

Denise Cavalcante de Melo

Estruturação do Eumenine Mastoparano por
Dinâmica Molecular em misturas de TFE – água

Dissertação de mestrado para a
obtenção do título de mestre em
Biofísica Molecular, área de
concentração Biofísica Molecular
apresentada ao Departamento de
Física do Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”.

Orientador
Prof. Dr. Jorge Chahine

São José do Rio Preto

2007

Melo, Denise Cavalcante de.

Estruturação do Eumenine Mastoparano por Dinâmica Molecular em misturas de TFE-água / Denise Cavalcante de Melo - São José do Rio Preto : [s.n], 2007.

63 f. : il ; 30 cm.

Orientador: Jorge Chahine

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biofísica molecular. 2. Dinâmica molecular. 3. Peptídeos antimicrobianos.. 4. Misturas de trifluoretanol (TFE)-água. 5. Hélice-alfa - Estabilidade. 6. Análise de componentes principais. 7. Análise de histogramas. I. Chahine, Jorge. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.32

Aos meus pais,
pelo amor e apoio incondicionais.

“Tu deviens responsable pour toujours de ce que tu as apprivoisé.”

“Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.”

Antoine de Saint-Exupéry

Agradecimentos

Agradeço a Deus em primeiro lugar pelas bênçãos na minha vida. Principalmente, porque permitiu que eu conhecesse pessoas maravilhosas, e que aprendesse muito com elas. Aqui, listo algumas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jorge Chahine pela dedicação, disponibilidade, paciência e principalmente confiança depositadas em mim. Admiro-o como profissional e ser humano que ele é. Além da valiosa orientação, e preocupação com a minha formação. Incluindo a ajuda como coordenador da pós-graduação, dando suporte nos congressos da vida. Tudo isso foi bastante significativo na minha vida profissional.

Ao Prof. Dr. José Roberto Ruggiero pela colaboração, discussões, ensinamentos e pelo exemplo de professor e pessoa. Quando eu “crescer” quero ser assim! Não esquecendo de agradecer a preocupação com o meu desenvolvimento tanto na disciplina quanto na dissertação.

A todos os professores do Departamento de Física que contribuíram de alguma forma no meu crescimento profissional e pessoal: Elso, Agostinho, João, Márcio, Marinônio, Vítor, Elói, Marcelo e Ramon e Valmir.

Amor maior que eu tenho por essas pessoas seria impossível, ainda mais porque são responsáveis pela minha chegada a esse mundo. Aos meus queridos pais pelo amor incondicional, carinho, apoio, preocupação, incentivo, e suporte financeiro o que permitiu a aventura de me distanciar de uns 3000 km deles sem algum questionamento.

Agradeço profundamente a companhia, cumplicidade e amor dedicado pelo Fernando Tadeu. Uma pessoa que certamente acreditou mais em mim do que eu própria em várias ocasiões, e que me ajudou a crescer como ser humano. Sou eternamente grata pela atenção e dedicação a momentos maravilhosos e ocasiões difíceis que passamos tornando-se assim como a minha família nesta cidade que é tão distante da minha Fortaleza.

A todos os meus familiares, tios, tias, primas, primos, e agora filhos de primas, que torceram muito por mim, e ainda torcem. Sinto muito a falta de todos, e das reuniões familiares... Em especial minha Vó Maria do Carmo, e minha tia Nádja que são como segundas mães pra mim.

Aos meus novos amigos de Rio Preto: Marisa, Janaína, Diego, Pepeu, Márcia, Márcio, Hugo e Priscilinha que foram fundamentais na adaptação da minha nova vida na nova cidade. Com essas pessoas certamente foi mais fácil a vivência e a convivência numa cidade desconhecida. Sou muitíssima grata a vocês que já fazem parte da minha vida! Muito abrigada mesmo!

Ao amigo Carlos, tanto pelas discussões relacionadas ao trabalho, como a respeito do GROMACS e dinâmica molecular, quanto pelas conversas sobre absolutamente nada e tudo.

À Sabrina pela amizade e disposição a ajudar desde o início deste trabalho. Fundamental para que eu continuasse no desenvolvimento deste.

À Márcia Cabrera pelas conversas e ajuda a respeito do peptídeo, e sobre a vida também.

Ao Paulo (Quinze) pelos momentos agradáveis, fosse estudando para alguma disciplina ou conversando a respeito de outras coisas, como as notícias do dia.

Ao Ésio pelas longas conversas a respeito das pessoas e criaturas, sem falar na física, filosofia, psicologia...

À Ana Helena pela grande amizade, somente descoberta no finalzinho, mas bastante preciosa que me amparou no derradeiro mês. Com certeza lembrarei-me das nossas longas conversas e dos momentos divertidíssimos quase sempre acompanhados por outra loira, só que gelada.

Ao queridíssimo Dr. José Geraldo Nery pela companhia agradabilíssima e pelo incentivo mostrando que o céu é o limite. E também pelos ensinamentos a respeito dos “Beaujolais” da vida.

Ao Ronaldo pela companhia e amizade desde o início do mestrado, e pela paciência ao responder minhas perguntas frequentes a respeito do cluster, de outros computadores, de Linux, Debian...

Ao Sidney que sempre se dispôs a responder minhas dúvidas de física, pela companhia na sala e por tornar as últimas semanas agradabilíssimas juntamente com a Ana, Ésio, Ronaldo, Leandro...

Ao Leandro por me convencer a usar Debian, e me ajudar nessa distribuição até então desconhecida por mim. Pela amizade, incentivo, conversas, e por organizar umas sete despedidas por semana pra mim nas últimas três semanas.

Aos colegas de Departamento: Ricardão, Ricardinho, Cristina, Priscilla, Fernanda, Gisele, Eduardo, Magno, Fernando e Ricardo pela agradável convivência e que tornaram além de outras pessoas o ambiente bastante familiar.

Aos funcionários do departamento, Ilva, Paulinho, Barboza, pela presteza e atenção para com a minha pessoa. E a outros funcionários que de alguma forma contribuem para a manutenção deste departamento.

À Capes pelo auxílio financeiro e à FAPESP pelo auxílio indireto na realização do meu trabalho.

Sumário

Lista de Figuras	3
Lista de Tabelas.....	5
Resumo.....	6
Abstract	7
1. Introdução.....	8
1.1 Veneno de Himenópteros.....	8
1.2 Mastoparanos isolados de vespas solitárias	8
1.3 Atividade Biológica.....	10
1.4 Determinantes Estruturais.....	11
1.4.1 Carga	11
1.4.2 Hidrofobicidade	12
1.4.3 Anfipaticidade e Momento hidrofóbico	13
1.4.4 Terminal Amidado	13
1.5 Mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos	14
2. Objetivos	16
3. Métodos Teóricos	17
3.1 Campo de Forças	18
3.1.1 Potenciais Harmônicos.....	18
3.1.2 Potencial Torcional	20
3.1.3 Potencial de Lennard – Jones	21
3.1.4 Potencial de Coulomb	22
3.1.5 Função da Energia Potencial Total	22
3.2 Algoritmos de Otimização da Geometria Molecular.....	23
3.3 Dinâmica Molecular Clássica	24
3.3.1 Métodos de Integração	24
3.4 Parâmetros das Simulações.....	25
3.5 Método de Troca de Réplicas.....	26
3.6 Análise de Componentes Principais	28
3.7 Wham - (Weighted Histogram Analysis Method)	29
4. Resultados e Discussão	33
5. Conclusão	51
6. Referências Bibliográficas	52

7. Apêndice A.....	57
Análise do tamanho da caixa e do peptídeo.....	57

Lista de Figuras

Figura 1.1 – Vespa <i>Anterhynchium flavomarginatum micado</i>	9
Figura 1.2 – Fatores que podem alterar a estruturação dos PAMs.....	11
Figura 1.3 – Representação em esquema dos modelos sugeridos para o mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos em hélice- α	15
Figura 3.1 – Representação dos parâmetros r , comprimento das ligações químicas θ , ângulo entre duas ligações consecutivas, e ϕ , ângulo torcional para ligações com liberdade de rotação.	19
Figura 3.2 – Estrutura tetraédrica do $C\alpha$. ξ é o ângulo entre os planos ijk e jkl	20
Figura 3.3 – Ângulo torcional entre quatro átomos em seqüência, onde ijk formam um plano, e jkl formam outro plano	21
Figura 3.4 – Histogramas do número de configurações acessadas $N(E)$ da energia, medidas em duas dimensões para as temperaturas 280K em preto, 284K em vermelho, 288K em azul, 292K em verde.	30
Figura 4.1 – A) Moléculas de TFE (em verde) e água (em vermelho e branco) solvatando o peptídeo (em rosa). B) Ligações de hidrogênio da água (em verde) e do TFE (em preto). C) Ligação de hidrogênio de moléculas de TFE com moléculas de água. Em verde escuro os carbonos, em verde claro os flúors, em vermelho o oxigênio e em branco o hidrogênio.	33
Figura 4.2 – Estrutura aleatória usada inicialmente.....	34
Figura 4.3 – Gráfico padrão da estrutura secundária para a temperatura 280K.....	35
Figura 4.4 – Gráfico padrão da estrutura secundária para a temperatura 288K.....	35
Figura 4.5 – Gráfico padrão da estrutura secundária para a temperatura 300K	35
Figura 4.6 – Gráfico padrão da estrutura secundária para a temperatura 343K.....	35
Figura 4.7 – Gráfico padrão de estrutura secundária para a temperatura de 288K, durante o intervalo de 41.000ps a 44.000ps, aproximadamente	36
Figura 4.8 – Estrutura obtida a partir da troca de réplicas, uma hélice- α anfipática com alguns resíduos identificados e os terminais.....	36
Figura 4.9 – Conjunto das vinte conformações de RMN fitadas uma a uma em perspectivas diferentes	38
Figura 4.10 – Estrutura de ressonância (17° na tabela 4.2) em rosa fitada com a hélice da simulação em verde. As lisinas e os terminais estão identificados	38
Figura 4.11 – A) RMSD das estruturas obtidas na dinâmica de 288K com a hélice ideal, fitados no $C\alpha$ apenas. (B) Desvio médio das flutuações da cadeia principal, levando em conta os átomos N, $C\alpha$, C, O e H (das amidas e do N-terminal) dos resíduos ao longo da dinâmica de 288K.....	39
Figura 4.12 – Autovalores em ordem decrescente de magnitude obtido da matriz de covariância das coordenadas dos átomos N, $C\alpha$ e C (“backbone”) do peptídeo (42 átomos no total) considerando as massas de cada átomo versus o índice dos dez primeiros autovetores para as trajetórias de temperaturas 284K e 288K	40

Figura 4.13 – Desvio padrão das flutuações atômicas do N, C _α e C (“backbone”) pelo número de átomos (42 átomos no total) para o autovetor mais significativo (preto), o segundo (vermelho) e o terceiro (verde), para a trajetória referente à 288K	41
Figura 4.14 – Duas primeiras componentes principais para as temperaturas 284K, em preto, e 288K em vermelho.....	42
Figura 4.15 – Mapa de superfície da energia livre em função de duas componentes principais do sistema a temperatura 284K. A barra de cores ao lado de cada figura é a escala da energia relativa em KJ/mol, e PC’s estão em nm. A figura abaixo é uma ampliação do limite próximo ao mínimo de energia com algumas estruturas identificadas (Fig 4.17).....	43
Figura 4.16 – Mapa de superfície da energia livre em função de duas componentes principais do sistema a temperatura 288K. A barra de cores ao lado de cada figura é a escala da energia relativa em KJ/mol, e PC’s estão em nm. A figura abaixo é uma ampliação do limite próximo ao mínimo de energia com algumas estruturas identificadas (Fig. 4.17)	44
Figura 4.17 – Estruturas identificadas nos mínimos de energia das Figuras 4.15 e 4.16	45
Figura 4.18 – Gráfico padrão da estrutura secundária da cadeia principal do peptídeo.....	46
Figura 4.19 – Autovalores em ordem decrescente de magnitude obtido da matriz de covariância das coordenadas dos átomos N, C _α e C (“backbone”) do peptídeo (42 átomos no total) versus o índice dos dez primeiros autovetores. A trajetória de equilíbrio em preto, e a ‘trajetória’ das estruturas de ressonância em vermelho.....	47
Figura 4.20 – Segunda componente principal em função da primeira, para as trajetórias de equilíbrio e de ressonância	48
Figura 4.21 – Acima, o “backbone” da dinâmica da estabilidade da hélice filtrada apenas na primeira componente principal e desta transformada em imagens e depois fitadas. Em baixo, o “backbone” das estruturas de ressonância fitados	49
Figura 4.22 – Mapa de superfície da energia livre em função de duas componentes principais do sistema para a trajetória de equilíbrio. A barra de cores ao lado de cada figura é a escala da energia relativa em KJ/mol, e PC’s estão em nm. Cinco estruturas de “backbone” foram identificadas.....	50

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 – Seqüência primária dos mastoparanos e sua origem	10
Tabela 3.1 – Parâmetros propostos por Fioroni (2000)	25
Tabela 4.1 – Seqüência primaria da Eumenine Mastoparano amidada	34
Tabela 4.2 – RMSD das 20 estruturas de RMN com a conformação obtida.....	37

Resumo

O tetradecapeptídeo Eumenine mastoparano – AF (EMP-AF) extraído do veneno de vespa, em solução aquosa contendo trifluoretanol (TFE) mostra conformação helicoidal anfipática de acordo com os dados de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Dicroísmo Circular (CD). A seqüência de aminoácidos tem o N-terminal amidado e três lisinas carregadas (5, 8 e 12). Nesse trabalho, investigamos a estrutura conformacional desse peptídeo em solução aquosa contendo TFE por simulação de dinâmica molecular usando o pacote GROMACS. As simulações foram feitas usando uma caixa cúbica que inclui o TFE (30%) e moléculas de água (70%). O método da troca de réplica foi usado para simular o sistema no intervalo de temperatura (280K - 350K) uniformemente distribuída em 14 processadores. Cada réplica numa dada temperatura T tem uma estrutura aleatória como conformação inicial. Em intervalos fixos de tempo, duas réplicas vizinhas tentam trocar conformações de acordo com a probabilidade de Boltzmann ($e^{-\Delta}$ onde $\Delta = (\Delta\beta)(\Delta U)$, β é $1/\kappa_B T$ e U a energia potencial). Apresentamos trajetórias que mostram claramente a formação de uma estrutura helicoidal (resíduos 3 e 12). Juntamente com a estrutura helicoidal, outras conformações tais como estruturas helicoidais parciais e folhas- β também exibem estabilidade relativamente alta. A estrutura helicoidal está de acordo com as 20 estruturas disponíveis obtidas por RMN, com valores pequenos de RMSD. Também mostramos que a diversidade de estruturas obtidas por RMN está relacionada com flutuações globais da cadeia, como indicado pela análise de componentes principais. A projeção da trajetória de equilíbrio na primeira componente principal, de uma estrutura helicoidal obtida como conformação inicial, mostrou flutuações que aproximadamente reproduzem a diversidade de estruturas de RMN, que são devidas principalmente à flexibilidade do N- terminal do peptídeo.

Abstract

Tetradecapeptide eumenine mastoparan-AF (EMP-AF) (14 residues) extracted from wasp venom, in solution with water and trifluoroethanol (TFE) show amphiphatic helical conformation, according with Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Circular Dichroism (CD) data. The amino acid sequence has amidated N-terminus and three charged lysine (5, 8 and 12). In this work, we have investigated structural conformations of this peptide in TFE aqueous solution by molecular dynamics simulations using GROMACS package. The simulations have been done using a cubic box that included TFE (30%) and water molecules (70%). The replica-exchange method was used to simulate the system in the temperature range (280K - 350K) uniformly distributed in 14 processors. Each replica, at a given T has a coil structure as the initial conformation. At fixed time intervals, two neighboring replica try to exchange configurations with Boltzmann probability $e^{-\Delta}$, where $\Delta = (\Delta\beta)(\Delta U)$, β is $1/\kappa_B T$ and U is potential energy. We present trajectories, which clearly show the formation of the helix structure of the peptide (residues 3 to 12). Along with the helix structure, other conformations, such as partial helical structure and β -sheet, also show relatively high stability. The helical structure shows good agreement with the twenty available NMR structures, with relatively small values of RMSD. It is also shown that this diversity of the NMR structures is related to global fluctuations of the chain, as indicated by a principal component analysis. The projection of equilibrium trajectory, with the obtained helix as the initial conformation, on the first principal component, showed fluctuations that nearly reproduce the diversity of the NMR structures, which are due, mainly, to the flexibility of the N-terminus of the peptide.

1. Introdução

1.1 Veneno de Himenópteros

Uma das maiores ordens dentro da classe de insetos é a *Hymenoptera*: importantes artrópodes venenosos além das aranhas e escorpiões. Composta de no mínimo 200.000 espécies entre abelhas, vespas e formigas e que estão direta ou indiretamente envolvidas na vida humana, já que aproximadamente 3/4 de todos os animais são artrópodes e alguns causam problemas agrícolas e até enfermidades (Vetter & Visscher, 1998).

Os insetos dessa ordem são classificados em sociais e solitários, por disporem seus venenos diferentemente. Himenópteros sociais usam o veneno como ferramenta de defesa própria e/ou de suas larvas, contra ataques de invasores e predadores. Os principais componentes encontrados são peptídeos como a melitina, presente no veneno de abelhas (Kreil, 1973) e mastoparanos no veneno de vespas (Konno *et al.*, 2001). Já o veneno de himenópteros solitários é usado para captura de presas. Uma vez injetado o veneno em aranhas e insetos, estes ficam paralisados e servem para nutrir suas larvas, o que levou a proposição da existência de várias neurotoxinas (Konno, 1998), além de moléculas similares às encontradas no veneno das vespas sociais.

1.2 Mastoparanos isolados de vespas solitárias

Os mastoparanos são peptídeos constituídos de 10 a 14 resíduos de aminoácidos (Nakajima, 1984) (ver tabela 1.1) que compõe a classe de degranuladores de mastócitos (Konno *et al.*, 2000; Hirai *et al.*, 1979a, 1979b, 1980, 1981) extraídos de insetos da família *Vespidae* (Nakagima, 1986). Eles são catiônicos, possuem resíduos hidrofóbicos, a maioria apresenta C-terminal amidado, e geralmente estão em conformação helicoidal anfipática quando interagem com biomembranas (Katsu *et al.*, 1989). Tais peptídeos possuem alta variabilidade de atividades biológicas associadas principalmente às características das membranas: liberação de histamina dos mastócitos (Konno *et al.*, 2000); estimulam a atividade fosfolipásica (das fosfalipases A₂ e C) (Argiolas & Pisano, 1983); acentuada atividade hemolítica, e atividade antimicrobiana (Ho & Hwang, 1991; Nakagima, 1984). Estas atividades tornam esses peptídeos objetos de intensos estudos no desenho de drogas; regulação da proteína G através da GTP (Higashijima, 1988), entre outras.

Dados experimentais de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Dicroísmo Circular (CD) mostram que em solução aquosa os mastoparanos apresentam uma conformação aleatória,

ou estrutura secundária não mensurável. Já em solução com trifluoretanol (TFE) exibem hélice- α anfipática (Chuang *et al.*, 1996), onde resíduos hidrofóbicos estão dispostos de um lado da hélice, e na outra face os positivamente carregados, como o grupo amina e resíduos de lisina (Katsu *et al.*, 1990). Esta configuração é fundamental para ação tóxica destes peptídeos, já que a interação da parte carregada dos fosfolipídeos da bicamada ocorre com a parte catiônica desses peptídeos. (Konno *et al.*, 2000).

Estudos estruturais confirmaram a conformação helicoidal anfipática, por exemplo, na melitina que possui 27 resíduos em dois segmentos helicoidais, é extraída do veneno da vespa *Apis Melifera* e interage com membrana (Kreil, 1973); no mastoparano-B da Vespa *basalis* que possui os resíduos Lys-4, Ser-5, Ser-8, Lys-11 e Lys-12 do lado hidrofílico e os resíduos Leu-3, Ile-6, Trp-9, Ala-10, Val-13 e Leu-14 do lado hidrofóbico (Chuang *et al.*, 1996). Estes são exemplos de peptídeos extraídos de vespas sociais. Há também os peptídeos encontrados em vespas solitárias que possuem a estrutura anfipática como o EMP-AF, principal componente do veneno da vespa *Anterhynchium flavomarginatum micado* (ver figura 1.1), tetradecapeptídeo rico em aminoácidos hidrofóbicos e básicos, e o Anoplin, extraído da vespa *Anoplius samariensis*, com 10 resíduos hidrofóbicos e básicos, ambos com C-terminal amidado.

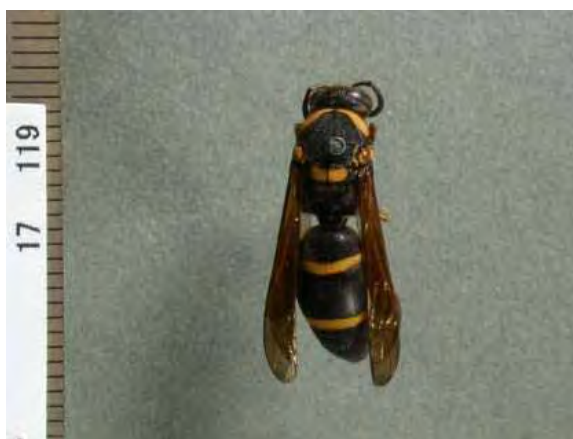


Figura 1.1

Vespa Anterhynchium flavomarginatum micado

(<http://www.city.funabashi.chiba.jp/kankyohozen/envmap/photogallery/insect/17-0119.html>)

Análogos do EMP-AF foram extraídos, EMP-AF1, 2 e 3, possivelmente devido à digestão enzimática durante a estocagem e procedimentos de dissecação (Konno *et al.*, 2000), contudo estes não apresentam atividade hemolítica nem de degranulação de mastócito, mas são importantes no estudo da relação estrutura-função desses mastoparanos (Lorenzi, 2002). Na tabela 1.1 apresentamos a seqüência e origem de alguns dos peptídeos da família dos mastoparanos.

Tabela 1.1
Seqüência primária dos mastoparanos e sua origem

Peptídeo	Seqüência	Origem	Referência
Anoplin	G-L-L-K-R-I-K-T-L-L-NH ₂	<i>Anoplius samariensis</i>	Konno et al., 2000
Anoplin-OH	G-L-L-K-R-I-K-T-L-L-OH	Sintetizado	Konno et al., 2000
EMP-AF	I-N-L-L-K-I-A-K-G-I-K-S-L-NH ₂	<i>A. flavomarginatum micado</i>	Konno et al., 2000
EMP-AF 1	I-N-L-L-K-I-A-K-G-I-K-S-L-OH	<i>A. flavomarginatum micado</i>	Konno et al., 2000
EMP-AF 2	L-K-I-A-K-G-I-K-S-L-NH ₂	<i>A. flavomarginatum micado</i>	Konno et al., 2000
EMP-AF 3	L-K-I-A-K-G-I-K-S-L-OH	<i>A. flavomarginatum micado</i>	Konno et al., 2000
Eumenitin	L-N-L-K-G-I-F-K-K-V-A-S-L-L-T-OH	<i>Eumenes rubronatus</i>	dos Santos C., 2006
MP	I-N-L-K-A-L-A-A-L-A-K-K-I-L-NH ₂	<i>Vespula lewisii</i>	Hirai et al., 1979 ^a
MP-B	L-K-L-K-S-I-V-S-W-A-K-K-V-L-NH ₂	<i>Vespa basalis</i>	Ho et al., 1991
MP-X	I-N-W-K-G-I-A-A-M-A-K-K-L-L-NH ₂	<i>Vespa xanthoptera</i>	Hirai et al., 1979 ^b

1.3 Atividade Biológica

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs), assim como os mastoparanos, apresentam grande diversidade de atividades já citadas, que dependem de parâmetros como seqüência, cationicidade, hidrofobicidade e anfipaticidade (Giangaspero, *et al.*, 2001).

Os PAMs já foram encontrados em mamíferos, até em plantas, sendo a grande maioria encontrada nas células epiteliais, defendendo o organismo de agressores: discernindo-os dos seus próprios constituintes (Zasloff, 2002). Outros organismos como fungos, insetos, e anfíbios também produzem PAMs com atividades anti-fúngica, hemolítica, anti-virótica e anti-tumoral (Baba & Schneewind, 1998). Porém, devido à composição das membranas existentes, um peptídeo exclusivo não seria apto a exterminar diferentes microrganismos (Yeaman & Yount, 2003).

Resíduos hidrofóbicos são os maiores constituintes dos PAMs. Isto proporciona uma interação com membranas bacterianas anfifílicas, devendo ter participação no mecanismo de ação. As forças eletrostáticas dão impulso ao primeiro contato dos peptídeos com as cabeças aniônicas dos fosfolipídeos das membranas externas das bactérias podendo orientá-las com as cargas dos resíduos. O mecanismo pelo qual um peptídeo danifique patógenos sem que afetem outros elementos do ambiente está principalmente conectado à membrana bacteriana, pois há estudos com peptídeos que não são catiônicos, conseqüentemente não são seletivos, e bactérias que são resistentes devido à concentração baixa de fosfolipídios aniônicos (Andreu & Rivas, 1998; Zasloff, 2002).

1.4 Determinantes Estruturais

Alguns aspectos relevantes serão esclarecidos como carga, hidrofobicidade, momento hidrofóbico, anfipaticidade, e terminal amidado. Tais determinantes moleculares influenciam em propriedades conformacionais e bioquímicas, o que podem provocar alterações nas atividades biológicas, e/ou transição para estados ativos ou inativos.

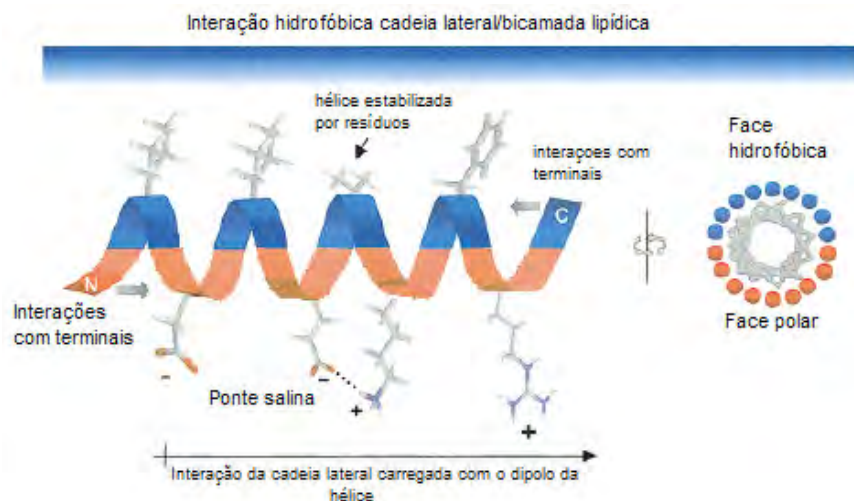


Figura 1.2

Fatores que podem alterar a estruturação dos PAMs helicoidais (Tossi et al., 2000).

Alguns fatores que podem comprometer a estrutura do peptídeo estão apresentados na figura 1.2. Isto implica a presença de resíduos como, por exemplo, leucina, alanina e lisina que estabilizam a hélice e prolina que desestabiliza (Tossi, 2000). Incluindo as interações nos terminais; pontes salinas entre resíduos com cargas opostas, separados pelas posições $i, i \pm 3$ ou $i, i \pm 4$; e interações de resíduos da parte hidrofóbica com fosfolipídios da bicamada lipídica.

1.4.1 Carga

PAMs e hemolíticos são carregados positivamente, com seu domínio catiônico altamente definido, e carga líquida variando de +2 a +9. Incontestavelmente, esta característica é importante numa atração eletrostática inicial entre peptídeos e membranas fosfolipídicas de bactérias e outros organismos carregados negativamente. Além disso, a eletroafinidade mútua confere uma possível seletividade antimicrobiana (Yeaman & Yount, 2003).

As membranas bacterianas são carregadas negativamente por serem ricas em ácidos fosfolipídicos (PG, fosfatidilglicerol; PS, fosfatidilserina e CL, cardiolipina). Além dos lipopolissacarídeos (LPS) e ácidos teicoico e teicurônico das bactérias Gram-positivas e Gram-

negativas que adicionam parte da carga às suas superfícies. Uma maneira de concentrar peptídeos carregados positivamente em superfícies microbianas é pelo potencial transmembranar, 50% maior em procariotos que na maioria dos mamíferos (Yeaman & Yount, 2003).

Fundamentado nestas considerações, muitos estudos tentam correlacionar a cationicidade com ação antimicrobiana (Bessalle et al., 1992; Matsuzaki et al., 1996; Dathe et al., 1997). Dentro de um certo intervalo, o aumento do potencial antibactericida é geralmente associado com o incremento da cationicidade. Estudos com a magainina 2, mantendo constantes parâmetros como hidrofobicidade e helicidade, mostraram que para um aumento da carga de +3 à +5 ocorrem um aumento da ação antibacteriana contra patógenos Gram-negativos e Gram-positivos. De qualquer forma há um limite nesse contrabalanço (Dathe et al., 2001). Um percentual mínimo de cargas, talvez +2, é necessário à seletividade em microorganismos, por razões como: interação eletrostática inicial; potencial de deslocamento de cátions ligados a membranas; e potencial transmembranar forte para facilitar a transição de orientação de peptídeos catiônicos dentro da membrana (organização do poro), e/ou translocar peptídeos para a membrana citoplasmática (Yeaman & Yount, 2003; Andreu & Rivas, 1998).

1.4.2 Hidrofobicidade

O conceito de hidrofobicidade de um peptídeo está ligado à porcentagem de resíduos hidrofóbicos (aproximadamente 50% para a maioria dos PAMs) (Yeaman & Yount, 2003), presentes na cadeia. Este parâmetro mede o grau de afinidade do peptídeo pela região das cadeias acíclicas de lipídeos de membranas biológicas (Zhao, 2003).

Hidrofobicidade é uma característica inerente do peptídeo - a de ser capaz de se deslocar de uma fase aquosa para uma fase hidrofóbica, e também um fator modulador da atividade membranar. Então, para o peptídeo ser lítico e fazer parte do sistema de defesa do hospedeiro, duas exigências têm que ser cumpridas: primeiro, exigindo baixa hidrofobicidade, o peptídeo tem que ser suficientemente solúvel em água permitindo armazenamento em alta concentração e possibilitando transporte rápido ao alvo microbiano; e segundo, requer alta hidrofobicidade, devendo ser ao mesmo tempo capaz de interagir com a região hidrofóbica da bicamada a fim de perturbá-la, e aumentar a permeabilidade. Entretanto, alta hidrofobicidade poderá causar agregação e até precipitação em água, impedindo seu transporte ao alvo; por outro lado, baixa hidrofobicidade tem afinidade lipídica insuficiente (Dathe & Wieprecht, 1999).

1.4.3 Anfipaticidade e Momento hidrofóbico

A conformação mais comum entre PAMs ao interagirem com alvos de membrana é a estrutura anfipática, que pode apresentar várias conformações, sendo a hélice- α a mais eficiente em interação com biomembranas. Nessa conformação a maior parte dos PAMs mostra variação intermediária de carga de +4 a +6 e tem uma porcentagem de 40% a 60% de resíduos hidrofóbicos (Tossi et al., 2000).

Para medir esta anfipaticidade, calculamos o momento hidrofóbico, definido como o vetor soma das hidrofobicidades dos aminoácidos individualmente e perpendicular ao eixo da hélice, pressupondo que o ângulo entre as cadeias laterais dos resíduos e o eixo da hélice é de quase 100° (Dathe & Wieprecht, 1999). Maiores detalhes a respeito das hidrofobicidades de cada aminoácido equação do momento hidrofóbico podem ser visto em Broggio Costa, 2006.

Uma correlação completa entre o momento hidrofóbico e a atividade da membrana é difícil de ser elucidada; primeiro porque em alguns peptídeos os resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos não estão regularmente distribuídos na cadeia, acarretando regiões de auto e baixo momentos hidrofóbicos; segundo, porque o teor helicoidal do peptídeo é freqüentemente considerado menor que 100%, e o momento hidrofóbico é calculado com base numa hélice ideal (Dathe & Wieprecht, 1999).

1.4.4 Terminal Amidado

Uma modificação pós-traducional de peptídeos antimicrobianos, que altera a atividade biológica é a amidação. Ela ocorre numa ampla variedade de peptídeos como, por exemplo, na melitina (Kreil, 1973), na cecropina (Andreu et al., 1983), no EMP-AF (Konno et al., 2000; Delatorre et al., 2001), entre outros. Tal metodologia envolve descarboxilação oxidativa – clivagem - de um resíduo de glicina no C-terminal, em dois passos do processo enzimático. A amidação evita clivagem pelas carboxipeptidases (enzimas que catalisam a remoção hidrolítica de um resíduo terminal), conseqüentemente o C-terminal deixa de ser negativo e se acomoda, fornecendo uma ligação extra de hidrogênio para a formação de hélices- α (Andreu & Rivas, 1998; Epanand & Vogel, 1999; Sforça et al., 2004).

A correlação entre amidação e atividade biológica é objeto de intensos estudos. Em 1983, Andreu comparou a cecropina amidada e a não-amidada, e constatou uma alta eficácia na atividade antimicrobiana para a versão amidada. Experimentos com análogos da seminalplasmina (SPLN), o SPFK amidado e não amidado - parte mais hidrofóbica da seqüência da SPLN com a substituição de um resíduo de ácido glutâmico pela lisina, e também a cisteína no lugar do primeiro e do último resíduo - resultaram em um considerável aumento

na atividade antimicrobiana sem qualquer atividade hemolítica para o C-terminal amidado (Sitaram & Nagaraj, 1999). Confrontando as Eumenines, EMP-AF-NH₂ e o EMP-AF-COO⁻, verificou-se que o primeiro possui atividade biológica mais potente que o segundo (Sforça et al., 2004).

1.5 Mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos

Muitos peptídeos antimicrobianos empregam mecanismos sofisticados e dinâmicos de efeitos rápidos e atividade potente na sua ação. O entendimento desse processo ajuda a promover o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos mais resistentes, que aumente a imunidade, tenha um espectro mais amplo, etc.

Um componente elementar na composição de todas as membranas é a bicamada fosfolipídica, que por definição é anfipática, tendo domínios hidrofílicos e hidrofóbicos. Contudo, células procarióticas e eucarióticas têm as suas especificidades, como por exemplo, a presença do colesterol nas de núcleo presente, mas raramente encontrado nas desprovidas de núcleo celular (Yeaman & Yount, 2003). Geralmente, as membranas de mamíferos são constituídas de lipídeos zwitteriônicos (não possuem carga líquida), e as compostas de membranas aniônicas estão presentes em muitas bactérias.

O caráter catiônico do peptídeo acaba atraindo eletrostaticamente moléculas negativas, como por exemplo, superfícies de micróbios, podendo até induzir formação de hélice- α (Matsuzaki, 1999b), mas em regra desestrutura-se em solução. Então, esta interação direta deve auxiliar a passagem do peptídeo para o interior da membrana. O processo começa quando os grupos da cabeça da membrana fosfolipídica carregada é alcançada e o peptídeo assume a conformação helicoidal que permite sua inserção na face hidrofóbica dentro da bicamada até se acumularem e formarem agregados.

A permeabilização da membrana pode ocorrer por três mecanismos, como representados na figura 1.3. Primeiro a proporção de moléculas de peptídeos reorientada formam o poro-barril (Yang *et al.*, 2001; Shai, 1999). Segundo a agregação dos peptídeos causam um afinamento na membrana, e então formam a cavidade de poros toroidais (Tossi *et al.*, 2000; Matsuzaki, 1995a). E por último, as moléculas do peptídeo se acumulam paralelamente à superfície e causam desagregação, um processo conhecido como carpete.

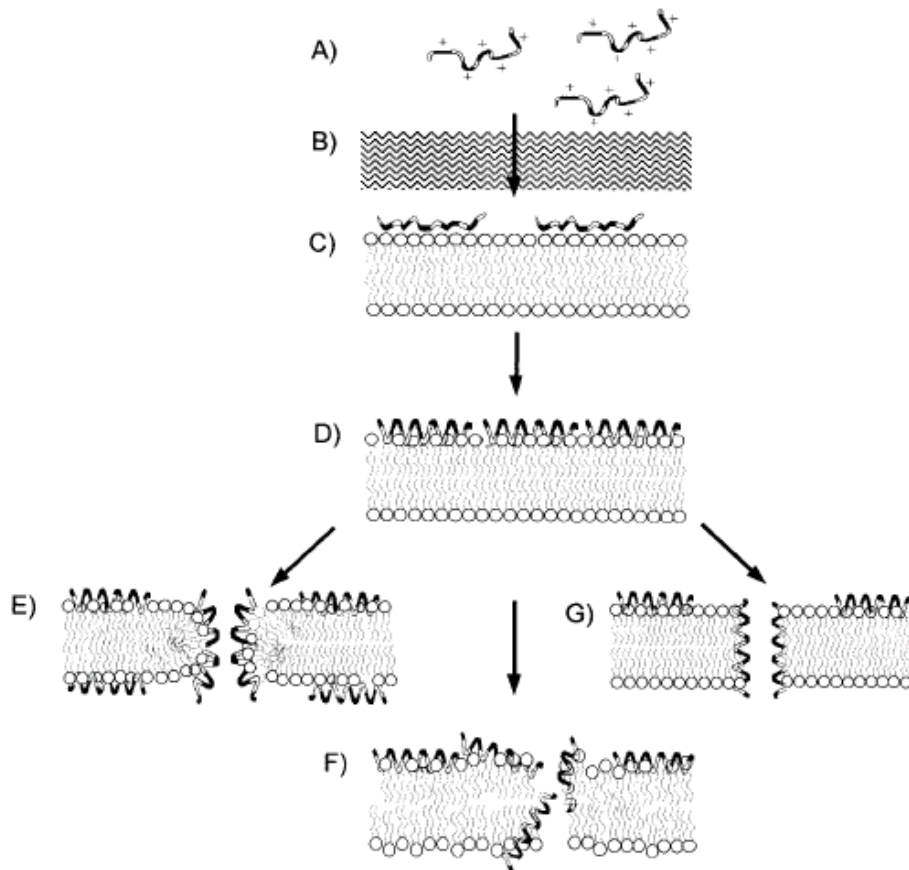


Figura 1.3

Representação em esquema dos modelos sugeridos para o mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos em hélice- α (adaptado de Tossi *et al.*, 2000). (A) Atração eletrostática á superfície aniônica dos microorganismos. (B) Passagem através da membrana externa e/ou da camada de peptidoglicanos. (C) Atração eletrostática aos fosfolípídeos aniônicos da membrana citoplasmática. (D) Transição conformacional, inserção e acumulação na membrana. (E) Formação do poro toroidal e translocação do peptídeo. (F) Mecanismo tapete de permeabilização de membrana. (G) Formação do poro barril.

2. Objetivos

A estrutura secundária do peptídeo Eumenine mastoparano – AF é importantíssima para a atividade biológica, como foi discutido na introdução. O peptídeo assume uma conformação de hélice- α anfipática na presença de membranas, ou em ambiente semelhante, com a presença de co-solventes. Nesta dissertação, mimetizamos a bicamada através de um modelo de misturas de trifluoretanol (TFE) e água, pois o TFE também é anfipático – proporciona um ambiente hidrofílico e hidrofóbico. Assim, os objetivos deste trabalho são:

- A partir de uma estrutura aleatória obter o mapa conformacional do peptídeo através de simulações de dinâmica molecular usando o método de troca de réplicas que consiste na permutação do sistema de acordo com uma probabilidade;
- Estudar as estabilidades de algumas estruturas presente no mapa conformacional através do perfil de energia livre;
- As duas primeiras componentes principais oriundas da diagonalização da matriz de covariância serão os parâmetros de ordem em função dos quais a energia livre será calculada;
- Comparar uma das estruturas presentes no mapa conformacional, uma hélice, com dados de RMN.

3. Métodos Teóricos

No início dos anos 50, o conceito em Dinâmica Molecular (DM) estava originalmente sendo desenvolvido por Alder e Wainwright, como uma técnica para simular sistemas de colisão de esferas rígidas (Alder & Wainwright, 1957). Somente em 1977, Van Gunsteren & Berendsen publicaram a primeira simulação de uma macromolécula biológica, a BPTI (*Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor* - inibidor de tripsina bovino pancreático) de duração de 9.2ps em vácuo.

A idéia fundamental da DM é extremamente simples, mas exigente computacionalmente. Consiste em estudar os movimentos de um sistema de partículas. A relação entre a posição e o tempo de N partículas que interagem, de massas m_i em um dado conjunto de coordenadas, é dada através da solução direta das equações de movimento de Newton:

$$\vec{F}_i = m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} \quad i = 1, 2, \dots, N. \quad [3.1]$$

onde $\vec{r}_i(t)$ é a posição da partícula i . A força instantânea \vec{F}_i em cada átomo deve ser calculada das interações no sistema, definida como o gradiente da função energia potencial V dependente das posições de todos os átomos,

$$\vec{F}_i = -\vec{\nabla}_i V(\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_N) \quad [3.2]$$

O cálculo desse potencial será descrito na próxima secção.

Com esse método podemos explorar propriedades estruturais, energéticas, e movimentos de sistemas moleculares. Em geral, todos os átomos estão representados explicitamente, usando uma função potencial empírica para descrever suas interações (equação 3.2).

Contudo ainda há limitações nesses experimentos *in silico*. A escala disponível de tempo ainda é limitada se comparada com alguns processos bioquímicos. Cada vez mais, pesquisas vêm aprimorando o desempenho computacional, e o desenvolvimento de softwares mais velozes diminuem o “gap” dessa limitação. Como o supercomputador BlueGene que anseia em operar à velocidade natural dos processos biológicos (Fitch et al., 2006).

3.1 Campo de Forças

Para a determinação das equações de movimento, torna-se essencial definir como a energia potencial do sistema molecular varia com a posição dos átomos do sistema. A princípio, tal cálculo pode ser obtido pela resolução quanto-mecânica para determinar a energia de menor estado dos elétrons no sistema e cada possibilidade da posição nuclear. No entanto, seu custo computacional é alto, devido à grande quantidade de átomos numa simulação - principalmente considerando o solvente em torno da molécula. Contorna-se esse problema com funções potenciais clássicas dependentes apenas das posições entre núcleos atômicos.

Quando tratamos de sistemas com milhares de átomos, proteínas por exemplo, inserimos funções potenciais empíricas de acordo com dados experimentais e cálculos quânticos de moléculas pequenas, genericamente chamado de “campo de força molecular” (Brooks III et al., 1988; van Gunsteren & Berendsen, 1990).

Diversos pesquisadores desenvolveram Campos de Forças com parametrização específica – funções potenciais diversificados, dependendo do sistema – como o AMBER (Weiner et al., 1996), CHARMM (Brooks et al., 1983), GROMOS (van Gunsteren & Berendsen, 1987) e OPLS/AMBER (Jorgensen & Tirado-Rives, 1988). As funções potenciais comumente são subdivididas em contribuições de termos ligados, como o potencial de estiramento da ligação, angular e torcional, termos não-ligados que consideram a impenetrabilidade das nuvens eletrônicas, como as forças de dispersão, indução dipolar e interações eletrostáticas, e por último as interações especiais, como a restrição de posição e de distância baseadas em listas fixas.

As simulações submetidas neste trabalho utilizaram o campo de força GROMOS/96 (van Gunsteren et al., 1996), com a função de energia potencial descrita por termos harmônicos devido às interações covalentes: potencial de ligação, angular, torcional próprio e impróprio; e devido aos átomos não-ligados - separados por três ou mais ligações covalentes: potencial de Lennard-Jones e Coulomb. A seguir, estes potenciais serão discutidos com mais detalhes.

3.1.1 Potenciais Harmônicos

A maioria dos movimentos que ocorrem nas proteínas à temperatura ambiente permite que o comprimento das ligações, inclusive o tamanho dos ângulos, flutue próximo ao valor de equilíbrio. A natureza das ligações e as massas atômicas é que determinam essas vibrações das moléculas.

O estiramento de ligação entre dois átomos covalentemente ligados i e j (ver figura 3.1) é uma função potencial semelhante ao de Hooke num sistema massa-mola,

$$V_b(r_{ij}) = \frac{1}{2} k_{ij}^0 (r_{ij} - r_{ij}^0)^2 \quad [3.3]$$

onde, r_{ij}^0 é o comprimento de equilíbrio, r_{ij} é a distância do par ij em um determinado instante, e k_{ij}^0 é uma constante elástica que descreve a “dureza” da ligação. Esta é estimada através da comparação da energia do fóton absorvido pela radiação infravermelha com a diferença em energia dos estados vibracionais da molécula ao passar do nível fundamental para o primeiro estado excitado.

De modo similar, o dobramento angular dos átomos i, j, k – onde i faz ligação com j e j com k (ver figura 3.1) – é representado pelo seguinte potencial:

$$V_a(\theta_{ijk}) = \frac{1}{2} k_{ijk}^0 (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2 \quad [3.4]$$

onde θ_{ijk} é o ângulo entre as ligações em um certo instante, θ_{ijk}^0 o ângulo de equilíbrio, e k_{ijk}^0 a constante da força que determina a dificuldade em distorcer o ângulo.

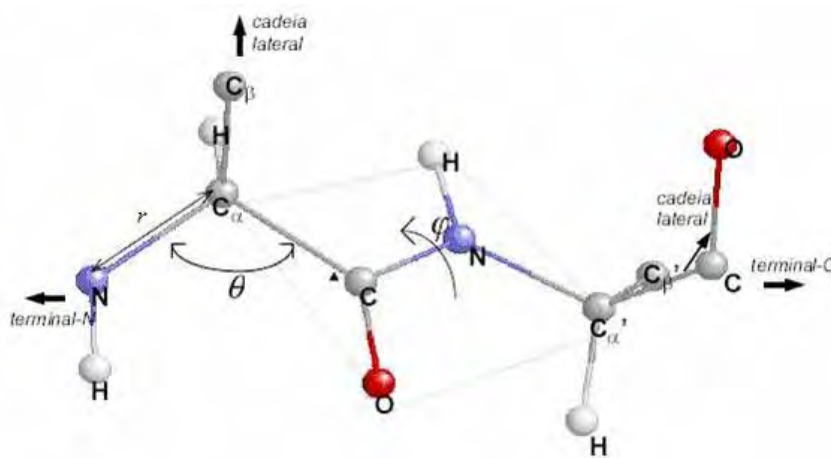


Figura 3.1

Representação dos parâmetros r , comprimento das ligações químicas, θ , ângulo entre duas ligações consecutivas, e ϕ , ângulo torcional para ligações com liberdade de rotação. Os ângulos torcionais, em bioquímica, são denominados ϕ , para ligação entre N – C $_{\alpha}$, ψ , entre C $_{\alpha}$ – C e ω entre C – N. (adaptado de Pascutti, 2002).

Existe um terceiro potencial harmônico em alguns campos de força, como no GROMOS, necessário em sistemas planares e em sistemas com hidrogênios ligados aos carbonos que não são tratados explicitamente. Assim, para manter a estrutura tridimensional em um conjunto de quatro átomos, seja ele planar ou tetraédrica, incluímos um potencial chamado diedral impróprio. A equação, com um átomo central i ligado a três outros, j, k, l é:

$$V_{imp}(\xi_{ijkl}) = \frac{1}{2} k_{ijkl}^0 (\xi_{ijkl} - \xi_{ijkl}^0)^2 \quad [3.5]$$

onde ξ_{ijkl} é o ângulo entre os plano ijk e jkl (ver figura 3.2), a constante para a restituição do ângulo de equilíbrio ξ_{ijkl}^0 entre esses plano é k_{ijkl}^0 .

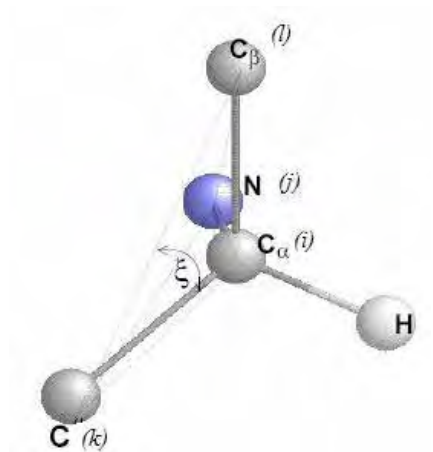


Figura 3.2

Estrutura tetraédrica do $C\alpha$. ξ é o ângulo entre os planos ijk e jkl e vale $35,264^\circ$ (no equilíbrio). (Pascutti, 2002).

Na figura acima, o plano formado pelos átomos $C\alpha - N - C$, ijk e k respectivamente, e o outro plano com os átomos $N - C - C\beta$, jkl respectivamente, tendo o ângulo de $35,264^\circ$ é conservada a estrutura tetraédrica média do carbono- α . Mantendo a seqüência $ijkl$, $C\alpha - N - C - C\beta$ respectivamente, garante-se que o resíduo de aminoácido da cadeia lateral (figura 3.1) fique na posição levógira do $C\alpha$. Este tipo de potencial ainda fortalece a coplanaridade dos átomos $C\alpha - C - O - N - H - C\alpha$ na cadeia polipeptídica (figura 3.1), tomando ξ_0 como zero, e também em anéis aromáticos onde a estrutura planar deve ser mantida.

3.1.2 Potencial Torcional

A rotação em torno das ligações covalentes entre dois átomos não pode ser modelada pelos termos já descritos, sendo necessário introduzir um potencial torcional explícito. Os ângulos diedrais, formados pela seqüência de quatro átomos, possuem liberdade de torção, como pode ser observado na figura abaixo:

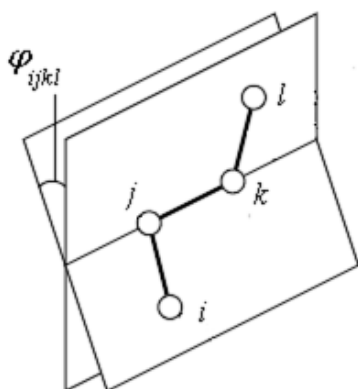


Figura 3.3

Ângulo torcional entre quatro átomos em seqüência, onde $i j k$ formam um plano, e $j k l$ formam outro plano. (Adaptado de Allen, 2004).

Comumente, usa-se a expansão do co-seno, mantendo-se o termo de menor ordem. A equação do potencial torcional próprio é:

$$V_{died}(\varphi_{ijkl}) = k_{jk}^{\varphi} [1 + \cos(n\varphi - \delta)] \quad [3.6]$$

onde k_{jk}^{φ} é a constante que define a barreira de torção, n é o número de mínimos para a torção de uma certa ligação química, δ é a fase (usualmente tomada como 0° , podendo ser 180°) podendo posicionar $V_{died}(0)$ num máximo ou num mínimo, e φ é o ângulo diedral para a ligação central na série dos quatro átomos (figuras 3.1 e 3.3).

Os ângulos de torção podem descrever as mudanças conformacionais da cadeia principal de uma proteína (átomos que participam das ligações peptídicas, sem levar em conta as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos). As principais modificações são em torno das ligações $N - C_\alpha$ e $C_\alpha - C$, por possuírem barreiras acessíveis à temperatura ambiente. A estrutura secundária, tanto a hélice- α como a folha β , são definidas pelos valores dos ângulos diedrais $C - N - C_\alpha - C$ e $N - C_\alpha - C - N$ (ϕ e ψ em bioquímica).

3.1.3 Potencial de Lennard – Jones

Átomos não unidos covalentemente, afastados de três ou mais ligações, compõe termos de repulsão - curto alcance, e de atração - longo alcance (van der Waals) numa função potencial. A parte repulsiva, de curtíssimo alcance proporcional a $1/r^{12}$, se deve ao impedimento da interpenetração das nuvens eletrônicas dos átomos em questão, de acordo com o princípio de exclusão de Pauling. Já o termo atrativo, de longo alcance proporcional a $1/r^6$, se deve às oscilações na distribuição de carga de um átomo na presença de outro, surgindo uma atração dipolo-induzido dipolo-induzido que é a dispersão de London. A junção desses termos é mais conhecida como potencial de Lennard-Jones:

$$V_{LJ}(r_{ij}) = \left[\frac{C_{ij}^{(12)}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}^{(6)}}{r_{ij}^6} \right] \quad [3.7]$$

onde C_{ij}^6 e C_{ij}^{12} refletem o diâmetro das nuvens eletrônicas e depende dos átomos envolvidos. No cálculo de interações entre moléculas, os termos de todos os pares são contados, e em interações intramoléculas, apenas alguns átomos separados de no mínimo três ligações (às vezes quatro ligações) são incluídas. Tais parâmetros podem ser experimentalmente e teoricamente ajustados.

3.1.4 Potencial de Coulomb

Um outro potencial de átomos carregados e não ligados quimicamente é descrito pelo potencial eletrostático de Coulomb. Esta interação é de longo alcance, proporcional a $1/r$, sendo capaz de deslocar nuvens eletrônicas com predileção sobre um dos átomos através de uma diferença de eletronegatividade. Dependendo dos resíduos que compõe a proteína, e a sua disposição, as cargas parciais dos átomos podem promover ligações de hidrogênio entre si ou com o solvente aquoso. Conseqüentemente, definem e/ou estabilizam estruturas secundárias, inclusive se na seqüência contiver aminoácidos e terminais carregados.

O potencial é dado pela forma:

$$V_{Coul}(r_{ij}) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad [3.8]$$

onde q_i e q_j são as cargas, r_{ij} é a distancia que separa as cargas i e j , ϵ_0 é a permissividade no vácuo e ϵ_r a constante dielétrica do meio. Para as correções eletrostáticas de longo alcance utilizamos o PME (*Particle Mesh Ewald*). Derivado da soma de Ewald, o PME calcula no espaço de Fourier as interações de longo alcance que acontecem no espaço real (Darden, York, e Pedersen, 1993; Essmann et al., 1995).

3.1.5 Função da Energia Potencial Total

A função potencial total é a soma das interações entre átomos ligados e não-ligados, descritos anteriormente:

$$V_{lig} = \sum_{n=1}^{N_b} V_b(r_{ij}) + \sum_{n=1}^{N_a} V_a(\theta_{ijk}) + \sum_{n=1}^{N_\xi} V_{imp}(\xi_{ijkl}) + \sum_{n=1}^{N_\phi} V_{died}(\phi_{ijkl}) \quad [3.9]$$

$$V_{nlig} = \sum_{i < j}^N [V_{LJ}(r_{ij}) + V_{Coul}(r_{ij})] \quad [3.10]$$

$$V_{tot} = V_{lig} + V_{nlig} \quad [3.11]$$

A equação 3.9 descreve as interações covalentemente entre átomos ligados, sendo um sistema molecular que possua no total N_b ligações químicas, N_a ângulos entre pares de ligações consecutivas, N_ξ ângulos diedrais impróprios, e N_ϕ ângulos diedrais próprios. A equação 3.10 representa a soma sobre todos os pares de átomos i e j , no total de N partículas (excluindo primeiro e segundo vizinhos ligados).

3.2 Algoritmos de Otimização da Geometria Molecular

A idéia essencial de minimização de energia é evitar conflitos estéricos, deixar o sistema mais relaxado, por exemplo, encontrando um novo conjunto de coordenadas (como dado na Eq. 3.11) do sistema de interesse. Contudo, isso é dificultoso já que para uma macromolécula com muitos graus de liberdade conduz a vários mínimos nas funções potenciais. A alternativa é empregar um método que encontre um mínimo local, ou de preferência um mínimo global. Desde que a função energia potencial seja expressa de forma analítica, as derivadas são dadas por funções simples que possam ser usadas para promover a busca por um mínimo (Brooks III et al., 1998).

As otimizações foram usadas no intuito de ajustar posições atômicas, relaxando possíveis distorções nas ligações químicas, nos ângulos entre três átomos (ou duas ligações), e nos contatos de van der Waals das estruturas iniciais.

Os algoritmos utilizados na minimização de energia das simulações realizadas foram o “*Steepest Descent*” e o Gradiente Conjugado. O primeiro método consiste em movimentar a molécula na direção oposta ao do gradiente da função potencial num determinado ponto. Como o gradiente fornece a direção de maior variação de uma função, a direção escolhida aponta para a direção de máximo decréscimo da função em cada ponto. Esse método é eficiente para se aproximar de um mínimo, mas converge vagorosamente nas suas proximidades. O segundo método, Gradiente Conjugado, a direção de movimento é dada pela conjugação das direções do gradiente no ponto atual e no ponto anterior. Uma vez vizinho ao mínimo esse método é mais eficiente que o “*Steepest Descent*” para encontrar o mínimo da função potencial. Indicado em sistemas que tenham restrição de posição e ângulo nos seus átomos.

3.3 Dinâmica Molecular Clássica

Em modelos moleculares onde se despreza efeitos quânticos, cada átomo é considerado como uma massa pontual cujo movimento é determinado por forças sobre ele exercidas pelos demais átomos, como descrito nas equações clássicas de movimento. A física clássica fornece solução para descrever as equações de movimento do sistema de partículas interagindo, para apenas alguns sistemas, e alguns casos envolvendo uma ou duas partículas independentes. Para três ou mais partículas independentes, chamamos isso de problema de muitos corpos onde as equações de movimento devem ser solucionadas numericamente.

3.3.1 Métodos de Integração

Uma variedade de algoritmos têm sido usados para integrar equações de movimento em simulações de dinâmica molecular. Um dos métodos mais simples, frequentemente usado em dinâmica molecular, foi desenvolvido por Verlet (Verlet, 1967). Derivado de duas expansões de Taylor (truncadas), dependente de coordenadas \mathbf{r}_i no tempo $t - \Delta t$ e $t + \Delta t$,

$$\mathbf{r}_i(t - \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) - \Delta t \frac{d}{dt} \mathbf{r}_i(t) + \frac{(\Delta t)^2}{2!} \frac{d^2}{dt^2} \mathbf{r}_i(t) - \frac{(\Delta t)^3}{3!} \frac{d^3}{dt^3} \mathbf{r}_i(t) + \dots$$

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \Delta t \frac{d}{dt} \mathbf{r}_i(t) + \frac{(\Delta t)^2}{2!} \frac{d^2}{dt^2} \mathbf{r}_i(t) + \frac{(\Delta t)^3}{3!} \frac{d^3}{dt^3} \mathbf{r}_i(t) + \dots$$

Somando as duas equações juntamente com a equação 3.1, temos:

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) \approx -\mathbf{r}_i(t - \Delta t) + 2\mathbf{r}_i(t) + \frac{\Delta t^2}{m_i} \mathbf{F}_i$$

$$\mathbf{v}_i(t) \approx \frac{1}{2\Delta t} [\mathbf{r}_i(t + \Delta t) - \mathbf{r}_i(t - \Delta t)].$$

O truncamento introduz um erro da ordem de $(\Delta t)^4$ para as coordenadas e $(\Delta t)^3$ para as velocidades. De qualquer forma, um problema com esse método é que as velocidades são obtidas como diferença de dois termos de mesma magnitude, com precisão numérica muito sensível. Uma pequena modificação, teoricamente equivalente, é o algoritmo de *Leap-Frog* (Hockney et al., 1974) utilizado pelo GROMACS:

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) \approx \mathbf{r}_i(t) + \Delta t \mathbf{v}_i(t + \Delta t/2) \quad (3.12)$$

$$\mathbf{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) \approx \mathbf{v}_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{\Delta t}{m_i} \mathbf{F}_i \quad (3.13)$$

Esta aproximação evita a diferença entre grandes termos quando calculamos as velocidades. O único problema é que durante metade do passo as velocidades ficam desligadas das posições, em outras palavras não podem ser calculadas no mesmo momento. Porém o GROMACS contorna isto pelo resultado das médias das velocidades nos instantes $(t + \Delta t/2)$ e $(t - \Delta t/2)$, para obter a velocidade do instante t . Uma vantagem desse algoritmo é o fato dele permitir o acoplamento do banho térmico ao sistema, já que o cálculo das energias potenciais depende das posições, e como suas variações dependem das velocidades, estas acabam controlando as energias.

3.4 Parâmetros das Simulações

As simulações foram realizadas com o pacote computacional GROMACS versão 3.3.1 (Lindahl et al., 2001) a partir de um arquivo pdb de uma estrutura aleatória do EMP-AF, como mostraremos no próximo capítulo, em catorze (14) computadores em *cluster* sendo a temperatura a única diferença entre eles, variando em intervalos de 4K, 5K e 6K de 280K a 343K. A cada 1000 passos a condição de troca de réplicas (seção 3.5) era verificada. As trajetórias têm duração de aproximadamente 45ns, mas os primeiros 14ns não foram utilizados nas análises. O campo de força usado neste trabalho, GROMOS/96 (43a1) (van Gunsteren, et al. 1996), tem alguns dos parâmetros modificados pela inclusão do TFE (2, 2, 2-Trifluoretanol) proposto por Fioroni e colaboradores (2000).

Tabela 3.1
Parâmetros propostos por Fioroni (2000) para simulações de DM com TFE.

átomos	$C_{1,1}^6 / (kJ mol^{-1} nm^6)$ $\times 10^3$	$C_{1,1}^{12} / (kJ mol^{-1} nm^{22})$ $\times 10^6$	q/e
F	1.177862	1.000000	-0.17
C	2.340624	3.374569	0.452
CH2	7.104804	25.775929	0.273
O	2.261954	1.505529	-0.625
H	0.0	0.0	0.41
Ligação		Distância	
F – C		1.36	
CH2 – O		1.43	
CH2 – C		1.53	
O – H		1.00	
Ângulo de ligação	θ_0 (deg)	$K_\theta / kJ mol^{-1} rad^{-2}$	
H – O – CH2	109.5	397.5	
O – CH2 – C	110.3	460.2	
CH2 – C – F	111.4	460.2	
F – C – F	107.6	460.2	
Diedral	Φ_0 (graus)	$K_\Phi / kJ mol^{-1} rad^{-2}$	
H – O – C – C	3	1.300	

O tamanho da caixa cúbica em cada réplica foi de 4.5nm por aresta, que continha água – TFE na proporção de 70:30 (v:v), com os parâmetros acima descritos. A relação entre o tamanho da caixa e o tamanho que o peptídeo adquire está discutida no apêndice B. Mais detalhes a respeito da caixa termalizada nessa proporção podem ser encontrados em Broggio Costa (2006). Adicionamos quatro átomos de cloro nas posições eletrostaticamente mais favoráveis a fim de neutralizar o sistema, pois o N-terminal foi tratado como grupo carregado, além de três lisinas ao longo do peptídeo. Para a minimização de energia, primeiramente realizamos 8000 passos de gradiente conjugado, onde a cada 1000 um passo de *Steepest Descent* era feito. A dinâmica de restrição de posição teve duração de 1ns, com o passo de integração de 2fs, para relaxar o solvente e os íons aplicando ao peptídeo uma constante de força de ordem 1000. Finalmente, esse sistema foi submetido em cada processador dos 14 nós do cluster.

O modelo de água utilizado foi o SPC (*Simple Point Charge*) (Berendsen et al., 1981), para restringir sua geometria empregamos o algoritmo SETTLE (Miyamoto & Kollman, 1992). O sistema incluía 1898 moléculas de água e 201 moléculas de TFE. Para vincular todos os comprimentos de ligação usamos o algoritmo LINCS (Hess et al., 1997). As correções eletrostáticas foram feitas pelo algoritmo PME (*Particle Mesh Ewald*) com um raio de corte de 1.4nm. O mesmo valor de raio de corte também foi usado nas interações de van der Waals.

A temperatura e a pressão foram controladas pelo método de Berendsen (Berendsen et al., 1984), com $\tau_T = 0.1$ ps e $\tau_P = 1,0$ ps, sendo acoplado ao sistema em questão, e a compressibilidade isotérmica de $6,5 \cdot 10^{-5}$ bar⁻¹, a pressão de referência foi de 1 atm, e por último, a temperatura de referência para cada processador estava entre 280K e 343K.

A dinâmica de equilíbrio da estrutura enovelada incluía os mesmos parâmetros descritos aqui, exceto a condição de réplica, e a sua temperatura de referência foi de 300K, com a duração de 10ns, e a estrutura inicial foi uma das estruturas de hélice obtida.

3.5 Método de Troca de Réplicas

Simulações de sistemas macromoleculares biológicos por Dinâmica Molecular (DM) ou por Monte Carlo (MC) tornam-se limitadas pelo número insuficiente de amostras no espaço configuracional. Um exemplo dessa limitação é a capacidade de alguns sistemas ficarem presos em mínimos de energia, a temperatura ambiente. Uma maneira de minimizar essa limitação é o uso de técnicas como a troca de réplicas em dinâmica molecular (REMD – *Replica Exchange Molecular Dynamics*).

Dinâmica molecular com trocas de réplicas é um método usado para aumentar a frequência de acesso às conformações da cadeia, especialmente se as conformações são separadas por barreiras de energia.

No caso deste trabalho, 14 réplicas do sistema - EMP-AF, solvente, co-solvente e íons – foram distribuídos em 14 processadores. Cada sistema é simulado numa temperatura diferente (280K, 284K, 288K, 292K, 296K, 300K, 305K, 310K, 315K, 320K, 325K, 331K, 337K, 343K). As réplicas são ordenadas automaticamente nos processadores de acordo com as temperaturas, T . A cada intervalo fixo, 1000 passos neste trabalho, sistemas vizinhos, i e $i+1$ por exemplo, com temperaturas T_i e T_{i+1} respectivamente, podem mudar de configuração de tal maneira que o sistema i muda para a temperatura T_{i+1} , e o sistema $i+1$ para a temperatura T_i .

A probabilidade para que essa mudança ocorra é:

$$P(1 \leftrightarrow 2) = \min \left(1, \exp \left[\left(\frac{1}{\kappa_B T_1} - \frac{1}{\kappa_B T_2} \right) (U_1 - U_2) \right] \right) \quad [3.14]$$

onde T_1 e T_2 são temperaturas vizinhas e U_1 e U_2 são as energias potenciais instantâneas das réplicas 1 e 2 respectivamente, antes da troca.

Depois das mudanças, as velocidades são calculadas de acordo com $(T_1/T_2)^{\pm 0.5}$ e a procura pela troca com o vizinho será executada somente na próxima verificação. Tentamos apenas trocas com temperaturas vizinhas na medida em que a probabilidade decresce muito rapidamente com a diferença de temperatura (Sugita & Okamoto, 1999). A tentativa de troca com todos pares possíveis em um passo não é permitida. Se, por um instante, as réplicas 1 e 2 trocarem, a chance de troca para as réplicas 2 e 3 não depende apenas das energias delas, mas também da energia da réplica 1. No GROMACS isto é resolvido tentando permutar todos os pares ‘ímpares’ em tentativas ‘ímpares’ e para todos os pares ‘pares’ em tentativas ‘pares’. Se tivermos 4 réplicas: 0, 1, 2 e 3, ordenados por temperatura e tentarmos trocas a cada 1000 passos, os pares 0-1 e 2-3 serão examinados a cada 1000, 3000 etc. e o par 1-2 a cada 2000, 4000 etc.

A escolha da diferença de temperatura entre réplicas consecutivas também é importante para o sistema ter energia suficiente para vencer barreiras. A diferença pode ser escrita como:

$$U_1 - U_2 = N_{df} \frac{c}{2} k_B (T_1 - T_2) \quad [3.15]$$

onde N_{df} é o número total de graus de liberdade de uma réplica e $c = 1$ para potencial harmônico, e $c \approx 2$ para sistemas proteína/água (Van der Spoel et al., 2005).

A temperatura efetiva T_{eff} pode ser descrita como:

$$\frac{1}{k_B T_1} - \frac{1}{k_B T_2} = \frac{1}{k_B T_{eff}} \quad [3.16]$$

E,

$$T_{eff} = \frac{T_1 T_2}{|T_1 - T_2|} \quad [3.17]$$

Onde T_{eff} é da ordem de 15.000K para $T_1 = 300K$, e $T_1 - T_2 \sim 6K$, e então podemos ter trocas de réplicas de até $\sim 50k_B T_1$ de diferença de energia (Garcia & Sanbonmatsu, 2001).

3.6 Análise de Componentes Principais

Movimentos internos de proteínas podem permitir a ligação de um substrato ou de uma coenzima, ou uma adaptação a diferentes ambientes como um agregado específico, entre outras. Tais movimentos internos podem ser sutis e envolvem correlações complexas entre movimentos atômicos, mas sua natureza é inerente à estrutura e às interações dentro da molécula. Associar esses movimentos de estrutura e interação molecular a funções biológicas, reduzindo a complexa dinâmica em graus essenciais de liberdade tem se tornado cada vez mais comum.

As análises de componentes principais (PCA – *Principal Component Analysis*) têm mostrado resultados valiosos na aplicação de álgebra linear e usado abundantemente em diversas áreas da neurociência à computação gráfica, principalmente porque é simples e seu método extrai informações relevantes de conjuntos de dados sem relação aparente. Nesta dissertação, correlacionamos flutuações de posições entre átomos derivados das simulações de dinâmica molecular.

Representamos movimentos internos descritos na trajetória $\mathbf{x}(t)$, onde \mathbf{x} é um vetor 3N-dimensional de todas as coordenadas atômicas. A correlação entre os movimentos atômicos pode ser expressa pela matriz de covariância C de desvios de posição:

$$\mathbf{x} = \begin{bmatrix} \mathbf{x}_i \\ \dots \\ \mathbf{x}_N \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{x}_i & \dots & \mathbf{x}_N \end{bmatrix}, \quad [3.18]$$

$$C = \text{cov}(\mathbf{x}) = \left\langle M_i^{1/2} (\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle) M_i^{1/2} (\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle)^T \right\rangle$$

onde $\langle \rangle$ denota média no tempo, e M é a matriz diagonal que contém as massas dos átomos, podendo também ser uma matriz unitária nas análises. Em geral, a diagonalização da matriz de covariância dos deslocamentos atômicos mostra que a maior parte das flutuações das posições

está concentrada em movimentos correlacionados num subespaço com apenas alguns graus de liberdade, enquanto que os demais graus de liberdade representam flutuações de menor importância. A matriz simétrica C pode ser sempre diagonalizada por uma transformação de coordenada ortogonal R :

$$\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle = R\mathbf{q} \quad \text{ou} \quad \mathbf{q} = R^T (\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle), \quad [3.19]$$

A qual transforma C na matriz diagonal $\Lambda = \langle \mathbf{q}\mathbf{q}^T \rangle$ de autovalores λ_i :

$$C = R\Lambda R^T \quad \text{ou} \quad \Lambda = R^T C R$$

A i -ésima coluna de R é o autovetor pertencente a λ_i .

Assim, a flutuação total da posição $\sum_i \langle (x_i - \langle x_i \rangle)^2 \rangle$ pode ser construída de contribuições de autovetores e correspondente autovalores:

$$\begin{aligned} \sum_i \langle (x_i - \langle x_i \rangle)^2 \rangle &= \langle (\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle)^T (\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle) \rangle = \\ \langle \mathbf{q}^T R^T R \mathbf{q} \rangle &= \langle \mathbf{q}^T \mathbf{q} \rangle = \sum_i \langle q_i^2 \rangle = \sum_i \lambda_i \end{aligned} \quad [3.20]$$

Escolhemos ordenar λ_i em ordem decrescente de valor. Então o primeiro autovetor representa o maior desvio da posição média, o segundo representa flutuações das posições imediatamente menores e assim por diante. A grande maioria das flutuações das posições atômicas consiste num conjunto limitado de n autovalores, muito menor quando comparados ao total de $3N$ graus de liberdade.

A projeção da trajetória na direção dos autovetores, que constituem as colunas de R , também chamadas de modos essenciais, nos dá a componente principal $p_i(t)$:

$$\mathbf{p}(t) = R^T M^{\frac{1}{2}} (\mathbf{x}(t) - \langle \mathbf{x} \rangle) \quad [3.21]$$

3.7 Wham - (Weighted Histogram Analysis Method)

O método de análise de histogramas é uma técnica que permite analisar uma simulação numa temperatura específica e extrapolar os resultados a outras temperaturas próximas. Este é baseado na idéia de Valleu e Card (1972), porém a versão que descreveremos é de Ferrenberg e Swendsen (1988).

O programa que implementa o método de análise dos histogramas ponderados (Kumar, et al. 1995) em uma e duas dimensões, cujo código é livre e aberto (<http://dasher.wustl.edu/alan/>) é o WHAM. Essa metodologia combina dados de todas as réplicas em todas as temperaturas utilizadas. Em sua essência o protocolo deste programa é apenas a generalização das equações de energia livre.

A probabilidade de gerarmos um estado com energia E é:

$$p(E) = \rho(E) \frac{e^{-\beta E}}{Z} \quad [3.22]$$

onde β é $1/k_B T$, $\rho(E)$ a densidade de estados, e Z é a função de partição, desconhecida. Se executarmos uma simulação a uma temperatura T e n medidas independentes da energia total E do sistema, podemos estimar essa probabilidade:

$$p(E) = \frac{N(E)}{n} \quad [3.23]$$

Onde o histograma $N(E)$ é o número de conformações do sistema com energia E em n . A partir das equações 3.22 e 3.23 temos uma nova forma para a densidade de estados sobre cada temperatura $T_i(\beta_i)$:

$$\rho_i(E) = \frac{N_i(E)}{n_i} \frac{Z_i}{e^{-\beta_i E}} \quad [3.24]$$

A densidade de estados $\rho(E)$ é calculada de forma mais precisa quando se tem à disposição histogramas $N(E)$ obtidos em várias temperaturas, desde que esses histogramas se sobreponham parcialmente como mostra o gráfico abaixo:

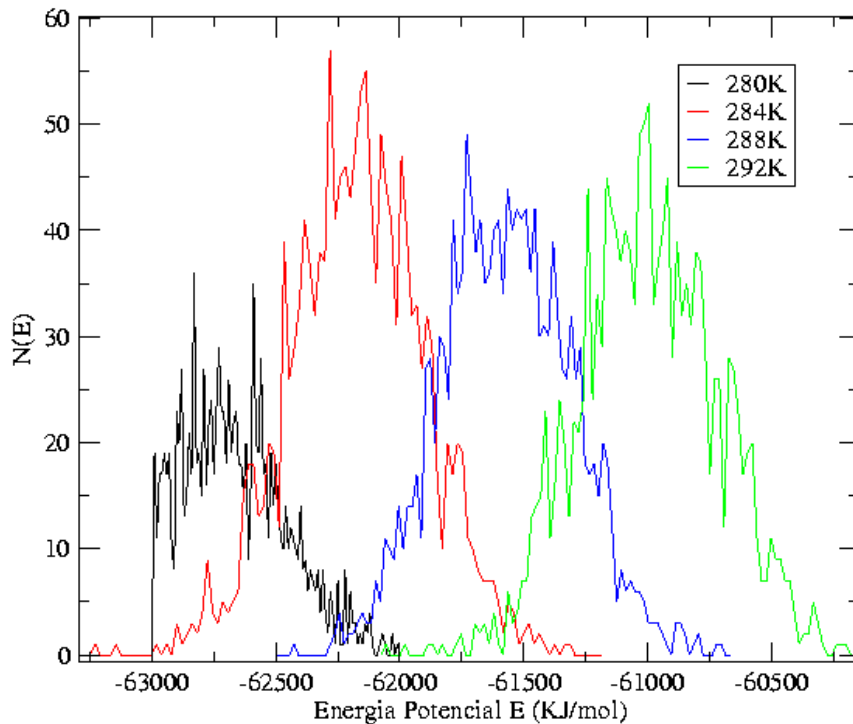


Figura 3.4

Histogramas do número de configurações acessadas $N(E)$ da energia, medidas em duas dimensões para as temperaturas 280K em preto, 284K em vermelho, 288K em azul, 292K em verde. Observe que para temperaturas próximas há sobreposição de informações, entre as temperaturas 280K e 284K, e entre 288K e 292K. Já para as temperaturas 280K e 292K não há sobreposição, o que impossibilita o uso do método entre elas.

O cálculo da densidade de estados que contenha a informação sobre todo o domínio de valores de energia E , envolve realizações de médias sobre os histogramas $N_i(E)$ realizadas em cada temperatura. O modo padrão de realizar a média ponderada supõe um número de medidas x_i , de quantidade x , onde cada uma dessas tem um erro associado σ_i , então a melhor estimativa é:

$$\bar{x} = \frac{\sum_i x_i / \sigma_i^2}{\sum_j 1 / \sigma_j^2} \quad [3.25]$$

Ou seja, o desvio padrão para um conjunto de medidas é grande, então o valor médio daquele conjunto entra na média com peso baixo (inversamente proporcional ao desvio padrão). Assumindo que nossas medidas de energia do sistema são independentes, o erro $\Delta N_i(E)$ relativo ao histograma é uma função do histograma médio $\overline{N_i(E)}$ à temperatura β_i ,

$$\Delta N_i(E) = \sqrt{\overline{N_i(E)}} \quad [3.26]$$

Para esclarecer mais, imaginemos um grande número de simulações, todas com temperaturas inversas β_i , em que se realizam n_i medidas de E em cada, formando um histograma a cada execução, e calculando a média desses histogramas de bin em bin . A raiz quadrada dessa média de $bins$ é a estimativa correta de erro $\Delta N_i(E)$ em algum histograma. $\overline{N_i(E)}$ está relacionado com $\rho(E)$ então:

$$\rho(E) = \frac{\overline{N_i(E)}}{n_i} \frac{Z_i}{e^{-\beta_i E}} \quad [3.27]$$

onde $\rho(E)$ é a densidade de estados.

Pela equação 3.25 onde o peso da média ponderada é $1/\sigma_i^2$, o melhor cálculo do verdadeiro $\rho(E)$ é conseguido pela média ponderada:

$$\rho(E) = \frac{\sum_i \overline{N_i(E)} \left[\frac{N_i(E)}{n_i} \right] \left[\frac{Z_i}{e^{-\beta_i E}} \right]}{\sum_j \overline{N_j(E)}} = \frac{\sum_i N_i(E)}{\sum_j n_j \frac{e^{-\beta_j E}}{Z_j}} \quad [3.28]$$

A expressão acima ainda é pouco usada porque contém a função de partição Z_j para cada β_j que é uma quantidade desconhecida. Tal função é dada por:

$$Z_k = \sum_E \rho(E) e^{-\beta_k E} = \sum_E \frac{\sum_i N_i(E)}{\sum_j n_j Z_j^{-1} e^{(\beta_k - \beta_j) E}} \quad [3.29]$$

Implementar o método de múltiplos histogramas envolve solucionar a equação 3.29 iterativamente por funções de partição Z_k a cada temperatura inversa β_k usada nas simulações. Estimamos alguns valores iniciais de Z_k colocando-os na equação acima, várias vezes, elegendo o melhor valor quando a função convergir dentro de um fator de tolerância (Newman & Barkema, 1999).

4. Resultados e Discussão

Simulação de Dinâmica Molecular com troca de réplicas do EMP-AF em Misturas de TFE-água

O processo no qual a proteína atinge sua conformação funcional - comumente conhecido como enovelamento, dobramento ou *folding* - é assunto de numerosos estudos teóricos e experimentais nas últimas décadas. O dobramento está relacionado a vários fatores como a seqüência, tamanho, solvente, temperatura, entre outros.

O enovelamento helicoidal do peptídeo EMP-AF é fundamental na interação com a bicamada lipídica, como já discutimos no capítulo 1. Dados recentes de experimentos de Dicroísmo Circular (CD) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) utilizam mistura de água e trifluoretanol (TFE), já que este induz estrutura secundária. O co-solvente, TFE, em solução aquosa se reúne propiciando um ambiente de regiões hidrofóbicas e hidrofílicas aos peptídeos, pois sua hidroxila pode ligar-se a outras moléculas TFE, ou com moléculas de água, ou com o próprio grupo polar do peptídeo. Os três átomos de flúor ligados ao carbono solvatam as regiões hidrofóbicas do peptídeo.

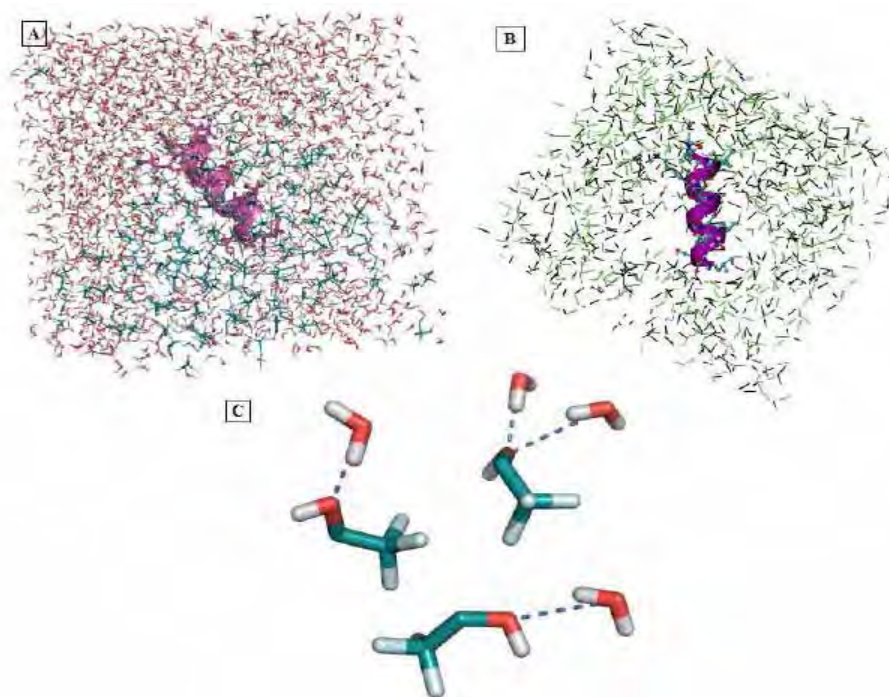


Figura 4.1

A) Moléculas de TFE (em verde) e água (em vermelho e branco) solvatando o peptídeo (em rosa). B) Ligações de hidrogênio da água (em verde) e do TFE (em preto). C) Ligação de hidrogênio de moléculas de TFE com moléculas de água. Em verde escuro os carbonos, em verde claro os flúors, em vermelho o oxigênio e em branco o hidrogênio. Figuras feitas no PYMOL (A e C) e VMD (B).

As simulações computacionais foram realizadas a partir de uma estrutura aleatória do EMP-AF-NH₂ (Figura 4.2), onde sua seqüência primária está descrita na tabela 4.1. As condições iniciais do sistema eram: uma caixa cúbica de 4.5nm de aresta com mistura de TFE-água 30:70 (v/v) solvatando um peptídeo aleatório com uma carga líquida de +4 – considerando as lisinas e o N-terminal carregado – neutralizando o sistema com o número correspondente de contraíons (Cloro). Esse sistema foi “multiplicado” 14 vezes, cada um em um processador distinto e com uma temperatura, variando de 280K a 343K. A cada 1000 passos (2ps) a condição de troca era verificada. A duração de cada simulação tem aproximadamente 45ns.

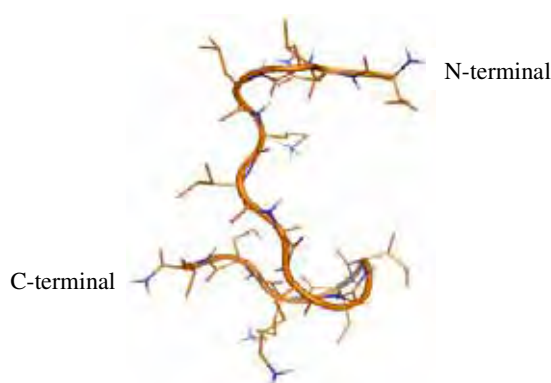


Figura 4.2
Estrutura aleatória usada inicialmente

Tabela 4.1

Seqüência primária da Eumenine mastoparano amidada. Resíduos representados em azul são os carregados positivamente, em preto os hidrofóbicos, e em verde os polares.

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

As representações dos gráficos de padrões de estruturas secundárias referentes a algumas temperaturas estão exemplificadas nas figuras 4.3 até a 4.7. Percebe-se que na maior parte do tempo as estruturas em vermelho, folha- β , estão mais presentes que outras, e a partir de 40.000ps as hélices do 3° ao 13° resíduo começam a surgir, embora sua duração seja curta - provavelmente por causa da probabilidade de troca entre as réplicas vizinhas. Tanto que a hélice também aparece no mesmo intervalo de tempo em outras temperaturas, como no caso do gráfico padrão de 300K (figura 4.5), e tornando cada vez menos freqüente em temperaturas maiores, como por exemplo, não se observa sua presença no gráfico padrão à 343K (figura 4.6). A conformação em hélice persiste no intervalo de tempo mais longo simulado no processador correspondente à temperatura 288K (figura 4.7), em torno dos 42200ps e 42400ps.

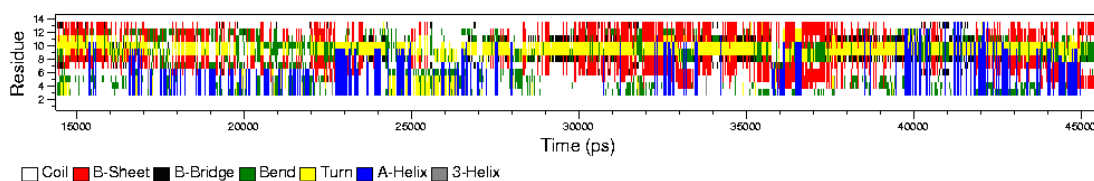


Figura 4.3

Gráfico padrão da estrutura secundária para a temperatura 280K. A partir de 40.000ps hélices começam a aparecer, resíduos em azul, em alguns instantes. Folhas- β , em vermelho, estão bastantes presentes. Resíduos em conformação aleatória estão em branco, em amarelo resíduos em voltas, em verde a conformação é de curva.

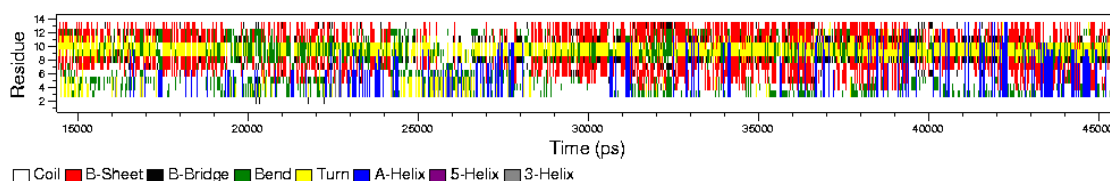


Figura 4.4

Gráfico padrão da estrutura secundária para a temperatura 288K. A partir de 40.000ps hélices começam a aparecer, resíduos em azul, em alguns instantes. Folhas- β , em vermelho, estão bastantes presentes. Resíduos em conformação aleatória estão em branco, em amarelo resíduos em voltas, em verde a conformação é de curva.

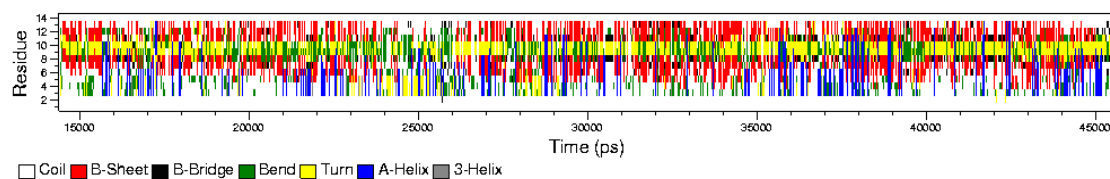


Figura 4.5

Gráfico padrão da estrutura secundária para a temperatura 300K. A partir de 40.000ps hélices começam a aparecer, resíduos em azul. Folhas- β , em vermelho, estão bastantes presentes. Resíduos em conformação aleatória estão em branco, em amarelo resíduos em voltas, em verde a conformação é de curva.

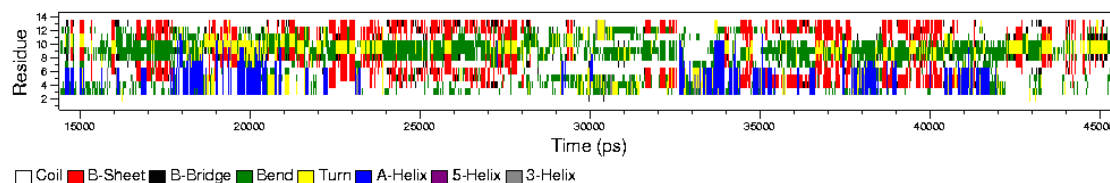


Figura 4.6

Gráfico padrão da estrutura secundária para a temperatura 343K. Percebemos que as hélices já não aparecem mais, e a conformação de folhas- β também é menor. Resíduos em conformação aleatória estão em branco, em amarelo resíduos em voltas, em verde a conformação é de curva.

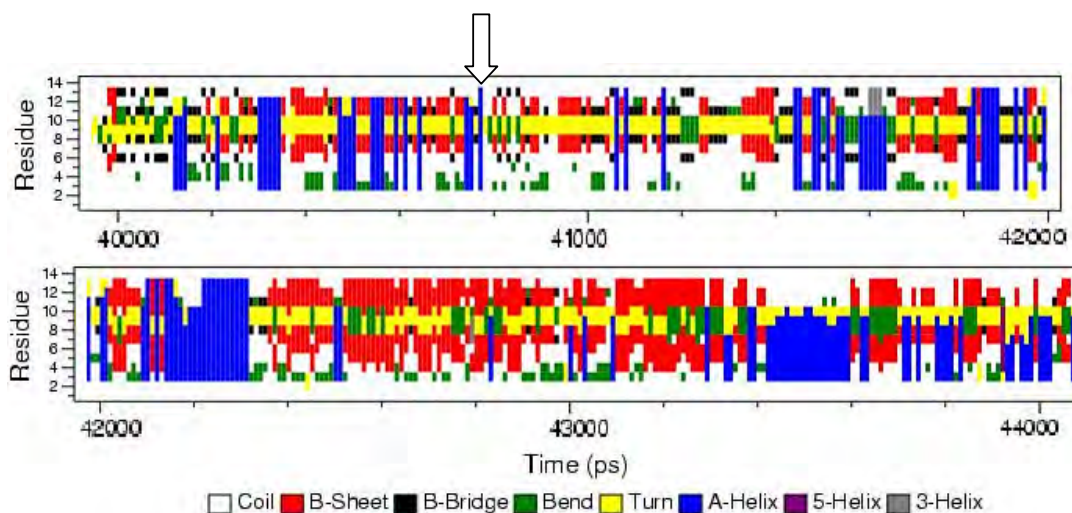


Figura 4.7

Gráfico padrão de estrutura secundária para a temperatura de 288K, durante o intervalo de 41.000ps a 44.000ps, aproximadamente. Observe que nesse intervalo em vários momentos conseguimos uma estrutura de hélice, do 3º ao 13º resíduo em azul. Outra conformação bastante presente é a da folha- β , em vermelho sendo o amarelo a curva. A seta indica o instante em que uma hélice foi conseguida, 40770ps. Esta será utilizada nas análises deste trabalho.

Escolhemos uma das estruturas em hélice atingidas na simulação, especificamente relativa à temperatura 288K no tempo de 40.770 ps, para fazermos as análises necessárias. A figura 4.8 mostra a hélice- α obtida, indicando o N-terminal, o C-terminal, alguns resíduos carregados como as lisinas (5, 8 e 12) em uma face, e resíduos apolares como leucinas (3, 4), e isoleucinas (6 e 10) na face oposta, caracterizando a anfipaticidade da hélice.

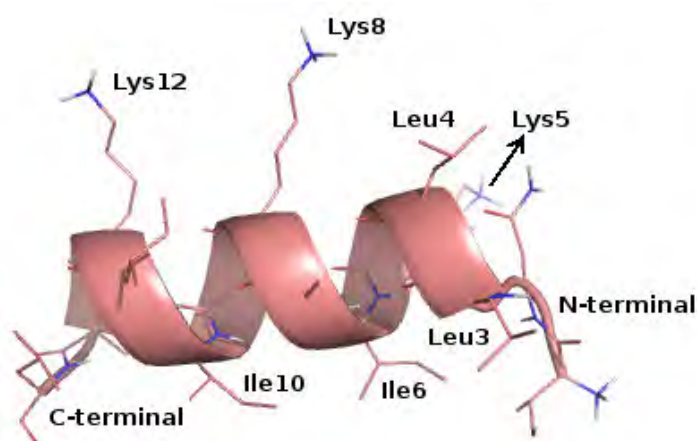


Figura 4.8

Estrutura obtida a partir da troca de réplicas, uma hélice- α anfipática com alguns resíduos identificados e os terminais.

O Desvio quadrático médio (RMSD – *Root Mean Square Deviation*) da hélice obtida fitada com cada estrutura de ressonância como referência foi calculado usando o programa ProFit (Martin, 2001), apenas com os carbonos alfa (C_{α}) do 3º ao 14º resíduo, como mostra a tabela 4.2. O valor médio do RMSD da estrutura escolhida com as estruturas de RMN foi de 0,07684nm.

Tabela 4.2
RMSD das 20 estruturas de RMN com a conformação obtida feito no programa ProFit.

Estrutura de RMN com a hélice- α	RMSD (nm)
1º	0,0757
2º	0,0758
3º	0,0701
4º	0,0826
5º	0,0815
6º	0,0809
7º	0,0765
8º	0,0801
9º	0,0833
10º	0,0707
11º	0,0729
12º	0,0728
13º	0,0705
14º	0,0845
15º	0,0770
16º	0,0707
17º	0,0815
18º	0,0729
19º	0,0795
20º	0,0773

As diferenças das 20 estruturas de ressonância do EMP-AF estão principalmente no N-terminal, e nas Lisinas (5, 8 e 12), como mostra a figura 4.10 sob duas perspectivas diferentes. Os “backbones” dessas estruturas estão perfeitamente superpostos, com um RMSD de 0.026nm \pm 0,013nm para todos os resíduos, e de 0,010nm \pm 0,002nm para os resíduos 3-14 (Sforça et al, 2004). Uma comparação da 17ª estrutura de RMN (tabela 4.2) com a conformação escolhida (figura 4.8) está exemplificada na figura 4.10. Percebemos que as lisinas estão na mesma face da hélice tanto para a estrutura experimental quanto para a estrutura obtida por simulação. Nas duas estruturas superpostas o mais possível, temos uma diferença nos N-terminais da ordem de 0,7nm, obtido no VMD (Humphrey, Dalke, e Schulten, 1996).

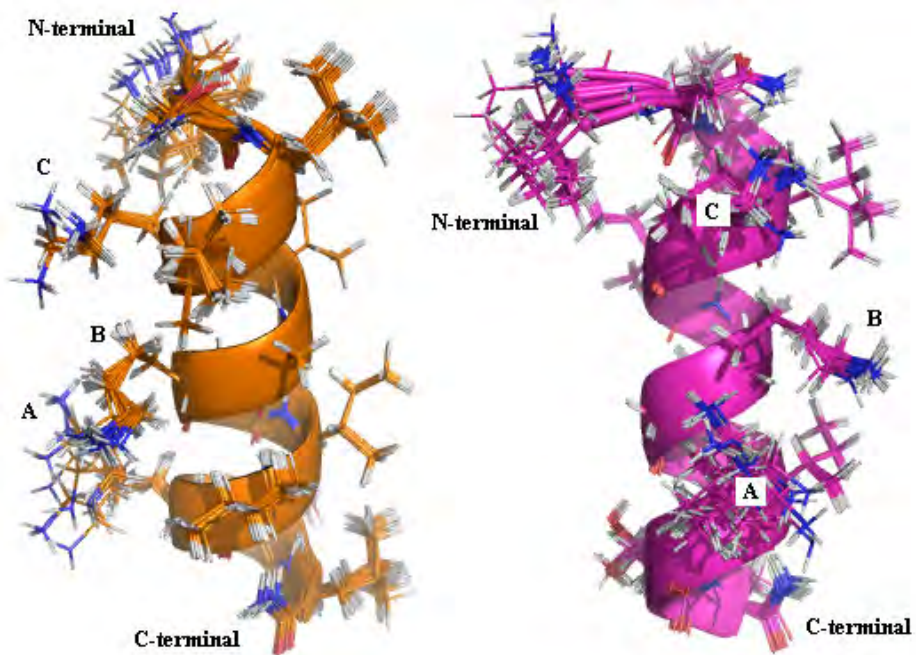


Figura 4.9

Conjunto das vinte conformações de RMN fitadas uma a uma em perspectivas diferentes. O N-terminal, e as lisinas 5 (C), 8 (B) e 12 (A) são as maiores diferenças entre todas. As figuras foram feitas no pymol, onde o “backbone” das estruturas está representado em *cartoon* e as cadeias laterais em *lines*.

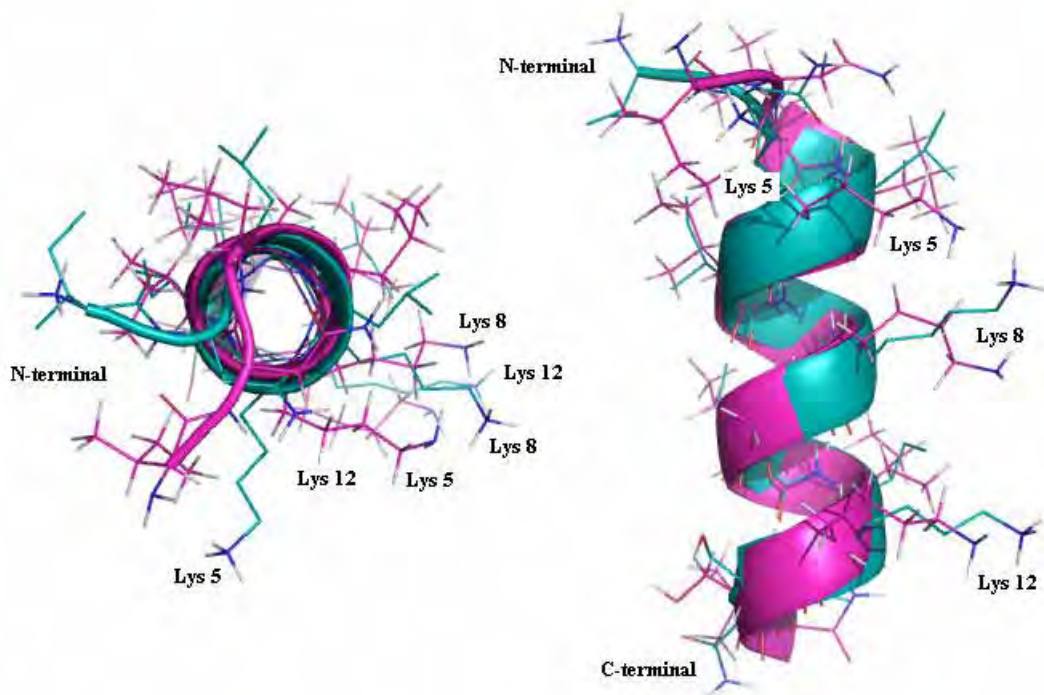


Figura 4.10

Estrutura de ressonância (17^o na tabela 4.2) em rosa fitada com a hélice da simulação em verde. As lisinas e os terminais estão identificados. A figura da esquerda mostra as conformações projetadas no plano normal ao eixo da hélice, e a da direita perpendicular ao eixo da hélice. As figuras foram feitas no pymol, onde o “backbone” das estruturas está representado em *cartoon* e as cadeias laterais em *lines*.

Simulações de dinâmicas de troca de réplicas geram conformações bem distintas umas das outras, como pode se observar nos gráficos de estrutura padrão (Fig. 4.3 - 4.7), pelo fato que trocamos constantemente as conformações. Isso pode ser controlado mudando a frequência do cálculo da probabilidade da mudança. O desvio médio quadrático com uma hélice ideal de referência fitada com todas as outras conformações obtidas ao longo do tempo da dinâmica da temperatura 288K está apresentado na figura 4.11(a). No instante em que a hélice foi gerada, o RMSD foi de 0.047nm, mostrando que a hélice obtida está muito próxima da ideal. Em torno dos 40.000ps o desvio cai bastante em comparação dos valores em torno de 20.000ps. A variação do RMSD vai de 0nm até 0.6nm aproximadamente, valor que provavelmente é uma conformação aleatória.

O desvio médio dos átomos da cadeia principal juntamente com os hidrogênios com relação à estrutura média, ou RMSF (*Root Mean Square Flutuation*), da trajetória da réplica de 288K está apresentado na figura 4.12(b). As maiores flutuações ficam por conta do 1º resíduo, uma Ile, e do 14º, uma Leu, pelo fato das extremidades serem bem flexíveis. Entre os resíduos 3º e 11º a oscilação é de 0,25nm e 0,35nm, sendo o 8º resíduo (lisina) o de menor flutuação.

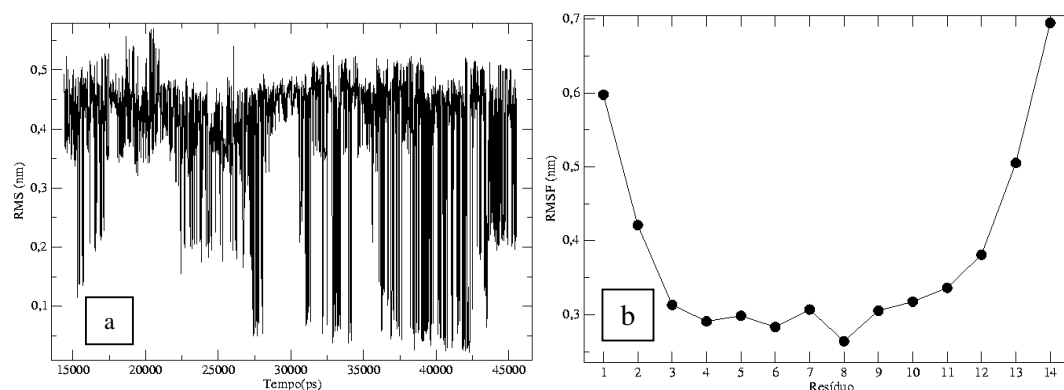


Figura 4.11

a) RMSD das estruturas obtidas na dinâmica de 288K com a hélice ideal, fitados no C α apenas. (b) Desvio médio das flutuações da cadeia principal, levando em conta os átomos N, C α , C, O e H (das amidas e do N-terminal) dos resíduos ao longo da dinâmica de 288K.

Um dos maiores problemas na interpretação de resultados de dinâmica molecular é o grande número de coordenadas do sistema e seus diversos movimentos. A correlação entre coordenadas pode ser uma saída para reduzir os graus de liberdade já que nem todas as correspondências são permitidas, como foi discutido no capítulo anterior. Análises de componentes principais ajudam a descobrir quais movimentos da proteína são mais significativos que outros, através da correlação entre flutuações na posição atômica, conhecida como matriz de covariância, derivada da simulação de dinâmica molecular.

Diagonalizamos a matriz dos deslocamentos atômicos no espaço $3N \times 3N$, onde N é o número de átomos, levando-se em conta as massas de cada átomo, e encontramos os autovalores. A maioria das flutuações posicionais está concentrada em movimentos correlatos num subespaço de poucos graus de liberdade, enquanto que os outros não têm uma representação significativa, como podemos perceber no gráfico 4.12. O primeiro autovalor corresponde ao maior desvio da posição média, o segundo tem flutuação menor e assim por diante até que a partir do 5º autovalor os outros se aproximam de zero na trajetória referente à temperatura 284K, enquanto que na dinâmica de 288K a partir do 4º já percebemos essa aproximação.

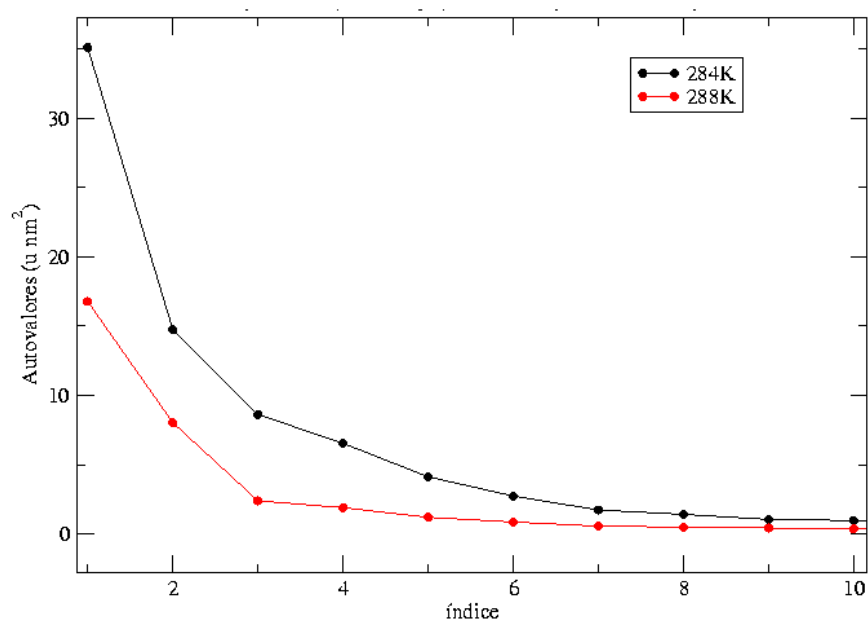


Figura 4.12

Autovalores em ordem decrescente de magnitude obtido da matriz de covariância das coordenadas dos átomos N, C_α e C (“backbone”) do peptídeo (42 átomos no total) considerando as massas de cada átomo versus o índice dos dez primeiros autovetores para as trajetórias de temperaturas 284K e 288K.

O desvio padrão das flutuações dos átomos do “backbone” para os três primeiros autovetores da trajetória de temperatura 288K está apresentado na figura 4.13. Observamos que o primeiro autovetor tem um desvio maior em relação aos outros na maioria dos átomos, o segundo autovetor tem um desvio menor que o primeiro, mas maior que o terceiro para alguns átomos, enquanto que o terceiro tem o menor desvio. Como era de se esperar, já que no gráfico dos autovalores também segue o mesmo raciocínio. No entanto, em torno do 14º átomo (C_α da Lys 5) os gráficos estão próximos do mesmo ponto.

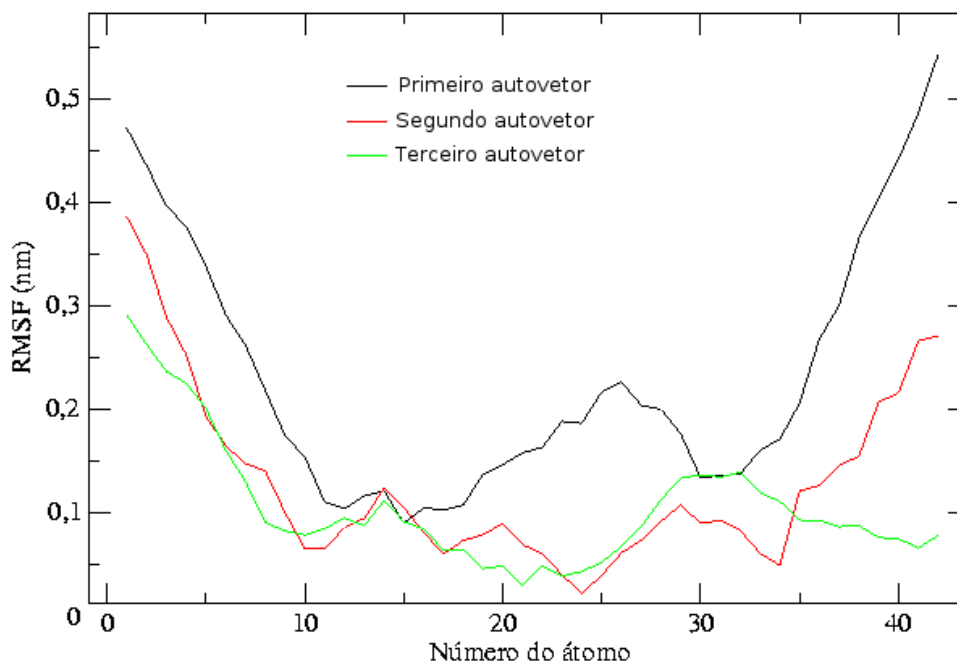


Figura 4.13

Desvio padrão das flutuações atômicas do N, C $_{\alpha}$ e C (“backbone”) pelo número de átomos (42 átomos no total) para o autovetor mais significativo (preto), o segundo (vermelho) e o terceiro (verde), para a trajetória referente à 288K.

As coordenadas das componentes principais (PC – *Principal Component*) são obtidas multiplicando a matriz de autovetor transposta, a matriz das massas atômicas, e a diferença do deslocamento atômico instantâneo da média (equação 3.6.4). A figura 4.14 mostra a projeção de duas trajetórias de temperaturas 284K, em preto, e 288K em vermelho, no espaço conformacional de componente principal. As regiões mais populosas desta figura estão entre -5.0 e -8.0 para o PC-1 e -5.0 e 0.0 para PC-2, do gráfico de 284K, e entre -4.0 e -5.0, para o PC-1, e -3.0 e 3.0 para o PC-2, do gráfico de 288K aproximadamente.

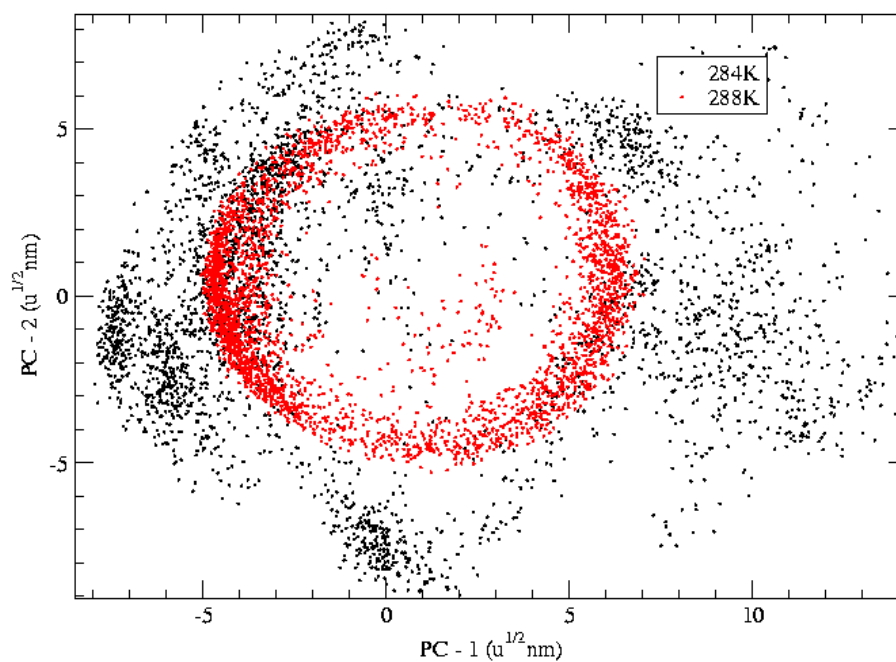


Figura 4.14

Duas primeiras componentes principais para as temperaturas 284K, em preto, e 288K em vermelho.

Posteriormente, descrevemos a superfície de energia livre como função das componentes principais do sistema reunindo histogramas da média de ocupação do espaço das componentes como função da temperatura, realizado pelo programa WHAM (Kumar et al., 1995), descrito na seção 3.7 do capítulo anterior. Algumas estruturas foram identificadas de acordo com suas componentes principais nas regiões de baixa energia, como mostra a figura 4.36, inclusive a hélice obtida.

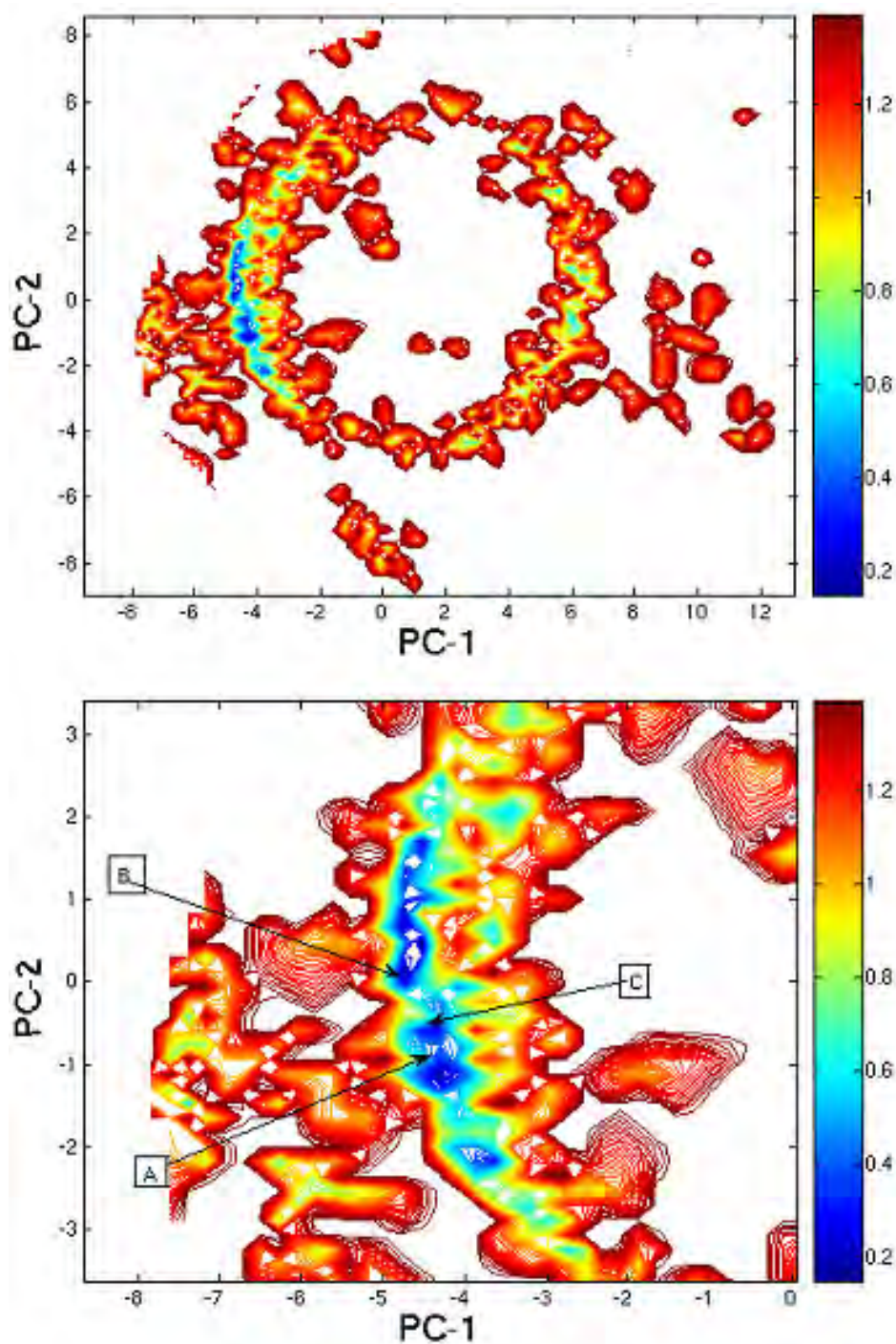


Figura 4.15

Mapa de superfície da energia livre em função de duas componentes principais do sistema a temperatura 284K. A barra de cores ao lado de cada figura é a escala da energia relativa em KJ/mol, e PC's estão em nm. A figura abaixo é uma ampliação do limite próximo ao mínimo de energia com algumas estruturas identificadas (Fig 4.17): A) a PC-1 e PC-2 $\sim(-4,34\text{nm}; -1,21\text{nm})$ que corresponde a 6 resíduos em conformação aleatória, 7 em hélice- α e 1 em volta e com 1773,57 KJ/mol; B) $\sim(-4,62\text{nm}; -0,0\text{nm})$, com 10 resíduos em hélice e 4 em conformação aleatória e com 1758,89 KJ/mol; C) $\sim(-4,73\text{nm}; 0,36\text{nm})$, com 6 resíduos em folha- β , 2 em volta, 2 em curva e 4 estruturalmente aleatórios.

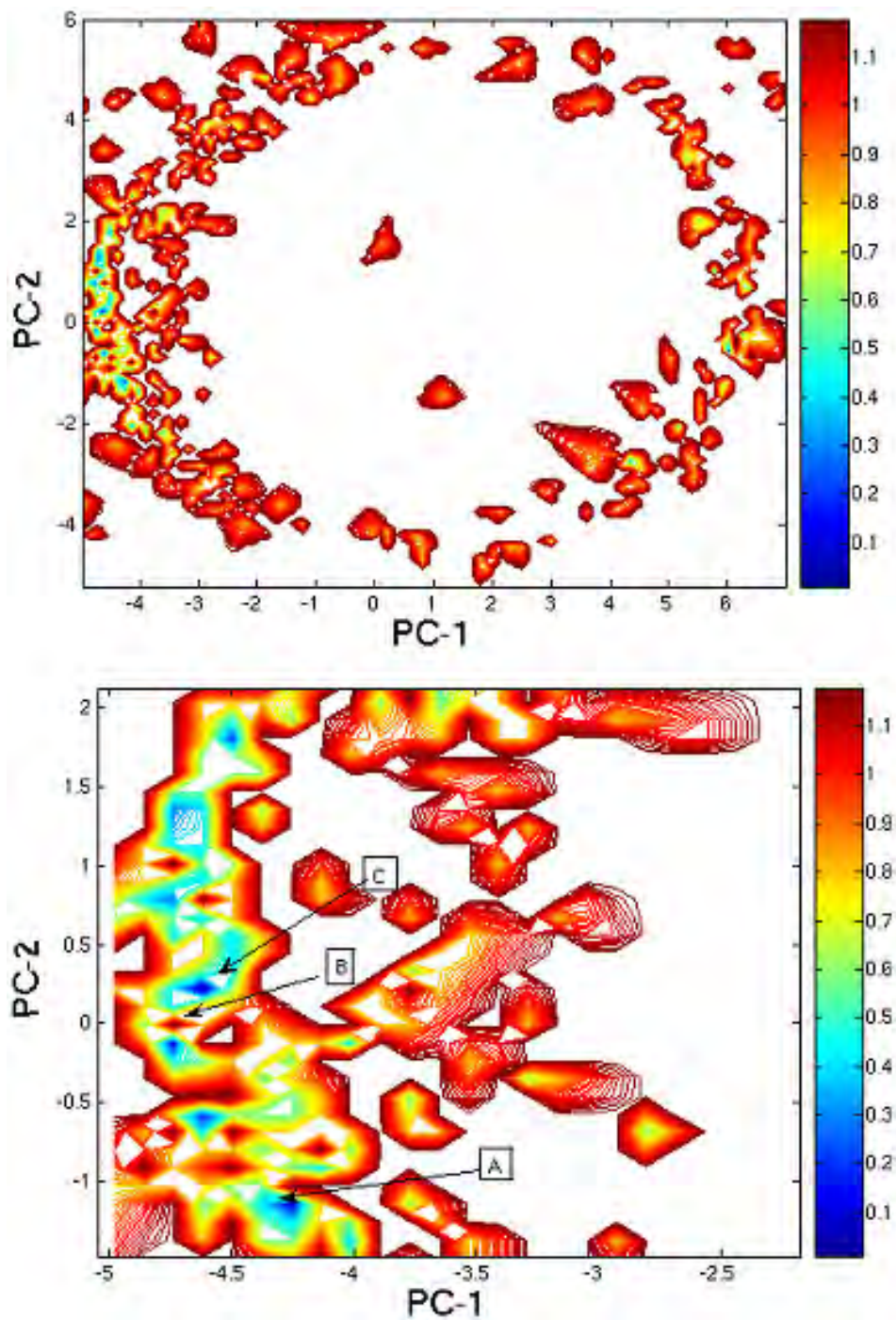


Figura 4.16

Mapa de superfície da energia livre em função de duas componentes principais do sistema a temperatura 288K. A barra de cores ao lado de cada figura é a escala da energia relativa em KJ/mol, e PC's estão em nm. A figura abaixo é uma ampliação do limite próximo ao mínimo de energia com algumas estruturas identificadas (Fig. 4.17): A) a PC-1 e PC-2 $\sim(-4,34\text{nm}; -1,21\text{nm})$ que corresponde a 6 resíduos em conformação aleatória, 7 em hélice- α e 1 em volta e com 1773,57 KJ/mol; B) $\sim(-4,62\text{nm}; -0,0\text{nm})$, com 10 resíduos em hélice e 4 em conformação aleatória e com 1758,89 KJ/mol; C) $\sim(-4,73\text{nm}; 0,36\text{nm})$, com 6 resíduos em folha- β , 2 em volta, 2 em curva e 4 estruturalmente aleatórios.

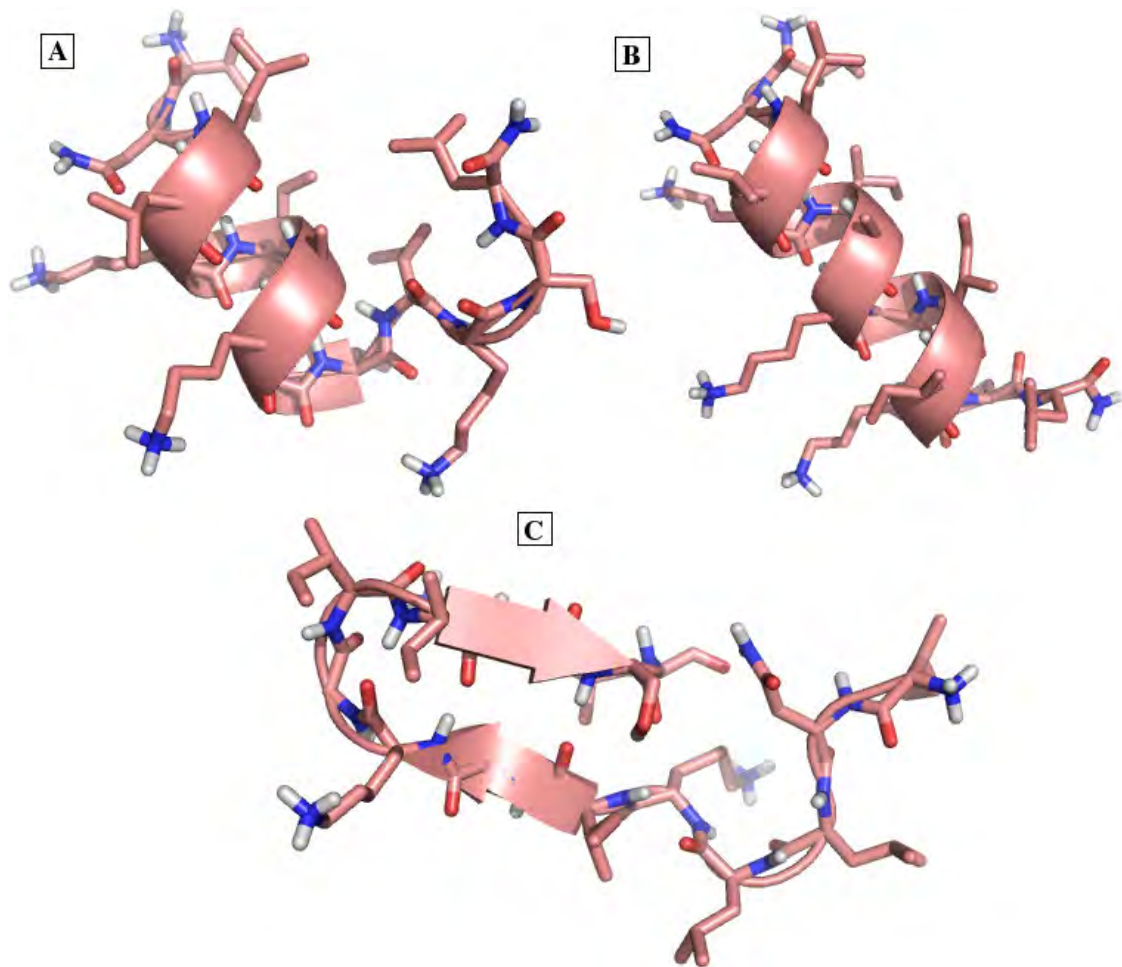


Figura 4.17

Estruturas identificadas nos mínimos de energia das Figuras 4.15 e 4.16. A) a PC-1 e PC-2 $\sim(-4,34\text{nm}; -1,21\text{nm})$ que corresponde a 6 resíduos em conformação aleatória, 7 em hélice- α e 1 em volta e com 1773,57 KJ/mol ; B) $\sim(-4,62\text{nm}; -0,0\text{nm})$, com 10 resíduos em hélice e 4 em conformação aleatória e com 1758,89 KJ/mol; C) $\sim(-4,73\text{nm}; 0,36\text{nm})$, com 6 resíduos em folha- β , 2 em volta, 2 em curva e 4 estruturalmente aleatórios.

Simulação de dinâmica molecular da estabilidade da hélice em mistura de TFE-água

Simulamos a conformação de hélice alcançada em uma das simulações de réplica (Fig. 4.8) durante 10ns, num ambiente semelhante ao anterior, descrito no capítulo 2 (pág. 20), a menos da temperatura que foi de 300K. A finalidade foi averiguarmos sua estabilidade, quais resíduos se manteriam e quais sairiam da conformação.

O resultado da dinâmica foi que o peptídeo manteve o mesmo ajuste durante toda a trajetória, como pode ser observado na figura 4.17 do gráfico padrão da estrutura secundária.

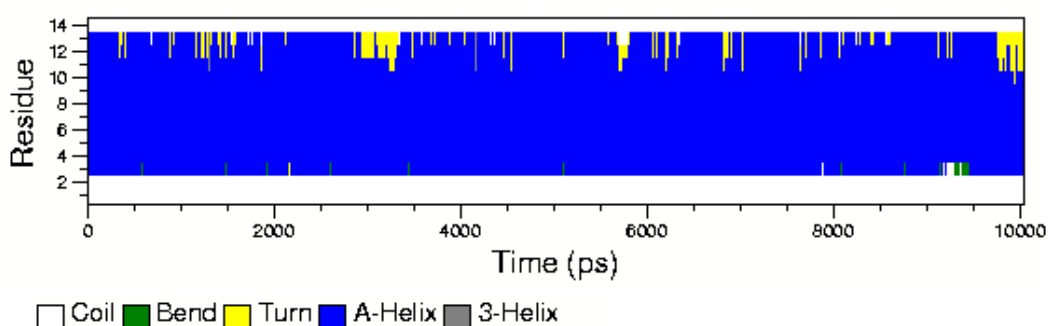


Figura 4.18

Gráfico padrão da estrutura secundária da cadeia principal do peptídeo (*mainchain+H*).

Apenas em alguns picossegundos os últimos aminoácidos, 12° e 13°, assumiram uma conformação em volta (em amarelo no gráfico), mas depois retornavam para a estrutura helicoidal.

Como discutimos na seção anterior, análises de componentes principais em relação a movimentos de proteína mais significativos que outros através da correlação entre flutuações na posição atômica, verificamos essas componentes também na trajetória de equilíbrio e na ‘trajetória’ das estruturas de ressonância, onde cada pdb é uma “imagem” da dinâmica.

Após a diagonalização da matriz de covariância considerando as massas atômicas, esboçamos o gráfico dos autovalores em ordem decrescente de magnitude, tanto para a trajetória de equilíbrio, em preto, quanto para a de ressonância, em vermelho, figura 4.18. Note que a partir do 6° valor de autovalor é que os outros começam a convergir na dinâmica equilibrada, enquanto que apenas o primeiro na coleção de estruturas experimentais é mais representativo que os outros.

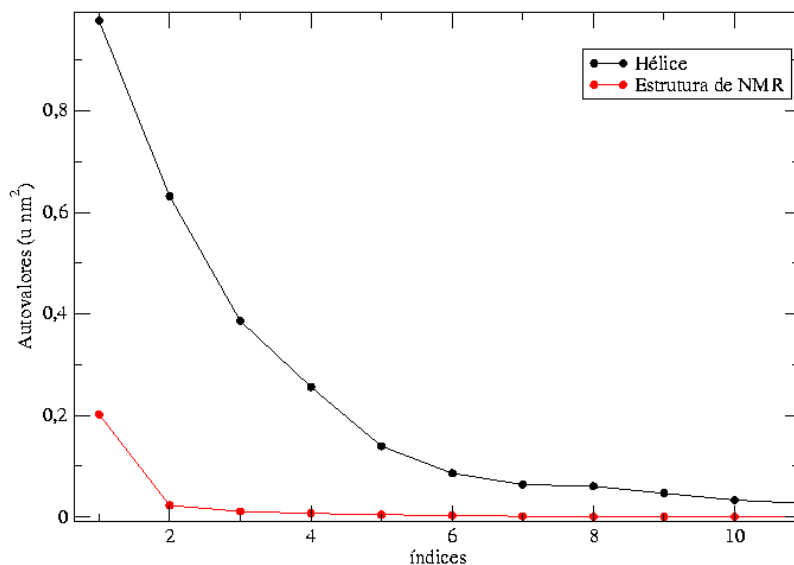


Figura 4.19

Autovalores em ordem decrescente de magnitude obtido da matriz de covariância das coordenadas dos átomos N, C_α e C (“backbone”) do peptídeo (42 átomos no total) versus o índice dos dez primeiros autovetores. A trajetória de equilíbrio em preto, e a ‘trajetória’ das estruturas de ressonância em vermelho.

As projeções das coordenadas das componentes principais no espaço conformacional das duas trajetórias estão mostradas na figura 4.19. Em preto a dinâmica da hélice- α , e em vermelho as estruturas de ressonância. Vale ressaltar que valores das componentes da simulação e de RMN estão bem próximas, significando que a nossa estrutura tem os movimentos principais similar aos das estruturas nativas. Isto pode ser observado mais claramente na figura 4.21, onde a trajetória foi filtrada na primeira componente principal. Apresentando o “backbone” do peptídeo como “fotografias” desse movimento, e logo abaixo mostrando o “backbone” das estruturas obtidas experimentalmente fitadas uma a uma.

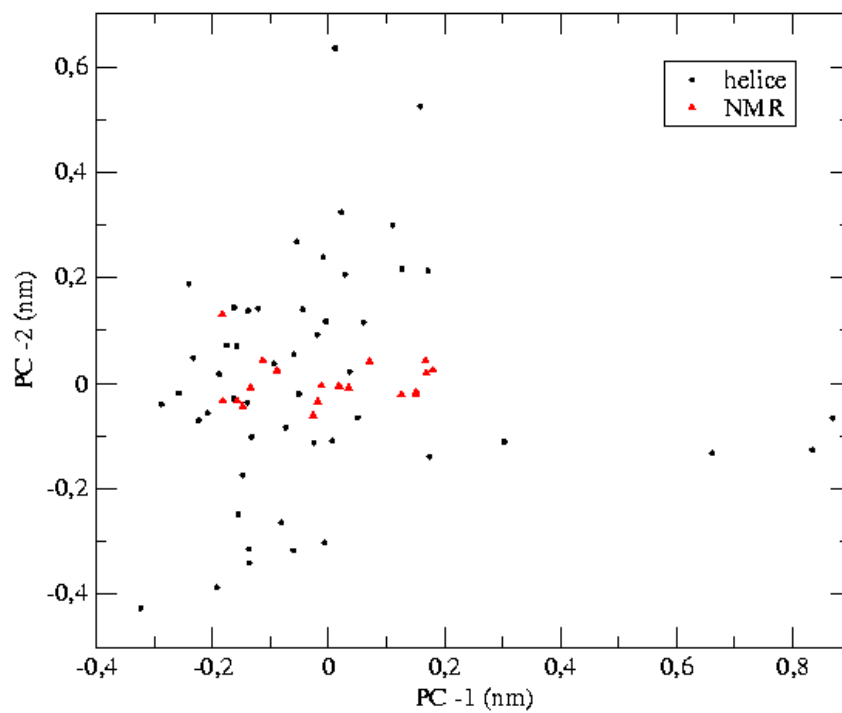


Figura 4.20

Segunda componente principal em função da primeira, para as trajetórias de equilíbrio e de ressonância. Em preto a trajetória de equilíbrio, e em vermelho a trajetória de ressonância.



Figura 4.21

Acima, o “*backbone*” da dinâmica da estabilidade da hélice filtrada apenas na primeira componente principal e desta transformada em imagens e depois fitadas. Em baixo, o “*backbone*” das estruturas de ressonância fitados.

Finalmente, o mapa de superfície de energia para a simulação de equilíbrio identificado com uma estrutura de ressonância e cinco hélices no mínimo de energia. Perceba que os mínimos estão ao longo da primeira componente principal, que é o movimento mais representativo, enquanto que a variação fica em torno do segundo PC.

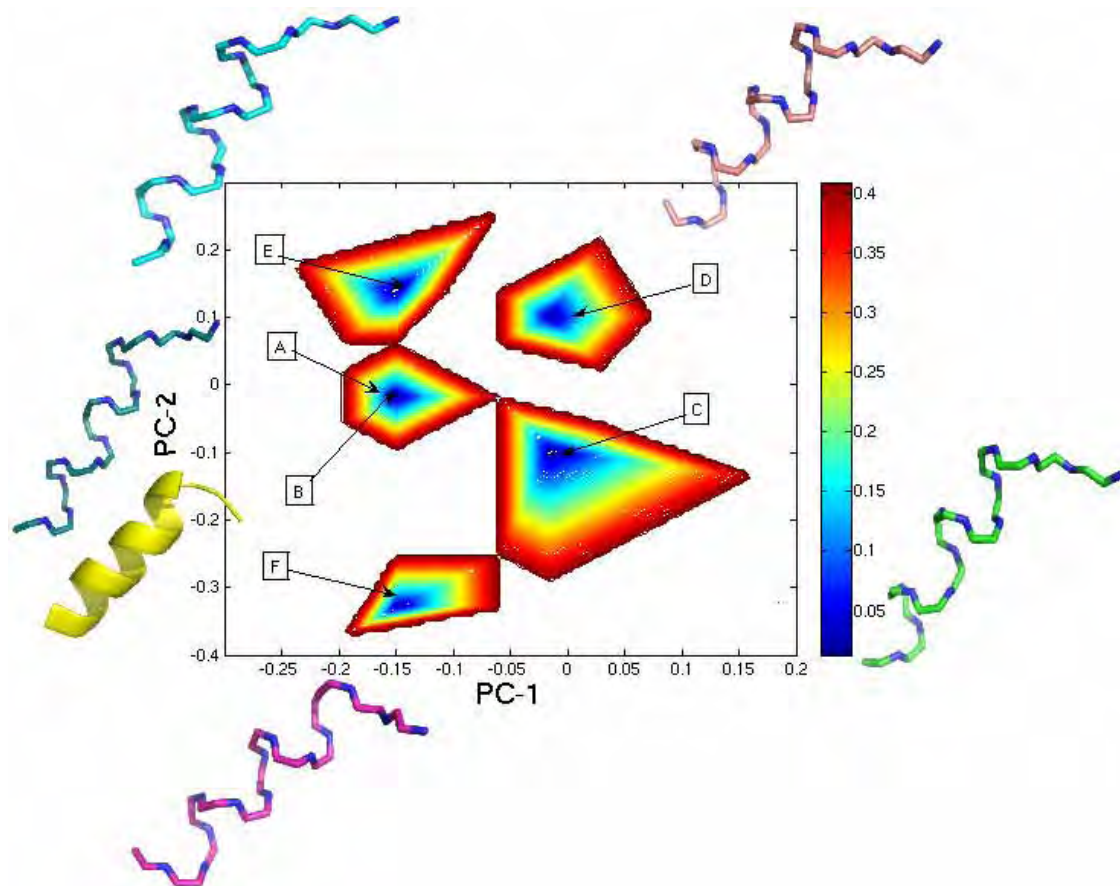


Figura 4.22

Mapa de superfície da energia livre em função de duas componentes principais do sistema para a trajetória de equilíbrio. A barra de cores ao lado de cada figura é a escala da energia relativa em KJ/mol, e PC's estão em nm. Cinco estruturas de "backbone" foram identificadas: A) a PC-1 e PC-2 $\sim(-0,18\text{nm}; 0,01\text{nm})$; B) a PC-1 e PC-2 $\sim(-0,13\text{nm}; -0,01\text{nm})$ de uma estrutura de ressonância (11^a da tabela 4.2); C) a PC-1 e PC-2 $\sim(-0,03\text{nm}; -0,11\text{nm})$; D) a PC-1 e PC-2 $\sim(-0,02\text{nm}; 0,09\text{nm})$; E) a PC-1 e PC-2 $\sim(-0,14\text{nm}; 0,14\text{nm})$; F) a PC-1 e PC-2 $\sim(-0,14\text{nm}; -0,31\text{nm})$.

5. Conclusão

O principal objetivo deste trabalho era a estruturação do EMP-AF na presença de TFE-água 30:70 (v/v), já que dados de RMN mostravam uma conformação helicoidal (Sforça et al, 2004) nessa proporção. A partir de uma estrutura aleatória, e com um método de dinâmica molecular que não é exatamente de equilíbrio, pois a cada intervalo de tempo fixo, 2ps no nosso caso, era possível trocar conformações em processadores vizinhos, com temperaturas próximas, num total de 14 réplicas do sistema, obteve-se a conformação esperada em vários instantes. A superposição da hélice obtida com estruturas de RMN mostra boa concordância, com desvios relativamente baixos. Outras estruturas, com relativa estabilidade, também foram obtidas, como mostradas nos gráficos de padrão de estrutura secundária (figuras 4.3 a 4.7). Projetando-se as trajetórias nas duas componentes principais (PC-1, PC-2) mais relevantes, obteve-se a superfície de energia livre, que mostra um espaço conformacional amplo, conforme mostra a figura 4.16, onde alguns mínimos são identificados, como a folha- β , a hélice- α , e parte de hélice formada. A simulação de equilíbrio da hélice mostra relativa estabilidade da estrutura helicoidal. As flutuações mais significativas dessa simulação são compatíveis com a diversidade de estruturas de RMN disponíveis experimentalmente. Quando a trajetória de equilíbrio da hélice é projetada na primeira componente principal, as estruturas mostram uma variação conformacional no N-terminal (figura 4.21 superior) muito semelhante às estruturas de ressonância (figura 4.21 inferior). Essa concordância visual pode ser vista mais precisamente no mapa de superfície de energia livre, figura 4.22, através da proximidade dos dois mínimos correspondentes à estrutura de RMN e da hélice obtida pela simulação. Os mínimos, na figura 4.22, estão mais espalhados ao longo de PC-2 (na vertical), indicando flutuações menores ao longo da componente principal mais relevante PC-1.

Portanto, três resultados se destacam esse trabalho: (1) o enovelamento do peptídeo foi obtido com boa concordância com dados de RMN, (2) a diversidade das estruturas de RMN se deve a flutuações globais da cadeia, como indicado pela análise de componentes principais da simulação que reproduziu de forma muito semelhante a variedade de estruturas experimentais, e por último (3) como as estruturas de RMN estão espalhadas ao longo de PC-1 sugerimos que isso se deve às diferentes formas do N-terminal. Nas simulações o “backbone” mostra flutuações que por sua vez estão representados ao longo de PC-2. É provável que os pontos em vermelho da figura 4.20 sejam uma média dos mínimos ao longo da vertical.

6. Referências Bibliográficas

ANDREU, D. et al. Solid – phase synthesis of cecropin A and related peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 80, p. 6475-6479, 1983.

ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers*, v. 47, p. 415-433, 1998.

ARGIOLAS, A.; PISANO, J. J. Facilitation of phospholipase A2 activity by mastoparans, a new class of mast cell degranulating peptides from wasp venom. *J. Biol. Chem.*, v.258, p. 13697-13702, 1983.

ALDER, B. J.; WAINWRIGHT, T. E. Phase Transitions for a Hard Sphere System. *J. Chem. Phys.* 27, 1208-1209, 1957.

BABA, T.; SCHNEEWIND, O. Instruments of microbial warfare: bacteriocin synthesis, toxicity and immunity *Trends Microbial*, v.6-2, p.66-71, 1998.

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

BERENDSEN, H. J. C. et al., Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.*, v. 81 (8), p. 3684-3690, 1984.

BESSALLE, R. et al., Augmentation of antibacterial activity of magainin by positive-charge chain extension. *Antimicrob Agents Chemother*. v. 36, p. 313-317, 1992.

BROGGIO COSTA, S. T. *Estudos conformacionais por Dinâmica Molecular de peptídeos antimicrobianos da família dos mastoparanos em mistura de TFE-água*. 133 f. Tese (Doutorado em Biofísica Molecular) – Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2006.

BROOKS, B. R. et al., A program for macromolecular energy, minimization, and calculations. *J. Comput. Chem.* v. 4, p. 187-217, 1983.

BROOKS III C. L. et al., *Proteins: a theoretical perspective of dynamics, structure and thermodynamics*. Advances in chemical physics. New York : John Wiley & Sons, v. LXXI, 1988.

CHUANG, C. C. et al. Conformation of *Vespa basalis* Mastoparan-B in trifluoroethanol-containing aqueous solution. *Biochim. Biophys. Acta*. v.1292, p.1-8, 1996.

DARDEN, T., YORK, D., PEDERSEN, L. Particle Mesh Ewald: An N-log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* v. 98, p. 10089-10092, 1993.

DATHE, M. et al. Hydrophobicity, hydrophobic moment and subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic of amphipathic helical peptides. *FEBS Lett.* v. 403, p. 208-212, 1997.

DATHE, M.; WIEPRECHT, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membrane and biological cells. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 1462, p. 71-87, 1999.

DATHE, M. et al. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett.* v. 50, p. 146-150, 2001.

DELATORRE, P. et al. Preliminary cyocrystallography analysis of an eumenine mastoparan toxin isolated from the venom of the wasp *Antherhynchium flavomarginatum micado*. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 1545, p. 372-376, 2001.

dos SANTOS CABRERA, M. P. et al. Conformation and lytic activity of eumenine mastoparan: a new antimicrobial peptide from wasp venom. *J. Peptide Res.*, v. 64, p. 95-103, 2004.

dos SANTOS CABRERA, M. P. *Estudo da conformação e atividade lítica de peptídeos antimicrobianos de vespas.* 89 f. Tese (Doutorado em Biofísica Molecular) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2006.

ESSMAN, U. et al. A smooth particle mesh ewald potential. *J. Chem. Phys.* V. 103, p. 8477-8592, 1995.

EPAND, R. M.; VOGEL, H. J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1462, p. 11-28, 1999.

FALLA, T.J.; KARUNARATNE, D.N.; HANCOCK, R.E.W. *J. Biol. Chem.* v. 271, p. 19298-19303, 1996.

FIORONI, M. et al. A New 2,2,2-Trifluoretanol Model for Molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem.*, v. 104, p. 12347- 12354, 2000.

FITCH, B. G., et al. Blue Matter: Strong Scaling of Molecular Dynamics on Blue Gene/L. *International Conference on Computational Science*, v. 2, p. 846-854, 2006.

GARCÍA, A. E., SANBONMATSU, K. Y. Exploring the Energy Landscape of a β Hairpin en Explicit Solvent, *Proteins.* v. 42, p. 345-354, 2001.

GIANGASPERO, A. et al. Amphipathic α helical antimicrobial peptides: A systematic study of the effects of structural and physical properties on biological Activity. *Eur. J. Biochem.* v. 268, p. 5589-5600, 2001.

HESS, B. et al. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comp. Chem.*, v. 18, p. 1463-1472, 1997.

HIGASHIJIMA T., Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G Proteins). *J. Biol. Chem.* V. 263, p. 6491-6494, 1988.

HO, C. L.; HWANG, L. L. Structure and Biological activities of a new mastoparan isolated from the venom of the hornet *Vespa basalis*. *Biochem. J.* v. 274, p. 453-456, 1991.

HUKUSHIMA, K., NEMOTO, K. Exchange monte carlo method and application to spin glass simulations. *J. Phys. Soc. Jpn.* v. 65, p. 1604–1608, 1996.

HUMPHREY, W., DALKE, A., SCHULTEN, K., VMD, *J. Molec. Graphics*, v.14.1, 33-38, 1996.

JORGENSEN, W.; Tirado-Rives, J. The OPLS potential function for proteins, energy minimization for crystals of cyclic peptides and crambin, *J. Am. Chem. Soc.* v. 110, p. 1657-1666, 1988.

KATSU, T. et al. Mechanism of membrane damage induced by the amphipathic peptides gramicidin S and melittin. *Biochim. Biophys. Acta.* v.983, p. 135-141, 1989.

KATSU, T. et al. Interaction of wasp venom mastoparan with biomembranes. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1027, p. 185-190, 1990.

KONNO, K. et al. Isolation and structure of pompilidotoxins (PMTXs), novel neurotoxins in solitary wasp venoms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V.250, p. 612-616, 1998.

KONNO, K. et al. Structure and biological activities of Eumenine Mastoparan-AF (EMP-AF), a new mast cell degranulating peptide in the venom of the solitary wasp (*Anterhynchium flavomarginatum micado*). *Toxicon*, v.38, p. 1505-1515, 2000.

KONNO, K. et al. Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1550, p.70-80, 2001.

KREIL, G. Biosynthesis of melittin, a toxic peptide from bee venom. Amino-Acid Sequence of the Precursor. *Eur. J. Biochem.* v. 33, p. 558-566, 1973.

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

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

LORENZI, C. C. B. *Estudo Estrutural de mastoparanos isolados de vespas solitárias*. 200 f. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) – Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” São Jose do Rio Preto, 2002.

- MATIN, A. C. R. ProFit V2.5, SciTech Software, www.bioinf.org.uk/software/swreg.html, 2001.
- MATSUZAKI, K. et al. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 1327, p. 119-130, 1997.
- MATSUZAKI, K. et al. Interactions of an antimicrobial peptide, Magainin 2, with lipopolysaccharideo containing liposomes as a model for outer membranes of Gram-negative Bacteria. *FEBS Lett* v. 449, p. 221-224, 1999.
- MIYAMOTO, S.; KOLLMAN, P. A. SETTLE: An analytical version of the Shake and Rattle algorithm for rigid water models. *J. Comput. Chem.*, v. 13, p. 952-962, 1992.
- NAKAJIMA, T., **Handbook of Natural Toxins** New York: Marcel Dekker, v.2, p. 109-133, 1984.
- NAKAJIMA, T. et al. Amphiphilic peptides in wasp venom. *Biopolymers*, v. 25, p. S115-S121, 1986.
- PASCUTTI, P.G., Introdução à Modelagem e Dinâmica Molecular, www.bioinfo.ufrj.br/biomod/DinamicaMolecular.PDF, Escola de modelagem molecular em sistemas biológicos, 2002.
- SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipids bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 1462, p. 55-70, 1999.
- SITARAM, N.; NAGARAJ, R. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 1462, p. 29-54, 1999.
- SFORÇA, M. L. et al. How C-terminal carboxyamidation alters the biological activity of peptides from the venom of the Eumenine solitary wasp. *Biochemistry*, v. 43, p. 5608-5617, 2004.
- SUGITA, Y., OKAMOTO, Y. Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. *Chem. Phys. Lett.* v. 314, p. 141-151, 1999.
- VAN DER SPOEL, D. et al. Gromacs User Manual version 3.3, www.gromacs.org, 2005.
- TORRIE, G.; VALLEU, J. Monte Carlo free energy estimates using non-boltzmann sampling: application to the sub-critical lennard-jones fluid. *Chem. Phys. Lett.* v. 28, p. 578-581, 1974.
- TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. Amphipatic, α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, v. 55, p. 4-30, 2000.
- VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Gromos-87 Manual Biomos. Groningen, Netherlands, 1987.

VAN GUNSTEREN, W.F.; BERENDSEN, H.J.C. Computer simulation of molecular dynamics: methodology, applications and perspectives in chemistry, p. 992-1023, 1990.

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

VERLET, L. Computer experiments on classical fluids. i. thermodynamical properties of lennard-jones molecules. *Phys. Rev.* v. 159, p. 98–103, 1967.

VETTER, R. S.; VISSCHER, P. K. Bites and stings of medically important venomous arthropods. *Internat. J. Dermat.* v. 37, p. 481-496, 1998.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**, New York: John Wiley, 1995.

WEINER, S. J. et al. An all atom force field for simulations of proteins and nucleic acids. *J. Comput. Chem.*, v. 7, p. 230-252, 1996.

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

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

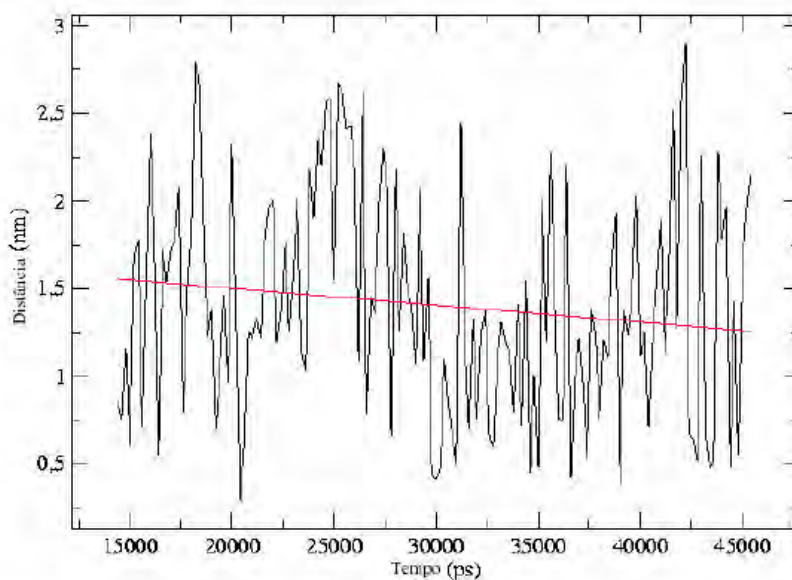
ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* v. 415, p. 389-395, 2002.

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

7. Apêndice A

Análise do tamanho da caixa e do peptídeo

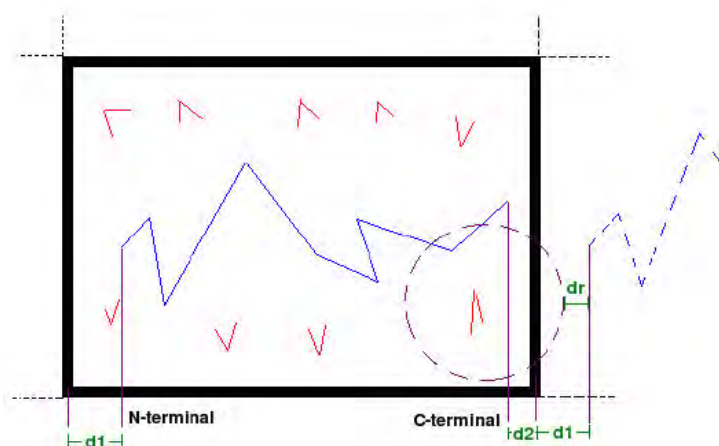
Para provarmos que não existe artefato vamos comparar a distância *end-to-end* do peptídeo com a dimensão da caixa cúbica e o raio de corte. O tamanho da caixa é de 4,5nm para cada face, a máxima distância entre o nitrogênio da isoleucina 1 (átomo 1) e o hidrogênio da amida (átomo 137) é de 2,9nm de acordo com o gráfico abaixo obtido pelo *g_dist*.



Distância calculada entre os centro de massa do 1º e do último (137º) átomo do peptídeo ao longo da dinâmica, referente a temperatura 288K. A máxima distância entre esses centros é de aproximadamente 2,9nm e a média dessa distância é 1,40nm.

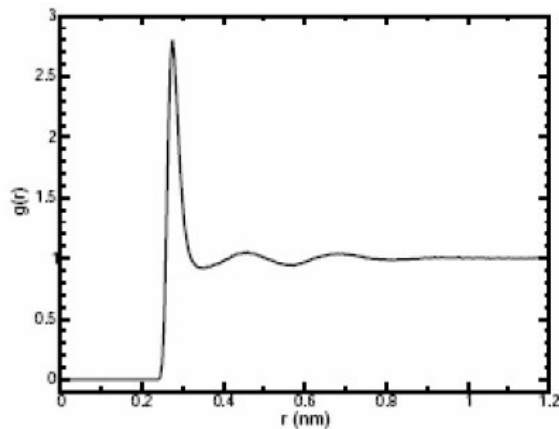
Considere a figura abaixo como uma representação do sistema quando o peptídeo assume a conformação de máxima distância entre os extremos átomos, em azul o peptídeo, em vermelho as águas, e o peptídeo pontilhado sua imagem. A distância entre a borda e N-terminal (d_1), e o C-terminal e a borda (d_2) é de 1,6nm ($4,5 - 2,9 = 1,6 = d_1 + d_2$). Como o raio de corte é 1,4nm, a distância entre o raio de corte e a imagem do peptídeo (d_r) é de 0,2nm.

Contudo, teremos que analisar a água nessa distância, se ela é *bulk*.

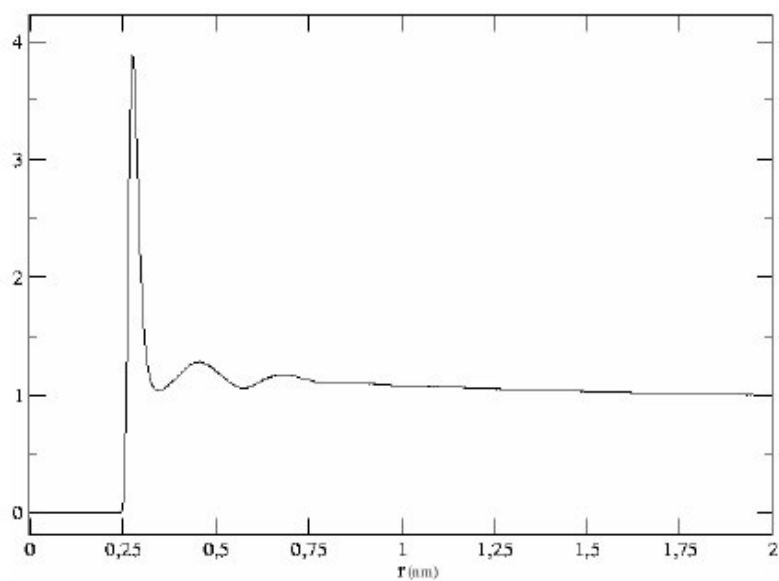


Representação de uma caixa cúbica em simulação de Dinâmica Molecular. Em azul, o peptídeo – linha contínua, a sua imagem – linha tracejada, e em vermelho a água.

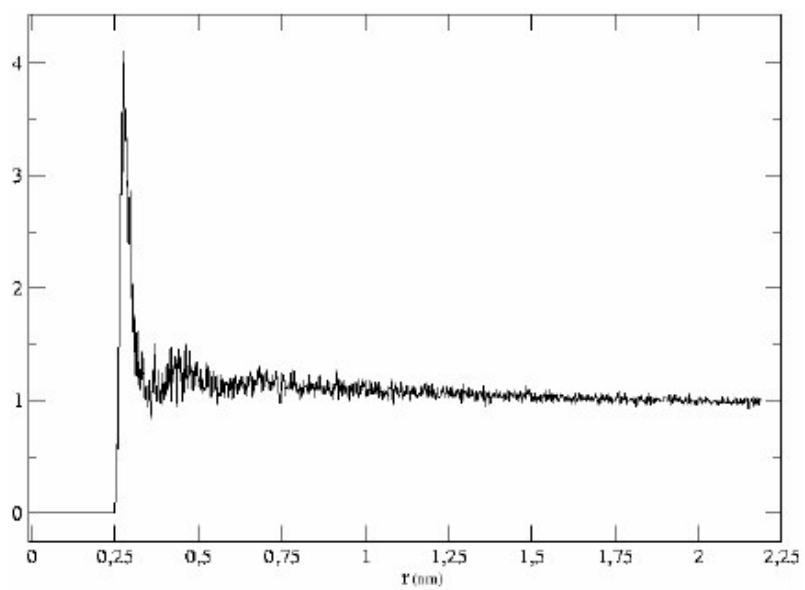
Para isso vamos calcular a função distribuição radial oxigênio-oxigênio da água SPC, tanto no tempo total como no tempo referente a máxima distância “*end-to-end*” e compararmos com o gráfico abaixo e com o mesmo cálculo feito para a caixa termalizada com TFE-água de precisão simples e dupla.



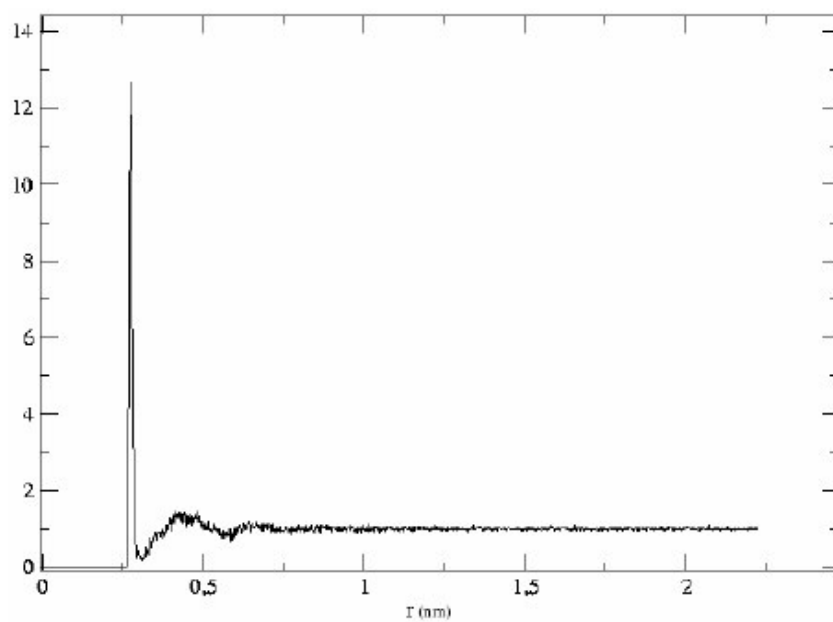
Função distribuição radial $g_{oo}(r)$ para oxigênio-oxigênio da água – SPC (GROMACS manual).



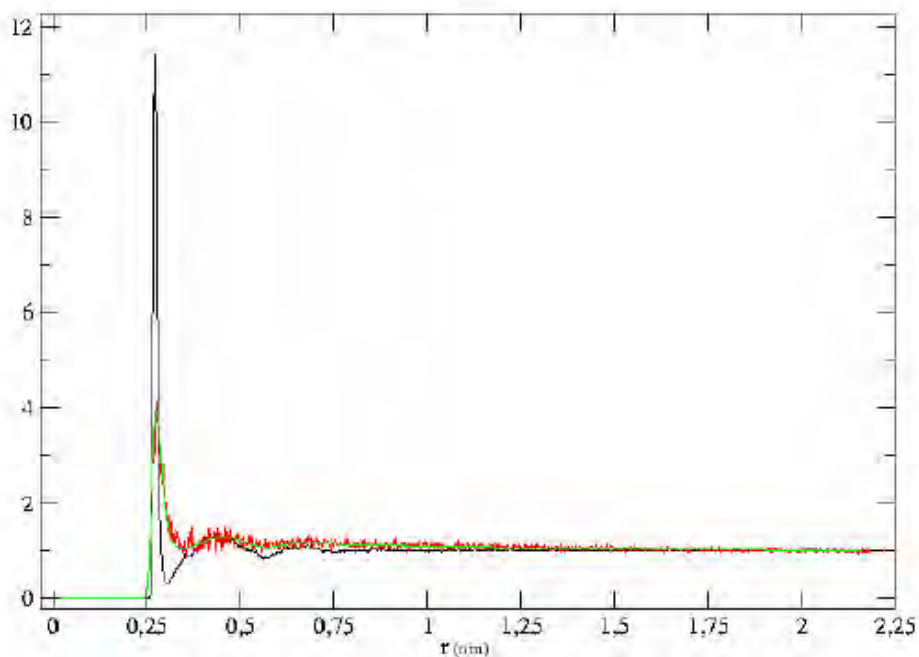
Função distribuição radial $g_{oo}(r)$ oxigênio-oxigênio para a trajetória referente a temperatura 288K.



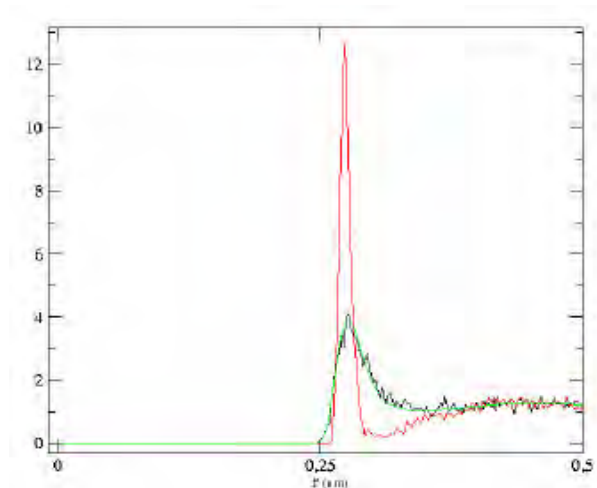
Função distribuição radial $g_{oo}(r)$ oxigênio-oxigênio da caixa TFE-água.



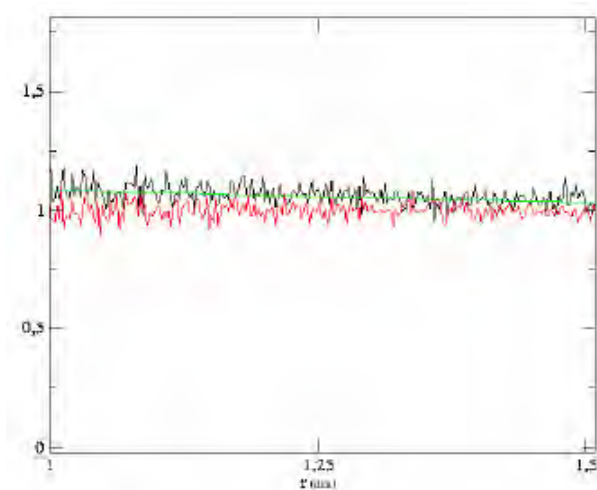
Função distribuição radial $g_{oo}(r)$ oxigênio-oxigênio para a trajetória ordenada referente a temperatura 288K no tempo 42200ps (frame 2780), quando a distância “end-to-end” é máxima – 2.9nm.



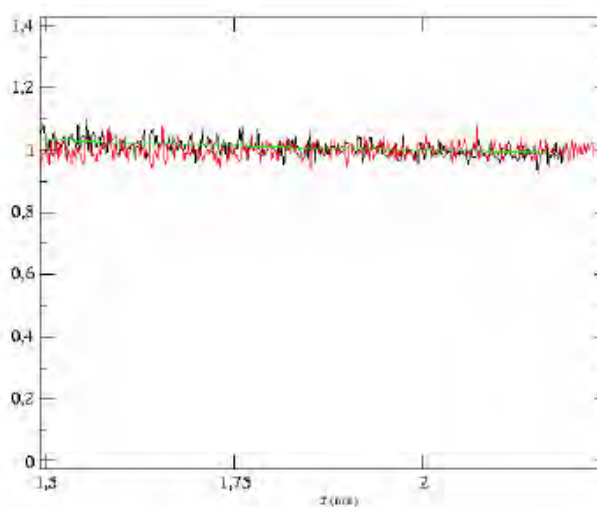
Função distribuição radial $g_{oo}(r)$ oxigênio-oxigênio para a caixa TFE-água, em preto precisão dupla, em vermelho precisão simples e em verde trajetória referente a temperatura 288K.



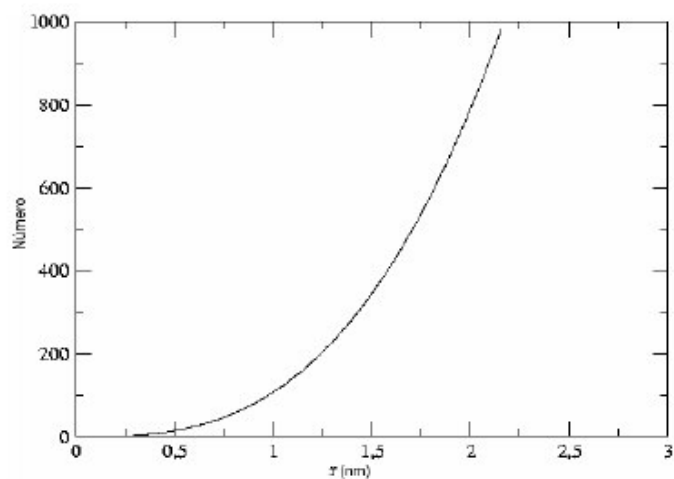
Função distribuição radial $g_{OO}(r)$ oxigênio-oxigênio para a caixa TFE-água, em preto precisão dupla, em vermelho precisão simples e em verde trajetória no tempo total referente a temperatura 288K, de 0 a 0,5nm.



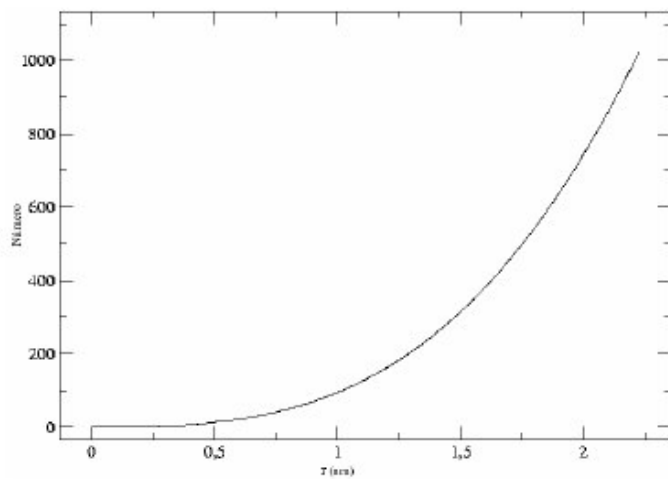
Função distribuição radial $g_{OO}(r)$ oxigênio-oxigênio para a caixa TFE-água, em preto precisão dupla, em vermelho precisão simples e em verde trajetória referente a temperatura 288K, de 1,0 a 1,5nm.



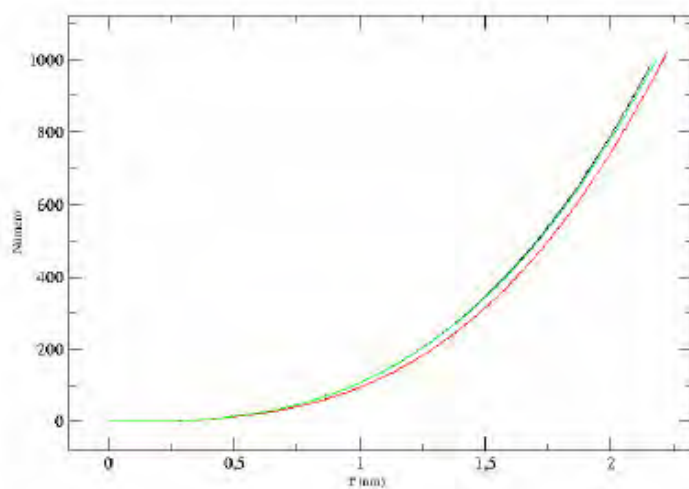
Função distribuição radial $g_{OO}(r)$ oxigênio-oxigênio para a caixa TFE-água, em preto precisão dupla, em vermelho precisão simples e em verde trajetória referente a temperatura 288K de 1,5 a 2,25nm.



Curva de RIN (*Run Integration Number*) oxigênio-oxigênio para a caixa TFE-água referente a trajetória da temperatura 288K.



Curva de RIN (*Run Integration Number*) oxigênio-oxigênio para a caixa TFE-água.



Curva de RIN (*Run Integration Number*) oxigênio-oxigênio para a caixa TFE-água.

Em preto a trajetória ordenada referente a 288K, em vermelho precisão dupla, e em verde precisão simples.