v. 85, n. Pt 5, p. 1153–1165. doi: 10.1099/vir.0.19769-0, 2004.

RODRIGUEZ, R.; RAMILO, O. Respiratory syncytial virus: how, why and what to do. **The Journal of Infection**, v. 68 Suppl 1, p. S115–118. doi: 10.1016/j.jinf.2013.09.021, 2014.

ROSSMAN, J. S.; JING, X.; LESER, G. P.; BALANNIK, V.; et al. Influenza virus m2 ion channel protein is necessary for filamentous virion formation. **Journal of Virology**, v. 84, n. 10, p. 5078–5088. doi: 10.1128/JVI.00119-10, 2010.

ROSSMAN, J. S.; JING, X.; LESER, G. P.; LAMB, R. A. Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. **Cell**, v. 142, n. 6, p. 902–913. doi: 10.1016/j.cell.2010.08.029, 2010.

ROUX, B.; SCHULTEN, K. Computational studies of membrane channels. **Structure (London, England: 1993)**, v. 12, n. 8, p. 1343–1351. doi: 10.1016/j.str.2004.06.013, 2004.

RUIZ, A.; GUATELLI, J. C.; STEPHENS, E. B. The Vpu Protein: New Concepts in Virus Release and CD4 Down-Modulation. **Current HIV research**, v. 8, n. 3, p. 240–252, 2010.

SACHS, J. N.; CROZIER, P. S.; WOOLF, T. B. Atomistic simulations of biologically realistic transmembrane potential gradients. **The Journal of Chemical Physics**, v. 121, n. 22, p. 10847–10851. doi: 10.1063/1.1826056, 2004.

SAKAGUCHI, T.; LESER, G. P.; LAMB, R. A. The ion channel activity of the influenza virus M2 protein affects transport through the Golgi apparatus. **The Journal of Cell Biology**, v. 133, n. 4, p. 733–747, 1996.

SANDERS, C. R.; LANDIS, G. C. Reconstitution of Membrane Proteins into Lipid-Rich Bilayered Mixed Micelles for NMR Studies. **Biochemistry**, v. 34, n. 12, p. 4030–4040. doi: 10.1021/bi00012a022, 1995.

SANDOVAL, I. V.; CARRASCO, L. Poliovirus infection and expression of the poliovirus protein 2B provoke the disassembly of the Golgi complex, the organelle target for the antipoliovirus drug Ro-090179. **Journal of Virology**, v. 71, n. 6, p. 4679–4693, 1997.

SARLES, L. R.; COTTS, R. M. Double Nuclear Magnetic Resonance and the Dipole Interaction in Solids. **Physical Review**, v. 111, n. 3, p. 853–859. doi: 10.1103/PhysRev.111.853, 1958.

SCHNELL, J. R.; CHOU, J. J. Structure and Mechanism of the M2 Proton Channel of Influenza A Virus. **Nature**, v. 451, n. 7178, p. 591–595. doi: 10.1038/nature06531, 2008.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 821–832. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.040, 2010.

SCHROEDER, C.; HEIDER, H.; MÖNCKE-BUCHNER, E.; LIN, T.-I. The influenza virus ion channel and maturation cofactor M2 is a cholesterol-binding protein. **European biophysics journal: EBJ**, v. 34, n. 1, p. 52–66. doi: 10.1007/s00249-004-0424-1, 2005.

SHARMA, M.; YI, M.; DONG, H.; et al. Insight into the Mechanism of the Influenza A Proton Channel from a Structure in a Lipid Bilayer. **Science (New York, N.y.)**, v. 330, n. 6003, p. 509–512. doi: 10.1126/science.1191750, 2010.

SHI, T.; MCALLISTER, D. A.; O'BRIEN, K. L.; et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. **Lancet (London, England)**, v. 390, n. 10098, p. 946–958. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30938-8, 2017.

VAN SOEST, H.; VAN DER SCHAAR, P. J.; KOEK, G. H.; et al. No beneficial effects of amantadine in treatment of chronic hepatitis C patients. **Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver**, v. 42, n. 7, p. 496–502. doi: 10.1016/j.dld.2009.10.006, 2010.

STEINMANN, E.; PENIN, F.; KALLIS, S.; et al. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. **PLoS pathogens**, v. 3, n. 7, p. e103. doi: 10.1371/journal.ppat.0030103, 2007.

STEINMANN, E.; WHITFIELD, T.; KALLIS, S.; et al. Antiviral effects of amantadine and iminosugar derivatives against hepatitis C virus. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 46, n. 2, p. 330–338. doi: 10.1002/hep.21686, 2007.

STGELAIS, C.; TUTHILL, T. J.; CLARKE, D. S.; et al. Inhibition of hepatitis C virus p7 membrane channels in a liposome-based assay system. **Antiviral Research**, v. 76, n. 1, p. 48–58. doi: 10.1016/j.antiviral.2007.05.001, 2007.

STOUFFER, A. L.; ACHARYA, R.; SALOM, D.; et al. Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel. **Nature**, v. 451, n. 7178, p. 596–599. doi: 10.1038/nature06528, 2008.

SUZUKI, T.; ORBA, Y.; OKADA, Y.; et al. The Human Polyoma JC Virus Agnoprotein Acts as a Viroporin. **PLOS Pathogens**, v. 6, n. 3, p. e1000801. doi: 10.1371/journal.ppat.1000801, 2010.

TAKEGOSHI, K.; NAKAMURA, S.; TERAO, T.; NAKAMURA, S. C-13–H-1 dipolar-assisted rotational resonance in magic-angle spinning NMR. . doi: 10.1016/S0009-2614(01)00791-6, 2001.

TECHAARPORNKUL, S.; BARRETTO, N.; PEEPLES, M. E. Functional Analysis of Recombinant Respiratory Syncytial Virus Deletion Mutants Lacking the Small Hydrophobic and/or Attachment Glycoprotein Gene. **Journal of Virology**, v. 75, n. 15, p. 6825–6834. doi: 10.1128/JVI.75.15.6825-6834.2001, 2001.

TEDBURY, P.; WELBOURN, S.; PAUSE, A.; et al. The subcellular localization of the hepatitis C virus non-structural protein NS2 is regulated by an ion channel-independent function of the p7 protein. **The Journal of General Virology**, v. 92, n. Pt 4, p. 819–830. doi: 10.1099/vir.0.027441-0, 2011.

TERWILLIGER, E. F.; COHEN, E. A.; LU, Y. C.; SODROSKI, J. G.; HASELTINE, W. A. Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 13, p. 5163–5167, 1989.

TIAN, C.; GAO, P. F.; PINTO, L. H.; LAMB, R. A.; CROSS, T. A. Initial structural and dynamic characterization of the M2 protein transmembrane and amphipathic helices in lipid bilayers. **Protein Science: A Publication of the Protein Society**, v. 12, n. 11, p. 2597–2605. doi: 10.1110/ps.03168503, 2003.

TIELEMAN, D. P.; BERENDSEN, H. J.; SANSOM, M. S. Voltage-dependent insertion of alamethicin at phospholipid/water and octane/water interfaces. **Biophysical Journal**, v. 80, n. 1, p. 331–346, 2001.

TOUKMAJI, A. Y.; BOARD, J. A. Ewald summation techniques in perspective: a survey. **Computer Physics Communications**, v. 95, n. 2, p. 73–92. doi: 10.1016/0010-4655(96)00016-1, 1996.

TRIANTAFILOU, K.; KAR, S.; VAKAKIS, E.; KOTECHA, S.; TRIANTAFILOU, M. Human respiratory syncytial virus viroporin SH: a viral recognition pathway used by the host to signal inflammasome activation. **Thorax**, v. 68, n. 1, p. 66–75. doi: 10.1136/thoraxjnl-2012-202182, 2013.

ULRICH, E. L.; AKUTSU, H.; DORELEIJERS, J. F.; et al. BioMagResBank. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. suppl_1, p. D402–D408. doi: 10.1093/nar/gkm957, 2008.

VENNEMA, H.; GODEKE, G. J.; ROSSEN, J. W.; et al. Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. **The EMBO journal**, v. 15, n. 8, p. 2020–2028, 1996.

VERLET, L. Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. **Physical Review**, v. 159, n. 1, p. 98–103. doi: 10.1103/PhysRev.159.98, 1967.

VIEYRES, G.; BROHM, C.; FRIESLAND, M.; et al. Subcellular Localization and Function of an Epitope-Tagged p7 Viroporin in Hepatitis C Virus-Producing Cells. **Journal of Virology**, v. 87, n. 3, p. 1664–1678. doi: 10.1128/JVI.02782-12, 2013.

VINCENT, M. J.; RAJA, N. U.; JABBAR, M. A. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces degradation of chimeric envelope glycoproteins bearing the cytoplasmic and anchor domains

of CD4: role of the cytoplasmic domain in Vpu-induced degradation in the endoplasmic reticulum. **Journal of Virology**, v. 67, n. 9, p. 5538–5549, 1993.

VOLD, R. R.; PROSSER, R. S.; DEESE, A. J. Isotropic solutions of phospholipid bicelles: a new membrane mimetic for high-resolution NMR studies of polypeptides. **Journal of biomolecular NMR**, v. 9, n. 3, p. 329–335, 1997.

WANG, J.; KIM, S.; KOVACS, F.; CROSS, T. A. Structure of the transmembrane region of the M2 protein H+ channel. **Protein Science : A Publication of the Protein Society**, v. 10, n. 11, p. 2241–2250, 2001.

WETHERILL, L. F.; HOLMES, K. K.; VEROW, M.; et al. High-risk human papillomavirus E5 oncoprotein displays channel-forming activity sensitive to small-molecule inhibitors. **Journal of Virology**, v. 86, n. 9, p. 5341–5351. doi: 10.1128/JVI.06243-11, 2012.

WHITEHEAD, S. S.; BUKREYEV, A.; TENG, M. N.; et al. Recombinant respiratory syncytial virus bearing a deletion of either the NS2 or SH gene is attenuated in chimpanzees. **Journal of Virology**, v. 73, n. 4, p. 3438–3442, 1999.

WHITE, J. A.; ROMÁN, F. L.; GONZÁLEZ, A.; VELASCO, S. Periodic boundary conditions and the correct molecular-dynamics ensemble. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 387, n. 27, p. 6705–6711. doi: 10.1016/j.physa.2008.08.008, 2008.

WILLEY, R. L.; BUCKLER-WHITE, A.; STREBEL, K. Sequences present in the cytoplasmic domain of CD4 are necessary and sufficient to confer sensitivity to the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein. **Journal of Virology**, v. 68, n. 2, p. 1207–1212, 1994.

WILSON, L.; GAGE, P.; EWART, G. Hexamethylene amiloride blocks E protein ion channels and inhibits coronavirus replication. **Virology**, v. 353, n. 2, p. 294–306. doi: 10.1016/j.virol.2006.05.028, 2006.

YE, Y.; HOGUE, B. G. Role of the coronavirus E viroporin protein transmembrane domain in virus assembly. **Journal of Virology**, v. 81, n. 7, p. 3597–3607. doi: 10.1128/JVI.01472-06, 2007.

ZENG, R.; YANG, R.-F.; SHI, M.-D.; et al. Characterization of the 3a protein of SARS-associated coronavirus in infected vero E6 cells and SARS patients. **Journal of Molecular Biology**, v. 341, n. 1, p. 271–279. doi: 10.1016/j.jmb.2004.06.016, 2004.

ZHENG, W.; HU, R.; CAI, R.; et al. Identification and characterization of hydrophobic gate residues in TRP channels. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 32, n. 2, p. 639–653. doi: 10.1096/fj.201700599RR, 2018.

ZHONG, Q.; MOORE, P. B.; NEWNS, D. M.; KLEIN, M. L. Molecular dynamics study of the LS3 voltage-gated ion channel. **FEBS Letters**, v. 427, n. 2, p. 267–270. doi: 10.1016/S0014-5793(98)00304-4, 1998.

ZHOU, Y.; FREY, T. K.; YANG, J. J. Viral calciomics: interplays between Ca2+ and virus. **Cell Calcium**, v. 46, n. 1, p. 1–17. doi: 10.1016/j.ceca.2009.05.005, 2009.

Apêndice I

Tutorial I: Simulação do pentâmero inserido/próximo à bicamada lipídica para sistemas atomísticos

O objetivo deste tutorial é disponibilizar a estudantes e pesquisadores uma maneira mostar e a simular proteínas em bicamadas lipídicas. Neste tutorial utilizamos o GROMACS (http://www.gromacs.org/) para realização e análises das simulações de dinâmica molecular e o programa de visualização molecular VMD (http://www.ks.uiuc.edu/Research/**vmd**/).

Configuração inicial da bicamada lipídica

As bicamadas lipídicas podem ser compostas por diferentes lipídeos. Essa composição varia conforme o tipo celular e organismo. Desta forma, é importante especificar por qual tipo de lipídeo sua bicamada será composta. Neste tutorial foi escolhido o lipídeo POPC (1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine), uma vez que é um importante lipídeo para experimentos biofísicos é naturalmente encontrado em células eucarióticas.

As coordenadas e a topologia de bicamadas pré-equilibradas, compostas por diferentes fosfolipídeos, podem ser encontradas em bancos de dados online (http://www.gromacs.org/Downloads/User_contributions/Molecule_topologies) ou podem ser construídas por servidores como MemBuilder (http://bioinf.modares.ac.ir/software/mb2/).

Os arquivos de topologia (.itp) e coordenadas (.pdb) da bicamada de POPC foram baixados da página do próprio GROMACS. Uma vez obtidos os arquivos, é necessário adequá-los ao tamanho do seu sistema. Para isto, foi necessário aumentar o tamanho da bicamada nas três direções (x, y e z). As direções x e y formam o plano que compõe a bicamada e a direção z é o plano normal à bicamada.

Para ampliar a bicamada na direção x e y, primeiramente, as moléculas de água do arquivo de coordenadas foram excluídas e um novo arquivo pdb foi salvo somente com as coordenadas das moléculas de POPC. Para aumentar o sistema, duplicamos a bicamada nas direções x e y utilizando a ferramenta *genconf* do GROMACS, que cria uma réplica do sistema de entrada nos eixos x, y, e z:

>genconf –f arq.pdb –o bicamada.pdb –nbox 2 2 1

onde: -f: arquivo de entrada (caixa unitária); -o: arquivo de saída (configuração final);-nbox: replica n vezes a caixa unitária em cada eixo x, y e z.

Hidratação da bicamada

Para hidratar a bicamada, uma caixa de moléculas de água é criada com as mesmas dimensões x e y da bicamada e com dimensão z suficiente para que a proteína fique totalmente submersa e longe da sua imagem criada pelas condições periódicas de contorno. Para a construção da caixa de água, utilizamos a ferramenta genbox:

>genbox –cs spc216.gro –o água.gro –box X, Y, Z

Para finalizar, a bicamada é hidratada fazendo a sobreposição dos dois sistemas, Nesta etapa, as moléculas sobrepostas são excluídas. Antes da sobreposição, é necessário não só editar a conformação da bicamada para uma caixa com as mesmas dimensões x, y, e z da caixa de água, mas também centrar a bicamada. Para isto, utilizamos a ferramenta editconf:

>editconf –f bicamada.pdb –o bicamada.gro –c –box X, Y, Z

Com a caixa da bicamada nas mesmas dimensões da caixa de água, podemos fazer a sobreposição dos dois sistemas utilizando, novamente, a ferramentas genbox:

-genbox –cs água.gro –cp bicamada.gro –o bicamada_hidratada.gro

Após a sobreposição, podemos observar moléculas de água no interior da bicamada. Para deletar as moléculas de água do interior da bicamada, podemos utilizar o VMD com o auxílio do TK Console. Nesta etapa, todas as moléculas de água presentes nas mesmas coordenadas Z da bicamada são removidas.

- set sel [atomselect top “resname POPC”]
- measure minmax $sel

Neste momento, aparecerá dois vetores: (Xmin, Ymin, Zmin) e (Xmax, Ymax, Zmax). Desta forma, selecionamos todas as moléculas, exceto as moléculas de água que estiverem nas coordenadas Z<Zmin e Z>Zmax. Esta seleção gera o nosso sistema final.

- set sel [atomselect top ”not same residue as (water and (z>Zmin) or (z<Zmax))”]

- $sel writepdb bicamada_popc.pdb

Editanto o arquivo de topologia

No arquivo de topologia deve conter a mesma quantidade de moléculas de POPC e de solvente (água) que o sistema final. Existem várias formas para realizar a contagem das moléculas. Neste tutorial, utilizamos novamente o VMD por meio da ferramenta TK Console.

- set sel [atomselect top “resname POPC”]
- $sel num

O valor apresentado é o número total de átomos de POPC. Como cada molécula de POPC possui 53 átomos, a valor apresentado é dividido por 53. O mesmo é feito para a água (SOL), só que para a água o valor apresentado é dividido por 3. Com os valores exatos da quantidade de moléculas de POPC e SOL, editamos o arquivo de topologia da bicamada de POPC hidratada.

Gerando arquivo de topologia para a estrutura da proteína

Uma vez obtido o arquivo de coordenada da proteína (em extensão pdb), o arquivo de topologia é necessário uma vez que contém todas as informações necessárias para definição da molécula em uma simulação. Para criar o arquivo de topologia utilizamos a ferramenta *pdb2gmx* do GROMACS. Nesta etapa, escolhe-se qual o campo de força que iremos definir e qual será o estado de protonação dos aminoácidos. Esta etapa é extremamente importante. O campo de força tem que ser o mesmo utilizado para a topologia da bicamada. O estado de protonação é extremamente importante, uma vez que a mudança no estado de protonação de proteínas pode influenciar na sua estrutura e função. Para auxiliar no estado de protonação dos aminoácidos, pode ser utilizado o servidor H++ (http://biophysics.cs.vt.edu/). Este servidor calcula a protonação dos aminoácidos com base na coordenada 3D da proteína e do pH de interesse. Com base nestas informações, a topologia da proteína foi gerada:

- pdb2gmx –f proteína.pdb –o proteína.gro –p topologia.top –lys –arg –his –asp –glu –ter –ignh

Inserção da proteína na bicamada lipídica ou próximo a bicamada lipídica

Para inserção da proteína na bicamada, uma caixa é criada nas mesmas dimensões x, y e z da bicamada já hidratada. No presente estudo, foi estudado dois tipos de sistemas: a proteína inserida na bicamada e a proteína próxima a bicamada. O que muda de um sistema para o outro é onde iremos centrar a proteína na caixa construída. Para o primeiro sistema, colocamos a proteína no centro da caixa, onde se encontra também a bicamada. Para o segundo sistema, a proteína é centrada em uma região próxima a bicamada. Para a construção da caixa e posicionamento da proteína nesta utilizamos a ferramenta editconf:

- editconf –f proteína.gro –o proteína_box.gro –center x y z –box x y z

Com a proteína contida em uma caixa de mesma dimensão que a bicamada e centrada na região de interesse, podemos fazer a sobreposição dos dois sistemas utilizando, novamente, a ferramentas genbox:

-genbox –cs bicamada.gro –cp proteína_box.gro –o bicamada_proteina.gro

Edição do arquivo de topologia do sistema proteína/membrana

O arquivo de topologia deve conter a mesma quantidade de moléculas de POPC, de solvente (água) e proteína que o sistema final. Para a contagem das moléculas, usaremos nvamente o programa VMD, utilizando a ferramenta TK Console.

- set sel [atomselect top “resname POPC”]
- $sel num

O valor apresentado é o número total de átomos de POPC. Como cada molécula de POPC possui 53 átomos, a valor apresentado é dividido por 53. O mesmo é feito para a água (SOL), só que, para a água, o valor apresentado é dividido por 3. Em seguida, realizamos os mesmos procedimentos para a proteína. Com os valores exatos da quantidade de moléculas de POPC, SOL e proteína, editamos o arquivo de topologia da bicamada de POPC hidratada com a proteína.

Adição de íons e ajuste da concentração salina

Para solvatação do sistema e ajuste da concentração salina é utilizado a ferramenta gmx *genion*. O arquivo de entrada para a ferramenta *genion* é o arquivo com extensão tpr (arquivo que contém todos os parâmetros para todos os átomos do sistema). Para produzir o arquivo .tpr precisamos da ferramenta *grompp* que utiliza como arquivo de entrada um arquivo de extensão mdp (*molecular dynamics*

parameter – parâmetros da dinâmica molecular). Um arquivo mdp normalmente é utilizado para correr uma minimização ou dinâmica molecular, No entanto, neste caso, ele é usado somente para gerar uma descrição atômica do sistema. (Os arquivos mdp utilizados nas simulações podem ser encontrado no site de Tutoriais do GROMACS - http://www.bevanlab.biochem.vt.edu/Pages/Personal/justin/gmx-tutorials/)

- grompp –f arq.md –c bicamada_protreina.gro –o bicamada_protreina.tpr

Com o arquivo tpr gerado, é possível fazer a adição de íons e ajuste da concentração salina pelo *genion*. Nos sistemas estudados, a concentração salina foi de 150 mM de NaCl. A ferramenta perguntará ao usuário qual molécula deseja substituir pelos íons a serem adicionados. Recomenda-se fazer a substituição por moléculas de água (SOL):

- genion –s bicamada_proteina.tpr –conc 0.15 -neutral –o bicamada_proteina_ion.gro –p bicamada_proteina_ion.top

Minimização do Sistema

Para garantir que o sistema não tenha confrontos estéricos ou geometria inadequada, a estrutura é relaxada por meio de um processo chamado de minimização de energia. Nesta etapa, utiliza-se como arquivo de entrada um arquivo .tpr. Para produzir o arquivo .tpr, precisamos da ferramenta *grompp,* que utiliza como arquivo de entrada um arquivo de extensão mdp (*molecular dynamics parameter* – parâmetros da dinâmica molecular):

- grompp –f minim.mdp –c bicamada_protreina_ion.gro –o bicamada_prot_ion_min.tpr

Com o arquivo tpr gerado, é possível fazer a minimização do sistema pela ferramenta *mdrun*:

- mdrun –s bicamada_prot_ion_min.tpr – nice 0 –deffnm

Uma maneira de determinar se a minimização foi bem sucedida é verificar se a energia potencial está negativa (da ordem de 10^5 -10^6, dependendo do tamanho do sistema e do número de moléculas de água) e também se o valor da força máxima é menor que o valor estipulado (“emtol = 1000.0” = 1000 $kJ.mol^{-1}.nm^{-1}$).

Equilibrando pressão e temperatura

Após o sistema ser minimizado, é preciso equilibrar o sistema. A equilibração do sistema foi conduzida em duas partes. A primeira etapa ocorreu sob um ensemble NVT (com número de partículas, volume e temperatura constantes). Nesta etapa, a temperatura do sistema deve alcançar a temperatura desejada. Para os nossos sistemas, compostos pela proteína inserida na membrana, ambos lipídeos e água atuam como solvente. Assim, moléculas de água têm que se reorientar em regiões próximas as cabeças dos lipídeos e nas regiões expostas da proteína, Já os lipídeos precisam se reorientar em regiões próximas a proteína. Com isso, a equilibração leva um tempo maior que sistemas contendo apenas proteína solvatada. Nos sistemas simulados, a temperatura utilizada foi de 310K. Para a equilibração da temperatura, primeiramente foi criado dois grupos especiais: um contendo íons e solvente e outro contendo a proteína e os lipídeos. Para isto, foi utilizamos a ferramenta *make_ndx*. Construído os grupos, utiliza-se a ferramenta *grompp*, que utiliza como arquivo de entrada um arquivo de extensão mdp, seguido do mdrun.

- grompp –f nvt.mdp –c bicamada_prot_ion_min.gro –o bicamada_prot_nvt.tpr

Com o arquivo tpr gerado é possível fazer a equilibração do sistema pela ferramenta *mdrun*:

- mdrun –s bicamada_prot_nvt.tpr – nice 0 –deffnm

Algumas informações importante devem ser levadas em consideração em simulação de sistemas compostos por proteína inseridos/próximos à membrana. A temperatura desejada para equilibração e posterior dinâmica do sistema deve ser maior que a temperatura de transição de fase do lipídeo que constitui a bicamada. Nos sistemas simulados, os lipídeos utilizados foram POPC e DMPC, com temperatura de transição de fase de 271K e 297K, respectivamente. Cada grupo (proteína, lipídeo e sovente+íons) deve ser acoplado separadamente para aumentar acurácia.
A ferramente g_energy pode ser usada para confirma se a temperatura do sistema foi atingida e se o sistema é estável na temperatura desejada.

Para atingir a pressão desejada de 1 atm, a segunda parte da equilibrção foi realizada. Para isto, os mesmo passos foram seguido, mas, agora, parâmetros referentes ao ensemble NPT foram fornecidos no arquivo mdp.

- grompp –f npt.mdp –c bicamada_prot_nvt.gro –o bicamada_prot_npt.tpr

Com o arquivo tpr gerado, é possível fazer a equilibração do sistema pela ferramenta mdrun:

- mdrun –s bicamada_prot_npt.tpr – nice 0 –deffnm

Vale ressaltar algumas informações importantes em simulação de proteína em membrana:

Tcoupl = Nose-Hoover: O termotasto Nose-hoover é amplamente utilizado em simulações de membrana porque produz um conjunto cinético correto e permite flutuações que produzem dinâmicas mais naturais. No entanto, devido a estas amplas flutuações, este termostato não é apropriado para a equilibração NVT. Desta forma, começar a equilibração NVT com Berendsen ou V-rescale e mudar para Nosé-Hoover no início do NPT foram as estratégias utilizadas.

Pcoupltype = semiisotropic: a bicamada deve estar livre para se deformar no plano x-y, independente de z.

Após completar as duas etapas de equilibração, o sistema está bem equilibrado na temperatura e pressão desejada.

Dinâmica molecular

A próxima etapa é a dinâmica de restrição e produção para coleta de dados. Novamente, um arquivo de parâmetros é necessário. O arquivo tpr foi gerado e a simualção foi realizada:

- grompp –f md.mdp –c bicamada_prot_npt.gro –o bicamada_prot_md.tpr

Com o arquivo tpr gerado, é possível fazer a equilibração do sistema pela ferramenta mdrun:

- mdrun –s bicamada_prot_md.tpr – nice 0 –deffnm

As tabelas 1 e 2 especificam o número de moléculas de água, lipídeos, proteína e íons em cada sistema simulado em temperatura de 310K e em 1atm, utilizando campos de força atomísticos e corase-grained, respectivamente.

Tutorial II: Simulação do pentâmero inserido/próximo à bicamada lipídica para sistemas Coarse-Grained (CG)

Para simulação dos sistemas utilizando o campo de força MARTINI, o processo de montagem dos sistemas é mais simples e rápido. O servidor do MARTINI oferece uma biblioteca de parâmetros para os mais variados fosfolipídeos e proteínas, além de ferramentas para criar a topologia da proteína e construir bicamadas lipídicas. No mesmo site, tutoriais para construção e simulação de diferentes sistemas também podem ser encontrados (http://cgmartini.nl/index.php).

Os sistemas que utilizam o campo de força MARTINI foram construídos utilizando um programa fornecido na própria página do MARTINI chamado insane.py . O INSANE (INSert membrANE) é uma ferramenta que gera membranas pela distribuição lipídica sobre um *"grid"*. Isso permite a construção de bicamadas assimétricas com composições lipídicas específicas. O programa também permite a adição de solventes, íons e proteínas.

As bicamadas de POPC, DMPC e miméticos de RAFT (com proporção molecular de 4: 3: 3 de DPPC: DUPC: CHOL), totalmente hidratados com concentração de íons de 150 nm e inserção da proteína SH ou do peptídeo TM foram construídos usando insane.py.

Preparação dos arquivos da proteína

Para as simulações no campo de força MARTINI, primeiramente foi preciso converter o arquivo de estrutura da proteína para uma estrutura simplista e preparar a topologia da proteína para o campo de força MARTINI.

Os arquivos da estrutura terciária da proteína SH completa e do peptídeo TM foram usados como arquivos de entrada para o *script* martinize.py. Este *script* gera a estrutura CG e a topologia necessária para as simulações com MARTINI. Além do martinize.py e arquivo PDB, é necessário um arquivo binário com a informação da estrutura secundária da proteína. Para obter o arquivo binário da estrutura secundária foi utilizado o servidor CMIB (http://www.cmbi.ru.nl/xssp/). O download de todos os outros arquivos necessários (versão do campo de força MARTINI, insane.py e arquivos mdp de parâmetros para minimização, equilibração e dinâmica) foi realizado também no próprio site do MARTINI (http://cgmartini.nl/index.php) .

Com os arquivos preparados, primeiramente, geramos a topologia para a proteína e transformamos para estruturas CG, utilizando a ferramenta martinize.py:

- martinize.py -f protein.pdb -o protein.top -x proteína_CG.gro -dssp estrutura_secundaria -p backbone -ff martini22

-f: arquivo pdb da proteína; -o: arquivo gerado de topologia da proteína: -x arquivo pdb da proteína em CG; -dssp: arquivo com informações da estrutura secundária da proteína; -ff: versão do campo de força MARTINI 2.2; -p: lista dos átomos de interesse.

Após a preparação da estrutura da proteína SH completa e do peptídeo TM, inicializamos a construção dos sistemas bicamada+proteína.

Construção dos sistemas com a proteína inserida em bicamada lipídica

Para a construção dos sistemas da proteína SH completa ou do peptídeo TM inseridos nas diferentes composições de bicamada lipídica foi utilizado a ferramenta insane.py:

- insane.py -f protien.gro -o system.gro -p system.top -pbc square -box xx,yy,zz -l DPPC -center -sol W

-f: arquivo de entrada da proteína; -center: opção de centrar a proteína na membrana; -l indica qual o lipídeo utilizado, e para sistemas compostos por mais de um fofolipídeo, também é possível representar a proporção molecular (ex, para a construção de miméticos de RAFT: -l DPPC:3 –l DUPC:3 –l CHOL:4); -salt: a concentração salina desejada, no presente estudo utilizamos 150 mM; -x, -y, -x ou -box: determinam as dimensões da caixa a ser simulada para os eixos x, y, e z; -pdb: a condição periódica de contorno; -sol: o tipo de solvente (W=água); –o o arquivo da bicamada hidratada e com a proteína inserida construído*;*

Os passos de minimização, equilibração e produção da dinâmica molecular seguem as mesmos passos dos sistemas atomísticos que utilizam o pacote GROMACS.

A tabela 2 mostra o número de lipídeos, proteína, íons, proporção água/lipídeo, tempo de simulação, e dimensão da caixa para cada sistema simulado utilizando o campo de força MARTINI.

Tabela I: Composição dos sistemas simulados em campo de força atomístico com: nome do sistemas (Sistema), número de molécula de Água (W), Lipídeo (L), razão água/lipídeo (W/L), Proteína, Íons NA e CL, tempo de simulação , tempo de coleta de dados, e dimensão x, y e z da caixa de simulação.

Sistemas	Água (W)	Lipídeo (L)	(W)/(L)	Proteína	Íons		Tempo de DM (ns)	coleta de dados (ns)	Dimensão da caixa de simulação (nm)		
					NA	CL			X	Y	Z
SH POPC (C-terminal)	87687	405	216,5	1	296	298	100	100	10,84508	10,84508	27,61361
SH POPC (N-terminal)	87698	405	216,5	1	296	298	100	100	10,87017	10,87017	27,47336
SH POPC (paralelo)	87695	405	216,5	1	296	298	100	100	10,82645	10,82645	27,69703
SHTM POPC (C-terminal)	87966	405	217,2	1	297	298	50	50	10,99462	10,99462	26,87630
SHTM POPC (N-terminal)	87903	405	217	1	296	297	50	50	10,87560	10,87560	27,47528
SHTM POPC (paralelo)	87951	405	217,2	1	297	298	50	50	10,88700	10,88700	27,45009
SHTM POPC (HIS)	9469	352	26,9	5	152	152	100	100	9,91148	9,91148	7,16861
SHTM POPC (HIH)	10452	353	29,6	5	152	162	100	100	9,77120	9,77120	8,02786
SH POPC (HIS)	35773	357	100	5	154	159	100	100	10,88700	10,88700	15,72760
SHTM DMPC (HIS)	15424	427	36,1	5	144	149	100	50	11,27547	11,30979	7,62895
SHTM DMPC (HIH)	15415	427	36,1	5	144	154	100	50	11,25264	11,28689	7,66687
SH DMPC (HIS)	53899	396	136	5	202	2012	100	50	11,21028	11,24441	17,02657
SHTM DMPC (HIS) ΔV>0	15424	427	36,1	5	132	154	5	5	11,27547	11,30979	27,62895
SHTM DMPC (HIS) ΔV<0	15424	427	36,1	5	132	154	5	5	11,27547	11,30979	27,62895
SHTM DMPC (HIH) ΔV>0	15415	427	36,1	5	132	154	5	5	11,25264	11,28689	27,66687
SHTM DMPC (HIH) ΔV<0	15415	427	36,1	5	132	154	5	5	11,25264	11,28689	27,66687

Tabela II: Composição dos sistemas simulados em campo de força CG com: nome do sistemas (Sistema), número de molécula de Água (W), Lipídeo (L), razão água/lipídeo (W/L), Proteína, Íons NA e CL, tempo de simulação , tempo de coleta de dados, e dimensão x, y e z da caixa de simulação.

Sistemas	Água (W)	Lipídeo (L)	(W)/(L)	Proteína	Íons		Tempo de DM (ns)	coleta de dados (ns)	Dimensão da caixa de simulação		
					NA	CL			X	Y	Z
SH POPC	1782	147	12,1	1	40	41	500	100	7,03751	7,03751	8,42286
SH DMPC	2063	147	14,0	1	40	41	500	100	6,95914	6,95914	8,29804
SH RART	7127	DPPC 192 DUPC 143 CHOL 146	14,8	1	79	76	500	100	13,67496	9,11664	11,06302
SHTM POPC	1790	155	11,5	1	40	40	500	100	6,54552	6,54552	9,38391
SHTM DMPC	2178	146	14,9	1	40	40	500	100	6,93497	6,93497	8,70519
SHTM RART	7159	DPPC 194 DUPC 145 CHOL 148	14,7	1	79	79	500	100	13,79141	9,19428	10,88823
POPC	1876	162	11,6	-	20	20	500	100	6,97784	6,97784	8,40599
DMPC	2202	162	13,6	-	24	24	500	100	6,98011	6,08911	8,58367
RAFT	7162	DPPC 196 DUPC 148 CHOL 148	14,6	-	79	79	500	100	13,37606	8,91737	11,54054

Apêndice II

TABALHOS E COLABORAÇÕES FINALIZADOS E EM ANDAMENTO

Além da elaboração e execução do projeto da tese de doutorado (2013-2018), outros trabalhos foram realizados em colaboração não só com alunos do próprio grupo de pesquisa da Prof Fátima, mas também com alunos de outros grupos de pesquisa. Nestes trabalhos, que tratam de estudos estruturais de biomoléculas, de interação proteína-proteína e proteína-ligante, contribuí por meio da aplicação de técnicas e ferramentas de biologia computacional, incluindo: modelagem molecular, *docking* molecular e simulação de dinâmica molecular. Além disso, participei ativamente na discussão dos resultados obtidos.

Desses trabalhos e colaborações, alguns artigos já foram publicados:

1. GUIMARÃES, GIOVANA C.; PIVA, HEMILY R. M.; **ARAUJO, GABRIELA CAMPOS DE**; LIMA, CAROLINE S.; RAGASINI, LUIS OTÁVIO; MELO, FERNANDO ALVES DE; FOSSEY, MARCELO ANDRÉS; CARUSO, ÍCARO PUTINHON; SOUZA, FÁTIMA PEREIRA DE

Binding investigation between M2-1protein from hRSV and acetylated quercetin derivatives: ^{1}H NMR, fluorescence spectroscopy, and molecular docking. , v.111, p.33 - 38, 2018.

Additional references : English. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1016/j.ijbiomac.2011.12.141]

2. **ARAUJO, GABRIELA C**. ; SILVA, RICARDO H. T. ; SCOTT, LUIS P. B. ; ARAUJO, ALEXANDRE S. ; SOUZA, FATIMA P. ; DE OLIVEIRA, RONALDO JUNIO . Structure and functional dynamics characterization of the ion channel of the human respiratory syncytial virus (hRSV) small hydrophobic protein (SH) transmembrane domain by combining molecular dynamics with excited normal modes. Journal of Molecular Modeling (Print) JCR, v. 22, p. 22:286, 2016.

3. MARIUTTI, RICARDO BARROS; ULLAH, ANWAR; **ARAUJO, GABRIELA CAMPOS**; MURAKAMI, MARIO TYAGO; ARNI, RAGHUVIR KRISHNASWAMY
Tyrosine binding and promiscuity in the arginine repressor from the pathogenic bacterium Corynebacterium pseudotuberculosis. Biochemical and Biophysical Research Communications (Print). , v.475, p.350 - 355, 2016.

4. GOMES, DERIANE ELIAS; CARUSO, ÍCARO PUTINHON; **ARAUJO, GABRIELA CAMPOS DE**; LOURENÇO, ISABELLA OTENIO DE; MELO,

FERNANDO ALVES DE; CORNÉLIO, MARINÔNIO LOPES; FOSSEY, MARCELO ANDRÉS; SOUZA, FÁTIMA PEREIRA DE

Experimental evidence and molecular modeling of the interaction between hRSV NS1 and quercetin. International Journal of Biological Macromolecules. , v.85, p.40 - 47, 2015.

Additional references : English. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.12.051]

5. SOUZA, F. P.; SABBAG, M. P. ; ARAUJO, G. C. ; CRAVO, H. L. P. ; TEIXEIRA, T. S. P. ; GOMES, D. E. ; FADEL, V. ; FOSSEY, M. A.

Ineraction Model Between HRSV G-Protein and Flavonoids. *International Journal of Sciences, v. 2, p. 12-19, 2013.*

6. MORAIS, ANA; MEZA, ANDREIA; **ARAÚJO, GABRIELA**; VIDOTTO, ALESSANDRA; SOUZA, FÁTIMA; FOSSEY, MARCELO; MURAKAMI, MÁRIO; NOGUEIRA, MAURICIO

Biophysical and Structural Characterization of the Recombinant Human eIF3L. Protein and Peptide Letters. , v.21, p.56 - 62, 2013.

Additional references : English. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.2174/09298665113209990084]

Outros trabalhos estão em fase de elaboração:

- Estudos conformacionais da cadeia lateral do W41 da protéina M2 em diferentes pHs utilizando Ressonancia Magnética Nuclear do estado sólido - trabalho realizado durante o doutorado sanduíche (Abril-Agosto/2017) juntamente com o grupo de pesquisa do Dr. Timothy Cross;

Ou em fase de finalização:

- Estudos estruturais da proteína SH do RSV por simulação de dinâmica molecular – principal trabalho realizado para obtenção do título de Doutor;

- Estudos de interação da proteína TNF-alfa com cumarinas – trabalho realizado juntamente ao grupo de pesquisa da Prof. Fátima;

- Manuscrito de revisão sobre estrutura e função da proteína M2-2 do RSV - trabalho realizado juntamente ao grupo de pesquisa da Prof. Fátima;

- Estudos estruturais de interação da proteína G do RSV com flavonoides (morina, quercetina e quercetinas modificadas) - trabalho realizado juntamente ao grupo de pesquisa da Prof. Fátima e do Prof. Luiz Otávio Regazini;

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

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 02 / 03 / 2018

Gabriela C. de Araujo

Assinatura do autor