



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Programa de Pós-Graduação em Bioinformática



UFMG

MOEMA MONTEIRO BATISTA

Avaliação da Ação do Peptídeo Antimicrobiano

Dermadistinctina K em Membrana Modelo por Dinâmica

Molecular

BELO HORIZONTE, MG – BRASIL
2015

MOEMA MONTEIRO BATISTA

*Avaliação da Ação do Peptídeo Antimicrobiano
Dermadistinctina K em Membrana Modelo por Dinâmica
Molecular*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioinformática do Instituto de Ciência Biológicas Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Bioinformática.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Geraldo Pascutti

BELO HORIZONTE, MG – BRASIL

2015

Aos meus pais, ao Santoro

Agradecimentos

Um doutorado não se faz sozinha e eu tive apoio e torcida de pessoas de todo o Brasil, principalmente: Manaus, Minas Gerais e Rio de Janeiro.

Sou grata primeiramente a meus pais por compreenderem minhas ausências, por terem orgulho de mim, por me apoiarem em tudo e por me amarem.

Ao meu orientador Pedro Pascutti pela orientação, amizade, apoio e compreensão em momentos difíceis.

Agradeço ao meu mestre e amigo Marcelo Santoro, que não pode ver esse doutorado concluído.

Aos meus amigos do Laboratório de Modelagem e Dinâmica Molecular (LMDM) em especial ao Tácio, Torres, Reinaldo e Loureiro por todas as ajudas. Também à Pris, Raquel, Raísa, Rosemberg, Rafa Bernardi, Marcelo, Diego, Mariangela, Wesley, Rafa Mesquita, Manu, Bia, Professor Valiente, Dany Naranjo, Lili Hernandez. Obrigada pelo apoio técnico e sugestões ao trabalho.

Aos meus amigos do curso de Bioinformática da UFMG: Angelo, Valdete, Tiago Mendes, Raoni, Sandro, Douglas e João.

Aos meus amigos professores que me apresentaram a Bioinformática: Sérgio Campos, Alessandra Campos, Glória Franco, Daiane de Laat e Júlio César.

À Secretaria da Bioinformática.

As minhas amigas confidentes: Rafaela Ferreira, Liza Felicori, Fabíola Ribeiro, Tati Maioli e Daniele Aguiar.

Aos meninos do LUAR: Lucas Hanke, Betinho, Fernando, Nicholas, Marcelo, Paulo, Eduardo, Divino, Disso, Cristiano.

Aos meus amigos do Laboratório de Enzimologia e Físico-química.

Aos meus parceiros e amigos de congressos e discussões em ciência: Annie, Isa Guedes, e William Porto.

A minha irmã de coração Carolina.

Agradeço a minha família Nobre por ser a minha torcida organizada maior.

Aos meus amigos que se tornaram minha família e que me acolheram muitas vezes: Thais, Nilma, Felipe Ferré.

Aos meus amigos que foram minha base em Belo Horizonte: Luciana, Rafael, Gabi, Leidi, Adriano, Anaelle, Fernanda Godoi, Vinicius, Érica Maria. Quanta dificuldade foi o início; Meus amigos anfitriões por semanas, meses e anos: Marx, Luciana Nina, Kendi, Gabi, Eliana Feio, Sarah Zagury, D. Marly e Seu Fernando. Obrigada por aguentarem minha bagunça e por cuidarem de mim.

Aos demais amigos que sempre me ajudaram e torceram por mim.

À Kath pelos debates sobre a tese, pela paciência, compreensão e carinho infinito.

Aos membros da banca por lerem o material e por contribuírem com esse trabalho.

À FAPEAM pelo irrestrito apoio financeiro durante os 48 meses de doutorado. À CAPES e ao CNPq por investir na estrutura de cada laboratório e universidade por onde passei.

Ao Inmetro pela estrutura computacional utilizada no início e final da tese.

"Algumas coisas sempre parecem impossíveis até que sejam realizadas. "

(Nelson Mandela)

RESUMO

Há grande diversidade de animais e plantas que produzem peptídeos em seu sistema imune inato. Essas moléculas são moduladoras dos sistemas nervoso, imune e circulatório de predadores, e são de grande interesse para a indústria farmacêutica, para descoberta de novas moléculas ativas. Com o avanço da resistência antimicrobiana a agentes antimicrobianos, fármacos tornam-se menos efetivos contra bactérias, fungos, protozoários e vírus, e novos compostos farmacêuticos são necessários para enfrentar esse fenômeno mundial. O objeto de estudo nesse trabalho é um peptídeo antimicrobiano com potencial atividade antibiótica e cujo mecanismo de ação ainda pouco elucidado, a Dermadistinctina K (DD K), encontrada na pele do anuro *Phyllomedusa distincta*, espécie da Mata Atlântica do Brasil. O presente estudo focou a interação do peptídeo DD K com membrana modelo de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolipídica (POPC) com o objetivo de obter informações *in silico* para contribuir em elucidar sua ação e dar suporte ao desenvolvimento de fármacos antimicrobianos. Essa tese foi dividida em três abordagens. Na primeira foi realizado um estudo de predição estrutural do peptídeo DD K em mistura trifluoretanol/água (TFE/água) (50%/50%, v/v), empregando *Generalized Simulated Annealing* (GSA) usando o programa Thor-GSA, desenvolvido em nosso grupo de pesquisa, e Dinâmica Molecular com o programa GROMACS 4.6. O GSA possibilitou encontrar uma estrutura pré-enovelada para o peptídeo, a qual foi usada como entrada para DM e enovelou-se rapidamente até a estrutura nativa, que é formada por uma hélice- α anfifílica. Na segunda abordagem estabeleceu-se sistemas com 2, 3 e 4 peptídeos na presença de membrana modelo formada por 512 lipídeos de POPC, sendo observadas modificações na biomembrana e formação de agregados de peptídeos com perda parcial da estrutura nativa. Os monômeros de DD K formaram aglomerados juntando faces hidrofóbicas das estruturas em hélice- α . A face hidrofílica do peptídeo é formada principalmente por resíduos de lisina, que interagiram com as cabeças lipídicas da bicamada. No terceiro estudo foram utilizados poros pré-montados, com 6 peptídeos/468 lipídeos, 7 peptídeos/461 lipídeos e 8 peptídeos/454 lipídeos de POPC. Duas configurações de poros foram utilizadas: uma com os resíduos lisina voltados para o lado de fora do poro e outra com esses resíduos voltados para dentro, formando o lúmen do poro. Em ambos os modelos houve perturbação da bicamada, estabilização e passagem de água. Os poros com 6 e 7 peptídeos formaram estruturas estáveis, enquanto os resíduos de lisina provocaram o arraste das cabeças de fosfolipídeos para o interior da bicamada formando interstícios dando passagem a moléculas de água. O poro com 8 peptídeos mostrou conformação estável com os resíduos carregados voltados para o centro do poro, impedindo o colapso do poro por repulsão eletrostática, formando um lúmen por onde passaram moléculas de água. Concluiu-se que quando a concentração de peptídeo crítica para agregação é alcançada o extravasamento osmótico pode ocorrer por vários mecanismos ao mesmo tempo. Esses mecanismos incluiriam a perturbação da bicamada por agregados do peptídeo, a formação de feixes pelo DD K pela união das faces hidrofóbicas em grupos de até 7 peptídeos e poros semelhantes ao modelo barril pelo alinhamento ordenado formando o lúmen para conjuntos acima de 7 peptídeos.

PALAVRAS-CHAVES: Dermadistinctina K, Dinâmica Molecular, bicamada de POPC, poro colapsado, feixe de peptídeo, peptídeo antimicrobiano.

ABSTRACT

A vast diversity of plants and animals has peptides in their innate immune system. These molecules modulate the nervous, immune and circulatory system of predators, which are of great interest to the pharmaceutical industry concerning the discovery of new active biomolecules. The resistance to antimicrobial agents becomes prevalent, drugs turn out to be less effective against bacteria, fungi, protozoans and viruses, new pharmaceutical compounds are necessary to deal with this widespread phenomenon. The subject of study in this work is an antimicrobial peptide with potential antibiotic activity and whose action mechanism remains mostly unknown. This peptide, Dermadistinctin K (DD K) is found on the skin of the anuran *Phyllomedusa distincta* from the Brazilian Atlantic Forest. This study focused on the interaction of the peptide DD K with a membrane model of 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocoline (POPC) with the aim to collect information *in silico* to elucidate its action and support the development of antimicrobial drugs. This thesis has three parts. On part one; we conducted a study of structural prediction of the DD K peptide in trifluoroethanol/water mixture (TFE/water) (50%/50%, v/v), employing Generalized Simulated Annealing (GSA) using Thor-GSA software, developed in our research group, and Molecular Dynamics (MD) simulation using GROMACS 4.6. The GSA has made possible to find a pre-folded structure for DD K, which in sequence was submitted to MD simulation and finished folded in the native structure, an amphipathic α -helix. On part two we determined systems with 2, 3 and 4 peptides in bilayer with 512 molecules of POPC. Membrane model modifications were observed as also misfolded aggregates of DD K. DD K monomers aggregate by hydrophobic face of each α -helix of peptide. Hydrophilic face of DD K is formed mainly by lysine amino acid residues that interacted with headgroups of membrane. On the final part we used pre-mounted pores with 6 peptides/468 lipids, 7 peptides/461 lipids and 8 peptides/454 lipids of POPC bilayer. Two pore configurations were used: one with the lysine residues turned to outside of pore, and another with these residues turned inwards and making up the pore lumen. There were water passage, bilayer perturbation and pore stabilization in both models. The pores with 6 and 7 peptides formed stable but collapsed structures, while lysine residues dragged headgroup of phospholipids into the bilayer forming interices giving passage of water molecules. Pores with 8 peptides stabilized with the charged positive residues into the center preventing the pore collapse by electrostatic repulsion and forming a lumen through which water molecules can pass. In conclusion, when the peptide critical concentration to aggregate is reached to osmotic leaking can occur through several mechanisms at once. These mechanisms include the disturbance of the bilayer by aggregates of peptide, the formation of pores by fusion of hydrophobic phases, that could happen on up to 7 peptides, and the formation of barrel pores could be suggested by the orderly aggregation of up to 7 peptides forming a lumen.

KEYWORDS: Dermadistinctin K, Molecular Dynamics, POPC membrane, collapsed pore, peptide bundle, antimicrobial peptide.

CAPÍTULO 1	INTRODUÇÃO	1
1.1	<i>Peptídeos antimicrobianos</i>	1
1.1.1	Estrutura de folha β de peptídeos antimicrobianos	3
1.1.2	Estrutura de hélice- α de peptídeos antimicrobianos	5
1.1.3	Demais estruturas de peptídeos antimicrobianos	6
1.2	<i>Mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos</i>	7
1.3	<i>Peptídeo antimicrobiano Dermadistinctina K</i>	12
1.3.1	Estrutura molecular tridimensional do DD K	14
1.3.2	Atividade antimicrobiana e atividade hemolítica do DD K	17
1.4	<i>Modelos de lipídeos</i>	17
CAPÍTULO 2	OBJETIVOS	22
2.1	<i>Geral</i>	22
2.2	<i>Objetivos específicos</i>	22
CAPÍTULO 3	METODOLOGIA	23
3.1	<i>Estudo in silico de peptídeos antimicrobianos</i>	23
3.2	<i>Dinâmica Molecular</i>	24
3.2.1	Campo de força	26
3.2.2	Minimização de energia	32
3.2.3	Condições periódicas de contorno	33
3.3	<i>Generalized Simulated Annealing – GSA</i>	33
3.4	<i>Funcionamento do GSA</i>	37
3.5	<i>Simulações com peptídeo DD K imerso em solução</i>	40
3.5.1	Sistema do peptídeo em água	42
3.5.2	Sistema do peptídeo DD K em mistura trifluoretanol e água	43
3.6	<i>Simulações com bicamadas lipídicas</i>	45
3.6.1	Parâmetro de simulação com DD K em bicamada POPC	46
3.6.2	Preparação dos sistemas com DD K em interface bicamada POPC	47

3.6.3	Preparação do sistema de poro de DD K em bicamada de POPC	49
	Dinâmica Molecular dos sistemas com as conformações de poros de DD K em bicamada POPC	52
3.7	<i>Programas extras</i>	53
CAPÍTULO 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES		54
4.1	<i>Resultados do Generalized Simulated Annealing e Dinâmica Molecular dos sistemas do DD K imerso em solução</i>	54
4.1.1	Perfil de estrutura secundária do peptídeo DD K em simulação em água e mistura.....	55
4.1.2	RMSD dos sistemas com DD K em água e mistura TFE/água	58
4.1.3	Ligações de Hidrogênio dos sistemas em água e mistura TFE/água	60
4.1.4	Conformações finais dos sistemas com água e mistura TFE/água.....	61
4.2	<i>Resultados dos sistemas com monômeros em interface com bicamada POPC</i>	63
4.2.1	Conformações das estruturas dos sistemas com peptídeos em bicamada POPC.....	63
	Simulação do sistema DDK _{2pep-popc}	63
	Simulação do sistema DDK _{3pep-popc}	66
	Simulação do sistema DDK _{4pep-popc}	69
4.2.2	RMSD e RMSF dos peptídeos em bicamada POPC	70
	RMSF do sistema DDK _{2pep-popc}	72
	RMSF do sistema DDK _{3pep-popc}	73
	RMSF do sistema com 4 peptídeos DD K em bicamada POPC.....	74
4.2.3	Densidade eletrônica dos sistemas com peptídeos em bicamada POPC.....	75
4.2.4	Parâmetro de ordem da bicamada POPC com peptídeos.....	78
4.3	<i>Resultados das dinâmicas dos poros em membrana modelo POPC</i>	80
4.3.1	Conformações dos poros pré-montados	80
4.3.2	RMSD e RMSF dos sistemas com poros em POPC	87
	RMSD do sistema DDKporo6-popc.....	87
	RMSF do sistema DDKporo6-popc.....	89
	RMSD do sistema DDKporo7-popc	90
	RMSF do sistema DDKporo7-popc	92
	RMSD do sistema DDKporo8-popc.....	93

RMSF do sistema DDKporo8-popc	95
4.3.3 Prevalência das ligações de hidrogênio	97
4.3.4 Densidade eletrônica dos sistemas com poros em POPC.....	100
4.3.5 Parâmetro de ordem dos sistemas com poros em POPC	104
CAPÍTULO 5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
ANEXO I: WEBSITES COM PLATAFORMAS DESTINADAS A PEPTÍDEOS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS DESCRITOS NA LITERATURA.	I
ANEXO II: TUTORIAL DE PREPARAÇÃO DE SISTEMAS EM MEMBRANAS - GROMACS	II
ANEXO III: ARQUIVO MDP COM OS PARÂMETROS DA DINÂMICA MOLECULAR PARA OS SISTEMAS COM BICAMADA LIPÍDICA.	VI

Lista de Figuras

FIGURA 1: TIPOS ESTRUTURAIS DE PEPTÍDEOS A) FOLHA BETA (TAQUIPLESINA) B) A-HÉLICE (MAGAININA) C) ESTENDIDA (INDOLICIDINA) D) VOLTA (THANTINA). AS PONTES DE DISSULFETO ESTÃO INDICADAS EM AMARELO. FIGURA DESENHADA NO MOLMOL (POWERS & HANCOCK, 2003).....	2
FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO DA LIGAÇÃO PEPTÍDICA COM OS ÂNGULOS DO CARBONO α , PHI (Φ) E PSI (Ψ) E A DIREÇÃO EM QUE ELES PODEM ROTACIONAR. O PLANO AZUL É DA LIGAÇÃO PEPTÍDICA. ILUSTRAÇÃO ADAPTADA DE: (GARRETT & GRISHAM, 1995).....	3
FIGURA 3: (A) FOLHA B PARALELA EM SENTIDO $C \leftarrow N$. (B) FOLHA B PARALELA UMA SEQUÊNCIA EM SENTIDO $C \leftarrow N$ E A OUTRA EM SENTIDO $N \rightarrow C$. NA FIGURA O NITROGÊNIO ESTÁ COLORIDO EM AZUL, O CARBONO EM PRETO E EM VERMELHO O OXIGÊNIO (ILUSTRAÇÃO RETIRADA DE HTTP://WWW.WILEY.COM/COLLEGE/FOB/QUIZ/QUIZ06/6-9.HTML . DISPONÍVEL EM: 18/08/2015 ÀS 11:15.	4
FIGURA 4: ESTRUTURA DE ALFA-HÉLICE. (A) A-HÉLICE COM LIGAÇÕES DE C=O E N-H INTERAGINDO NO PRÓPRIO EIXO DA MOLÉCULA. (B) LIGAÇÕES INTRAMOLECULARES DA A-HÉLICE, DISTÂNCIA DE 5.4 Å. DISPONÍVEL EM: HTTP://XRAY.BMC.UU.SE/COURSES/BIOINFORMATIK/INTRO/INTRODUCTION.HTML EM 18/08/2015 ÀS 13:55	5
FIGURA 5: PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO CIRCULAR: GRAMICIDINA S.(BOCKUS; MCEWEN & LOKEY, 2013).....	6
FIGURA 6: REPRESENTAÇÃO DOS MODELOS DE RUPTURA DE MEMBRANA PROVOCADOS POR AMP'S. A- MODELO BARRIL OU BARREL-STAVE B- MODELO CARPETE OU CARPET-LIKE C- PORO TOROIDAL. (HERZOG & FRIDMAN, 2014)	10
FIGURA 7: DIVERSOS MECANISMOS DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS. MODIFICADO DE HANEY ET. AL. 2009.	11
FIGURA 8: <i>PHYLLOMEDUSA DISTINCTA</i> (FOTO DE GERMANO WOEHLE JR)	12
FIGURA 9: ESTRUTURA DO DD K COM 33 RESÍDUOS OBTIDA POR RMN. EM VERDE RESÍDUOS HIDROFÓBICOS DE ALANINAS E O TRIPTOFANO DA POSIÇÃO 3, QUE É CARACTERÍSTICO DA FAMÍLIA DO PEPTÍDEO E EM AZUL SÃO OS RESÍDUOS CARREGADOS POSITIVAMENTE, AS LISINAS. (PDB:2JX6, EDIÇÃO PYMOL).....	14
FIGURA 10: A - ESTRUTURA DE RMN EM SOLUÇÃO DE TFE/ÁGUA 50:50 v/v, B-D EM UMA SOLUÇÃO MICELAR DE DPCd38 EM ÁGUA. A E B SÃO AS 20 CONFORMAÇÕES DE MENOR ENERGIA. OS RESÍDUOS HIDROFÓBICOS ESTÃO IDENTIFICADOS EM AZUL E OS HIDROFÍLICOS EM VERDE. C E D (CORTE TRANSVERSAL) É A ESTRUTURA DE MENOR ENERGIA EM PRESENÇA DE DETERGENTE (FIGURA OBTIDA DE VERLY ET AL., 2009)	16

FIGURA 11: DD K EM CORTE TRANSVERSAL COM A FACE CARREGADA POSITIVAMENTE CIRCULADA E LISINAS DESTACADAS EM AZUL. ALANINAS DESTACADAS EM VERDE, REPRESENTANDO A FACE HIDROFÓBICA. O RESÍDUO E-31, CIRCULADO NO PONTILHADO, É DESESTRUTURADO OU DISTORCIDO EM BICAMADAS, ENTRANTO PROVÊ UMA ESTRUTURA MAIS ANFIFÍLICA AO POLIPEPTÍDEOS. (MODIFICADA DE VERLY <i>ET AL.</i> , 2009)	16
FIGURA 12: ESTRUTURA DE MOLÉCULAS DE SDS E DPC, AMBOS DETERGENTES FORMADORES DE MICELAS.	20
FIGURA 13: ESTRUTURA MOLECULAR DE <i>PALMITOIOLEILFOSFATIDILGLICEROL</i> - POPG	20
FIGURA 14: ESTRUTURA DE <i>PALMITOIOLEILFOSFATIDILCOLINA</i> - POPC.	21
FIGURA 15: REPRESENTAÇÃO DA LIGAÇÃO COVALENTE DE DOIS ÁTOMOS I E J NO COMPRIMENTO B_0	28
FIGURA 16: REPRESENTAÇÃO DO POTENCIAL HARMÔNICO ANGULAR ENTRE OS ÁTOMOS I-J-K	28
FIGURA 17: REPRESENTAÇÃO DO POTENCIAL DIÉDRICO IMPRÓPRIO QUE SE REFERE A INTERAÇÃO NOS ÁTOMOS I-J-K-L.	29
FIGURA 18: REPRESENTAÇÃO DO POTENCIAL TORCIONAL.	29
FIGURA 19: REPRESENTAÇÃO DO POTENCIAL DE LENNARD-JONES	30
FIGURA 20: REPRESENTAÇÃO DA EQUAÇÃO DO POTENCIAL DE COULOMB. OS CÍRCULOS SÃO LINHA DE ISOPOTENCIAL E AS SETAS DEMONSTRAM A DIREÇÃO DO CAMPO.....	31
FIGURA 21: DECAIMENTO DA TEMPERATURA VERSUS NÚMERO DE PASSOS DE CÁLCULO DO GSA PARA Q_T VARIANDO DE 1,1 A 2,9, ONDE $T=100$. (FERNANDES, 2009).....	34
FIGURA 22: CURVA DE VISITAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE ENERGIA PELO SORTEIO DE DIEDROS PARA Q_V VARIANDO DE 1.1 A 2.9 (FERNANDES, 2014).....	35
FIGURA 23: FUNÇÃO DE ACEITAÇÃO P_{QA} PARA Q_A VARIANDO 1,1 A 2,8.....	36
FIGURA 24: ESTRUTURA ESTENDIDA DO PEPTÍDEO DD K PRÉ SIMULAÇÃO COM GSA.	38
FIGURA 25: SISTEMA DO PEPTÍDEO DD K EM ÁGUA. EM AZUL, MOLÉCULAS DE ÁGUA.	42
FIGURA 26: MOLÉCULA DE TRIFLUOROETANOL - TFE	43
FIGURA 27: A - REPRESENTAÇÃO DA CAIXA DE SIMULAÇÃO DO SISTEMA DD K _{TFE/ÁGUA} . B – REPRESENTAÇÃO DA CAIXA DE SIMULAÇÃO DO SISTEMA DD K _{GSA-TFE/ÁGUA} . EM AZUL A ÁGUA, EM CINZA O TFE.....	45
FIGURA 28: SISTEMAS COM PEPTÍDEO DD K EM MEMBRANA MODELO COM 512 MOLÉCULAS DE POPC. A- SISTEMA CONTROLE, B- SISTEMA DDK _{2PEP-POPC} . C- SISTEMA DDK _{3PEP-POPC} . D – SISTEMA DDK _{4PEP-POPC} . E- DETALHE DA DISTÂNCIA DO PEPTÍDEO DA BICAMADA 7,4 - 8.7Å.	48
FIGURA 29: FLUXOGRAMA PARA PREPARAÇÃO DOS POROS DE DD K EM BICAMADA MODELO POPC.	51

FIGURA 30: SOBREPOSIÇÃO DO RESULTADO DA CONFORMAÇÃO FINAL, DE MENOR ENERGIA, DO GSA EM AZUL E DO MODELO ESCOLHIDO NO PDB:2JX6 (MODELO 18) EM LARANJA (RMSD=5.6A)	55
FIGURA 31: PADRÕES DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA DOS RESÍDUOS DO SISTEMA DDK AO LONGO DE 1000NS NAS SIMULAÇÕES DOS SISTEMAS DDK _{ÁGUA} (A), DDK _{TFE/ÁGUA} (B), DDK _{GSA-TFE/ÁGUA} (C), EM VERMELHO, <i>B-SHEET</i> ; EM PRETO, <i>B-BRIDGE</i> ; EM VERDE, <i>BEND</i> ; EM AMARELO, <i>TURN</i> ; EM ROXO, <i>5-HELIX</i> ; EM CINZA, <i>3-HELIX</i> ; EM AZUL, <i>α-HELIX</i> ; EM BRANCO, <i>COIL</i> ..	57
FIGURA 32: VARIAÇÃO DO RMSD DO <i>BACKBONE</i> DO PEPTÍDEO DD K NOS SISTEMAS (LADO ESQUERDO NO EIXO Y (BRMSD)) E (LADO DIREITO) ANÁLISE DE FORMAÇÃO DE CLUSTER CONFORMACIONAL EM FUNÇÃO DO TEMPO DE SIMULAÇÃO DE 1000 NS. (A) REPRESENTAÇÃO DO SISTEMA DDK _{ÁGUA} , (B) DDK _{TFE/ÁGUA} , (C) DDK _{GSA-TFE/ÁGUA}	59
FIGURA 33: NÚMERO DE LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE SIMULAÇÃO. (A)- SISTEMA DDK _{ÁGUA} ; (B) DDK _{TFE/ÁGUA} (C) DDK _{GSA-TFE/ÁGUA}	61
FIGURA 34: CONFORMAÇÕES FINAIS OBTIDAS PARA O PEPTÍDEO DD K. (A) SISTEMA DDK _{ÁGUA} (B) DDK _{TFE/ÁGUA} (C) DDK _{GSA-TFE/ÁGUA}	62
FIGURA 35: REPRESENTAÇÃO DOS MONÔMEROS DE PEPTÍDEOS EM CONTATO COM A INTERFACE DA BICAMADA POPC.A - INÍCIO DA SIMULAÇÃO. B – SIMULAÇÃO EM 14NS. C- SIMULAÇÃO EM 178 NS. D- SIMULAÇÃO EM 200 NS. AS ESFERAS MARRONS SÃO OS ÁTOMOS DE FÓSFORO DAS CABEÇAS LIPÍDICAS.	64
FIGURA 36: DOBRA NA REGIÃO COM OS RESÍDUOS GLY-22 (ROSA), LYS-19 (VERDE), ALA-18, ALA-17, ALA-16 (MARRON). ESFERAS MARRONS SÃO ÁTOMOS DE FÓSFORO DO GRUPO FOSFATO DA MEMBRANA. TERMINAL-N EM DESTAQUE EM ESFERAS AZUIS E BRANCAS.	65
FIGURA 37: REPRESENTAÇÃO DOS MONÔMEROS DE PEPTÍDEOS EM CONTATO COM A INTERFACE DA BICAMADA POPC TERMINAL-C (EM DESTAQUE: ALA-VERMELHO, VAL-AMARELO, AMIDAÇÃO- AZUL PARA O PEPTÍDEO A, AMIDAÇÃO LARANJA PARA O PEPTÍDEO B) AS ESFERAS MARRONS SÃO OS ÁTOMOS DE FÓSFORO DAS CABEÇAS LIPÍDICAS.	66
FIGURA 38: REPRESENTAÇÃO DA SIMULAÇÃO DO SISTEMA DDK _{3PEP-POPC} . O PEPTÍDEO DDK ESTÁ REPRESENTADO EM ROXO, OS RESÍDUOS DE LISINA EM AMARELO E OS RESÍDUOS DE ALANINA EM VERDE. N-TERMINAL EM DESTAQUE ME AZUL DE A- SIMULAÇÃO EM 0NS. B- SIMULAÇÃO EM 5 NS, C – SIMULAÇÃO EM 135 NS. AS ESFERAS MARRONS SÃO OS ÁTOMOS DE FÓSFORO E AS ESFERAS VERMELHAS DOS OXIGÊNIOS DO GRUPO FOSFATO DABICAMADA , QUE ESTÁ COM A CAUDA CARBÔNICA REPRESENTADA EM AZUL CLARO.	68
FIGURA 39: SIMULAÇÃO DO SISTEMA DDK _{4PEP-POPC} . A- SIMULAÇÃO EM 3NS. B- 50 NS C-140 NS. AS ESFERAS MARRONS SÃO OS ÁTOMOS DE FÓSFORO DAS CABEÇAS DOS FOSFOLIPÍDEOS.	69

FIGURA 40: VARIAÇÃO DE RMSD DO <i>BACKBONE</i> DOS SISTEMAS COM PEPTÍDEOS SOBRE A BICAMADA POPC. A- DDK _{2PEP-POPC} B- DDK _{3PEP-POPC} E C- DDK _{4PEP-POPC}	71
FIGURA 41: RMSF DO <i>BACKBONE</i> DOS MONÔMEROS DO SISTEMA DDK _{2PEP-POPC} EM FUNÇÃO DA POSIÇÃO DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS.....	72
FIGURA 42: VARIAÇÃO DE RMSF DO <i>BACKBONE</i> DOS MONÔMEROS DO SISTEMA DDK _{3PEP-POPC} EM FUNÇÃO DA POSIÇÃO DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS.....	73
FIGURA 43: RMSF DO <i>BACKBONE</i> DOS MONÔMEROS DO SISTEMA DDK _{4PEP-POPC} EM FUNÇÃO DA POSIÇÃO DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS.....	74
FIGURA 44: ESTRUTURAS FINAIS DO SISTEMA DDK _{4PEP-POPC} , AGLOMERADO ENVOLVENDO OS PEPTÍDEOS A, C E D. II- ESTRUTURAS FINAIS COM ALANINAS EM AZUL E LISINAS EM VERDE CLARO.	75
FIGURA 45: PERFIL DE DENSIDADE DA BICAMADA POPC NA PRESENÇA DE PEPTÍDEOS. O DESENHO REPRESENTA O EIXO Z DA BICAMADA, UTILIZADO NA ANÁLISE A- DENSIDADE CONTROLE. B – DIFERENÇA DAS DENSIDADES ELETRÔNICAS DAS CABEÇAS LIPÍDICAS DOS SISTEMAS DD K _{2PEP-POPC} , DD K _{3PEP-POPC} , DD K _{4PEP-POPC} , SUBTRAÍDAS DAS DENSIDADES DAS CABEÇAS LIPÍDICAS DO SISTEMA CONTROLE.....	77
FIGURA 46: PARÂMETRO DE ORDEM PARA A CADEIA SATURADA DAS MOLÉCULAS DE POPC EM SISTEMA SEM PEPTÍDEO (PRETO), SISTEMA COM 2 PEPTÍDEOS (VERMELHO), SISTEMA COM 3 PEPTÍDEOS (AZUL), SISTEMA COM 4 PEPTÍDEOS (VERDE).	78
FIGURA 47: CONFORMAÇÕES DE POROS DO PEPTÍDEO DD K COM MENOR ENERGIA, OBTIDAS NO SERVIDOR ROSIE. (A) PORO COM 6 MONÔMEROS DE PEPTÍDEOS; (B) PORO COM 7 MONÔMEROS DE PEPTÍDEOS; (C) PORO COM 8 MONÔMEROS DE PEPTÍDEOS.....	81
FIGURA 48: SIMULAÇÃO DO PORO COM 6 PEPTÍDEOS. A- 30 NS, B-56 NS, C- 72NS. ESFERAS SÃO ÁTOMOS DE FOSFORO DAS CABEÇAS LIPÍDICAS.	81
FIGURA 49: SIMULAÇÃO DO DDK _{PORO6-POPC} , A ÁGUA EM AZUL TRANSLÚCIDO PASSANDO POR FORA DO PORO, A LISINA DE UM DOS MONÔMEROS É ASSINALADA.....	82
FIGURA 50: SIMULAÇÃO DO SISTEMA DDK _{PORO6-POPC} COM ABERTURA EM TEMPO DE 2NS E FECHADO EM 100NS.....	83
FIGURA 51: SIMULAÇÃO DO SISTEMA DDK _{PORO7-POPC} , OS PEPTÍDEOS ESTÃO REPRESENTADOS EM ROXO, OS ÁTOMOS DE FÓSFORO EM ESFERAS MARRONS, NO CÍRCULO TRACEJADO SÃO AS MOLÉCULAS DE POPC ALINHADAS EM CONTATO COM OS PEPTÍDEOS DO PORO.A- 30 NS B-60 NS C-148NS	84

FIGURA 52: PORO COLAPSADO DO SISTEMA DDKPORO7-POPC, A REPRESENTAÇÃO EM AZUL DA ÁGUA TRANSLÚCIDA PASSANDO POR FORA DO LÚMEN, EM CONTATO COM AS LISINAS ASSINALADAS NA FIGURA. AS ESFERAS AMARELAS SÃO ÁTOMOS DE FÓSFORO DAS CABEÇAS FOSFOLIPÍDICAS DA BICAMADA.	85
FIGURA 53: VISÃO SUPERIOR DO SISTEMA DDKPORO8-POPC. EM AZUL ESTÃO OS PEPTÍDEOS FORMANDO O PORO E EM AMARELO A BICAMADA POPC.....	86
FIGURA 54: SIMULAÇÃO DO SISTEMA DDK _{PORO8} -POPC. EM AZUL ESTÃO OS MONÔMEROS DE DDK, AS ESFERAS AMARELAS SÃO A REPRESENTAÇÃO DAS CABEÇAS DOS FOSFOLIPÍDEOS DA BICAMADA POPC, EM ROXO SÃO TODAS AS LISINAS QUE COMPÕEM O DD K.....	86
FIGURA 55: PORO ABERTO DO SISTEMA DDKPORO8-POPC, A REPRESENTAÇÃO DA ÁGUA TRANSLÚCIDA PASSANDO POR DENTRO DO LÚMEN, EM CONTATO COM AS LISINAS ASSINALADAS NA FIGURA. AS ESFERAS AMARELAS SÃO ÁTOMOS DE FÓSFORO DAS CABEÇAS FOSFOLIPÍDICAS DABICAMADA DE POPC.	87
FIGURA 56: RMSD DO <i>BACKBONE</i> DDKPORO6-POPC EM FUNÇÃO DO TEMPO DE 200 NS.....	88
FIGURA 57: RMSF DO <i>BACKBONE</i> DOS MONÔMEROS DO SISTEMA DDKPORO6-POPC EM FUNÇÃO DOS RESÍDUOS.	89
FIGURA 58: RMSD DO <i>BACKBONE</i> DOS 7 MONÔMEROS QUE FORMAM O PORO EM POPC.	91
FIGURA 59: RMSF DO <i>BACKBONE</i> DOS MONÔMEROS DO SISTEMA DDKPORO7-POPC.	92
FIGURA 60: RMSD DO <i>BACKBONE</i> DOS MONÔMEROS DO SISTEMA DDKPORO8-POPC	94
FIGURA 61: RMSF DO <i>BAKCBONE</i> DOS MONÔMEROS DO SISTEMA DDKPORO8-POPC.	95
FIGURA 62: DISTÂNCIA ENTRE OS MONÔMEROS E O CENTRO DE MASSA DO PORO COM 8 PEPTÍDEOS.	96
FIGURA 63: PORCENTAGEM DE PREVALÊNCIA TEMPORAL DE LIGAÇÕES HIDROGÊNIO ENTRE LISINAS E GRUPOS DE FOSFATOS DAS MOLÉCULAS DE POPC DO SISTEMA DD KPORO6-POPC.	97
FIGURA 64: REPRESENTAÇÃO DA INTERAÇÃO DA LISINA 23 COM O A MOLÉCULA 626 DE POPC DO SISTEMA DD KPORO6-POPC	98
FIGURA 65: PREVALÊNCIA TEMPORAL DAS LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO ENTRE OS ÁTOMOS DE NITROGÊNIO DA CADEIA LATERAL DAS LISINAS E OS ÁTOMOS DE OXIGÊNIO DO GRUPO FOSFATO DAS MOLÉCULAS POPC DO SISTEMA DD KPORO7-POPC	99
FIGURA 66: REPRESENTAÇÃO DA INTERAÇÃO DA LISINA 148 COM O A MOLÉCULA 286 DE POPC DO SISTEMA DD KPORO7-POPC	100

FIGURA 67: PERFIL DE DENSIDADE ELETRÔNICA DA BICAMADA POPC EM SISTEMA COM: A- CONTROLE B- PORO COM 6 PEPTÍDEOS, C- PORO COM 7 PEPTÍDEOS D- PORO PRÉ MONTADO COM 8 PEPTÍDEOS	101
FIGURA 68: DIFERENÇA DOS VALORES DA DENSIDADE DAS CABEÇAS DE FOSFOLIPÍDEOS DOS SISTEMAS $DDK_{2PEP-POPC}$, $DDK_{3PEP-POPC}$, $DDK_{4PEP-POPC}$, $DDK_{PORO6-POPC}$, $DDK_{PORO7-POPC}$, $DDK_{PORO8-POPC}$ EM FUNÇÃO DA DISTÂNCIA NO EIXO Z DA CAIXA DE SIMULAÇÃO. DESENHO EM DESTAQUE REPRESENTA O EIXO Z COMO REFERÊNCIA DA POSIÇÃO DAS ESTRUTURAS.....	103
FIGURA 69: PARÂMETRO DE ORDEM PARA CADEIA SATURADA DAS MOLÉCULAS DE POPC DOS SISTEMAS: $DDK_{PORO6-POPC}$ (PRETO), $DDK_{PORO7-POPC}$ (VERMELHO), $DDK_{PORO8-POPC}$ (AZUL), CONTROLE (VERDE)	104

Lista de Tabelas

TABELA 1: DESCRIÇÃO DOS SISTEMAS COM DD K EM ÁGUA E EM MISTURA TFE/ÁGUA (50%/50%, v/v)	41
TABELA 2: DESCRIÇÃO DA DM DO PEPTÍDEO DD K EM SOLUÇÃO AQUOSA E MISTURA TFE/ÁGUA.....	42
TABELA 3: DESCRIÇÃO DO SISTEMA DO PEPTÍDEO EM SOLUÇÃO AQUOSA EM DM.....	43
TABELA 4: DESCRIÇÃO DA QUANTIDADE DE MOLÉCULAS DO SISTEMA DD K _{TFE/ÁGUA}	44
TABELA 5: DESCRIÇÃO DO NÚMERO DE MOLÉCULAS DO SISTEMA DD K _{GSA-TFE/ÁGUA}	44
TABELA 6: SISTEMA DO DD K EM INTERFACE DE BICAMADA COM 512 MOLÉCULAS DE POPC.	47
TABELA 7: DESCRIÇÃO DOS SISTEMAS COM CONFORMAÇÕES DE PORO DE DD K EM BICAMADA DE POPC.....	53

Lista de Símbolos, Siglas e Abreviaturas

- Å – angström
- μ s – microssegundo
- AMP - *Antimicrobial Peptide*
- CSA - *Cauchy Simulating Annealing*
- FSA – *Fast Simulating Annealing*
- DD K- *dermadistinctina K*
- DM - *Dinâmica Molecular*
- DPC – *Dodecil fosfocolina*
- DPPC – *Dipalmitoilfosfatidilcolina*
- GROMACS – “*GR*Oningen *MA*chine for *C*hemical *S*imulations”
- GROMOS – “*GR*Oningen *M*olecular *S*imulation”
- GSA – “*Generalized Simulated Annealing*”
- LPS -*lipopolissacarídeo*
- MC – *Monte Carlo*
- MCM - *Monte Carlo-mais-minimização*
- ns – nanossegundo
- nm – nanômetro
- PDB – “*Protein Data Bank*”
- PME- *Particle Mesh Ewald*
- POPC - *1-palmitoil-2-oleoil-glicerol-3-fosfocolina*
- POPG - *1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfoglicerol*
- RMSD – “*Root Mean Square Desviation*”
- bRMSD – “*backbone Root Mean Square Desviation*”
- RMSF – “*Root Mean Square Fluctuation*”
- RMN: *Ressonância Magnética Nuclear*
- ROSIE: *Rosetta Online Server that Includes Everyone*
- SDS – *Dodecil sulfato de sódio*
- SPC – “*Simple Point Charge*”
- TFE – *Trifluoretanol*
- VMD – *Visual Molecular Dynamics*

Capítulo 1

Introdução

1.1 Peptídeos antimicrobianos

Estudos de peptídeos antimicrobianos (AMP's) são amplamente difundidos devido ao seu papel de defesa realizado no organismo em que os peptídeos são produzidos. (AZEVEDO CALDERON *et al.*, 2011; BEVINS & ZASLOFF, 1990; RATES *et al.*, 2011) Zasloff isolou o primeiro peptídeo antimicrobiano do anuro *Xenopus laevis*, a magainina, sendo o AMP mais estudado e o primeiro a destacar características importantes dessas estruturas (ZASLOFF, 1987).

Característica dos AMP's que interessam, do ponto de vista terapêutico, é sua antibiótica de amplo espectro, tanto contra bactérias Gram-positivas quanto bactérias Gram-negativas, fungos e vírus. (BOMAN, 2003) Essas estruturas apresentam menos problemas toxicológicos do que outras os fármacos no mercado, devido a novos mecanismos de ação e sua alta especificidade antimicrobiana. (BOMAN, 2003; HU, 2011) Sendo assim os AMP's parecem ser uma opção para novos antibióticos e uma saída contra a resistência a medicamentos antimicrobianos.

A resistência a agentes antimicrobianos é um problema de saúde pública enfrentado mundialmente como resultado do uso indevido de antibióticos, o que tem

como efeito a seleção de cepas resistentes de alta potencialidade que produzem epidemias e até pandemias, muitas vezes irreversíveis. O tratamento dos pacientes infectados se torna limitado uma vez que praticamente todos os medicamentos antimicrobianos no mercado geram resistência, sendo assim a prevenção é a única solução dada pela Organização Mundial de Saúde. (HAMILL *et al.*, 2008; WHO, 2015)

Os AMP's, de interesse terapêutico são pertencentes ao sistema imune inato de animais e plantas. (JENSSEN; HAMILL & HANCOCK, 2006) A melitina, por exemplo, pertencente ao veneno da abelha *Apis mellifera*, o peptídeo polybia-MP1, da espécie *Polybia paulista*, a crotamina constitui o veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, a catelicidina é um peptídeo de mamíferos e são achadas em neutrófilos. Os AMP's também são encontrados em plantas como os ciclotídeos, que consiste em peptídeos circulares. (MATSUZAKI; YONEYAMA & MIYAJIMA, 1997; RADIS-BAPTISTA & KERKIS, 2011)

Existem diferentes tipos de AMP's e sua estrutura é caracterizada de acordo com sua função e ação. São estruturas secundárias distintas formadas por sequência de resíduos de aminoácidos, que fazem interação entre si durante seu mecanismo de ação. (HANCOCK & SAHL, 2006), conforme ilustra a Figura 1.

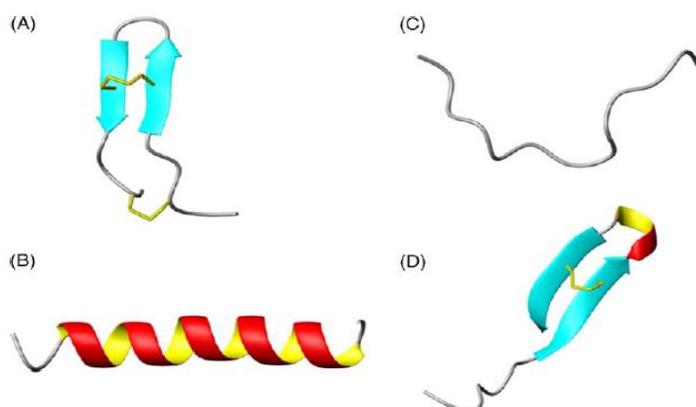


Figura 1: Tipos estruturais de peptídeos A) Folha Beta (taquiplesina) B) α -hélice (magainina) C) Estendida (indolicidina) D) Volta (thantina). As pontes de dissulfeto estão indicadas em amarelo. Figura desenhada no MOLMOL (POWERS & HANCOCK, 2003)

Essas estruturas são estabilizadas e caracterizadas por ligações intramoleculares, principalmente ligações de hidrogênio entre os grupos C=O e N=H da cadeia peptídica. As estruturas secundárias periódicas são formadas pela sequência de aminoácidos com os mesmos valores dos ângulos de rotação Phi (ϕ) para a rotação da ligação N-C α e Psi (Ψ) para a rotação da ligação C α -C. (NELSON & COX, 2008), ilustradas na Figura 2.

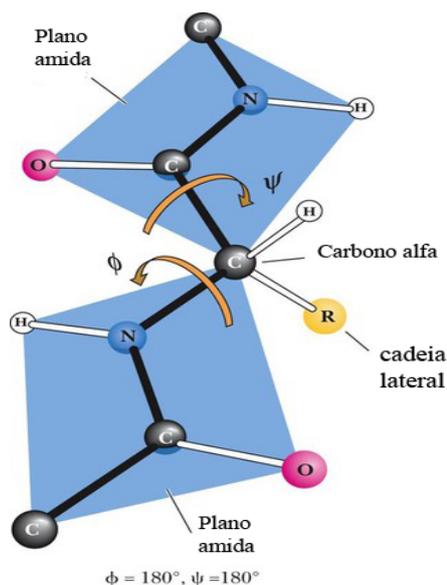


Figura 2: Representação da ligação peptídica com os ângulos do carbono α , Phi (ϕ) e Psi (Ψ) e a direção em que eles podem rotacionar. O plano azul é da ligação peptídica. Ilustração adaptada de: (GARRETT & GRISHAM, 1995)

1.1.1 Estrutura de folha β de peptídeos antimicrobianos

A estrutura β (Figura 1a) é formada quando duas ou mais sequências de aminoácidos se alinham lado a lado em um mesmo plano englobando os grupos C=O e N-H demonstrados na Figura 2. (KABSCH & SANDER, 1983) No entanto, a estrutura β possui ângulos de rotação com valores $\phi = -140$ e $\psi = +130$ e os resíduos de aminoácidos das cadeias adjacentes distam 3.5 Å entre si, em relação ao C α . Essas estruturas possuem uma sequência de 6 resíduos cada uma, formando um ângulo de 25° com o plano, constituindo uma estrutura pregueada, semelhante a um leque. Dentro desse grupo de

estruturas há 3 subgrupos: *I*) paralelas: quando duas seqüências de aminoácidos se alinham no sentido $N \rightarrow C$ ou $C \leftarrow N$; Figura 3A. *II*) antiparalelas: quando as duas seqüências divergem nos sentidos, uma fará o sentido $N \rightarrow C$ e a outra o sentido $C \leftarrow N$; Figura 3B *III*) mistas: quando há presença de paralelas e antiparalelas. (NELSON & COX, 2008) Os AMP's pertencentes a esse grupo são: taquiplesina (LIANG & KIM, 1999), bacterecina (SHAI, 2002) e defensina. (BATISTA *et al.*, 2001)

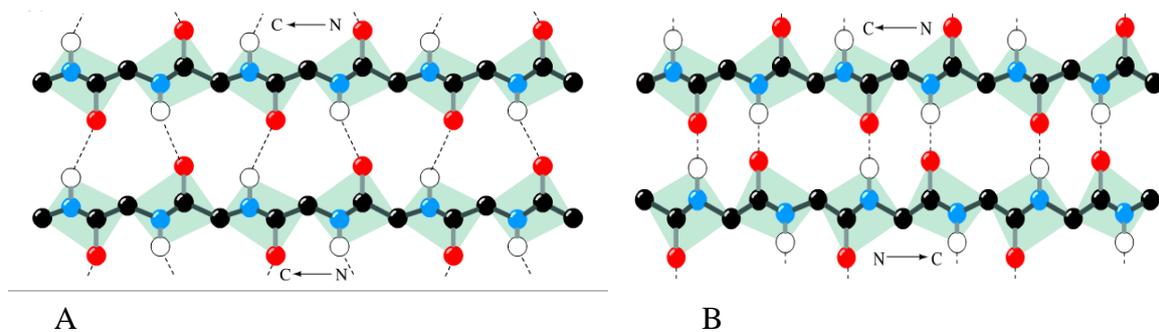


Figura 3: (A) Folha β paralela em sentido $C \leftarrow N$. (B) Folha β paralela uma seqüência em sentido $C \leftarrow N$ e a outra em sentido $N \rightarrow C$. Na figura o nitrogênio está colorido em azul, o carbono em preto e em vermelho o oxigênio (Ilustração retirada de <http://www.wiley.com/college/fob/quiz/quiz06/6-9.html>. Disponível em: 18/08/2015 às 11:15.

1.1.2 Estrutura de hélice- α de peptídeos antimicrobianos

O grupo de AMP de estrutura de hélice- α possui, como é característico dessas estruturas, 3,6 voltas/resíduos, tendo um resíduo a cada 100 graus de rotação ($360/3,6$) em torno do eixo da molécula. (Figura 4a). Possuem distância vertical de 5,4 Å entre os átomos estruturalmente equivalentes em cada volta e angulação de rotação de $\varphi = -57$ e $\psi = -47$ (Figura 4b). As ligações de hidrogênio para essa estrutura são feitas pelo C=O do resíduo i , que possui uma distância e orientação adequada com o grupo N-H do resíduo $i+4$ (4 resíduos de distância). A hélice formada é quiral, dextrográ e polar e os planos das ligações peptídicas são orientados quase paralelamente ao eixo da hélice. (NELSON & COX, 2008)

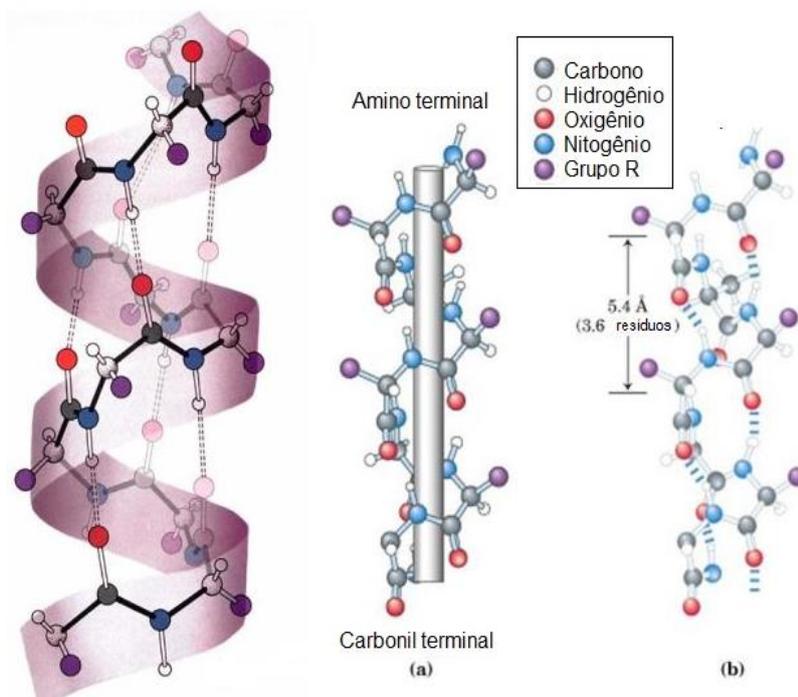


Figura 4: Estrutura de alfa-hélice. (a) α -hélice com ligações de C=O e N-H interagindo no próprio eixo da molécula. (b) Ligações intramoleculares da α -hélice, distância de 5,4 Å. Disponível em: <http://xray.bmc.uu.se/Courses/bioinformatik/Intro/Introduction.html> em 18/08/2015 às 13:55

1.1.3 Demais estruturas de peptídeos antimicrobianos

O grupo de peptídeos na Figura 1c são de estrutura estendida não periódica e geralmente compostos por um tipo de aminoácido específico exemplo: prolina e glicina. A indolicidina é um peptídeo de 13 resíduos que pertence a esse grupo. Esse é linear com grande porcentagem de resíduo triptofano (FALLA; KARUNARATNE & HANCOCK, 1996). O mecanismo de ação dessa molécula ainda é estudado. Uma hipótese é que possa agir em membrana biológica em canal dependente de voltagem. Por ser pequeno e ter uma estrutura incomum, acredita-se que ele não atravesse membranas biológicas (FALLA; KARUNARATNE & HANCOCK, 1996; POWERS & HANCOCK, 2003) .

A Figura 1d mostra uma estrutura em loop em que há uma única ligação dissulfeto. O representante mais conhecido desse grupo, é a tanatina, possui dois enantiômeros D- e L-tanatina que possuem ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e fungos, enquanto o L- é ativo contra Gram-negativas. (FEHLBAUM *et al.*, 1996)

Outra estrutura de peptídeo é a cíclica, onde há uma ligação covalente entre o amino terminal e o terminal carboxil (Figura 5) (MESH DATA, 2012). São também caracterizados pela quantidade de cargas em sua estrutura, a) os altamente carregados anionicamente e cationicamente; b) os não carregados, que contém cadeia muito lipofílica; c) peptídeos de polaridade mista, são anfifílicos mas não se limitam a alvos antimicrobianos; d) ciclotídeos ou proteína de nó de cisteína (*cystein-knot* protein).(BOCKUS; MCEWEN & LOKEY, 2013)

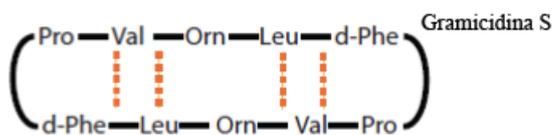


Figura 5: Peptídeo antimicrobiano circular: Gramicidina S.(BOCKUS; MCEWEN & LOKEY, 2013)

1.2 Mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos

A morte celular produzida por AMP's acontece principalmente por inibição das funções essenciais da membrana: Controle de entrada e saída de substâncias, delimitação estrutural da célula. Esses podem ser classificados pela ação na membrana celular: quando o antibiótico induz a morte celular é chamado de bactericida e quando inibem o crescimento celular é chamado de bacteriostático. Fármacos bactericidas inibem a síntese de DNA, RNA e a síntese da parede celular ou a síntese proteica. Contudo esses mecanismos são susceptíveis à geração de cepas resistentes a esses medicamentos (KOHANSKI; DWYER & COLLINS, 2010)

Os peptídeos que agem em membranas geralmente são pequenos e podem ser obtidos em larga escala e muitas vezes por síntese química. Contudo, há casos que são difíceis de se obter a estrutura final e por isso difícil de explicar o mecanismo de ação. (CRUZEIRO-SILVA *et al.*, 2007) Os AMP's mudam a conformação durante a aproximação para interação com a membrana, ocorrendo primeiramente uma ancoragem na membrana, podendo ocorrer ou não a ruptura da mesma. (CRUZEIRO-SILVA *et al.*, 2007; LEHRER & GANZ, 1999)

Em bactérias Gram-negativas a ação inicial dos peptídeos catiônicos é induzida pelo contato desses com os lipossacarídeos (LPS) (aniônicos) do folheto externo da membrana bacteriana, o que provoca uma diferença no potencial membranar bacteriano (-130 a -150 mV) quando comparado ao potencial membranar de mamíferos (-90 a -110 mV). (YEAMAN & YOUNT, 2003) E esse processo se chama *self-promoted uptake*. A hipótese é que a produção dessa diferença eletroquímica de potencial seja o mecanismo através do qual se produza a toxicidade seletiva da maioria dos peptídeos antimicrobianos. (HANCOCK, 1997) A carga positiva de peptídeos em pH fisiológico faz

interação inicial com o grupo aniônico da cabeça polar dos fosfolipídios e as propriedades hidrofóbicas permitem a interação com core hidrofóbico da membrana dos microrganismos. (CRUZEIRO-SILVA *et al.*, 2007; PESCHEL & SAHL, 2006; SATO & FEIX, 2006)

Há vários mecanismos envolvidos para os danos que esses peptídeos fazem às células, mas acredita-se que a primeira etapa do mecanismo na membrana é a interação eletrostática com o AMP. (CRUZEIRO-SILVA *et al.*, 2007; SATO & FEIX, 2006) Nem todos os peptídeos rompem membrana, mas podem causar a morte celular. (JENSSEN; HAMILL & HANCOCK, 2006; NGUYEN; HANEY & VOGEL, 2011)

Existem 3 modelos principais de mecanismos de ação de peptídeos por ruptura de membrana: formação de carpete (*carpet-like* ou *detergent-like*), modelo de barril (*barrel-stave*), poro toroidal (*toroidal pore*) (Figura 6)

Barrel-stave: A interação do peptídeo com a membrana também é dependente da concentração, esse mecanismo começa com um acúmulo de monômeros de peptídeos fazendo interação na membrana, efeito que diminui a espessura da membrana. Quando a concentração crítica de peptídeos é atingida, aglomerados formam o poro transmembranar do tipo barril, na qual a face hidrofóbica se alinha a parte da cadeia acila dos fosfolipídios da membrana e a face hidrofílica forma a superfície interna do poro para a passagem de íons, água, além de componentes intracelulares. (BECHINGER, 2004; KOZMA; SIMON & TUSNÁDY, 2013; SHAI, 2002) Esse modelo é considerado de formação rara durante a ação de peptídeos por isso a formação do poro toroidal, descrita a seguir, tem sido mais aceita como modelo.(YANG *et al.*, 2001) (Figura 6a)

O *carpet-like* é o mecanismo no qual o peptídeo faria interação com fosfolipídios da membrana, recobrando a superfície da membrana por peptídeos. Quando atingida uma concentração crítica a membrana se altera morfológicamente, se rompe e colapsa,

formando pequenos agregados de peptídeos e micelas como um efeito detergente. (HE & LAZARIDIS, 2013; SHAI, 1999) Esse mecanismo não envolve necessariamente a formação de poros, mas sugere-se que também pode ser a primeira etapa desse processo quando se trata de peptídeos cuja ação seja por formação de poro. (NGUYEN; HANEY & VOGEL, 2011) Alguns exemplos de peptídeos que realizam esse tipo de mecanismo são a dermaseptina S (SHAI, 2002; STRAHILEVITZ *et al.*, 1994) e outros análogos, cecropinas (GAZIT *et al.*, 1994, 1995) caerina (WONG; BOWIE & CARVER, 1997), o mastoparan X (GUO *et al.*, 2011; WHILES *et al.*, 2001) (Figura 6b)

Toroidal pore: é um modelo de mecanismo de ação que forma poro. Nesse os peptídeos agem também interagindo com as cabeças polares dos fosfolipídeos do folheto externo da membrana, o que induz a uma curvatura nessa estrutura e os aglomerados de peptídeos se inserem perpendicularmente formando o poro, ao mesmo tempo que ainda permanecem ligados aos fosfolipídeos (BOCCHINFUSO *et al.*, 2009; JENSSEN; HAMILL & HANCOCK, 2006; SHAI, 1999) (Figura 6C)

Além dos AMP's que ficam alinhados aos fosfolipídeos no poro toroidal clássico há também, o poro toroidal desorganizado em que a posição do peptídeo não obedece nenhuma ordem de entrada nem de alinhamento. (SENGUPTA *et al.*, 2008) Foi observado que os resíduos carregados no terminal-C do peptídeo apontaram ou para o interior do poro toroidal ou no sentido da camada de água de acordo com o modelo clássico como na Figura 7 (SENGUPTA *et al.*, 2008). O modelo de poro toroidal foi estudado em peptídeos como a magainina e a melitina. A cabeça dos lipídeos se mantém alinhados aos peptídeos formando o poro toroidal. (HOLT & KILLIAN, 2010; MATSUZAKI; YONEYAMA & MIYAJIMA, 1997; MATSUZAKI *et al.*, 1998; SENGUPTA *et al.*, 2008; VÁCHA & FRENKEL, 2014)

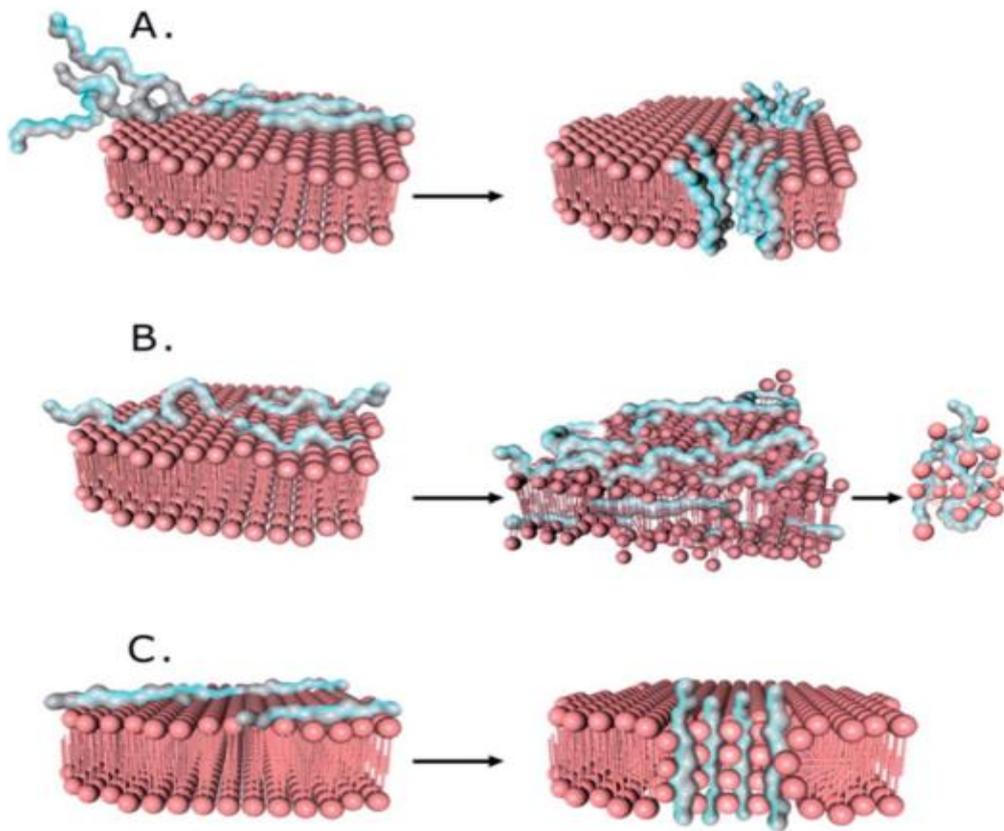


Figura 6: Representação dos modelos de ruptura de membrana provocados por AMP's. A- Modelo Barril ou Barrel-stave B- Modelo tapete ou Carpet-like C- Poro Toroidal. (HERZOG & FRIDMAN, 2014)

Outros eventos de mecanismo de ação de AMP's foram descritos além dos modelos clássicos citados (Figura 7). O que se tem observado é que o peptídeo antimicrobiano possui múltiplas formas de ação podendo ou não romper membranas. Pode ser um mecanismo clássico, mas com organização de diferentes peptídeos ou um conjunto de mecanismos provocado por um mesmo peptídeo. Isso deve-se por causa das diferentes estruturas dos peptídeos, composição de sequência, tamanho de cada peptídeo, além da variação conformacional durante a interação com a membrana. Como exemplo na Figura 7 os mecanismos de adelgaçamento e/ou espessamento, alguns mecanismos intermediários a camada lipídica, mecanismo de lipídio oxidado, que é causado pela própria aproximação do peptídeo. Geralmente o tamanho do peptídeo que causa ruptura

está de acordo com a espessura da membrana, ou seja, um peptídeo pequeno provavelmente não atravessará a membrana, e um peptídeo de mesmo tamanho que a espessura da membrana pode ter facilidade para realizar a inserção na mesma. (HANEY *et al.*, 2009)

A sequência de resíduos do peptídeo também é uma característica importante na penetração da membrana. Os peptídeos que possuem resíduo de triptofano em grande quantidade tendem a se inserir com mais facilidade, inclusive potencializando a ação do AMP em membranas de mamíferos, isso produz a citotoxicidade e torna o peptídeo desvantajoso (ZELEZETSKY & TOSSI, 2006).

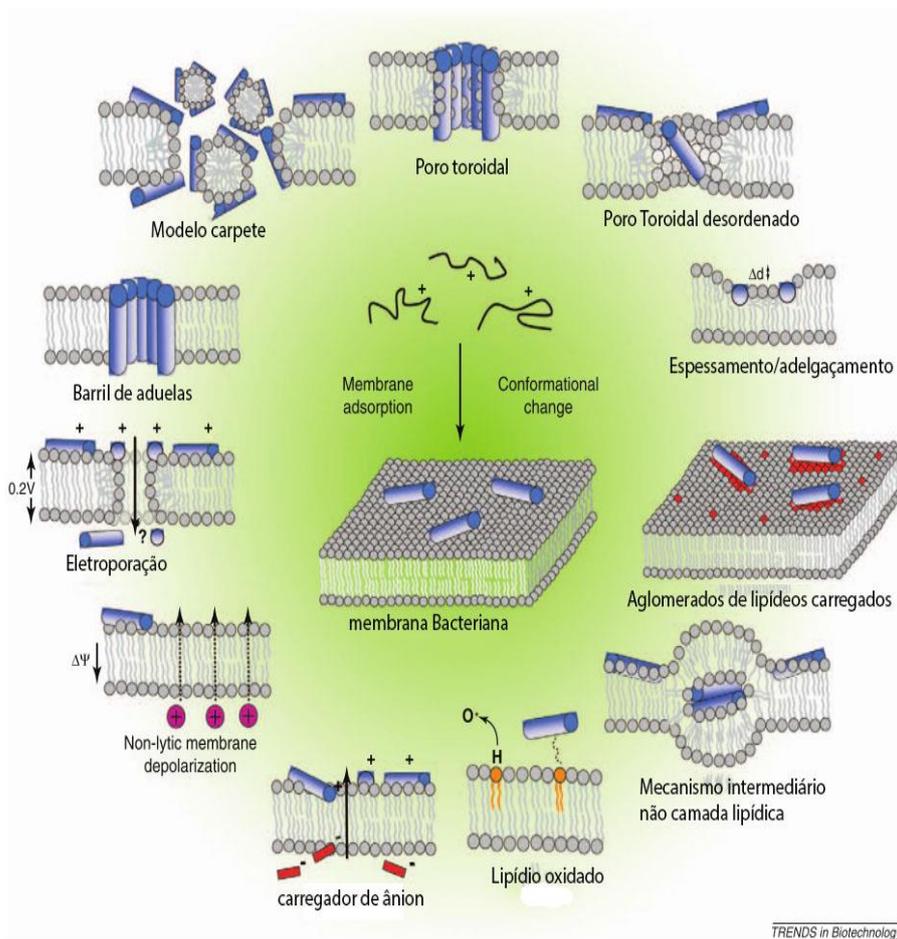


Figura 7: Diversos mecanismos de peptídeos antimicrobianos. Modificado de HANEY *et al.* 2009.

1.3 Peptídeo antimicrobiano Dermadistinctina K

O peptídeo antimicrobiano, alvo do estudo dessa tese, é proveniente da pele do anuro da família Hylidae, o *Phyllomedusa distincta* (Figura 8). A família Hylidae possui 51 gêneros, uma das maiores entre anuros. A sub-família Phyllomedusinae possui 57 espécies com 7 gêneros: Agalychnis, Cruziohyla, Hylomantis, Pachymedusa, Phasmahyla, Phrynomedusa e Phyllomedusa. (AZEVEDO CALDERON *et al.*, 2011; NICOLAS & EL AMRI, 2009)

Há mais de 900 peptídeos bioativos em defesa de eucariotos descritos da América do Sul, Europa, Ásia e América do Norte. Apesar do grande número de espécies apenas 80 peptídeos antimicrobianos têm sido isolados de onze espécies da sub-família Phyllomedusinae. (NICOLAS & EL AMRI, 2009) A espécie *Phyllomedusa distincta* anuro está presente principalmente na América do Sul, no Brasil, na região de mata Atlântica. Esse habitat tem sido diminuído por causa de desmatamento, ameaçando de extinção essa espécie e às demais, muitas ainda não descritas até o momento. Em vários locais do estado de Santa Catarina essa espécie já não se encontra mais. (RÃ-BUGIO, 2015)



Figura 8: *Phyllomedusa distincta* (foto de Germano Woehl Jr)

O peptídeo DD K é pertencente à superfamília de peptídeos dermaseptina, que são potentes peptídeos antimicrobianos e tem algumas características em comum:

- São catiônicos lineares;
 - Possuem quantidade maior de lisinas;
 - Possuem triptofano na posição 3 da sequência.
 - Formam hélice- α com um lado polar e carregado, constituindo principalmente por lisinas e outro não-polar. Por essa razão são moléculas anfipáticas, que é uma característica crucial para a atividade antimicrobiana desses peptídeos.
 - Apesar das similaridades, cada dermaseptina possui diferentes níveis de atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, fungos e protozoários.
- (AMICHE & GALANTH, 2011; RIVERO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2008)

O poder de ação desses peptídeos é determinado pela composição do potencial transmembranar da bactéria, polarização e características estruturais bem como a composição de aminoácidos dos peptídeos. Os peptídeos possuem uma assinatura padrão, um consensus AA(A/G)KAAL(G/N)A na região mediana. (NICOLAS & EL AMRI, 2009)

É essencial que os peptídeos antimicrobianos possuam seletividade tóxica para apenas alvos microbiológicos e não células de mamífero. Em um teste de hemólise o dermadistinctina L (DD L) demonstrou atividade hemolítica maior em uma concentração de 12,5 μM , enquanto uma mistura com DD K acusou ser hemolítico com 48,5 μM . É necessário que o peptídeo tenha essa concentração acima de 32 μM para ser considerado seletivo à células vermelhas. (BATISTA *et al.*, 1999, 2001)

Peptídeos antimicrobianos devem interagir em menor concentração com membranas carregadas negativamente em maior concentração com membranas neutras, que é o caso das membranas e eritrócitos. Os peptídeos que se ligam e permeiam

membranas neutras, esses são potencialmente hemolíticos. (GAZIT *et al.*, 1994; SHAI, 2002)

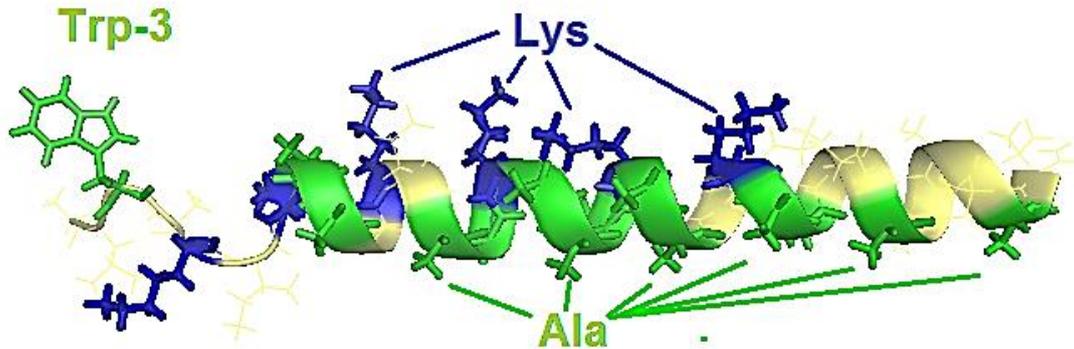


Figura 9: Estrutura do DD K com 33 resíduos obtida por RMN. Em verde resíduos hidrofóbicos de alaninas e o triptofano da posição 3, que é característico da família do peptídeo e em azul são os resíduos carregados positivamente, as lisinas. (PDB:2JX6, edição PyMol)

1.3.1 Estrutura molecular tridimensional do DD K

GLWSKIKAA GKE AAKAAAKAA GKAA LNA VSEA V-NH₂ é a sequência do peptídeo linear DD K com 33 resíduos. A sequência do DD K¹ obedece ao padrão das dermaseptinas já citado sendo que essa composição de resíduos pode estar relacionada com o mecanismo desse peptídeo. Como assinalado na Figura 9, o peptídeo DDK possui duas características importantes que dividem sua estrutura: carga positiva dada pelas lisinas assinaladas em azul e a hidrofóbica dada pelas alaninas e o triptofano assinalados em verde. (VERLY *et al.*, 2009)

¹ DD K de número de acesso P83638 (Uniprot) é idêntico ao DRSJ7 em uma espécie de anuro chamada *Phasmahyla jandaia* com número de acesso de P86639, mas essa sequência não possui estrutura determinada. (RATES *et al.*, 2011)

Essa estrutura mostra um triptofano na posição 3, em estudos prévios comprovou-se que é um resíduo de interface, o que permitiria durante o mecanismo de ação, a interação com a bicamada, mas essa parte não helicoidal do peptídeo não se inseriria na mesma. (YAU *et al.*, 1998)

O estudo de preferências estruturais do peptídeo foi feito por Dicroísmo Circular (CD) mostrou que em água predomina a não estruturação, já nas micelas de dodecilsulfato de sódio (SDS), micelas de dodecilsulfocolina (DPC), a preferência é de estrutura de hélice- α , a helicidade chega a 70% e 80% respectivamente e em solvente trifluoretanol com água (TFE/água – 50%/50%, v/v) a helicidade é de 80 %, maior que em concentrações com soluções alcólicas já utilizadas para determinação de padrões de estrutura secundária com o DD K. (SILVA *et al.*, 2008) Também foram utilizadas as membranas modelos: 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (POPG) e de 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC). O DD K apresenta helicidade maior na POPG (75%) do que na POPC (52%). (VERLY *et al.*, 2009)

O grupo do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química do ICEX, da Universidade Federal de Minas (UFMG) determinou a estrutura por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). O peptídeo mostrou flexibilidade do resíduo 1 ao 8 por não possuir estrutura definida e do resíduo 9 ao 33 uma estruturação de hélice- α . Essa estrutura possui uma amida no terminal-C, região que possui maior estruturação do que o terminal-N que inclui Trp-3 e Ser-4. (VERLY *et al.*, 2008, 2009)

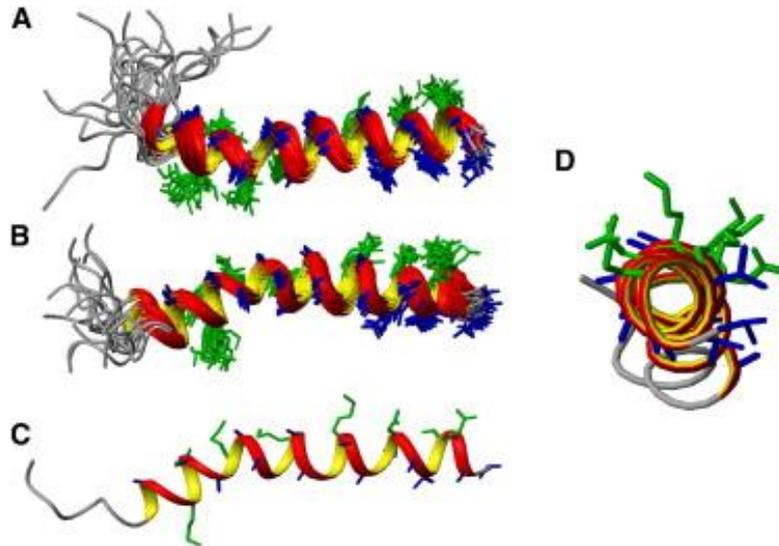


Figura 10: A - Estrutura de RMN em solução de TFE/água 50:50 v/v, B-D em uma solução micelar de DPCd38 em água. A e B são as 20 conformações de menor energia. Os resíduos hidrofóbicos estão identificados em azul e os hidrofílicos em verde. C e D (corte transversal) é a estrutura de menor energia em presença de detergente (figura obtida de VERLY *et al.*, 2009)

A estrutura helicoidal do peptídeo determinada por RMN ao ser observada no corte transversal fica ainda mais evidente a separação de faces do peptídeo, hidrofílica (em azul) com os resíduos de lisina e os resíduos hidrofóbicos: alanina e triptofano (verde) que pertencem a face hidrofóbica dando a característica anfipática à estrutura. A menor espessura da forma helicoidal é entre os resíduos 5-23 e a maior nos resíduos 24-33. (VERLY *et al.*, 2009)

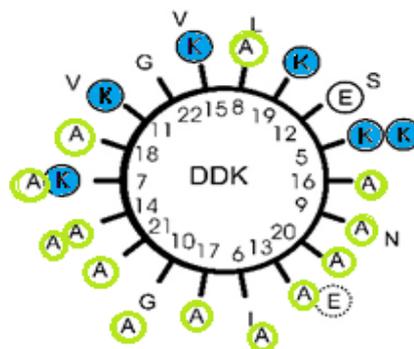


Figura 11: DD K em corte transversal com a face carregada positivamente circulado e lisinas destacadas em azul. Alaninas destacadas em verde, representando a face hidrofóbica. O resíduo E-31, circulado no pontilhado, é desestruturado ou distorcido em bicamadas, entrando provê uma estrutura mais anfífilica ao polipeptídeos. (modificada de VERLY *et al.*, 2009)

1.3.2 Atividade antimicrobiana e atividade hemolítica do DD K

O peptídeo DD K também se destaca pelo amplo espectro de ação que possui. Junto a ele foram sintetizados o DD L e DD Q1 e todos foram testados quanto sua atividade antimicrobiana contra: *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. A concentração mínima inibitória (MIC), definida como a mínima quantidade de peptídeos capaz de inibir o crescimento bacteriano, obteve valor para DD K contra *E. coli* de 0,6 μM , contra *P. aeruginosa* de 2,4 μM , *S. aureus* de 4,7 μM , já para *E. faecalis* > 19,0 μM , sendo que esses valores foram menores que os valores dos demais peptídeos testados. (BATISTA *et al.*, 1999) Como anti-*Trypanosoma cruzi* o DD K também mostrou ação lítica para tripomastigota quando encubado com concentração acima de 4 $\mu\text{g/mL}$ por 2h com as células do protozoário. (BRAND *et al.*, 2002)

Também foi comprovada a baixa atividade hemolítica do peptídeo DD K, devido ao efeito do colesterol na interação do DD K com vesículas unilamelares grandes (LUVs) de fosfatidilcolina (PC) com e sem colesterol por medidas da cinética de extravasamento de carboxifluoresceína (CF). O resultado foi que o DD K foi capaz de interagir fortemente com vesículas sem colesterol, mas de forma fraca com as que apresentavam colesterol. Uma vez que hemácias possuem grande quantidade de colesterol esse resultado comprovou sua seletividade de ação, o que aponta também para a ação em membranas de tripomastigota que também possuem em sua composição PC.(VERLY *et al.*, 2008)

1.4 Modelos de lipídeos

Biomembranas são formadas por uma dupla camada de fosfolipídios que possuem características anfipáticas. (ALBERTS , B. JOHNSON, A. LEWIS, 2002) Essas

estruturas ficam em contato com a água pela porção hidrofílica, e sua porção hidrofóbica, a cadeia de ácido graxo, controla a permeabilidade da célula. Essa anfipatia é o elemento fundamental na própria organização da bicamada. (ALBERTS , B. JOHNSON, A. LEWIS, 2002; NELSON & COX, 2008)

A importância da membrana para o organismo se dá pela sua capacidade de conformar a menor unidade funcional, a célula, unindo organelas e criando sistemas individualizados. A membrana também realiza o controle da homeostase intracelular: por exemplo em temperaturas altas a membrana fica mais fluida e aumenta a permeabilidade de matéria e informação. Já em baixas temperaturas, a membrana se torna menos fluida, podendo congelar a célula (ALBERTS , B. JOHNSON, A. LEWIS, 2002).

As bactérias podem ser divididas entre Gram-positivas e Gram-negativas, cuja diferença entre esses grupos está, entre outros aspectos na estrutura de sua membrana. A bactéria Gram-positiva possui dupla camada de peptidoglicano (polissacarídeos ligados à pequenos peptídeos de 3 resíduos), que formam um exoesqueleto para a proteção contra lise. As Gram-negativas, como a *Escherichia coli*, é cercada por uma camada de polissacarídeos. (ALBERTS , B. JOHNSON, A. LEWIS, 2002) As membranas são formadas por fosfolípidios em sua maioria fosfatidiletanolamina (70-80%), fosfatidilglicerol e cardiolipina, distribuídos de maneira uniforme tanto na membrana interna quanto externa. (KOEJNIK; LOCHER & VAN GELDER, 2000)

A representação dos modelos de peptídeo-membrana *in vitro* e *in silico* ainda tem limitações de representação em comparação aos modelos *in vivo*. Estamos trabalhando com um modelo *in silico* de peptídeo-membrana que depende de condições específicas: como o pH, temperatura e concentração mínima (SANDERSON, 2005).

A formação de membrana modelo e micelas ocorre por *self-assembly* ou auto-agregação das moléculas anfifílicas em água devido ao efeito hidrofóbico, e a estrutura

formada é sempre resultante de uma redução da tensão superficial e da minimização da Energia Livre de Gibbs. (FENDLER, 1980; PORCELLI *et al.*, 2006)

Algumas estruturas utilizadas em estudos com peptídeos são:

- *Dodecilsulfato de sódio (SDS) e Dodecilmfosfolina (DPC* (Figura 12)): SDS é um surfactante aniônico, enquanto DPC é um lipídeo zwitterionico. (PORCELLI *et al.*, 2006) O peptídeo DDK foi analisado em NMR tanto na presença de SDS-d₂₅ com a concentração de 400 mM e na mesma concentração com DPC-d₃₈ quando os espectros foram comparados aos ensaios com água e com TFE a 50%. Em presença de micela SDS e DPC o DD K se associa, pois, os sinais de ressonância apresentam-se alargados, devido ao aumento em seu tempo de correlação rotacional. Essa associação se dá pela interação das cargas negativas do detergente com as cargas positivas do peptídeo catiônico DD K (VERLY *et al.*, 2009)

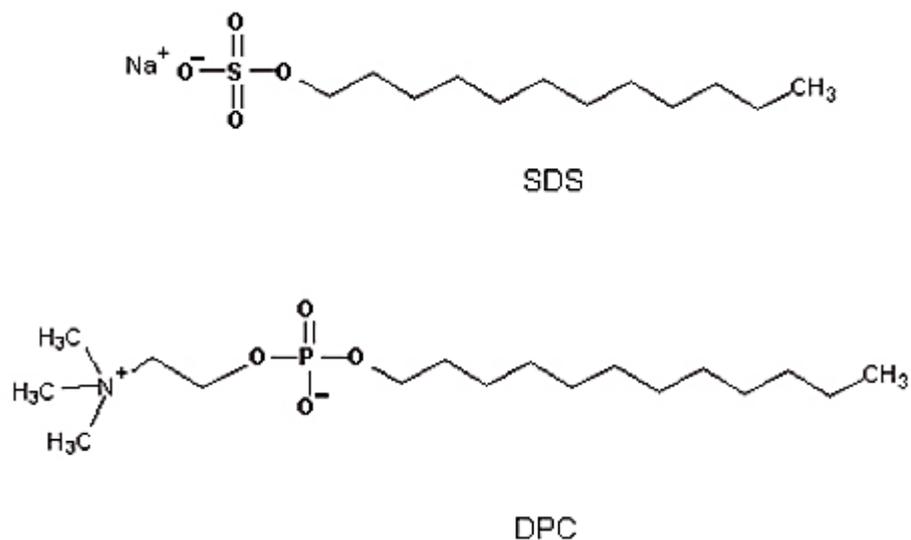


Figura 12: Estrutura de moléculas de SDS e DPC, ambos detergentes formadores de micelas.

- *Palmitoiloleilfosfatidilglicerol* (POPG): estrutura lipídica carregada negativamente. Possui em seu grupo cabeça uma molécula de glicerol. Também como já citado foi utilizado com o DD K por espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD), apresentando maior helicidade e uma extravasamento do líquido interno da micela. (VERLY *et al.*, 2009)

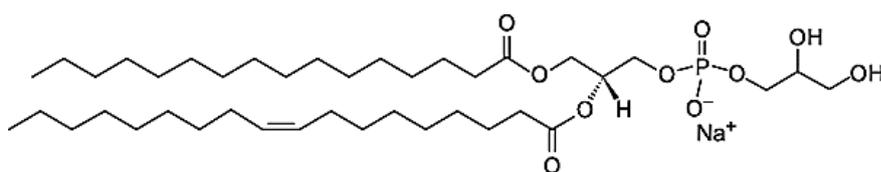


Figura 13: Estrutura molecular de *Palmitoiloleilfosfatidilglicerol*- POPG

- *Palmitoiloleilfosfatidilcolina* (POPC): é uma estrutura de fosfolipídio ou glicerofosfolipídeos, é anfipática com cabeça polares e caudas com átomos de carbono, sendo uma das caudas insaturada. (CHENG *et al.*, 2009)

POPC com concentração de 1mmol.L^{-1} em forma de LUVs foi calculado um conteúdo de hélice de 52% do DD K.

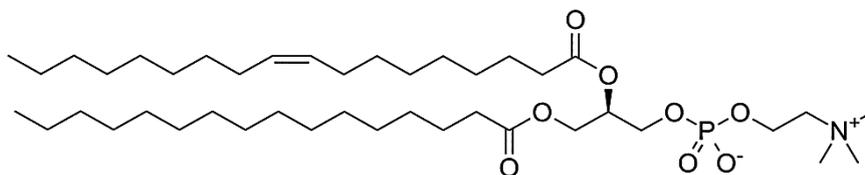


Figura 14: Estrutura de Palmitoioleilfosfatidilcolina- POPC.

Utilizamos dados experimentais do artigo de Verly et. al. sobre a determinação da estrutura por RMN e análise por Dicroísmo Circular na escolha do tipo de membrana modelo, a POPC que foi, utilizada como modelo. Os estudos com TFE/água também foram relevantes pois pudemos adequar as características físico-químicas do ambiente da simulação. (VERLY *et al.*, 2009)

O peptídeo DD K é descrito na literatura com muitos atributos estruturais, também faz parte de uma família de peptídeos que possui um amplo espectro de ação e experimentos comprovam sua interação com membrana modelos, no entanto, não está claro qual seu mecanismo, como sua estrutura efetivamente pode contribuir para interação membrana-peptídeo e se desconhece o tipo de poro que o peptídeo DD K pode fazer na membrana.

Capítulo 2

Objetivos

2.1 Geral

- O objetivo desse trabalho foi contribuir para elucidação do mecanismo de interação do peptídeo Dermadistinctina K em bicamada de POPC visando oferecer suporte ao desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos para uso clínico.

2.2 Objetivos específicos

- Descrição da dinâmica do peptídeo DD K em mistura TFE/água
- Contribuir para o estabelecimento de protocolo para construção de modelos de peptídeo-membrana combinando os métodos de *Generalized Simulated Annealing* e Dinâmica Molecular.
- Investigar o efeito de diferentes concentrações de peptídeos na presença de bicamada POPC.
- Caracterização de poros formados pelo peptídeo DDK em bicamada POPC.

Capítulo 3

Metodologia

3.1 Estudo *in silico* de peptídeos antimicrobianos

As características dos peptídeos como a sequência de aminoácido, as estruturas, a função e a ancestralidade são descritas em vários bancos de dados. Nesse trabalho foi possível conhecer plataformas importantes para a avaliação das estruturas de peptídeos, como as citadas no ANEXO I. (AMARAL *et al.*, 2012; WANG & WANG, 2004)

Há interfaces *web* com diversos algoritmos que abordam peptídeos nos campos do genoma, transcriptoma e proteoma, como o ExPasy (SIB Bioinformatics Resource Portal) (ARTIMO *et al.*, 2012). Esse portal possui o FindPept, que identifica peptídeos que são de origem de uma clivagem inespecífica de proteínas. (GATTIKER *et al.*, 2002)

Devido à importância de peptídeos, é necessário catalogar características como efeito terapêutico, mecanismo de ação, estrutura peptídica, sequências, o espectro de ação e o organismo de origem. Muitos desses peptídeos pertencem a espécies de animais e plantas de regiões com a biodiversidade em franca destruição, colocando essas espécies em extinção sem a chance de explorar seu potencial biotecnológico. Destaca-se assim a importância em catalogar e utilizar algoritmos que possam guardar e gerenciar informações dessa biodiversidade.

O banco de dados Protein DataBank (PDB) é uma plataforma em que são depositados estruturas de proteínas e peptídeos que tenham sido determinadas por técnicas experimentais como Cristalografia e Difração de Raios-X e Ressonância

Magnética Nuclear RMN (JOOSTEN *et al.*, 2011). A estrutura do DD K (Figura 9) foi obtida por RMN, cujas informações foram depositadas no PDB: 2JX6. RMN é aplicada para moléculas pequenas em solução em que pode se analisar o comportamento dinâmico da estrutura. (UNNERSTÅLE, 2010)

Existem alguns bancos de dados específicos para AMP's como o PEPbank do Hospital de Massachusets, o Antimicrobial Peptide Databank (APD), descreve as sequências, determina se já foi depositada estrutura do peptídeo, descreve o espectro de ação, se tem efeito nas principais bactérias conhecidas, de que organismo foi extraído e a qual família pertence. (CHEN *et al.*, 2013; SHTATLAND *et al.*, 2007; WANG & WANG, 2004)

A bioinformática é a área que aborda qualquer área do conhecimento que envolve técnica computacional aplicada ao estudo de sistemas biológicos, abrangendo sequências de nucleotídeos e aminoácidos a estrutura e dinâmica de proteínas. (VERLI, 2014) Assim abordamos nesse trabalho técnicas como a Dinâmica Molecular e o *Generalized Simulating Annealing* (GSA).

3.2 Dinâmica Molecular

As moléculas vão além de um sistema estático e a Dinâmica Molecular é uma técnica computacional que pode ser usada para predição ou refinamento de estruturas, dinâmicas de complexos moleculares, planejamento de fármaco e investigação da ação de sistemas moleculares biológicos. (MORGON & COUTINHO, 2007)

Dessa forma é possível obter informações dos sistemas moleculares como geometria molecular e energias: principais flutuações atômicas, flutuações locais (formação e quebra de ligações de hidrogênio, padrões de interação com água/soluto/íon ou movimento de esqueleto de estruturas como proteínas), mudanças de conformação,

energia livre e movimentos de natureza diversa de moléculas. Isso tornou a Dinâmica Molecular uma técnica popular por causa da simplicidade essencial e física, que possui complementos computacionais diversos para explorar propriedades estruturais e dinâmicas. Essa técnica utiliza a Mécânica Clássica, que tem por base as leis de Newton (SCHLICK, 2010).

Conforme descreveu MORGON, N. H.; COUTINHO, K. (2007, p.414, grifo nosso) “[...] se determina os movimentos de partículas de qualquer sistema, do qual se conhecem o potencial de interação entre estas partículas e as equações que regem seu movimento”, bem como suas posições iniciais.

As forças harmônicas ou elásticas atuam sobre cada átomo das moléculas e são calculadas pela derivada do potencial em relação às posições desses átomos. Essas forças dão origem às acelerações que são atribuídas à equação de movimento e assim são estudadas as posições atômicas ao longo do tempo. A cada passo esse movimento é revisado exigindo um processo iterativo, empregando termos de energia potencial simples, para cálculo rápido e com relativa acurácia. (NAMBA; SILVA & SILVA, 2008; SCHLICK, 2010)

De acordo com a Segunda Lei de Newton (equação 1), é simulado o movimento de um sistema em que a força sobre um átomo i é dada pela sua massa vezes sua aceleração.

$$\mathbf{F}_i = m_i a_i \text{ (eq.1)}$$

O potencial de interação entre os átomos do sistema, V_T , é descrito no item 3.2.1– Campo de Força. A derivada do potencial de interação em relação à posição atômica resulta na força sobre um determinado átomo i conforme a equação 2.

$$\mathbf{F}_i = -\frac{dV_i}{dr_i} \text{ (eq.2)}$$

Combinando com a equação 1 obtém-se a aceleração do átomo i (equação 3):

$$\mathbf{a}_i = \frac{F_i}{m_i} = -\frac{1}{m_i} \frac{dV_i}{dr_i} \text{ (eq.3)}$$

Esta é necessária para o cálculo da velocidade do átomo i (equação 4):

$$\mathbf{v}_i = v_{0i} + \mathbf{a}_i t \text{ (eq.4)}$$

Por sua vez, a equação 4 possibilita calcular a trajetória do átomo i, pela variação temporal de suas posições (equação 5):

$$\mathbf{r}_i = r_{0i} + \mathbf{v}_i \cdot t \text{ (eq.5)}$$

Todas essas equações explicadas de forma didática aqui, são equivalentes a integração de *leapfrog*, que é o método de integração de equações diferenciais em sistemas dinâmicos na mecânica clássica. (HOCKNEY & EASTWOOD, 1981)

A Dinâmica Molecular permite representar um sistema biológico e acompanhar sua evolução temporal, através do cálculo de posições de átomos das moléculas. Esse cálculo é feito através de uma aproximação clássica de parâmetros empíricos, chamada de campo de força (SCHLICK, 2010).

3.2.1 Campo de força

O campo de força empírico é uma representação cálculo da energia potencial de acordo com a Mecânica Clássica. Não levando, portanto, em conta o cálculo de posição de elétrons e sim de núcleos de átomos. A abordagem de sistemas moleculares mais precisa seria pela Mecânica Quântica, empregando a equação de Schrödinger. No entanto, a escala de tempo atual para estudos de dinâmica com essa abordagem é de picossegundos (ps), o que torna inviável para o cálculo do movimento de sistemas de macromoléculas

para maioria das aplicações. Por essa razão usa-se uma aproximação clássica da física, representando interações moleculares por funções potenciais clássicas. (NAMBA; SILVA & SILVA, 2008; SCHLICK, 2010)

Os sistemas biológicos possuem geralmente dezenas ou centenas de milhares de átomos representados nas simulações, como esferas de van der Waals com uma massa e uma carga pontual. Essa representação é descrita nos campos de força de forma simples devido à limitação computacional. (VERLI, 2014)

Segundo a IUPAC, campo de força é um método empírico de cálculos que tende a estimar a energia e a estrutura de diferentes conformações de moléculas. O método é baseado na adição de termos que consideram o comprimento e ângulos de ligações, torções em ligações com liberdade de giro e interações atrativa e/ou repulsiva de van der Waals e dipolares entre átomos não ligados, e é também chamado de cálculo de mecânica molecular (GOLD, 2014).

A equação 6 mostra um típico campo de força que é a somatória de todos os potenciais dando a energia potencial total ($V_{(T)}$):

$$V_{(T)} = V_b + V_\theta + V_\phi + V_\xi + V_{LJ} + V_{el} \text{ (eq. 6)}$$

a) Potencial harmônico para ligação

Esse potencial é baseado na lei de Hooke, e descreve as vibrações em torno do comprimento de equilíbrio entre dois átomos ligados covalentemente (b_0) usando uma constante de ligação ou de mola (K_b) (equação 7 e Figura 15):

$$V_b = \frac{1}{2} K_b (b - b_0)^2 \text{ (eq.7)}$$

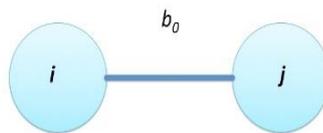


Figura 15: Representação da ligação covalente de dois átomos i e j no comprimento b_0 .

b é a distância entre o átomo i e o átomo j em um momento qualquer, b_0 é o comprimento de equilíbrio da ligação e K_b é a constante elástica da força, constante de Hooke, Figura 15.

b) Potencial harmônico angular

Esse termo (equação 8) mantém o ângulo de ligação entre átomos i - j - k , que são ligados de forma covalente e consecutiva, tomando uma conformação de equilíbrio (Figura 16).

$$V_\theta = \frac{1}{2} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \text{ (eq.8)}$$

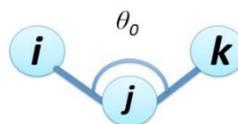


Figura 16: Representação do Potencial harmônico angular entre os átomos i - j - k

Na equação 8 referente a Figura 16 o θ é o ângulo entre duas ligações consecutivas e o θ_0 é o ângulo de equilíbrio entre as ligações químicas. K_θ é a constante elástica, que faz a restituição da força ao ângulo de equilíbrio. O valor do θ_0 dependerá de fatores como hibridação de orbitais atômicos e simetria da região onde está a molécula.

c) Potencial diédrico impróprio

Esse potencial se refere a integração de quatro átomos, i-j-k-l e ξ é ângulo entre os dois planos formados pelos átomos i-j-k e i-l-k e ξ_0 é seu ângulo de equilíbrio.

(Equação 9) (Figura 17)

$$V_{\xi} = \frac{1}{2} K_{\xi} (\xi - \xi_0)^2 \text{ (eq.9)}$$

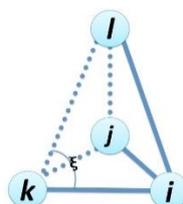


Figura 17: Representação do Potencial diédrico impróprio que se refere a interação nos átomos i-j-k-l.

Esse potencial tem por objetivo manter a estrutura tridimensional do conjunto desses quatro átomos de forma planar em $\xi = 0^{\circ}$ ou de forma tetraédrica $\xi = 35,25^{\circ}$, sendo K_{ξ} a constante de Hooke para restituição desses ângulos de equilíbrio.

d) Potencial torcional ou diédrico próprio

Representa a torção própria (rotações) de ligações covalentes com liberdade de giro. Existem dois planos definidos, o primeiro pela ligação i-j-k e o segundo pelo plano j-k-l e a rotação da ligação j-k (Figura 18) é dado pela equação 10, Figura 18.

$$V_{\varphi} = K_{\varphi} [1 + \cos(p\varphi + \delta)] \text{ (eq.10)}$$

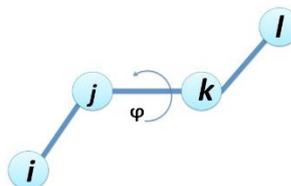


Figura 18: Representação do Potencial torcional.

K_{φ} é a constante de força, p periodicidade do potencial e δ é a fase.

e) Potencial de Lennard-Jones

Átomos não ligados, ou separados por 3 ou mais ligações são tratados por potenciais que levam em conta suas nuvens eletrônicas. Apesar de não haver reações químicas, há uma atração e repulsão. A dispersão de London que é modelado pelo termo em r^{-6} , descreve interações atrativas de curto alcance e a parte repulsiva é calculada pelo termo de repulsão de van der Waals cm dependência em r^{-12} .

σ_{ij}^6 e σ_{ij}^{12} são parâmetros que controlam a distância interatômica entre um par de átomos não ligados e ϵ controla a profundidade do poço de energia entre eles, como ilustrado na Figura 19 e equação 11.

$$V_{LJ} = 4\epsilon \left[\frac{\sigma_{ij}^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{\sigma_{ij}^6}{r_{ij}^6} \right] \text{ (eq.11)}$$

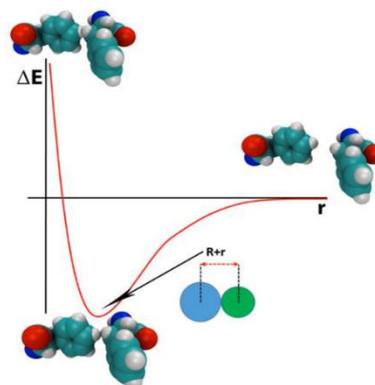


Figura 19: Representação do Potencial de Lennard-Jones

O cálculo de interação entre átomos não ligados é custoso computacionalmente na DM, enquanto o número de termos ligados (ângulos, ligações) é proporcional ao número de átomos, o de interações não ligadas é aumentado como função do quadrado do número de átomos do sistema. Assim cálculos da dinâmica de sistemas biológicos como o de mecanismos de ação de peptídeos em membranas se tornam muito demorados.

É necessário baixar o custo computacional para viabilizar a simulação, por isso utiliza-se um *cut-off* a partir de determina distância. (LEACH, 2001)²

f) Potencial de Coulomb

O Potencial de Coulomb é um potencial que representa distribuições internas de cargas parciais e é calculado entre átomos não ligados diretamente. Esse potencial é modelado de acordo com a lei de Coulomb. Por isso a energia eletrostática depende da carga atômica e a intensidade da força entre elas varia com inverso da distância entre os átomos i e j . Esse é um termo de longo alcance, sendo descrito pela equação 12 e Figura 20.

$$V_{el} = \sum_i \sum_{j>i} f \frac{q_i q_j}{r_{i,j}} \text{ (eq. 12)}$$

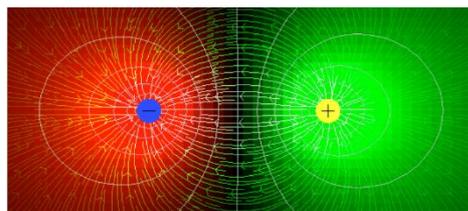


Figura 20: Representação da equação do Potencial de Coulomb. Os círculos são linha de isopotencial e as setas demonstram a direção do campo.

q_i e q_j são cargas parciais, que representam a distribuição eletrônica dos átomos i e j , r é a distância de separação entre os átomos. f é a relação $\frac{1}{4\pi\epsilon_m}$, onde ϵ_m é a permissividade dielétrica do espaço onde se encontram as cargas, sendo de $\epsilon_m = \epsilon_r \epsilon_0$, onde ϵ_r é a constante dielétrica do meio e ϵ_0 é a permissividade dielétrica do vácuo (SHEINERMAN; NOREL & HONIG, 2000).

Existem vários exemplos de campos de força como: AMBER (PEARLMAN *et al.*, 1995), GROMOS (VAN GUNSTEREN & BERENDSEN, 1987), CHARMM

² *Cut-off*: Raio de corte para interações não ligadas.

(BROOKS *et al.*, 1983), OPLS (KAMINSKI *et al.*, 2001). O GROMOS é um campo de força átomo unido (*united atom*), o qual trata os átomos de hidrogênio não polares e alifáticos como parte de um átomo maior; unidos ao átomo a que estão ligados. Átomos de hidrogênio em anéis aromáticos e átomos de hidrogênio polares são tratados explicitamente. O GROMOS foi o campo de força utilizado nesse trabalho. (OOSTENBRINK *et al.*, 2004)

3.2.2 Minimização de energia

Há dois modos de minimização de energia em sistemas moleculares o local e o global. O uso de algoritmos como Steepest Descent e Gradientes Conjugados leva aos mínimos locais de energia mais próximos e com isso alivia-se tensões em ligações químicas, ângulos entre ligações, em esferas de van der Waals e posicionamentos de cargas. Com isso é possível aplicar a simulação por Dinâmica Molecular, pois o alívio nas tensões locais evita grandes desequilíbrios na temperatura, provocados pela rápida conversão de energia potencial armazenada em energia cinética. No entanto, a minimização local de energia por esses métodos de gradiente não possibilita a transposição de barreiras de energia para buscar mínimos mais baixos e mesmo o mínimo global de energia. Assim, a conformação inicial dos modelos de proteínas, por exemplo, deve estar bem próxima da estrutura nativa. A Dinâmica Molecular, apesar de possibilitar transpor barreiras locais de energia, pode levar tempos incomensuráveis de simulação para alcançar a conformação nativa, partindo-se de uma conformação aleatória.

Os métodos de otimização global estão em desenvolvimento e visam alcançar a estrutura nativa partindo de conformações aleatórias. Essa técnica utiliza métodos denominados metaheurísticos em que a cada etapa o modelo vai sendo melhorado de

acordo com um critério. Apesar de não haver garantia de uma solução ótima, esse método é atualmente usado baseado no método de Monte Carlo e em algoritmos genéticos.

3.2.3 Condições periódicas de contorno

Em simulação, o sistema é acomodado em uma caixa que possui uma forma geométrica geralmente cúbica, dodecaédrica ou octaédrica. Dependendo do sistema, algumas caixas são muito econômicas no tempo computacional como exemplo a forma octaedro apresenta um volume de 77% de um cubo, enquanto que um dodecaedro 71%. (VERLI, 2014)

Em condições periódicas de contorno elimina-se os efeitos de bordas da caixa de simulação, de forma que se um átomo atravessa a fronteira da caixa ele emerge na face oposta, fazendo com que o ambiente atômico possa ser considerado infinito.

3.3 *Generalized Simulated Annealing* – GSA

O GSA é um método estocástico baseado no Método Monte Carlo, que envolve o cálculo de configurações de populações, ou conformações de uma proteína por exemplo, a partir de uma função de custo e da probabilidade de aceitar as novas configurações obtidas. No estudo de enovelamento de proteínas ao gerar essas diferentes conformações é possível visitar a hipersuperfície de energia da molécula, transpondo barreira, e buscar a conformação de mínimo global de energia, baixando a temperatura de forma controlada. (AGOSTINI *et al.*, 2006; ANDRICIOAEI & STRAUB, 1996; MELO *et al.*, 2012; METROPOLIS *et al.*, 1953; MORET *et al.*, 2002, 1998) . O GSA é utilizado pelo programa Thor-GSA(programa de modelagem desenvolvido por membros do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – IBBC/UFRJ e do IQ-UnB (MORET *et al.*, 1998)

Para manter a rapidez de resfriamento e considerar que o sistema molecular chegue à conformação com o mínimo global de energia são adotadas funções e ajustadas respectivos parâmetros que controlam a taxa de decaimento da temperatura (q_T), a visita à hipersuperfície de energia (q_V) e a probabilidade de aceitar novas configurações (q_A). O sucesso da técnica depende da escolha apropriada do conjunto [q_T , q_V , q_A]. O primeiro parâmetro, q_T , elege a forma da curva de decaimento da temperatura apresentada na Figura 21. (AGOSTINI, 2008; JÚNIOR & SILVA, 2004)

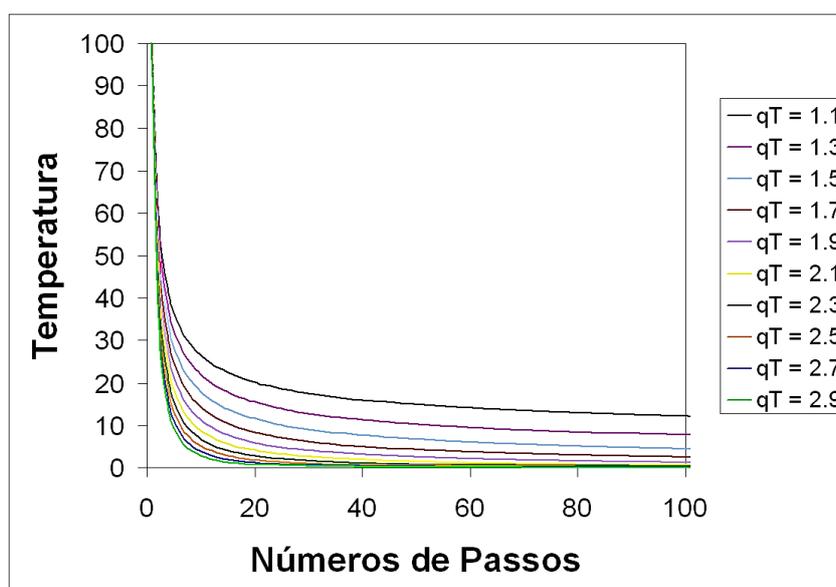


Figura 21: Decaimento da temperatura versus número de passos de cálculo do GSA para q_T variando de 1,1 a 2,9, onde $T=100$. (FERNANDES, 2009)

De acordo com a Figura 21, representa uma temperatura artificial inicial de $T=100$. Com o aumento do valor de q_T , o resfriamento é mais brusco, enquanto os valores menores para q_T deixam o processo de *annealing* mais suave, isso causa o balanceamento do número de graus de liberdade do sistema em estudo. (MORET *et al.*, 1998)

As novas conformações são obtidas a partir do sorteio de torções nos ângulos diedrais próprios Φ definidos no tópico referente ao Campo de Força (Figura 18). Os novos ângulos de torção ϕ_{t+1} são obtidos através de cada passo, calculado por uma função

de visitação, $g_{qv}(r)$, cuja forma, apresentada na Figura 22, é controlada pelo parâmetro qv .

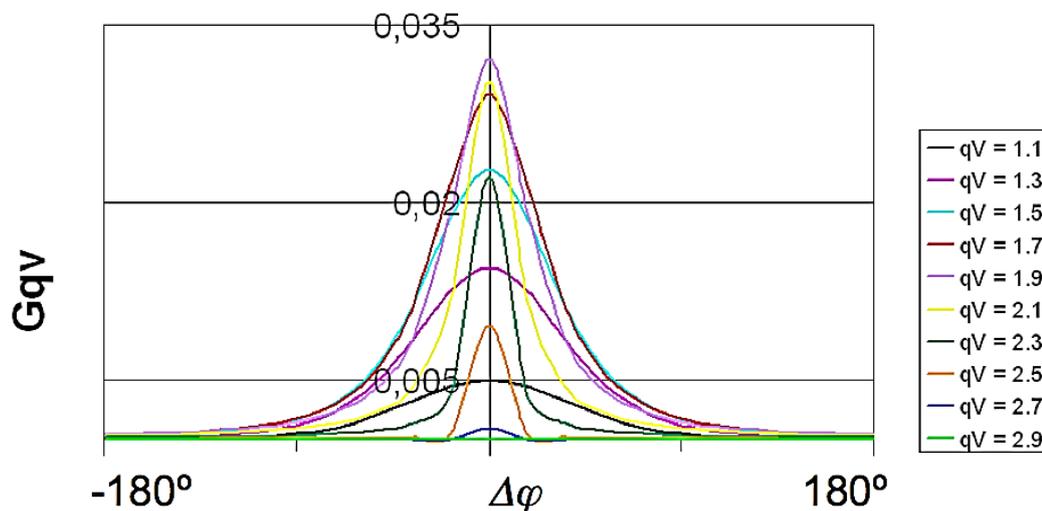


Figura 22: Curva de visitação da superfície de energia pelo sorteio de diedros para qv variando de 1.1 a 2.9 (FERNANDES, 2014)

qv é o  ndice que controla a visitação da superfície de energia na busca conformacional. A superfície de energia é diferente para cada macromolécula. A de proteínas apresenta um número astronômico de mínimos de energia locais equivalentes, correspondendo a conforma es aleatórias. A conforma o nativa é encontrada em um pequeno funil de energia que leva ao mínimo global, imerso na grande superfície dentre os mínimos locais. A diferença em energia entre o estado enovelado e os diversos estados conformacionais aleatórios   em geral menor que 20 Kcal/mol. Para qv igual a 1, a função de visita   superfície assume a distribuição gaussiana da máquina de Boltzmann (CSA) e

quando atinge o valor de 2, a distribuição assume a distribuição Lorentziana, a mesma da máquina de Cauchy (FSA).

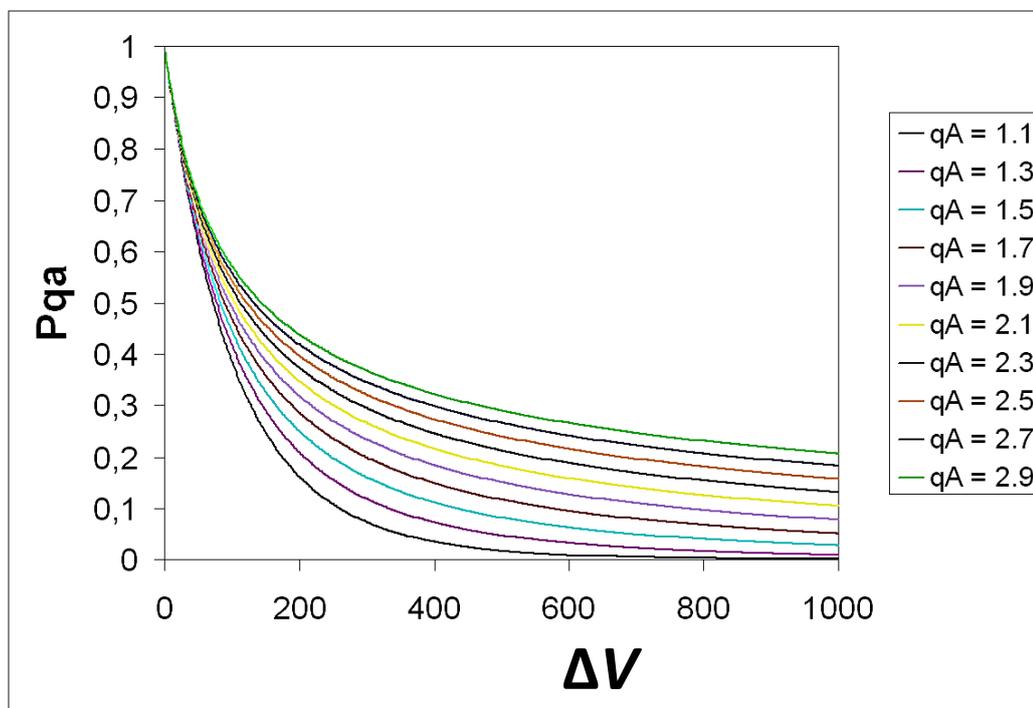


Figura 23: Função de aceitação P_{qA} para q_A variando 1,1 a 2,8.

q_A é o parâmetro de ajuste da função de aceitação, P_{qA} Figura 23, na estatística de Tsallis, é possível escolhê-lo visando uma maior desempenho do método. Quando $q_A = 1$, a probabilidade corresponde a probabilidade clássica de Boltzmann de acordo com o algoritmo de metrópoles, no método de Monte Carlo. (TSALLIS *et al.*, [s.d.]

ΔV é a diferença de energia entre dois estados conformacionais consecutivos no cálculo. A energia potencial, V , utilizada é a soma dos termos diedrais (equação 10), Lennard-Jones (equação 11) e Coulomb (equação 12) e definidos no tópico sobre o Campo de Força. Quanto maior o q_A maior a probabilidade em aceitar novas configurações, num mesmo valor de ΔV . A possibilidade de um determinado salto ser

aceito é maior quando q_A for alto. ΔV e a probabilidade de aceitação são inversamente proporcionais.

Observou-se estudando o homo-peptídeo contendo 18 resíduos de alanina (18-ala), que há uma tendência inversa dos valores do parâmetro que controla o decaimento da temperatura (q_T) em relação aos valores do parâmetro e visitação (q_V) para encontrar estruturas de menor energia, ou seja, o q_T aumenta o q_V diminui. (AGOSTINI *et al.*, 2006)

O GSA reduz o custo computacional comparado a outros métodos como a própria Dinâmica Molecular, no entanto deve-se lembrar que a DM é uma técnica determinística que possui como vantagem de análise o tempo, tendo assim uma trajetória do sistema e o GSA não possui uma trajetória temporal. (FERNANDES, 2009)

A combinação de GSA com Dinâmica Molecular tem demonstrado o aumento da velocidade e otimização do enovelamento de proteína, sendo uma grande vantagem por causa da redução do número de ciclos para alcançar o mínimo global. Nessa combinação, o GSA encontra o funil de energia, escondido na superfície de número astronômico de mínimos locais. A proteína com a conformação dentro do funil de energia é então conduzida ao mínimo global por DM. (MELO *et al.*, 2012)

3.4 Funcionamento do GSA

O método do GSA segue a seguinte descrição:

No *input* fornecemos ao programa os valores dos parâmetros de q_A , q_V , q_T que foram : parâmetro de aceitação (q_A) = 2.1, parâmetro de visitação (q_V) = 1.9, parâmetro

de controle de temperatura (q_T) = 1.7, e a temperatura artificial inicial (T_0) = 10.1. A estrutura de entrada para o GSA foi estendida, como mostra a Figura 24.

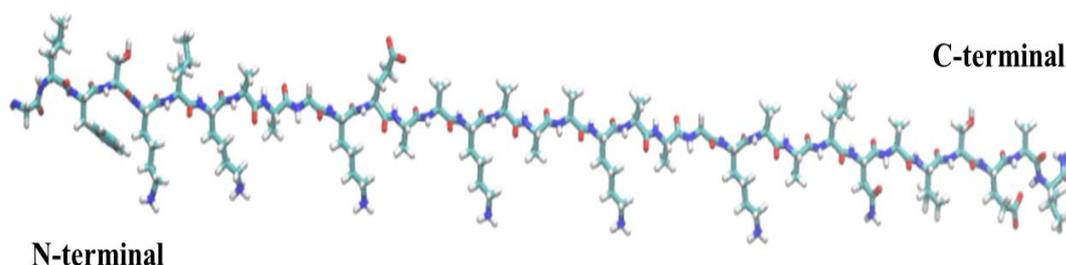


Figura 24: Estrutura estendida do peptídeo DD K pré simulação com GSA.

Uma vez escolhidos os parâmetros seguem os passos:

- 1) A cada passo t uma nova temperatura é calculada, de acordo com a Equação 13 (AGOSTINI *et al.*, 2006):

$$T_{qT}(t) = T_{qT}(1) \frac{2^{qT-1}-1}{(1+t)^{qT-1}-1} \quad (\text{eq. 13})$$

- 2) É realizado o mapeamento da hipersuperfície de energia potencial adicionando um incremento de ângulo ($\Delta\phi_{t,i}$) aos ângulos diedrais da molécula no passo “ t ” (ϕ_t), gerando um novo conjunto de coordenadas (ϕ_{t+1}). Os incrementos de ângulo ($\Delta\phi_{t,i}$), são calculados a cada passo de acordo com a Equação 14:

$$\phi_{t+1} = \phi_t + \Delta\phi_{t,i} \quad (\text{eq. 14})$$

E o $\Delta\Phi_{t,i}$ é calculado de acordo com g_{qv} é a função de distribuição de visitação, dada pela equação 15:

$$g_{qv}(\Delta\varphi_{t,i}) = \left(\frac{q_v - 1}{\pi}\right)^{\frac{D}{2}} \frac{\Gamma\left[\frac{1}{q_v - 1} + \frac{D - 1}{2}\right]}{\Gamma\left[\frac{1}{q_v - 1} - \frac{1}{2}\right]} \frac{[T(t)]^{\frac{-D}{3 - q_v}}}{\left\{1 + (q_v - 1) \frac{(\Delta\varphi_{t,i})^2}{[T(t)]^{(3 - q_v)}}}\right\}^{\frac{1}{(q_v - 1)} + \frac{D - 1}{2}}}$$

(eq. 15)

$\Gamma(x)$ é a função gama, D, que é a dimensão de espaço dos parâmetros e q_v é o índice que controla a visitação da superfície de energia e faz a busca conformacional de menor energia. Essa distribuição torna-se não normalizável para $q_v \geq 3$;

- 3) A energia E (Φ_{t+1}) é calculada com os potenciais de torção (Equação 10), de Lennard-Jones (Equação 11) e de Coulomb (Equação 12), utilizando o programa THOR, programa de modelagem e dinâmica molecular desenvolvido no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) e no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – IBCCF/UFRJ (MORET *et al.*, 1998). Esse programa também emprega o Campo de força GROMOS96 (VAN GUNSTEREN & BERENDSEN, 1987)

Os comprimentos e os ângulos de ligação são fixos em seus valores de equilíbrio, o que torna desnecessário o cálculo dos termos do campo de força relativo a esses potenciais. Calculando assim apenas os de átomos não ligados diretamente da proteína (van der Waals e eletrostáticas) e os termos de ângulos diedrais da cadeia peptídica e das cadeias laterais;

- 4) As novas coordenadas são aceitas seguindo o critério:

Se $E(\Phi_{t+1}) < E(\Phi_t)$, as coordenadas Φ_t são substituídas por Φ_{t+1} ;

Se $E(\Phi_{t+1}) \leq E(\Phi_t)$, é sorteado um número $n \in [0,1]$:

- se $n > P_{qA}$ (probabilidade de aceitação), as coordenadas de Φ_t se mantêm, se não, Φ_t é substituída por Φ_{t+1} . A probabilidade de aceitação é calculada pela Equação 17;

$$P_{qA} = \left[1 + (qA - 1) \frac{E(\Phi_{t+1}) - E(\Phi_t)}{T(t)} \right]^{\frac{1}{qA-1}} \text{ (eq. 17)}$$

Para $q_A = 1$ tem-se a distribuição clássica de Boltzmann utilizada no critério de Metropolis, no método de Monte Carlo.

- 5) Voltando ao 1º passo, o procedimento é repetido até que o sistema esteja totalmente resfriado ($T = 0$) ou até o número de iterações máximo seja alcançado.

3.5 Simulações com peptídeo DD K imerso em solução

A primeira abordagem com o peptídeo em solvente, analisa a estrutura secundária e o mecanismo de ação em ambiente anfifílico. Essa primeira parte gerou 3 sistemas com o peptídeo: 1) o controle em água 2) o peptídeo com mistura TFE/água (50%/50%, v/v) na mesma proporção feita na técnica de RMN 3) a estrutura obtida do GSA e estudada em DM, também em mistura TFE/água (50%/50%, v/v), como mostra a Tabela 1

Tabela 1: Descrição dos sistemas com DD K em água e em mistura TFE/água (50%/50%, v/v)

Nomenclatura	Condições de simulação	Tempo de simulação
DDK _{água}	1 peptídeo DD K em água com estrutura obtida por RMN	1000 ns
DDK _{TFE/água}	1 peptídeo DD K em mistura TFE-água com estrutura obtida por RMN	
DDK _{GSA-TFE/ÁGUA}	1 peptídeo DD K com estrutura pré-enovelada pelo GSA, simulada em mistura TFE-água.	

O arquivo da estrutura do peptídeo DDK foi obtido no banco de dados PDB com o código 2JX6.(VERLY *et al.*, 2009) Foi feito um estudo primeiramente de estrutura e de dinâmica do peptídeo, os sistemas foram construídos com base na abordagem feita por Verly *et. al.* (2009)

As simulações de dinâmica molecular descritas na Tabela 1 foram feitas com o programa GROMACS para os dois sistemas com o campo de força Gromos53a6 (OOSTENBRINK *et al.*, 2004). O modelo de água utilizado foi o SPC, *Simple Point Charge*. (BERENDSEN *et al.*, 1981)

O método PME (*Particle Mesh Ewald*) foi utilizado para calcular as interações eletrostáticas dos sistemas pelo potencial Coulomb, com raio de corte de 1.4 nm, a pressão utilizada foi 1 bar e a temperatura foi 293.15 K, controlada pelo acoplamento de Berendsen. (Tabela 2) (DESERNO & HOLM, 1998; GIBBON & SUTMANN, 2002)

Tabela 2: Descrição da DM do peptídeo DD K em solução aquosa e mistura TFE/água

Campo de Força	GROMOS 53a6
Modelo para água	SPC
Integrador	Velocity Verlet
Ensemble	NPT
Temperatura	293.15 K
Termostato	Berendsen
Pressão	1 bar
Barostato	Berendsen
Interações Eletrostáticas	PME
Restrições para água	LINCS
Restrições para TFE/água	SHAKE

3.5.1 Sistema do peptídeo em água

Foi construída uma caixa de simulação cúbica com 134x133x64 nm com água com uma molécula de peptídeo DD K (PDB:2JX6) (Figura 25). (VERLY *et al.*, 2009)Esse sistema foi balanceado com 5 íons de cloro para neutralizar cargas do sistema.

(Tabela 3)

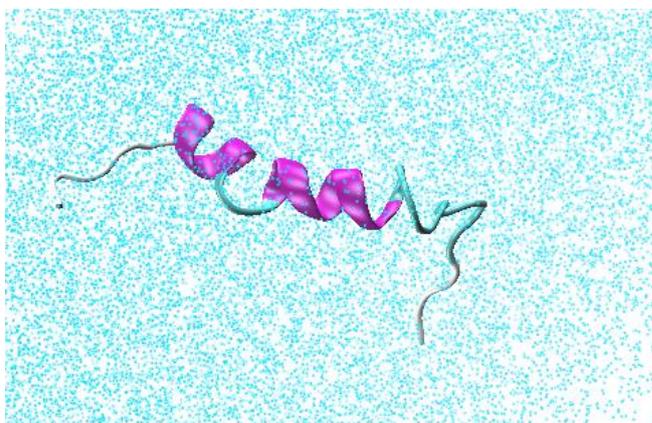


Figura 25: Sistema do peptídeo DD K em água. Em azul, moléculas de água.

Tabela 3: Descrição do sistema do peptídeo em solução aquosa em DM.

Número de moléculas de água	16594
Número de peptídeos	1
Contraíons de cloro	5
Número de átomos do sistema	50074

3.5.2 Sistema do peptídeo DD K em mistura trifluoroetanol e água

O 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) é um solvente amplamente utilizado para caracterização de estrutura secundária e enovelamento de peptídeos em mistura com água. De acordo com a literatura o TFE e outros álcoois induzem a formação de hélice- α e estabilizam-nas (BAKÓ; RADNAI & BELLISENT FUNEL, 2004).

O TFE (Figura 26) foi utilizado com o DD K por Verly et al. para determinação da estrutura do peptídeo em dicroísmo circular e RMN, que resultou na estrutura depositada no PDB: 2JX6. Misturas TFE/água são largamente utilizadas em técnicas experimentais e foram parametrizados para simulações por Dinâmica Molecular, os parâmetros utilizados para simulação do TFE foi proposto por Fioroni et. al. (BAKÓ; RADNAI & BELLISENT FUNEL, 2004; FIORONI *et al.*, 2000)

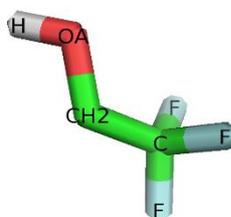


Figura 26: Molécula de trifluoroetanol -

Dois sistemas em TFE/água foram estudados, um com a estrutura do peptídeo do PDB: 2JX6 (DDK_{TFE/água}) e outro a partir da otimização prévia com GSA (DDK_{GSA-TFE/ÁGUA}), que teve como conformação de partida a estrutura estendida. (Figura 24).

A Tabela 4 descreve o sistema DD K_{TFE/água} e a Tabela 5 descreve o sistema DD K_{GSA-TFE/água}:

Tabela 4: Descrição da quantidade de moléculas do sistema DD K_{TFE/água}.

Número de moléculas de TFE	7741
Número de moléculas de água	14861
Número de peptídeos	1
Número de átomos do sistema	38376
Contraíons de cloro	5

O peptídeo DD K no sistema DD K_{TFE/água} foi colocado em uma caixa cúbica de 134x134x64 nm (Figura 27A) e no sistema DD K_{GSA-TFE/ÁGUA} a dimensão da caixa é de 70x70x70 nm (Figura 27B).

Tabela 5: Descrição do número de moléculas do sistema DD K_{GSA-TFE/ÁGUA}.

Número de moléculas de TFE	838
Número de moléculas de água	7239
Número de peptídeos	1
Número de átomos do sistema	27872
Contraíons de cloro	5

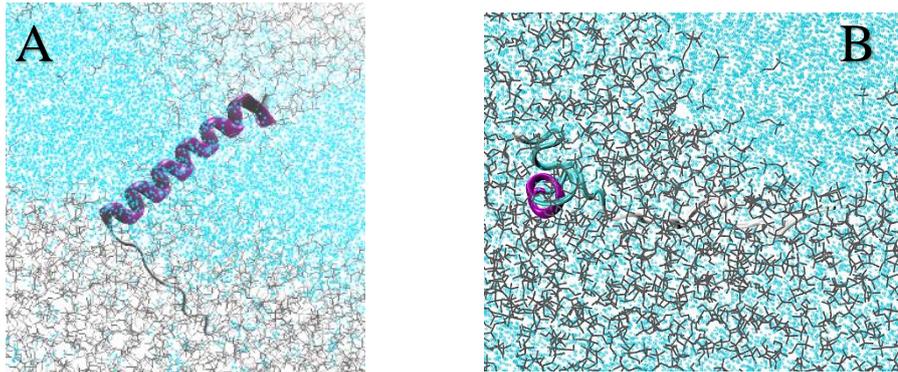


Figura 27: A - Representação da caixa de simulação do sistema DD $K_{\text{TFE/água}}$. B – Representação da caixa de simulação do sistema DD $K_{\text{GSA-TFE/ÁGUA}}$. Em azul a água, em cinza o TFE.

3.6 Simulações com bicamadas lipídicas

As bicamadas lipídicas são modelos teóricos simples que seguem parâmetros de características de cada lipídio (tamanho, carga e morfologia), concentração salina, pH, temperatura, etc. (MARGUET *et al.*, 2006)

As simulações por Dinâmica Molecular para sistemas lipídicos estão na faixa de centenas de nanossegundos a alguns microssegundos para um comprimento de caixa de 10 nm ou algumas centenas de lipídeos. Devido ao crescimento do poder computacional, também estão em grande ampliação. As simulações de granulação grossa ou *coarse-grain*, em inglês, são simulações mais rápidas por possuírem um modelo de representação de moléculas mais simples, discretizando detalhes moleculares, para sistemas de grande complexidade como polímeros (PETER & KREMER, 2010), lipídeos (MARRINK; DE VRIES & MARK, 2004) e proteínas (BOND; WEE & SANSOM, 2008). O modelo *coarse-grain* está atualmente na escala de tamanho de 10 – 100 nm para camadas lipídicas, enquanto as simulações atômicas numa escala de 20 x 20 nm. (BENNETT & TIELEMAN, 2013)

Uma simulação com bicamada e proteína de membrana requer mais de 30000 átomos com base na mecânica clássica. O campo de força GROMOS, sendo um dos mais usados, inclui a técnica de átomo unido, sendo uma vantagem para simulação em proteínas e biomembranas pois reduz em 60 % o número de átomos de proteínas e bicamadas lipídicas, por exemplo um sistema com o lipídeo 1,2 dipalmitoil-sn-glicerol-3 fosfatidilcolina (DPPC) é composto de 50 partículas no modelo átomo-unido, enquanto um modelo de *all-atom*, consiste em 130 partículas.(KUKOL, 2009)

DM é um método computacional relevante para determinar a dinâmica de lipídeos e de pequenas estruturas como peptídeos. Em geral, nessas simulações, condições periódicas de contornos são usadas para evitar artefatos.

3.6.1 Parâmetro de simulação com DD K em bicamada POPC

A simulação foi feita no programa GROMACS 4.6.7 (BERENDSEN; VAN DER SPOEL & VAN DRUNEN, 1995; HESS; UPPSALA & LINDAHL, 2008) manteve-se a temperatura em 293.15 K, a mesma utilizada no experimento de CD e RMN feitos por Verly et. al. (2009). Utilizou-se como acoplamento de temperatura V-rescale, pressão constante de 1 bar e o termostato de pressão utilizado foi Parrinello-Rahman, com acoplamento semi-isotrópico (PARRINELLO & RAHMAN, 2012). (ANEXO III).

Foi utilizada para as simulações a topologia da membrana modelo de POPC que se encontra no repositório do GROMOS 54a7. (POGER & MARK, 2010; POGER; VAN GUNSTEREN & MARK, 2010)

3.6.2 Preparação dos sistemas com DD K em interface bicamada POPC

Foram criados 4 sistemas com monômeros de DD K, o primeiro foi feito sem peptídeo, o controle, seguido do sistema com 2 (DDK_{2pep-popc}), com 3 peptídeos (DDK_{3pep-popc}) e com 4 peptídeos (DDK_{4pep-popc}). (Os monômeros de DD K obtidos do arquivo PDB:2JX6 foram colocados sobre a membrana modelo com 512 moléculas de POPC com distância de 7,4 -8,7 Å (KUKOL, 2009). (Figura 28)

Ao posicionar os peptídeos com o programa de visualização PyMol (DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA), utilizou-se a mesma orientação com relação a membrana modelo adotada por Rodrigo Verly em sua tese em 2010, a face hidrofóbica do peptídeo formada por resíduos de alaninas voltados para a bicamada e a face hidrofílica formada por lisinas em contato com o solvente, como mostra a Figura 28E (VERLY, 2010)

Tabela 6: Sistema do DD K em interface de bicamada com 512 moléculas de POPC.

Nomenclatura da simulação	Quantidade de moléculas de DD K na simulação	Carga neutralizada	Tempo de simulação
Controle	0	0	200 ns
DDK _{2pep-popc}	2	10	
DDK _{3pep-popc}	3	15	
DDK _{4pep-popc}	4	20	

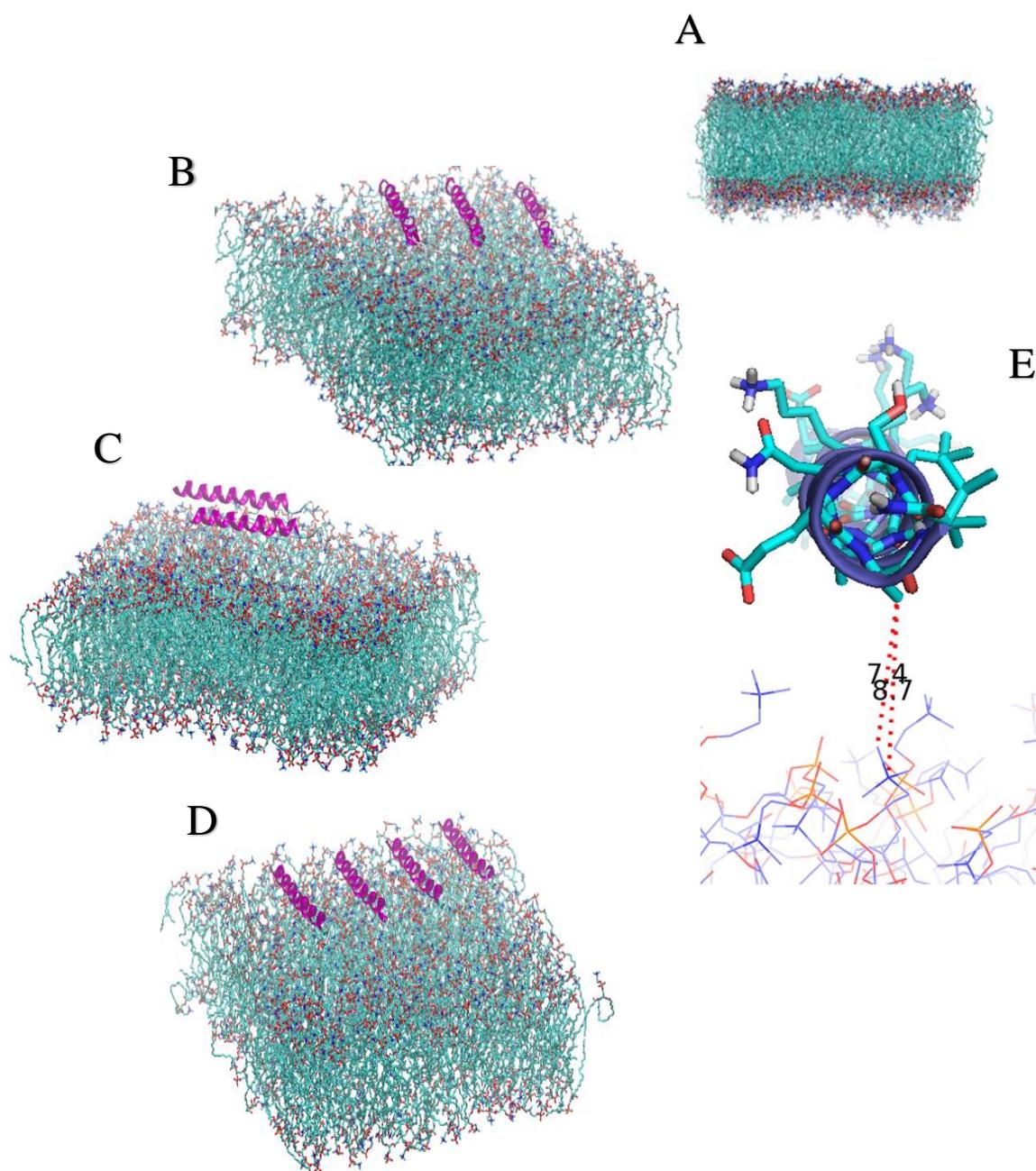


Figura 28: Sistemas com peptídeo DD K em membrana modelo com 512 moléculas de POPC. A- Sistema controle, B- Sistema DDK_{2pep-popc}. C- Sistema DDK_{3pep-popc}. D – Sistema DDK_{4pep-popc}. E- Detalhe da distância do peptídeo da bicamada 7,4 - 8.7Å.

3.6.3 Preparação do sistema de poro de DD K em bicamada de POPC

O peptídeo foi submetido ao servidor *Rosetta Online Server that Includes Everyone* (ROSIE), (LYSKOV *et al.*, 2013) utilizando o protocolo de Symmetric Docking (SymDOCK). (ANDRÉ LAB, 2007) Esse protocolo prediz a simetria homooligomérica de proteína, em que, a partir de uma subunidade de proteína, é feita uma montagem com simetria circular ou diedral. Esse protocolo é similar ao protocolo de ancoramento proteína-proteína e contém os mesmos componentes básicos, ou seja, a partir da subunidade inicial vai comparar um conjunto de conformações dessa subunidade mais próximas. A simulação começa com uma configuração simétrica randômica, os comprimentos de ligação e os ângulos de ligação são mantidos fixos e assumem uma simetria perfeita, enquanto os graus de liberdade são dados ao *backbone*³ e as cadeias laterais, bem como as subunidades monoméricas na forma de corpo rígido. A simulação é de alta resolução com o protocolo de Monte Carlo-mais-minimização (MCM), descritos nos passos a seguir:

- 1) Perturbação randômica do corpo rígido e graus de liberdade do *backbone*;
- 2) Otimização das conformações das cadeias laterais por empacotamento combinatório ou percorrendo ciclos alternativos de rotâmeros para cada cadeia lateral em uma ordem randomizada e seleção de conformação de baixa energia (triagem de rotâmeros);

³ Backbone: comumente a denominação do esqueleto peptídico para estudo de estruturas de proteínas, conjunto de átomos N,C α ,C, na sequência do peptídeo. Backbone é um termo comumente utilizado também em algoritmos se referindo a essa sequência de átomos em qualquer cálculo.

- 3) Minimização do *backbone*, cadeia lateral e graus de liberdade do corpo rígido. Os movimentos são aceitos ou rejeitados de acordo com o padrão do critério de Metropolis, em geral as simulações aceitam 100 movimentos com o MCM.
- 4) As estruturas de menor energia são clusterizadas e o membro de menor energia do cluster é escolhido. Em geral, a busca global é seguida pela busca local onde a superfície de energia livre é altamente explorada na vizinhança do espaço conformacional dos modelos de baixa energia.
- 5) O método é indicado para estruturas proteicas com mais de 10 resíduos. O número total de subunidade é colocado, sendo o máximo até 10 subunidades.
- 6) A partir disso se segue a implementação da simetria na estrutura para se criar o poro. Essas transformações podem ser de rotação, inversão ou de espelhagem, dada as coordenadas da subunidade.
- 7) Para preservar a simetria do sistema cíclico, por exemplo, essas coordenadas se tornam referências, como o eixo z durante a rotação no próprio, o eixo x apontando na direção paralela do eixo, e com y perpendicular ao plano medido por x e z.
- 8) Nessa representação, a translação do eixo x vai ser reproduzida e vai preservar a simetria se uma translação é aplicada para outras subunidades. Essa preservação de simetria acontece durante a minimização e a perturbação de corpo rígido, que no caso do sistema cíclico são 4 graus de corpo rígido (3 rotacionais e um translacional das subunidades do peptídeo).
- 9) Em adição, a função da derivada da energia parcial (Equação 18), com respeito a liberdade de um grau simétrico (corpo rígido ou torcional) pode ser calculado por multiplicar o correspondente de uma única subunidade de um fator n_s , onde n_s é o número de subunidades no sistema:

$$\frac{\partial E}{\partial x} = \nabla E \cdot \vec{x} = \nabla E \cdot \sum_{i=1}^{n_s} \hat{x}_i = \sum_{i=1}^{n_s} \frac{\partial E}{\partial x_i} = n_s \frac{\partial E}{\partial x_1}, \text{ (eq. 18)}$$

onde ∇E é o gradiente de todo o sistema (não simétrico) e \hat{x}_i é o vetor correspondente a translação da subunidade i ao longo do eixo x de um frame local. (ANDRÉ *et al.*, 2007)

O protocolo SymDock não aceita estruturas que não sejam aminoácidos, no input com o arquivo pdb, por isso as amidas (NH₂) terminais do DD K foram removidas quando o monômero foi submetido ao servidor. Após a criação do poro, o grupo NH₂ foi adicionado com o programa VMD com o script *build structure* em cada resíduo de VAL-33. (Figura 29) A partir dessa etapa foi seguido o protocolo de montagem de sistemas de proteínas com membrana modelo feito por Pedro Henrique Torres em sua tese defendida em 2014, e utilizado no acondicionamento das conformações dos poros na bicamada. (Detalhes no ANEXO II)

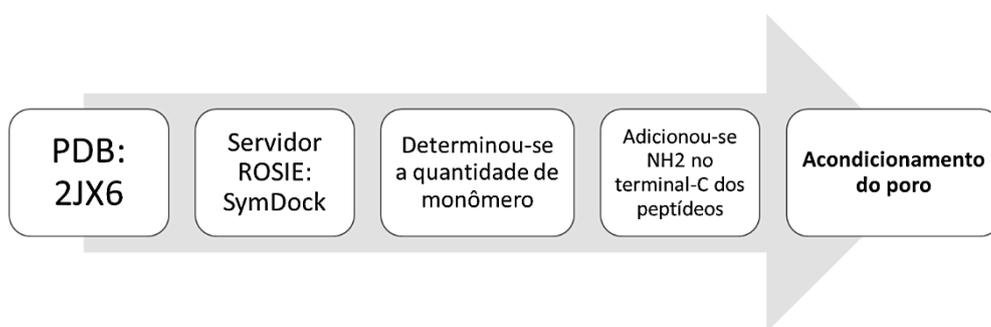


Figura 29: Fluxograma para preparação dos poros de DD K em bicamada modelo POPC.

Protocolo de preparação de simulações:

- 1) Utilizou-se a topologia da bicamada POPC (*.itp) obtida no diretório do GROMACS 4.6.7 para Gromos 54a7.
- 2) O poro de peptídeos foi posicionado na bicamada.
- 3) Foi feito um orifício na bicamada para acomodar o poro.

- 4) A caixa foi feita de acordo com as dimensões da membrana modelo e altura do poro.
- 5) Foi feita a remoção de água da bicamada lipídica.
- 6) Editou-se o arquivo de topologia com as moléculas de lipídeos e de água e com os monômeros na forma de poro.
- 7) Adicionou-se íons de cloro de acordo com cada sistema e simulou-se até 200 ns.
- 8) Esse sistema foi simulado usando o mesmo protocolo descrito no item 3.7 e anexo III.

Os estudos prévios com o peptídeo mostraram que o resíduo triptofano 3 é um resíduo de interface, ou seja, não se insere na bicamada, por isso alocamos, após estabelecidas as conformações de poro, o terminal-N, onde se localiza o triptofano-3 fora da bicamada e inserindo o terminal-C na bicamada. O triptofano é um resíduo que em grande quantidade torna o peptídeo hidrofóbico e faz com que ele rapidamente se insira em membranas biológicas. No DD K acredita-se que esse resíduo faça forte interação com a bicamada, mas não insere totalmente, permanecendo na interface em uma região *coil* da cadeia.

Dinâmica Molecular dos sistemas com as conformações de poros de DD K em bicamada POPC.

Como descrito no item 3.7 os sistemas com poros foram submetidos à Dinâmica Molecular com o GROMACS 4.6.7 e campo de força GROMOS 54a7 (HUANG; LIN & GUNSTEREN, 2011; POGER & MARK, 2010; POGER; VAN GUNSTEREN & MARK, 2010) Os sistemas nas simulações possuíam a descrição da Tabela 7 e também chegaram até o tempo de 200 ns.

Tabela 7: Descrição dos sistemas com conformações de poro de DD K em bicamada de POPC.

Nomenclatura da simulação	Moléculas de DD K na simulação	Moléculas de POPC	Carga neutralizada	Tempo de simulação
Controle	0	512	0	200 ns
DDK _{poro6-popc}	6	468	30	
DDK _{poro7-popc}	7	461	35	
DDK _{poro8-popc}	8	454	40	

3.7 Programas extras

Para observação, edição e geração de imagens moleculares dos sistemas foi utilizado o programa Visual Molecular Dynamics (VMD)(HUMPHREY; DALKE & SCHULTEN, 1996). Para geração de gráficos e cálculos estatísticos utilizou-se o programa Origin (OriginLab, Northampton, MA).

Capítulo 4

Resultados e discussões

Nesse capítulo são apresentados os resultados das simulações por Dinâmica Molecular de sistemas modelos constituídos por mistura TFE/água e bicamada lipídica realizadas com peptídeo DD K.

4.1 Resultados do *Generalized Simulated Annealing* e Dinâmica Molecular dos sistemas do DD K imerso em solução

Os primeiros resultados com o DD K foram obtidos por Dinâmica Molecular em água e em mistura TFE/água (50%/50%, v/v). Essa primeira análise consiste em uma comparação de metodologias para a predição de enovelamento do peptídeo. Cada um dos sistemas foi simulado por 1000 ns.

A estrutura de saída do GSA escolhida foi a representada na Figura 30 que a seguir foi submetida a Dinâmica Molecular com TFE/água em (50%/50%, v/v). Com 33 resíduos aminoácidos, o DD K tem 3^{33} possibilidades conformacionais, um número astronômico, considerando-se somente os mínimos de energia encontrados nas torções dos ângulos ϕ versus ψ , o diagrama de Ramachandran. Esses mínimos de energia correspondem às regiões de fitas beta, hélice para esquerda e hélice para direita do próprio diagrama.

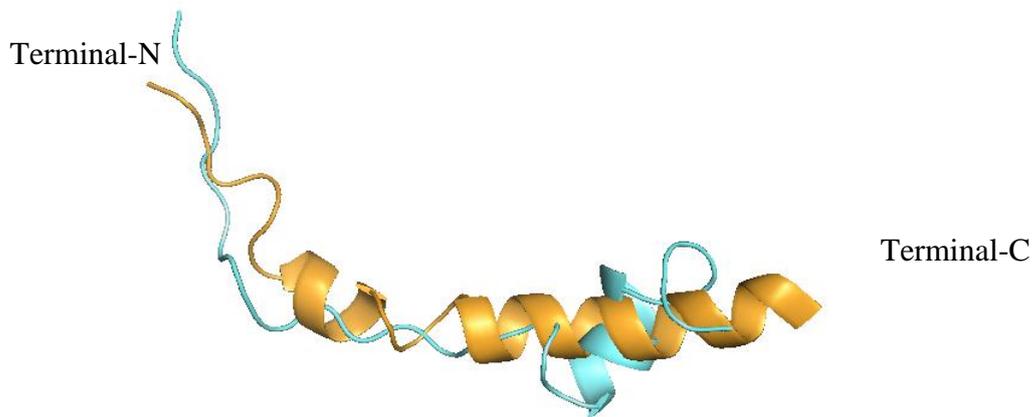


Figura 30: Sobreposição do resultado da conformação final, de menor energia, do GSA em azul e do modelo escolhido no PDB:2JX6 (modelo 18) em laranja (RMSD=5.6Å)

4.1.1 Perfil de estrutura secundária do peptídeo DD K em simulação em água e mistura

A Figura 31 mostra o resultado do perfil de estrutura secundária pelo programa DSSP (*Define Secondary Structure of Protein*) encontrado no pacote GROMACS com o binário⁴ *do_dssp*. (KABSCH & SANDER, 1983) No eixo y está descrito o número de cada resíduo e no eixo x está o tempo da simulação.

A estrutura inicial da simulação DDK_{água} como já citado foi proveniente do estudo por RMN. A Figura 31A mostra que na simulação desse sistema a partir dos 50 ns⁽⁵⁾ o peptídeo perde a estrutura de hélice- α e assume uma forma de fita- β nos resíduos TRP-3, SER-4, LYS-5, ILE-6, LYS7, ALA-8, ALA-9 e ALA-24, ALA-25, LEU-26, ASN-27, ALA-28. Ao longo da simulação não há estrutura de α -hélice estável.

É conhecido na literatura que os peptídeos antimicrobianos só adquirem conformação próxima a ambientes hidrofóbicos, se supondo-se que isso possa ajudar no

⁴ Binário: de maneira mais correta esse termo é denominado código binário, uma sequência de instruções a serem executadas pelo programa em linguagem de máquina.

⁵ns = nanossegundos

ancoramento na bicamada, alvo de ação desses peptídeos, visto que em água muitos peptídeos não se estruturam. (EICHENBERGER; VAN GUNSTEREN & SMITH, 2013; TAYLOR & KAISER, 1986; VERLY *et al.*, 2009). A mistura TFE/água é largamente utilizada para induzir o enovelamento de peptídeos. Por isso é possível ver a grande diferença na formação de estruturas secundárias entre demais perfis de estrutura secundária dos outros sistemas na mesma figura.

A análise na Figura 31B mostra o padrão de estrutura secundária do sistema $DDK_{TFE/água}$ que é predominante a hélice- α , o que sugere que o DD K ao ser colocado em contato com essa mistura tende a conservar sua helicidade, o que corrobora com os estudos de dicroísmo circular. (VERLY *et al.*, 2009) Durante a simulação observou-se a presença também da hélice 5 em roxo entre os resíduos 15 e 30.

A Figura 31C perfil de padrões de estrutura secundária do sistema $DDK_{GSA-TFE/ÁGUA}$, a estrutura inicial desse sistema é apresentada na Figura 30. Observa-se que a área em azul, que representa a hélice- α , é predominante. Uma estrutura de volta começa a se formar entre os resíduos 20-24 desse peptídeo, nessa região há a presença de glicina-22, que pode ser a responsável por essa quebra na sequência em hélice- α , já que esse resíduo tende a dar grande flexibilidade a cadeias polipeptídicas. O sistema com estrutura inicial obtida pelo GSA conservou a hélice- α , essa helicidade foi crescente no início da DM e permaneceu mais tempo do que nos outros sistemas estudados demonstrando que a metodologia é eficiente para predição da estrutura da estrutura de peptídeos (FERNANDES, 2014). No entanto, peptídeos são intrinsecamente mais flexíveis que proteínas, sendo esperada maior flutuação conformacional. Nota-se que em água o peptídeo se desestrutura (Figura 31A) ao passo que a predição com GSA mostra o peptídeo já em segmentos em hélice (Figura 30), embora não haja solvente no cálculo estocástico com esse método. A representação do solvente no GSA é por um meio

contínuo simulado por uma função dielétrica que pode ser ajustada segundo a polaridade do meio, sendo aqui utilizada com a constante dielétrica igual a 4,5 para distâncias interatômicas de até 5 Å, aumentando em curva sigmoidal até 80 em distâncias até 20 Å e mantendo-se nesse valor para distâncias superiores. Essa estratégia simula satisfatoriamente ambientes de interfaces como superfícies de proteínas e bicamadas lipídicas, ficando aqui demonstrada sua eficiência em enovelar peptídeos em ambientes simulando misturas como TFE/água. Como descrito na seção de métodos, o GSA encontrou o funil de enovelamento na superfície de potencial das interações atômicas ao enovelar segmentos em hélice (Figura 30) e em seguida a DM terminou o processo de enovelamento (Figura 31C).

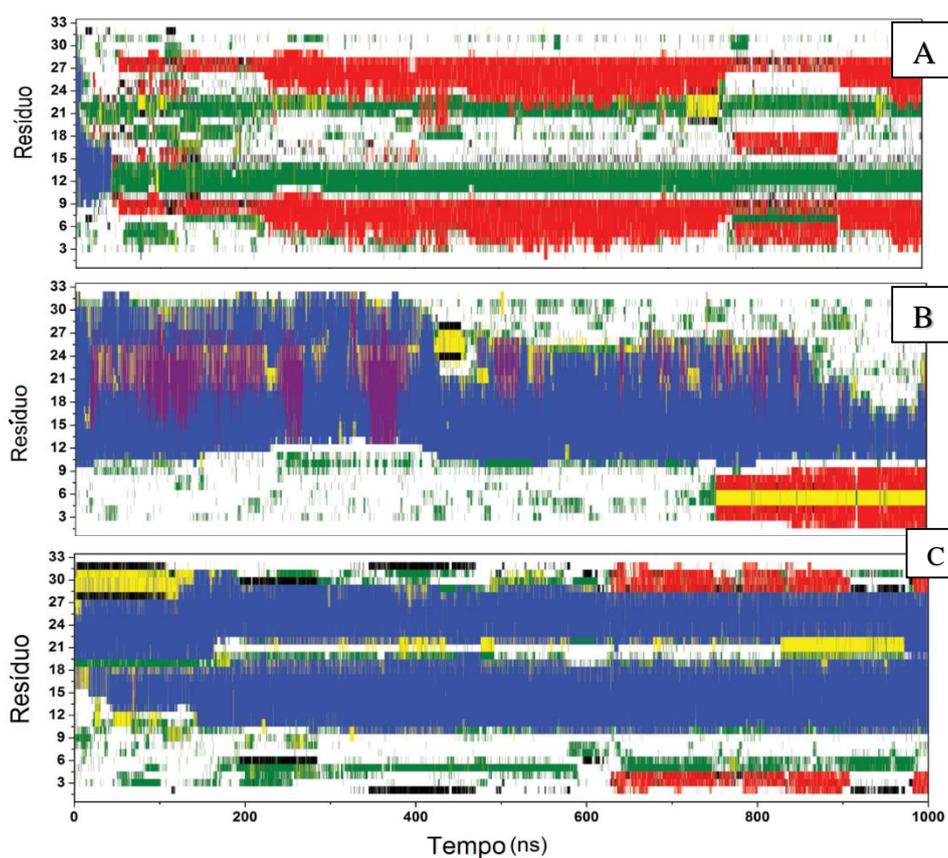


Figura 31: Padrões de estrutura secundária dos resíduos do sistema DDK ao longo de 1000ns nas simulações dos sistemas DDK_{água} (A), DDK_{TFE/água} (B), DDK_{GSA-TFE/ÁGUA}(C), em vermelho, β -sheet; em preto, β -bridge; em verde, bend; em amarelo, turn; em roxo, 5-helix; em cinza, 3-helix; em azul, α -helix; em branco, coil.

4.1.2 RMSD dos sistemas com DD K em água e mistura TFE/água

Durante a dinâmica molecular várias conformações aparecem e por causa disso é feita um cálculo para a comparação dessas estruturas, como o *Root-mean-square deviations* (RMSD) o desvio da raiz quadrática média. Ele é calculado a partir da variação das coordenadas atômicas das estruturas em relação a uma estrutura de referência. Na presente análise a estrutura de referência é a obtida por RMN, sendo o modelo utilizado o 19 do arquivo PDB: 2JX6, sendo o modelo mais representativo de acordo com o OLDERADO (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/nmr/olderado/>). Utiliza-se no RMSD os átomos do *backbone* da cadeia polipeptídica (bRMSD). (MAIOROV & CRIPPEN, 1995)

A análise de RMSD na Figura 32A mostra a mudança conformacional do sistema $DDK_{\text{água}}$, houve um aumento inicial de RMSD de até 11 Å e isso acontece devido à perda de estrutura desse peptídeo comparativamente a estrutura de RMN, mostrada na análise de estrutura secundária da Figura 31A. A análise de cluster, feita pelo binário *g_cluster* do pacote GROMACS, mostrou uma linha vermelha contínua o que sugere predominância de agrupamento em outra conformação. (Figura 32A). Podemos inferir que o mesmo se trata de conformações heterogêneas já demonstradas na Figura 31A, cuja representante inicial na mudança de conformação está em *cartoon* em destaque.

Na Figura 32B é apresentada a variação de RMSD do sistema $DDK_{\text{TFE/água}}$. Os valores de RMSD se mantêm em torno de 2-4 Å, até 400 ns, momento em que na simulação começam a aparecer mais conformações. De acordo com a Figura 32B, isso indica uma perda de helicidade nos resíduos 27-33, delineando uma desestrutura. A partir dos 800 ns aparecem mais *clusters*, conseqüentemente mais grupos com conformações diferentes também assinalados em vermelho, quantificados no eixo y da Figura 32B. O desenho na Figura 32B representa a conformação final com o Terminal-N em fita beta.

A variação de RMSD da Figura 32C se refere ao sistema $DDK_{GSA-TFE/\acute{A}GUA}$. Nesse gráfico há o crescimento do RMSD nos 200ns. A partir daí, há uma estabilização na faixa entre 7 e 9 Å do RMSD. Nesse período há a predominância de hélice- α como também mostrado na Figura 31C. Diferente das simulações anteriores, o sistema $DDK_{GSA-TFE/\acute{A}GUA}$ apresenta conformação com hélice- α predominante até o final. Também não possui tantos *clusters*, demonstrando que essa é a conformação mais representativa como mostrado na Figura 32C no eixo y e ao lado em vermelho.

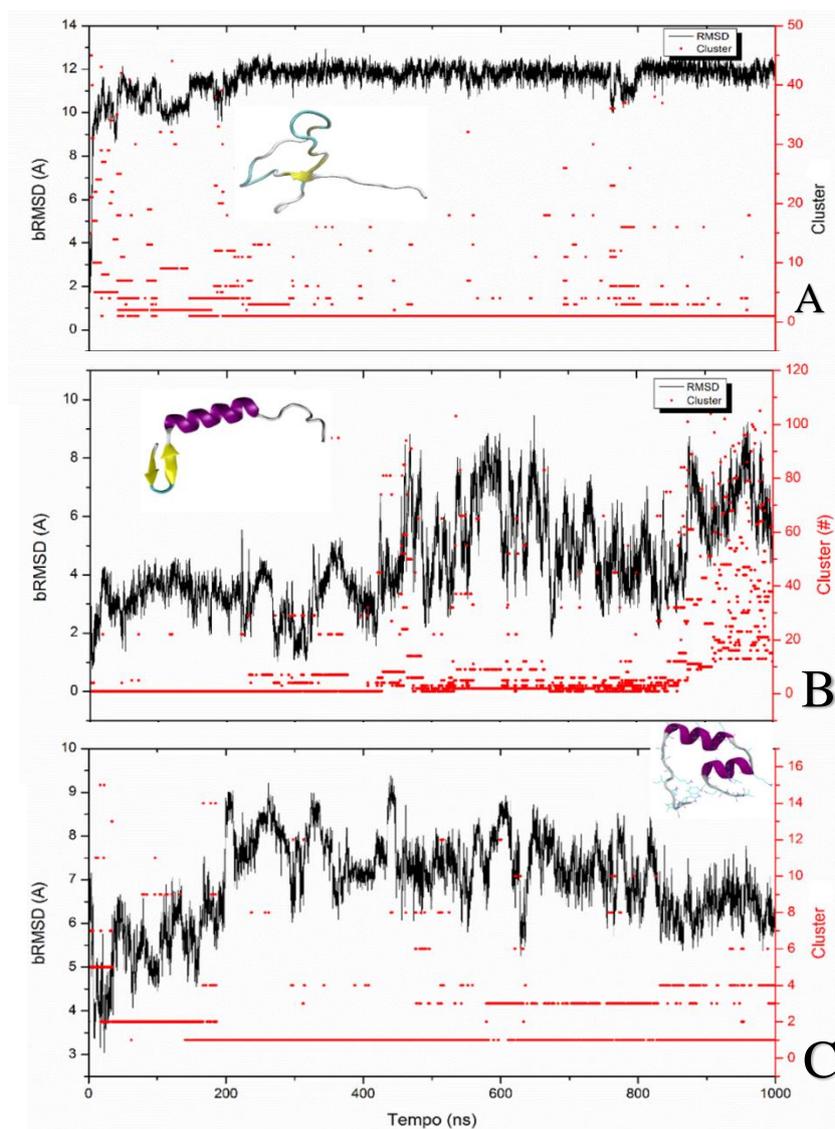


Figura 32: Variação do RMSD do *backbone* do peptídeo DD K nos sistemas (lado esquerdo no eixo y (bRMSD)) e (lado direito) análise de formação de cluster conformacional em função do tempo de simulação de 1000 ns. (A) Representação do sistema $DDK_{\acute{a}gua}$, (B) $DDK_{TFE/\acute{a}gua}$, (C) $DDK_{GSA-TFE/\acute{A}GUA}$.

4.1.3 Ligações de Hidrogênio dos sistemas em água e mistura TFE/água

As ligações de hidrogênio intramoleculares, juntamente em mistura TFE/água, ajudam a estabilizar a estrutura. Os resultados a seguir mostram a quantificação de ligações de hidrogênio no DD K nos diferentes ambientes. Essa análise foi feita pelo binário *g_hbond*, do pacote GROMACS, que calcula a quantidade de ligações de hidrogênio com o *cut-off* de 3.5 Å entre dois grupos, o acceptor e o doador de H.

O gráfico da Figura 33A mostra que as ligações de hidrogênio no sistema DDK_{água} (entre resíduos) é em baixo número em torno de 5 ligações. Esse gráfico concordo com outros resultados anteriores demonstrando a perda de estrutura do DD K. O gráfico Figura 33B do sistema DDK_{TFE/água}, mostra que há manutenção da quantidade de ligações, com média em torno de 14 ligações, até cerca de 800 ns, diminuindo a partir daí provavelmente devido à perda de helicidade dos resíduos 27 a 33.

O gráfico da Figura 33C é do sistema DDK_{GSA-TFE/ÁGUA}, e mostra um crescimento das ligações de hidrogênio na estrutura do peptídeo DD K até cerca de 14 ligações, demonstrando um enovelamento do peptídeo, uma vez que nesse sistema a estrutura inicial é proveniente do GSA como apresentado na Figura 30.

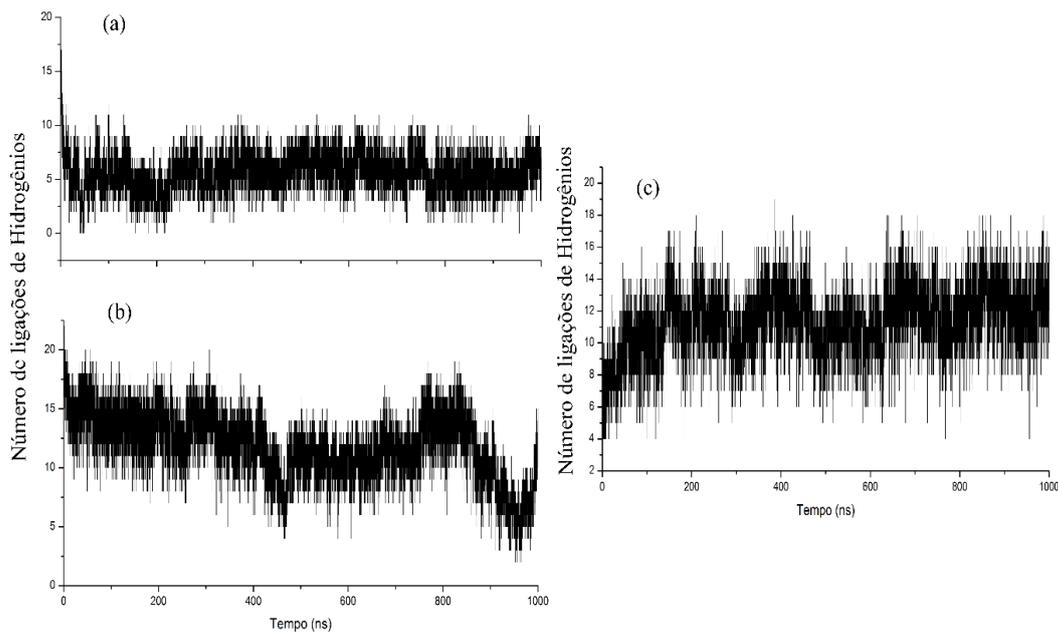


Figura 33: Número de ligações de hidrogênio em função do tempo de simulação. (A)- Sistema $DDK_{\text{água}}$; (B) $DDK_{\text{TFE/água}}$ (C) $DDK_{\text{GSA-TFE/ÁGUA}}$

4.1.4 Conformações finais dos sistemas com água e mistura TFE/água

Na Figura 34 temos as conformações finais dos sistemas: $DDK_{\text{água}}$, $DDK_{\text{TFE/água}}$ e $DDK_{\text{GSA-TFE/ÁGUA}}$. Na Figura 34A é apresentada a conformação final do sistema $DDK_{\text{água}}$, a conformação inicial desse sistema é a estrutura obtida por RMN (VERLY *et al.*, 2009). Nessa conformação podemos observar a perda total da estrutura enovelada em hélice. A Figura 34B é a estrutura final do sistema $DDK_{\text{TFE/água}}$. O peptídeo se mantém enovelado, mas seu terminal-N e terminal-C por ficarem em contato tendem a formar folha β . A curvatura do peptídeo é a mesma também observada na Figura 34C do sistema que teve como conformação inicial a vinda do cálculo com GSA. A dobra do peptídeo na mesma região observada as figuras Figura 34B e Figura 34C, poderia estar relacionada ao mecanismo de ação do peptídeo, pelo fato de a mistura TFE/água simular o ambiente na

interface membrana-água. Pudemos perceber essa dobra próximo a GLY-22 tanto no sistema $DDK_{TFE/água}$ quanto no sistema DDK_{GSA} .

Em estudos do DD K por Dicroísmo Circular, a mistura TFE/água induziu o enovelamento do peptídeo e foi a primeira análise que mostrou sua estrutura helicoidal, corroborada com estudo de RMN (VERLY *et al.*, 2009). A mistura TFE/água é largamente utilizada para a detecção e conservação de estruturas secundárias. (EICHENBERGER; VAN GUNSTEREN & SMITH, 2013; GERIG, 2014)

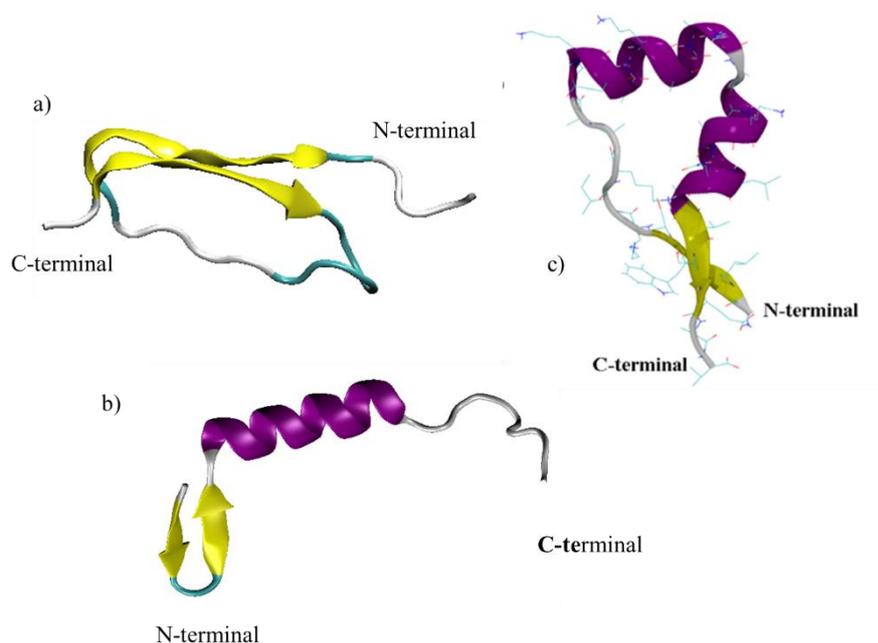


Figura 34: Conformações finais obtidas para o peptídeo DD K. (A) Sistema $DDK_{água}$ (B) $DDK_{TFE/água}$. (C) $DDK_{GSA-TFE/ÁGUA}$.

4.2 Resultados dos sistemas com monômeros em interface com bicamada POPC

A abordagem feita nessa seção refere-se aos resultados da simulação do peptídeo DD K na presença de bicamada POPC, conforme seção de métodos ([seção 3.6.2](#)), com 512 lipídeos, sendo 256 em cada face da bicamada. Os sistemas são descritos na Tabela 6.

A interação do peptídeo com micela DPC foi proposta inicialmente por Verly (2009) em que a face hidrofóbica do peptídeo fica em contato com a parte apolar da micela. No entanto, os peptídeos são expostos a parte das cabeças lipídicas formadas pelo grupo fosfatidilcolina que possui um grupo negativo formado pelo fosfato e um grupo positivo formado pela colina, assim a interação do peptídeo com essa superfície da bicamada pode ser dada tanto pelos resíduos carregados positivamente como as lisinas quanto pelos resíduos apolares como as alaninas, além do contato da face hidrofóbica do peptídeo com o core hidrofóbico da bicamada, composto pelas cadeias hidrocarbonadas da membrana modelo.

4.2.1 Conformações das estruturas dos sistemas com peptídeos em bicamada POPC

Simulação do sistema $DDK_{2\text{pep-popc}}$

A simulação do sistema $DDK_{2\text{pep-popc}}$ mostra mudança na estrutura do DD K quando interage com a bicamada POPC, como enfatiza a Figura 35. Nesse sistema pode ser observado que os resíduos do DD K próximos ao terminal-C se movimentam de encontro à bicamada nos 14 ns iniciais da simulação. Na Figura 35B, que está no tempo de simulação de 14 ns, se supõe uma interação inicial dos monômeros pode se dar pelo deslocamento e inserção dos resíduos terminais ALA -32 2 VAL 33 (Terminal-C) e LEU-2 e TRP-3 (terminal-N) na bicamada, assinalada em pontos cinza.

A Figura 35C mostra uma interação maior com a membrana modelo e um contato também pelo terminal-N com as cabeças de fosfolipídeos provocando uma dobra num dos monômeros na região formada por 3 alaninas, ALA-16, ALA-17 e ALA 18, isso acontece no tempo de 178 ns, maior detalhe na Figura 36. Os resíduos que formam a dobra também estão próximo a GLY-22, resíduo que dá flexibilidade ao peptídeo, e ainda próximo a duas lisinas: LYS 18 e LYS 23, causa flutuação durante a dinâmica, representado em maior detalhe na Figura 36.

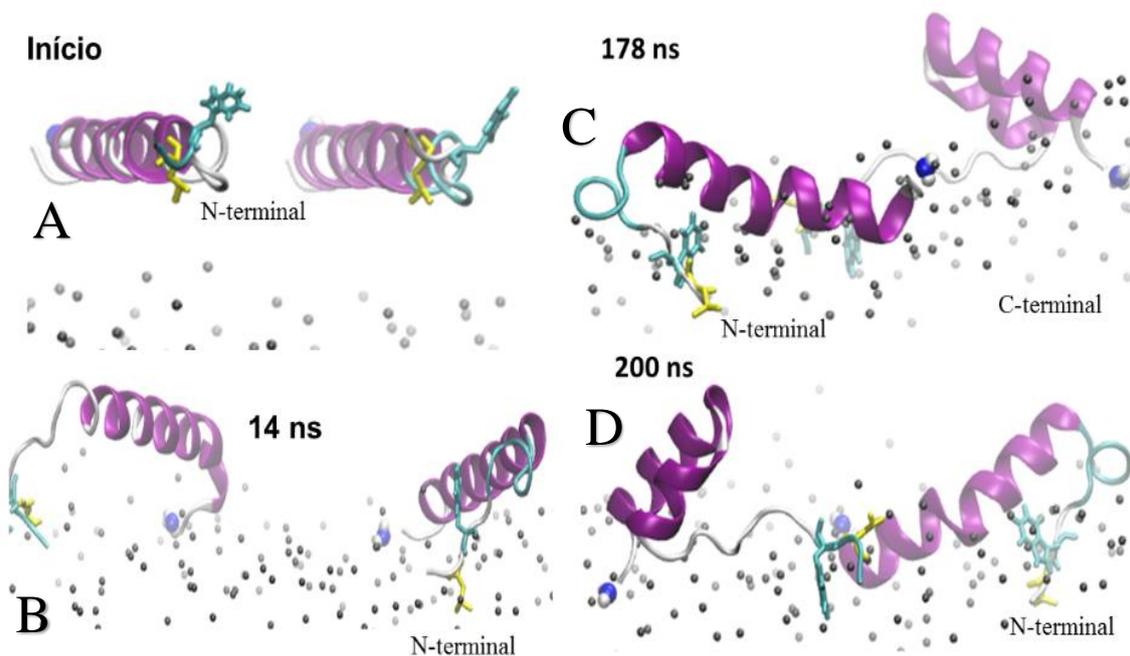


Figura 35: Representação dos monômeros de peptídeos em contato com a interface da bicamada POPC. A - Início da simulação. B – Simulação em 14ns. C- Simulação em 178 ns. D- Simulação em 200 ns. As esferas marrons são os átomos de fósforo das cabeças lipídicas.

Podemos supor que esse contato primeiramente pelo Terminal-C do DDK com a membrana modelo pode ser o início de seu mecanismo de ação, pois analisando a sequência do peptídeo, GLWSKIKAAAGKAAKAAAKAAGKAALNAVSEAV-NH₂, nota-se que o terminal-C é amidado e finda com dois resíduos hidrofóbicos (Ala-32 e

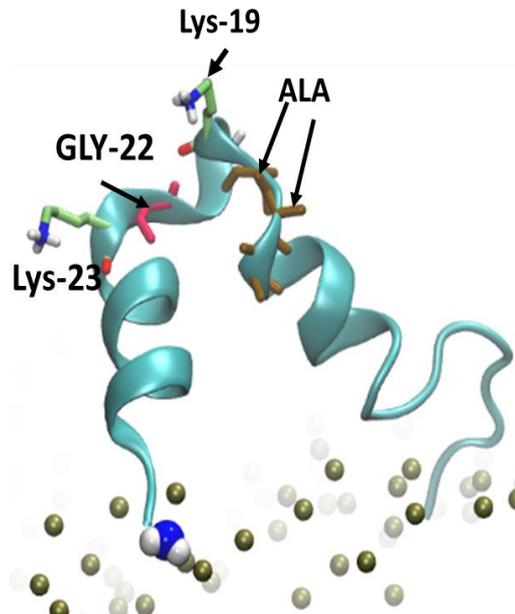


Figura 36: Dobra na região com os resíduos GLY-22 (rosa), LYS-19 (verde), ALA-18, ALA-17, ALA-16 (marrom). Esferas marrons são átomos de fósforo do grupo fosfato da membrana. Terminal-N em destaque em esferas azuis e brancas.

Val-33).

Um mecanismo semelhante é o que ocorreria com o mastoparan-X, um peptídeo catiônico, de sequência INWKGIAAMAKKLL-NH₂, presente em veneno de vespas. Sua estrutura é anfifílica em forma de hélice, ele é capaz de induzir a granulação de mastócitos, provocando lise, hemólise e algumas vezes apresenta ação antimicrobiana.(TODOKORO *et al.*, 2006) O aumento da potencialidade das atividades biológicas desse peptídeo parece estar relacionado a amidação dos resíduos do Terminal-C. Há estudos que relatam essa maior atividade do mastoparan amidado em comparação ao mastoparan sem amidação.(ALESSANDRA *et al.*, 2014) Outro ponto de contato

inicial seria pelos resíduos hidrofóbicos do terminal-N, Ile-1, Trp-3 no mastoparan-X, Leu-2 (amarelo) e Trp-3 (azul) no DDK, assinalados na Figura 35. Na mesma figura observa-se que os resíduos hidrofóbicos do terminal-N do DDK interagem com a membrana modelo quase que ao mesmo tempo que os do terminal-C (Figura 37). Como o mastoparan-X, o DDK também forma hélice- α anfifílica, que seria estabilizada na interface membrana-água após a interação dos terminais do peptídeo com a membrana modelo.

Uma aproximação poderia se dar pela inserção dos resíduos hidrofóbicos ALA-32, VAL-33 buscando contato com a parte hidrocarbonada dos lipídeos. A Figura 37 evidencia melhor o contato durante a simulação do terminal -C com a bicamada através dos resíduos já citados e da amida terminal em azul.

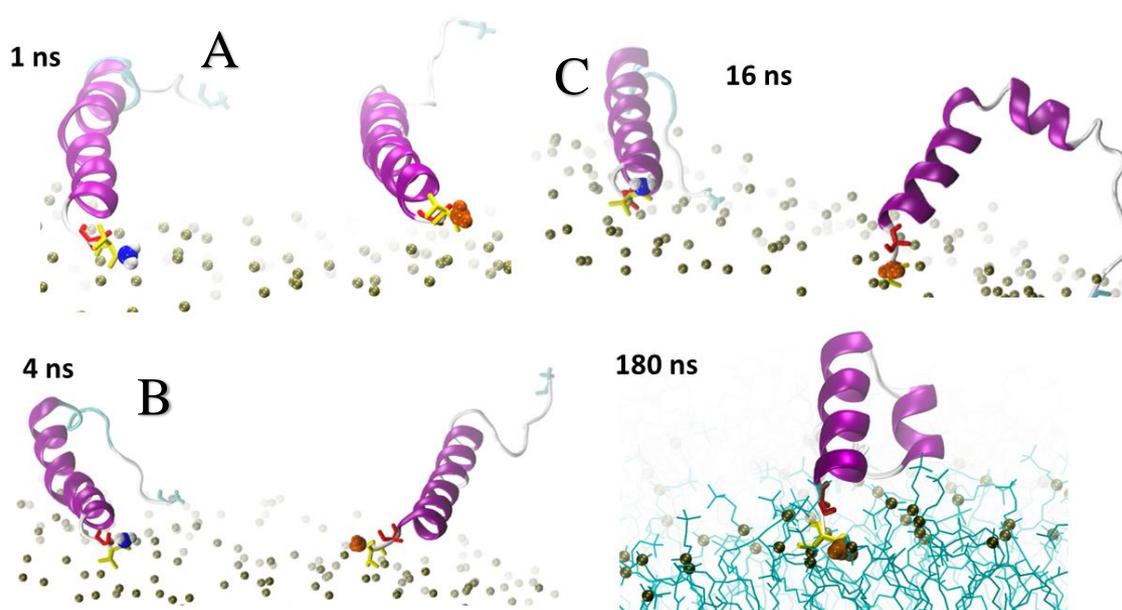


Figura 37: Representação dos monômeros de peptídeos em contato com a interface da bicamada POPC terminal-C (em destaque: ALA-vermelho, VAL-amarelo, amidação- azul para o peptídeo A, amidação- laranja para o peptídeo B) As esferas marrons são os átomos de fósforo das cabeças lipídicas.

Simulação do sistema DDK_{3pep-popc}

A simulação do sistema DDK_{3pep-popc}, representada na Figura 38 mostra o início da formação de um aglomerado de peptídeos. Figura 38A está no início da simulação em

que os peptídeo, na Figura 38B é o início do deslocamento do peptídeo B para formar um aglomerado com o peptídeo C, como mostra a Figura 38C. Esse aglomerado permanece por toda a dinâmica e é caracterizado pela interação entre as faces hidrofóbicas formadas por alaninas, enquanto a face hidrofílica representada pelas lisinas, ficam em contato com a água (peptídeo B) e em contato com as cabeças lipídicas (peptídeo C) (Figura 38).

Os agregados de peptídeos são importantes seja antes ou depois da ligação com a superfície da bicamada, é um pré-requisito para a formação de poros, uma que esses aglomerados que formam a tensão na superfície da bicamada e provocam sua ruptura. A presença de uma estrutura secundária helicoidal estável nos peptídeos não é pré-requisito para a inserção desses peptídeos, mas sim a concentração mínima para ocorrer a ruptura da membrana modelo. (SENGUPTA *et al.*, 2008) Em certo momento esses aglomerados de peptídeo ajudam a atingir uma concentração mínima, modificando a tensão na superfície da membrana modelo, e o peptídeo um ou dois espontaneamente se insere até o core da bicamada (BOND & KHALID, 2010). A inserção do DD K não foi aqui observada, acreditamos que seja devido à proporção peptídeo/lipídeo em que o lipídeo está em muito maior quantidade.

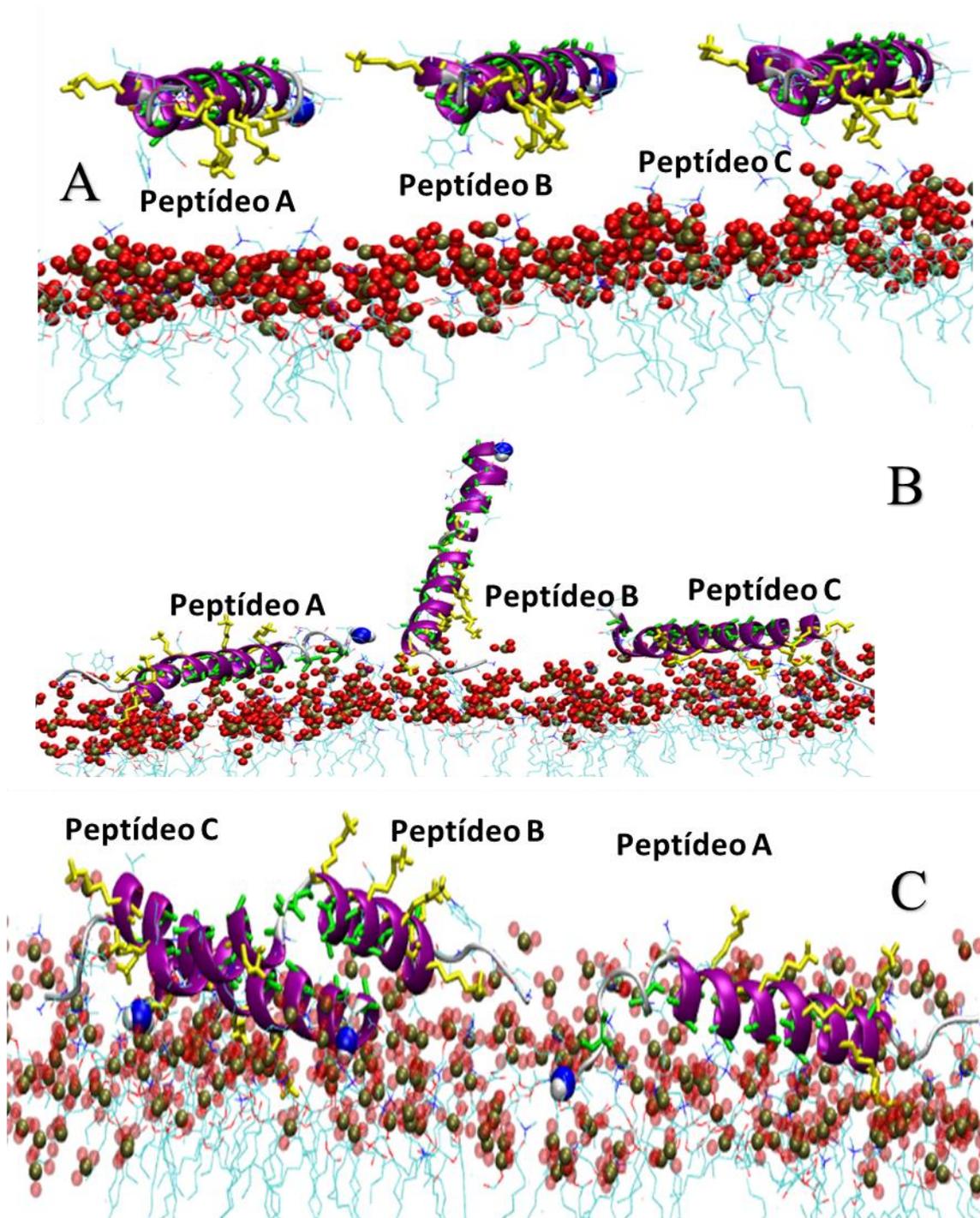


Figura 38: Representação da simulação do sistema DDK_{3pep-popc}. O peptídeo DDK está representado em roxo, os resíduos de lisina em amarelo e os resíduos de alanina em verde. N-terminal em destaque em azul de A- Simulação em 0ns. B- Simulação em 5 ns, C – Simulação em 135 ns. As esferas marrons são os átomos de fósforo e as esferas vermelhas dos oxigênios do grupo fosfato bicamada, que está com a cauda carbônica representada em azul claro.

Simulação do sistema DDK_{4pep-popc}

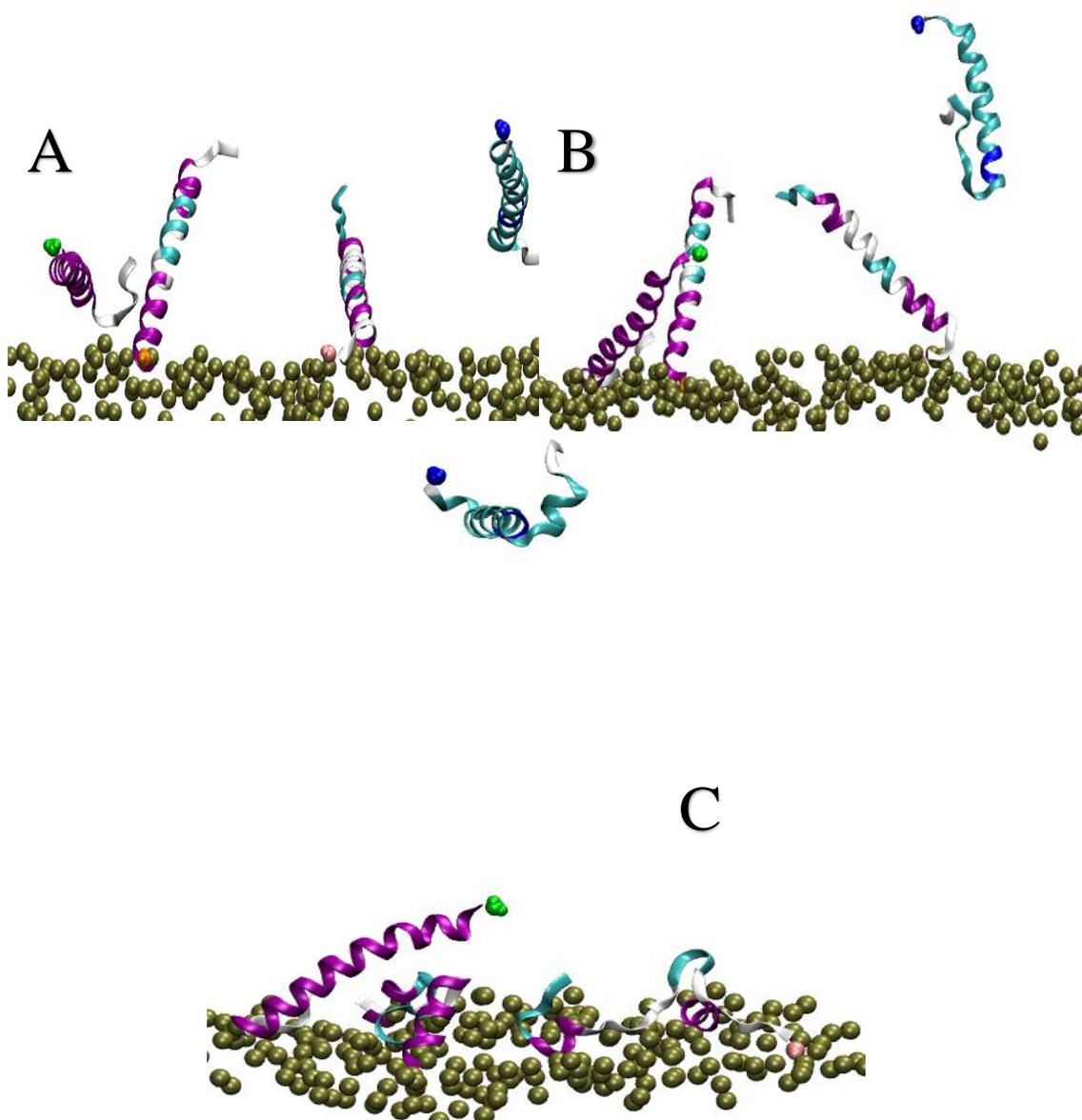


Figura 39: Simulação do sistema DDK_{4pep-popc}. A- Simulação em 3ns. B- 50 ns C-140 ns. As esferas marrons são os átomos de fósforo das cabeças dos fosfolípidos.

A Figura 39 está ilustrando a dinâmica do sistema DDK_{4pep-popc}. Os monômeros do DD K formaram aglomerados mais evidentes na Figura 39C, em que um dos monômeros está em contato com o outro lado da bicamada e não se junta ao aglomerado. Percebe-se uma perturbação maior da membrana modelo quando o sistema tem mais peptídeos

corroborando a necessidade de uma maior concentração de peptídeos na superfície da bicamada.

4.2.2 RMSD e RMSF dos peptídeos em bicamada POPC

A Figura 40 representa os valores de RMSD ao longo das simulações com membrana modelo em presença de diferentes quantidades de DD K como descrito na Tabela 6, tomando como referência a estrutura obtida por RMN. Na Figura 40A é apresentado o gráfico com os valores do RMSD do sistema $DDK_{2\text{pep-popc}}$ que variam entre 0,2 a 1,1nm. Os valores de RMSD do peptídeo A variam de 0,2 a 1,2 nm e 0,2 a 1,1 nm o peptídeo B.

Na Figura 40B representa a variação de RMSD do sistema do $DDK_{3\text{pep-popc}}$. O valor de RMSD varia de 0,2 a 0,6 nm para a peptídeo A, 0,2 a 0,8 nm, para o peptídeo B e 0,3 a 0,5 nm para o peptídeo C. Na Figura 40C é apresentado a variação do RMSD para o sistema $DDK_{4\text{pep-popc}}$, que apresentam valores de 0,2 nm a 1,0 nm para o peptídeo A, 0,2 a 1,3 nm para o peptídeo B, 0,2 a 0,8 nm para o peptídeo C, 0,2 a 0,7 nm peptídeo D.

O deslocamento dos peptídeos, para formar os aglomerados, demonstra “atração” entre essas estruturas e uma tendência de cooperação para uma possível ação, como ilustrado na Figura 38 e Figura 39, com isso a variação do RMSD pode ser mais alta uma vez que esse peptídeo desestrutura ao se deslocar para essa formação. A estrutura inicial nessas simulações foi helicoidal, a mesma obtida em RMN. Porém, peptídeos mais distantes da membrana modelo, mergulhados no *bulk* aquoso, não estabilizam hélices, conforme mostrado na Figura 39C. A interação inicial com a bicamada pelos terminais do peptídeo e as interações iniciais nos aglomerados de peptídeos também são fatores desestabilizantes. É possível que as hélices se recomponham em tempos mais longos de simulação, visto que são anfifílicas e estão em ambiente de interface-membrana.

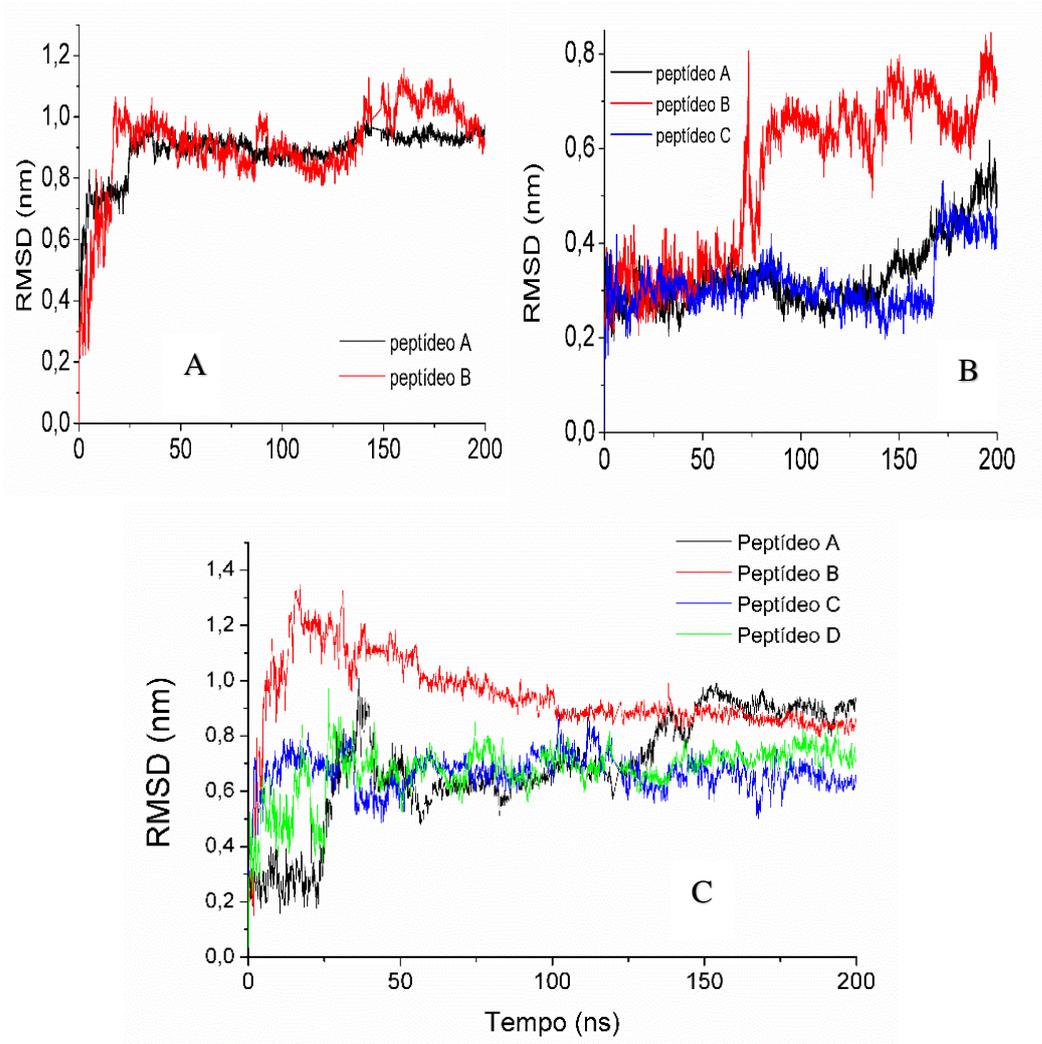


Figura 40: Variação de RMSD do *backbone* dos sistemas com peptídeos sobre a bicamada POPC. A- DDK₂pep-popc B- DDK₃pep-popc e C- DDK₄pep-popc

RMSF do sistema DDK₂pep-popc

A seguir temos o gráfico de *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF) ou a raiz quadrática média da flutuação de cada resíduo na dinâmica em relação à sua posição média, usando, como no cálculo do RMSD, os átomos do *backbone*. A flutuação de cada resíduo de cada monômero de peptídeo do sistema DDK₂pep-popc é exibida nos gráficos da Figura 41. Os resíduos que mais variam no peptídeo B são ALA9, GLY-10, LYS-11, além de ALA-18, LYS 19 e ALA-20, esse foi o peptídeo que mais houve flutuação. O peptídeo A linha em azul tem maior flutuação apenas em seu terminal-C.

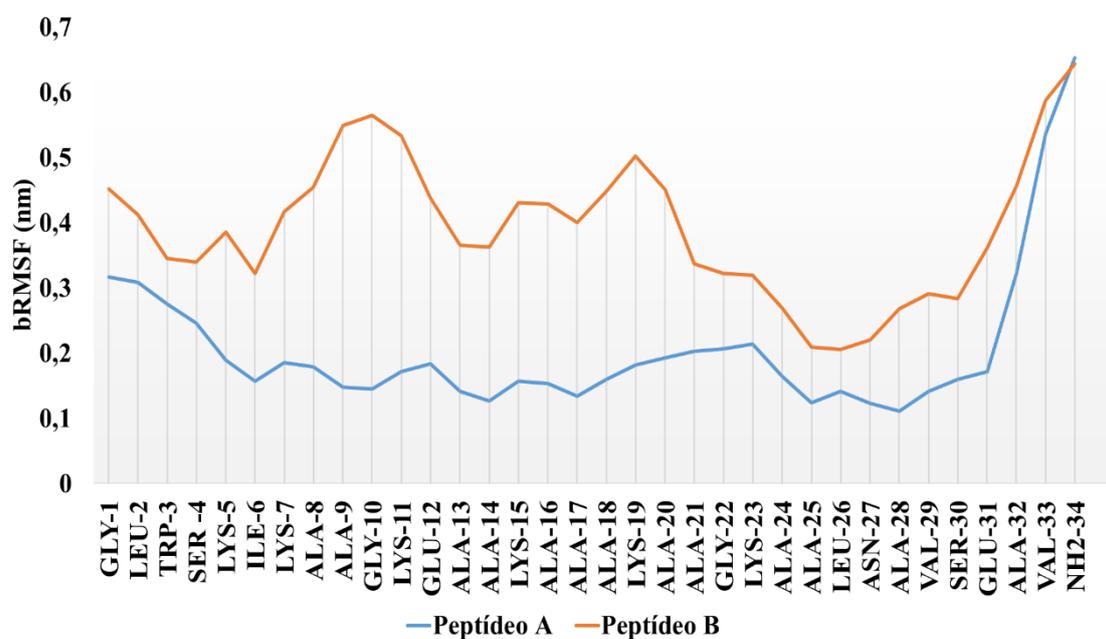


Figura 41: RMSF do *backbone* dos monômeros do sistema DDK₂pep-popc em função da posição dos resíduos de aminoácidos.

RMSF do sistema DDK_{3pep-popc}

A Figura 42 mostra a variação de RMSF do sistema DD K_{3pep-popc} em função da posição dos resíduos de aminoácidos. Os peptídeos A e C mantiveram pequena flutuação em seus os resíduos, no entanto o peptídeo B, por se aproximar do peptídeo C para formar um aglomerado, mostrou maior flutuação de acordo com a Figura 38C, o resíduo de flutuação mais acentuada foi a GLY-22.

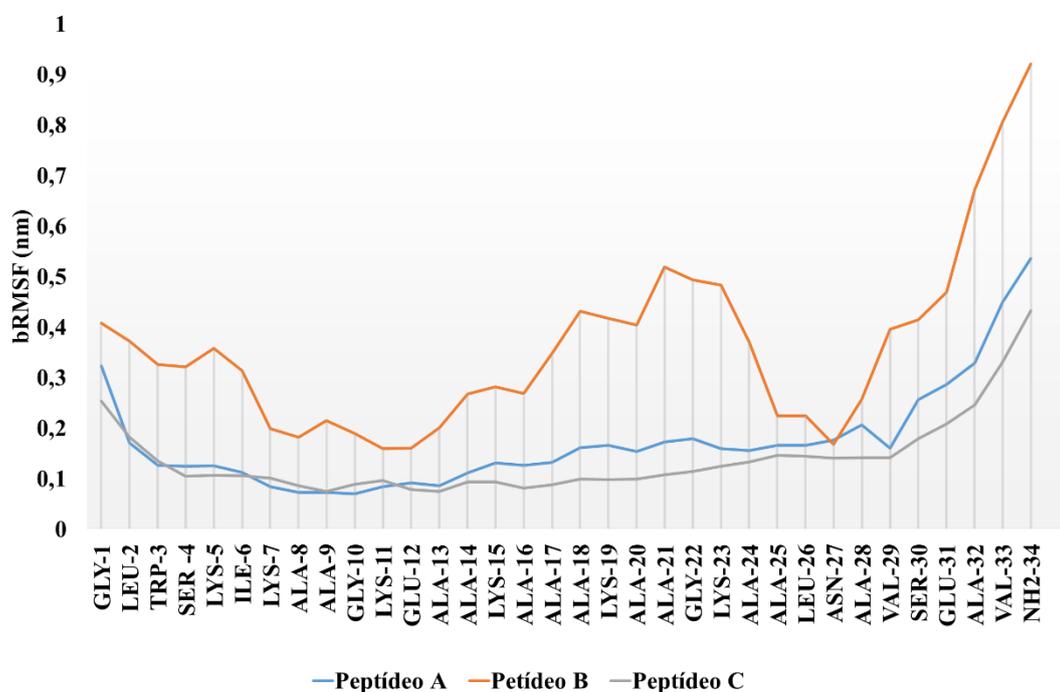


Figura 42: Variação de RMSF do *backbone* dos monômeros do sistema DDK_{3pep-popc} em função da posição dos resíduos de aminoácidos.

RMSF do sistema com 4 peptídeos DD K em bicamada POPC

O gráfico de RMSF do sistema $DDK4_{\text{pep-popc}}$ está representado na Figura 43. Os valores do RMSF do peptídeo A, B e D mostram uma variação maior que para o peptídeo C. É possível observar durante a simulação alguns desses monômeros se aproximando para interagir entre si e que há perda de estrutura para que essa aproximação ocorra, como observado na Figura 39C. Por perder boa parte de sua estrutura o peptídeo D possui uma maior flutuação, sendo também possível perceber a interação desse peptídeo com o peptídeo A, ambos assinalados na Figura 44. Pode-se observar o início de um aglomerado, em que as faces hidrofóbicas do peptídeo C e A começam a interagir (Figura 39B).

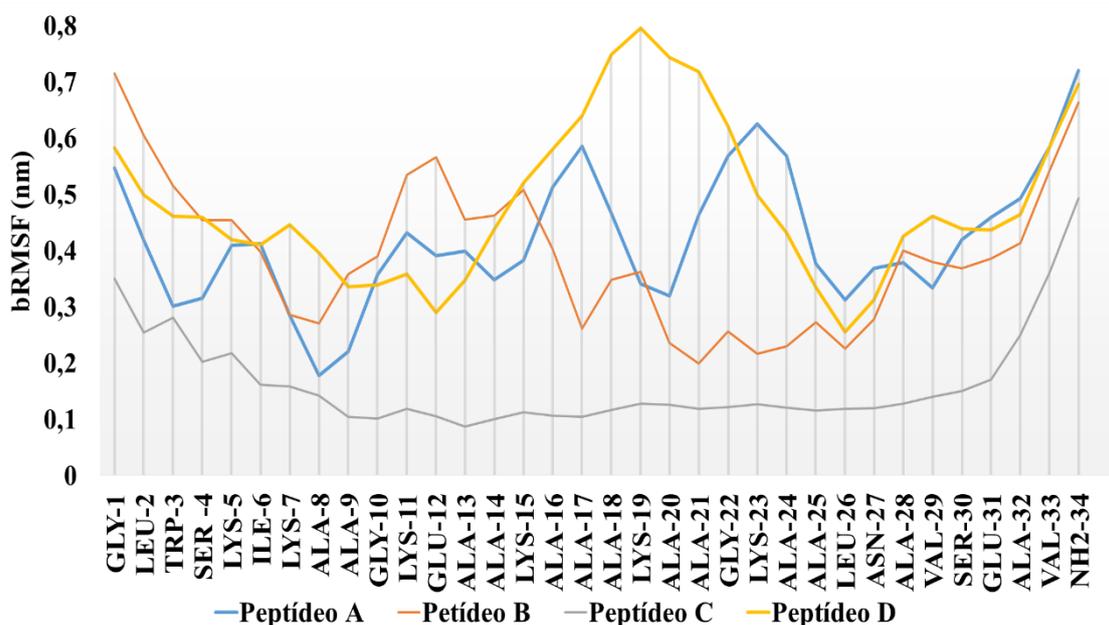


Figura 43: RMSF do *backbone* dos monômeros do sistema $DDK4_{\text{pep-popc}}$ em função da posição dos resíduos de aminoácidos.

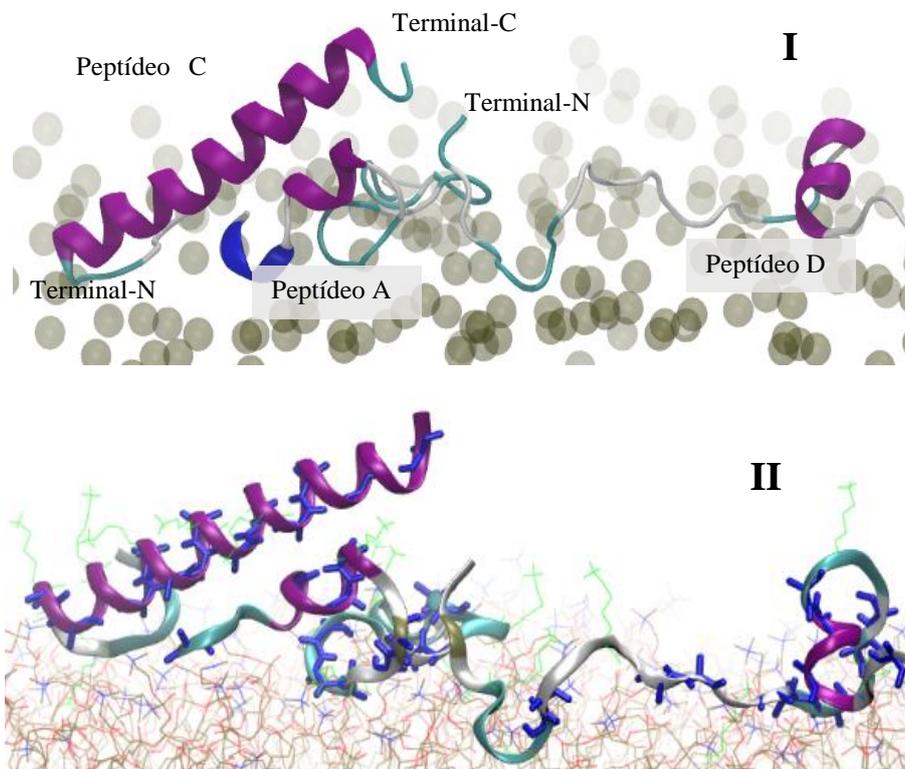


Figura 44: Estruturas finais do sistema DDK4pep-popc, aglomerado envolvendo os peptídeos A, C e D. II- Estruturas finais com alaninas em azul e lisinas em verde claro.

Diferente das simulações anteriores a simulação com 4 peptídeos expressou um movimento maior dos peptídeos e consequente variação maior na estrutura dos resíduos da cadeia peptídica como indicado gráfico da Figura 43. O peptídeo C manteve a estrutura helicoidal e por isso apresentou pouca flutuação conformacional.

4.2.3 Densidade eletrônica dos sistemas com peptídeos em bicamada POPC

A densidade eletrônica é uma propriedade em que se compara mais diretamente simulações de membranas com técnicas experimentais. Esse perfil pode ser calculado no binário *g_density* do pacote GROMACS4.6.7. (HESS; UPPSALA & LINDAHL, 2008) Para essa análise foram utilizados três grupos de átomos: os que formam a cabeça dos fosfolipídeos, o grupo de átomos da cauda lipídica e as moléculas de água para o gráfico

apresentado na Figura 45. Para cada tipo de átomo foi inserida no programa a quantidade de elétrons para o cálculo das densidades eletrônicas.

Na Figura 45 estão os gráficos dos perfis de densidade eletrônica das cabeças lipídicas dos sistemas controle, $DDK_{2\text{pep-popc}}$, $DDK_{3\text{pep-popc}}$, $DDK_{4\text{pep-popc}}$ medidos no eixo Z da caixa de simulação perpendicular ao plano da membrana modelo. No eixo X do gráfico do sistema controle aparece o comprimento da caixa da simulação da membrana modelo POPC, que é cerca de 13 nm e entre 4 e 9 nm aparecem as estruturas da bicamada (cabeça e caudas dos fosfolípidos).

O gráfico da Figura 45A mostra o perfil de densidade eletrônica do sistema controle em que não há presença do peptídeo na superfície da bicamada POPC. A densidade do conjunto de átomos da cabeça dos fosfolípidos está assinalado em preto, a do conjunto de átomos da cauda está vermelho, água está assinalada em azul, a qual não penetra na parte a hidrofóbica da membrana modelo mostrando densidade zero onde a densidade da cauda lipídica é máxima, ou seja, não há presença de água no interior da bicamada para o grupo controle. A Figura 45B mostra a diferença dos valores de densidades eletrônicas das cabeças lipídicas de todos os sistemas com peptídeos com os valores das densidades das cabeças lipídicas do sistema controle. Uma vez que, os sistemas simulados, com o DD K sobre a bicamada POPC, não mostraram inserção do peptídeo na bicamada, a representação da diferença dos valores de densidade tornou mais evidente as alterações de cada sistema das cabeças lipídicas em presença de DD K.

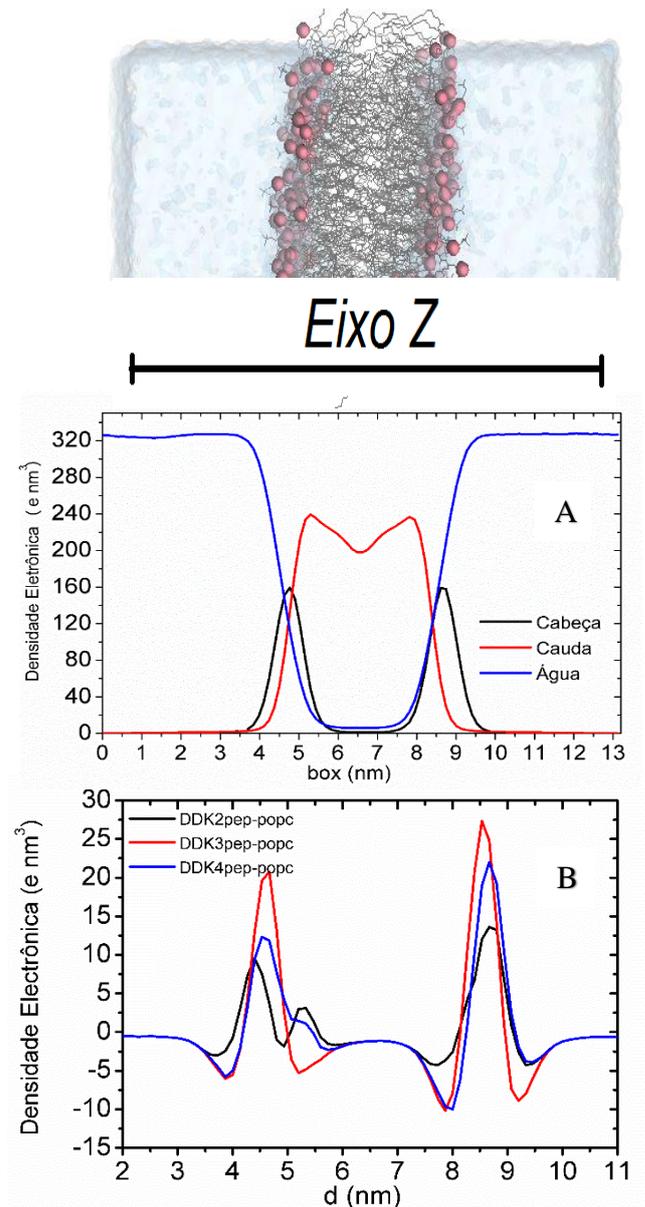


Figura 45: Perfil de densidade da bicamada POPC na presença de peptídeos. O desenho representa o eixo Z da bicamada, utilizado na análise A- Densidade controle. B – Diferença das densidades eletrônicas das cabeças lipídicas dos sistemas DD K₂pep-popc, DD K₃pep-popc, DD K₄pep-popc, subtraídas das densidades das cabeças lipídicas do sistema controle.

4.2.4 Parâmetro de ordem da bicamada POPC com peptídeos.

Na Figura 46 obteve-se o parâmetro de ordem ou *deuterium order parameter* (S_{CD}) para investigar a desorganização da membrana modelo em função da presença de peptídeos. O programa utiliza a Equação 19. θ_z é o ângulo entre o eixo z, como o desenho da Figura 45 da caixa de simulação representado e a molécula em consideração (POPC).

$$S_z = \frac{3}{2} \langle \cos^2 \theta_z \rangle - \frac{1}{2} \text{ (eq.19)}$$

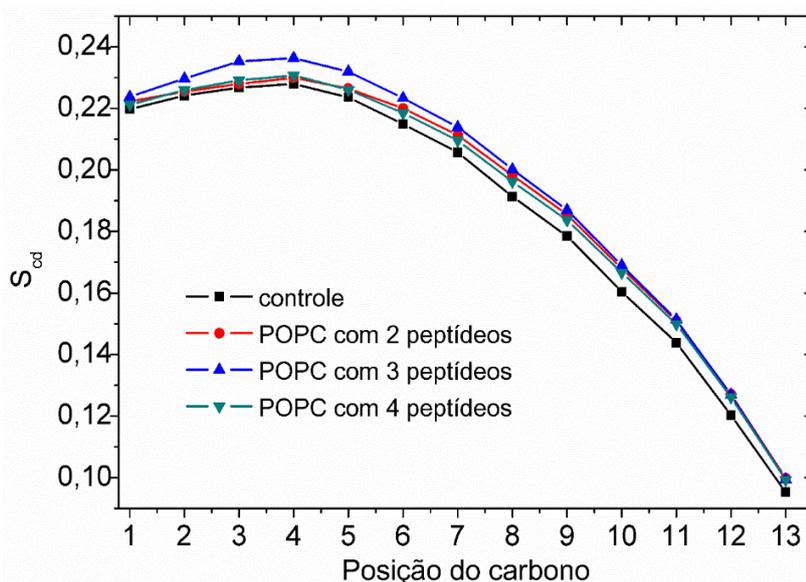


Figura 46: Parâmetro de ordem para a cadeia saturada das moléculas de POPC em sistema sem peptídeo (preto), sistema com 2 peptídeos (vermelho), sistema com 3 peptídeos (azul), sistema com 4 peptídeos (verde).

No eixo x está cada átomo de carbono da cadeia saturada da molécula de POPC, de forma que a ordem é ligeiramente crescente até o quarto átomo e depois decresce até o extremo da cadeia, o grupo metila na posição 13 onde a organização é maior.

Os valores do S_{cd} dos sistemas foram muito próximos ao controle demonstrando pouca diferença na estrutura da bicamada POPC quando na presença de peptídeos, os quais não se inseriram além da região das cabeças lipídicas. Observa-se que o sistema

com 3 peptídeos obteve ligeiramente maior ordenação entre os átomos de carbono 3 a 4 em relação aos demais sistemas e que, a partir do sexto átomo de carbono, todos os sistemas com peptídeos apresentam maior organização.

A análise global dos resultados com peptídeos em bicamada até aqui mostra que o peptídeo DD K tende a formar aglomerados ao interagir com a membrana modelo. Quanto mais peptídeos na interface membrana-água maior a probabilidade em formar aglomerado na bicamada. A associação de peptídeos pela face hidrofóbica da hélice, observada na Figura 38C, em dois dos três peptídeos do sistema, abre a questão sobre a estabilidade dessa associação por contato hidrofóbico e sua importância para os modelos de poros, que será investigada no tópico seguinte.

Foi observado por simulação que a magainina se liga na face hidrofílica da bicamada e se insere com em poucos nanossegundos na face a lipofílica da bicamada, mas antes esse peptídeo também se agrega. (LEONTIADOU; MARK & MARRINK, 2006) A inserção do DD K não foi observada, mas foi possível fazer o estudo dinâmico do peptídeo no tempo de 200 ns, sendo observada a interação do peptídeo com as cabeças lipídicas da bicamada e a formação de agregados. A não inserção pode ser devido ao pequeno número de monômeros de DD K na bicamada.

Entende-se que o aumento da quantidade de peptídeos, o que levaria ao aumento da concentração na interface, poderia romper a bicamada, pois esse é um dos principais pré-requisitos para essa ação no modelo carpete, bem como em outros mecanismos ainda não entendidos totalmente por ser um sistema cuja a estrutura do peptídeo adquire muitas formas de ação. (BOND & KHALID, 2010; LOPEZ *et al.*, 2006) Ao analisar a dinâmica dos peptídeos sobre a membrana modelo, pode-se observar alguma similaridade com a variação de estrutura encontrada nas estruturas finais com os sistemas em TFE/água. Como as flutuações estruturais e a dobra na região Gly-22.

4.3 Resultados das dinâmicas dos poros em membrana modelo POPC

A abordagem a seguir refere-se a 3 poros com quantidades de peptídeos diferentes conforme descrito na Tabela 7. As simulações foram conduzidas com conformações pré-montadas de poros, uma vez que a inserção do peptídeo demandaria tempo não acessíveis em simulações de Dinâmica Molecular tradicionais.

4.3.1 Conformações dos poros pré-montados

Foram obtidas diferentes conformações dos poros no servidor ROSIE. Foram eleitos 10 conjuntos de conformações de baixa energia e com monômeros circulares e simétricos. O algoritmo elegeu um representante de conformação mais provável de cada grupo (item 3.6.3). As conformações de poros com grande espaçamento entre os terminais-C de cada monômero foram excluídas devido à inviabilidade para inserir na bicamada.

A conformação escolhida para o poro com 6 monômeros de peptídeos DD K foi de acordo com a Figura 47A. O poro com 7 monômeros de peptídeo está representado na Figura 47B e o poro com 8 monômeros do peptídeo está representado na Figura 47C.

Essas configurações de poro inferem duas predições de dois tipos de poro, a primeira baseada no contato entre as faces hidrofóbicas dos peptídeos em hélice, observada no tópico anterior (Figura 47A e Figura 47B) a segunda de acordo com o que propôs Verly et. al (2009) em que as lisinas, que fazem parte da face hidrofílica do peptídeo, estão voltadas para a água no lúmen do poro, enquanto a face hidrofóbica do peptídeos é voltada para a face hidrofóbica dos lipídeos (Figura 47C).

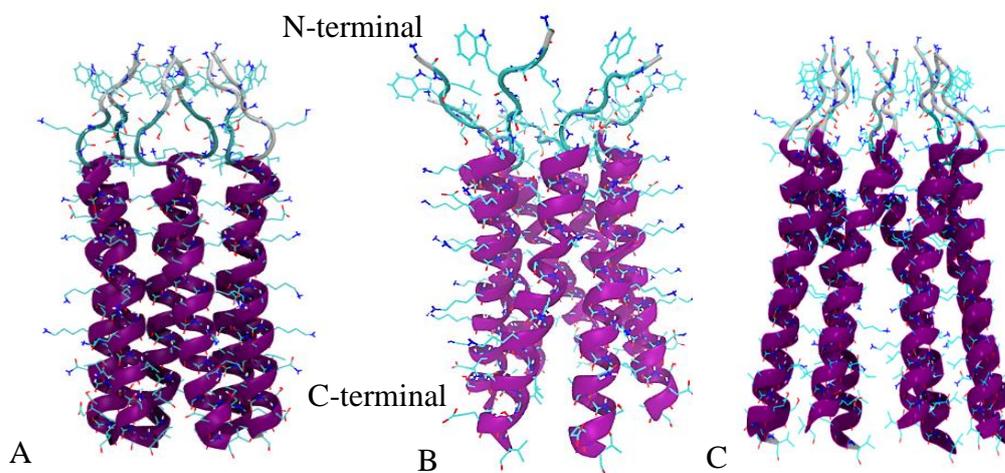


Figura 47: Conformações de poros do peptídeo DD K com menor energia, obtidas no servidor ROSIE. (A) Poro com 6 monômeros de peptídeos; (B) Poro com 7 monômeros de peptídeos; (C) Poro com 8 monômeros de peptídeos.

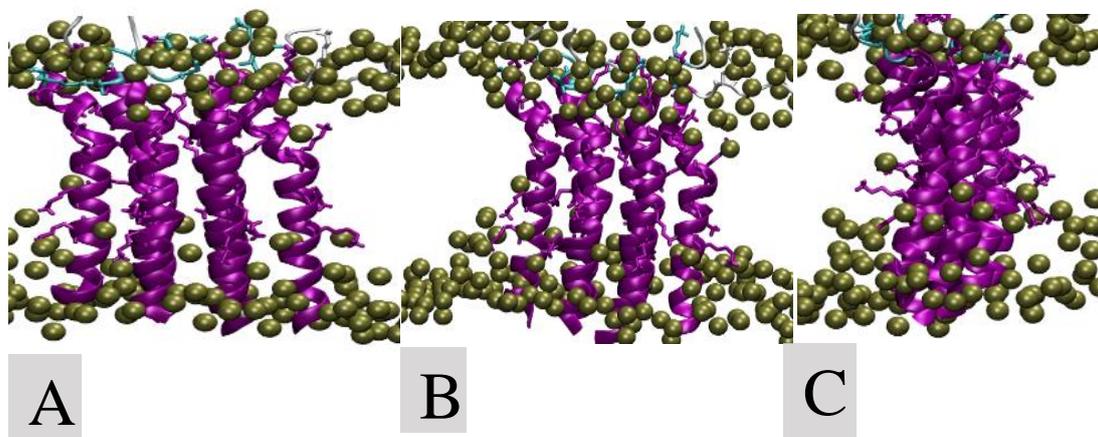


Figura 48: Simulação do poro com 6 peptídeos. A- 30 ns, B-56 ns, C- 72ns. Esferas são átomos de fosforo das cabeças lipídicas.

A Figura 48 ilustra a evolução temporal do poro com 6 peptídeos nos tempos A-30ns, B - 56ns, C – 72ns da Dinâmica Molecular. Os monômeros se encontram inicialmente lado a lado na forma circular. A cabeça dos fosfolipídeos estão representadas

em esferas amarelas, essas tendem a curvar-se para o centro da membrana atraídas pelos resíduos de lisina. A configuração do poro com 6 peptídeos possui lisinas voltadas para a parte externa do poro, isso faz com que esse resíduo carregado entre em contato tanto com os fosfolipídeos quanto com moléculas de água que passam entre a estrutura da membrana e a estrutura dos monômeros de peptídeos. Ou seja, mesmo com o lúmen do que seria o poro estando colapsado pelo efeito hidrofóbico, esse tipo de arranjo provoca extravasamento osmótico com a passagem de água pelos interstícios entre as cabeças lipídicas e as lisinas, como mostrado na Figura 49. Os resíduos de lisina arrastam as cabeças lipídicas para o centro da membrana, tendendo a formar o poro toroidal clássico. Como a face do peptídeo mais hidrofóbica fica dentro do que seria o lúmen do poro, os monômeros tendem a se unir por contato hidrofóbico como um feixe de peptídeos, como caracterizado na Figura 48C e Figura 50. Esse “poro” permanece nessa configuração,

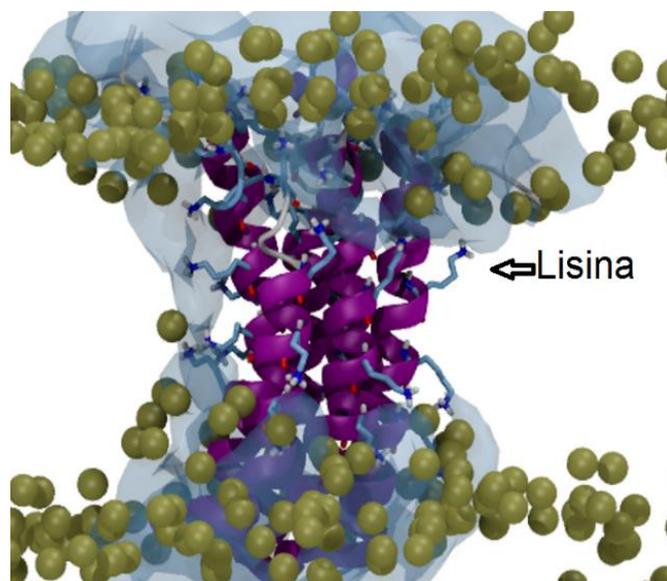


Figura 49: Simulação do DDKporo6-popc, a água em azul translúcido passando por fora do poro, a lisina de um dos monômeros é assinalada.

como um feixe de peptídeos unidos pelos resíduos hidrofóbicos, até o final da simulação.

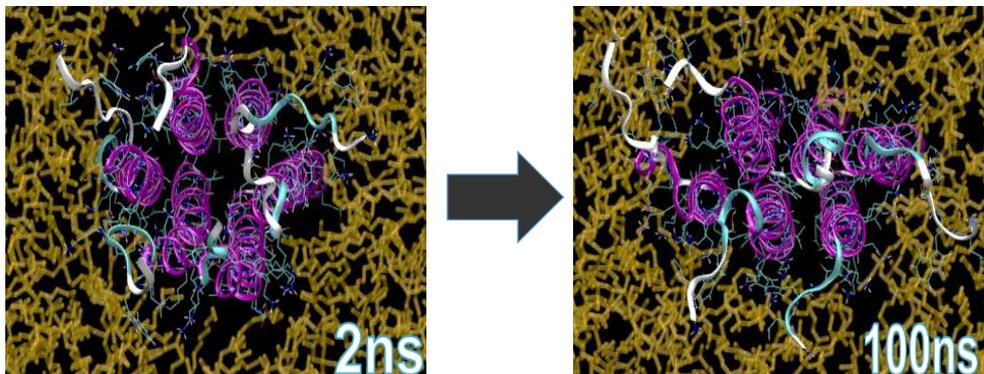


Figura 50: Simulação do sistema $DDK_{\text{poro6-popc}}$ com abertura em tempo de 2ns e fechado em 100ns.

A Figura 50 mostra a visão superior do $DDK_{\text{poro6-popc}}$, em que o poro está aberto em 2ns e nos 100ns está fechado. Há espaço entre os monômeros e a membrana, representada em amarelo, nesse espaço é por onde as cabeças de fosfolípídeos se inserem para ter contato com a face carregada do peptídeo DD K.

As faces hidrofóbicas dos monômeros do peptídeo DD K também se uniram no poro contendo 7 peptídeos. Essa configuração foi proposta pelo programa Symmetric Docking (ANDRÉ LAB, 2007) como de menor energia. Sua posição inicial foi demonstrada na Figura 47B, a qual também possui resíduos de lisina voltados para a cadeia acila da membrana. A evolução da dinâmica do sistema está ilustrada na Figura 51, em A, o poro permanece aberto e em B e C fechado.

A Figura 51C foi assinalada com um círculo tracejado para indicar a curvatura feitas pelas cabeças dos fosfolípídeos das moléculas de POPC, constatando a interação com a face hidrofílica do peptídeo. O mecanismo do modelo proposto de poro demonstra a interação da cabeça polar com as lisinas do peptídeo. Esse poro se mantém estável nessa configuração durante toda a simulação, assim como o poro do sistema $DDK_{\text{poro6-popc}}$. Os

monômeros de peptídeos se mantêm unidos também como um feixe de peptídeos e causam a curvatura dos fosfolipídeos progressivamente. (Figura 51)

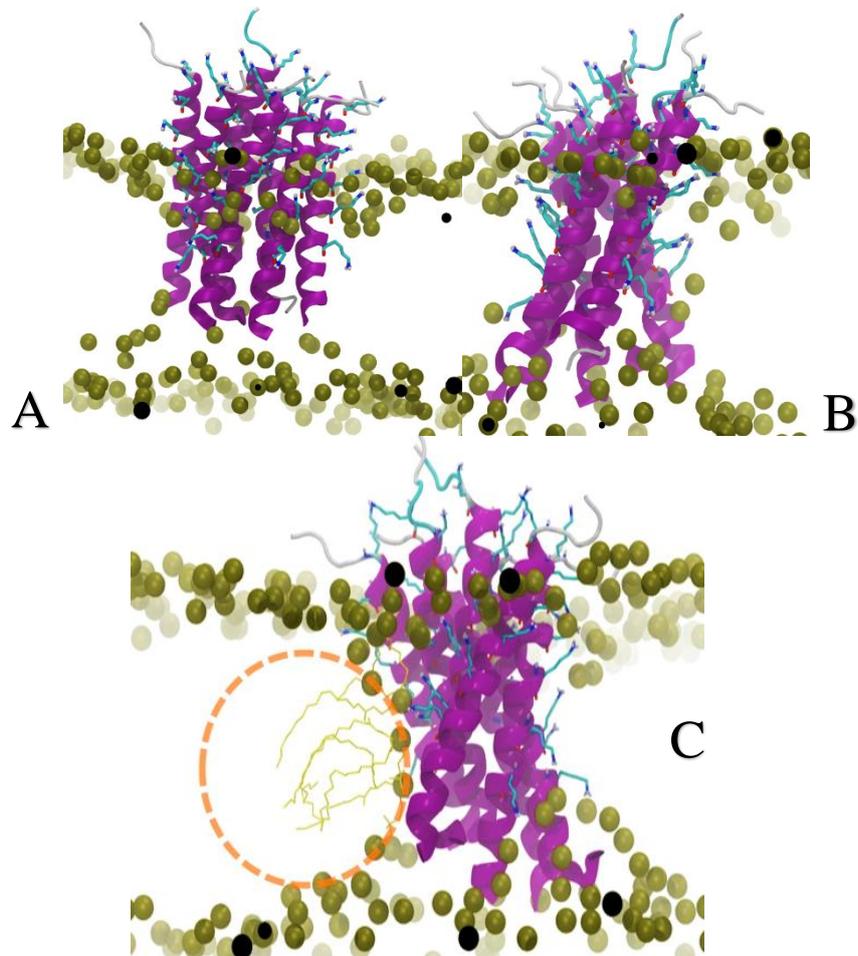


Figura 51: Simulação do sistema DDK_{poro7}-popc, os peptídeos estão representados em roxo, os átomos de fósforo em esferas marrons, no círculo tracejado são as moléculas de POPC alinhadas em contato com os peptídeos do poro. A- 30 ns B-60 ns C-148ns

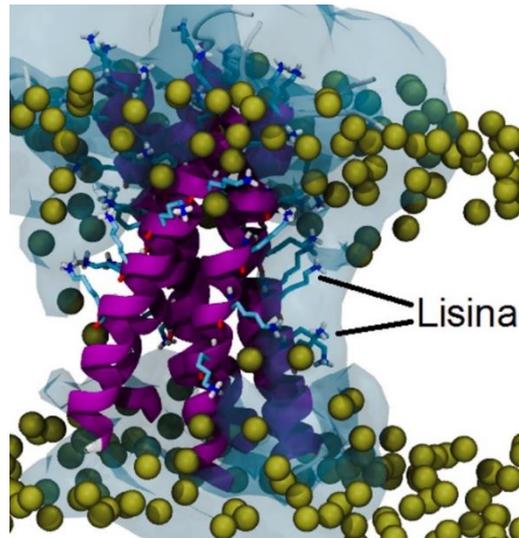


Figura 52: Poro colapsado do sistema DDKporo7-popc, a representação em azul da água translúcida passando por fora do lúmen, em contato com as lisinas assinaladas na figura. As esferas amarelas são átomos de fósforo das cabeças fosfolipídicas da bicamada.

Na Figura 52 mostra-se a passagem da água por fora do poro, em contato com cabeças de fosfolípeos representadas pelas esferas amarelas que são os átomos de fósforo. No mecanismo de poro toroidal, os peptídeos causam uma reorganização na membrana, que é a curvatura dos fosfolípeos de forma que os peptídeos possam ser alinhados dentro da membrana.(BOND *et al.*, 2008) O modelo ilustrado nas Figura 49 e Figura 52 mostra que as lisinas, resíduos carregados positivamente formando interstícios por onde passa moléculas de água (Figura 52). O resíduo lisina, portanto, é fundamental para essa interação e também para a passagem de água, ainda que o poro se mantenha colapsado pelas faces hidrofóbicas.(UNNERSTÅLE, 2010)

Conforme mostrado na Figura 47C, o sistema DDK_{poro8-popc} possui resíduos de lisina, voltados para dentro do poro. De acordo com a Figura 53, no início da simulação do sistema DDK_{poro8-popc}, os peptídeos estão alinhados e o poro está aberto, durante a simulação os peptídeos se repelem devido à grande repulsão entre cargas positivas das lisinas no interior do poro e a abertura se expande.

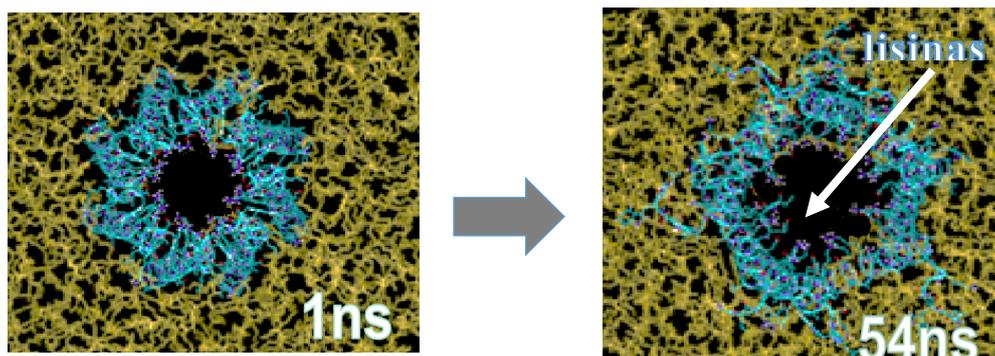


Figura 53: Visão superior do sistema DDKporo8-popc. Em azul estão os peptídeos formando o poro e em amarelo a bicamada POPC

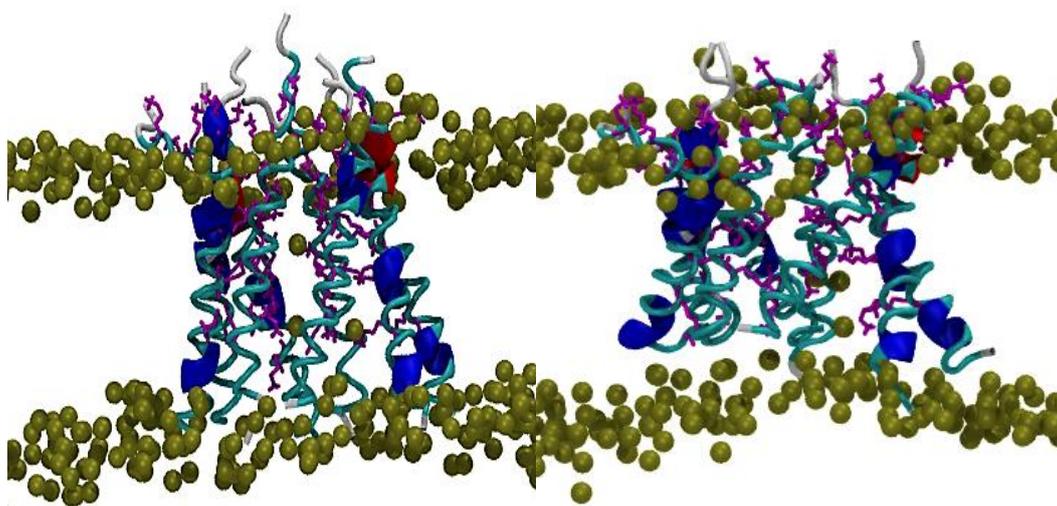


Figura 54: Simulação do sistema DDK_{poro8-popc}. Em azul estão os monômeros de DDK, as esferas amarelas são a representação das cabeças dos fosfolipídeos da bicamada POPC, em roxo são todas as lisinas que compõem o DD K.

Na Figura 54 e Figura 55, não se observa as cabeças de fosfolipídeos formando curvatura e interagindo com os resíduos de lisina, o que mostra ser um modelo de poro barril uma vez que os peptídeos estão em paralelo a cadeia acídica dos fosfolipídeos. Apesar do poro barril ser um modelo de formação discutível em ação de peptídeos antimicrobianos, a conformação de poro de 8 peptídeos com lisinas voltadas para o centro do poro, de acordo com a Figura 55, abre para a entrada de água e se mantém estável dessa maneira.

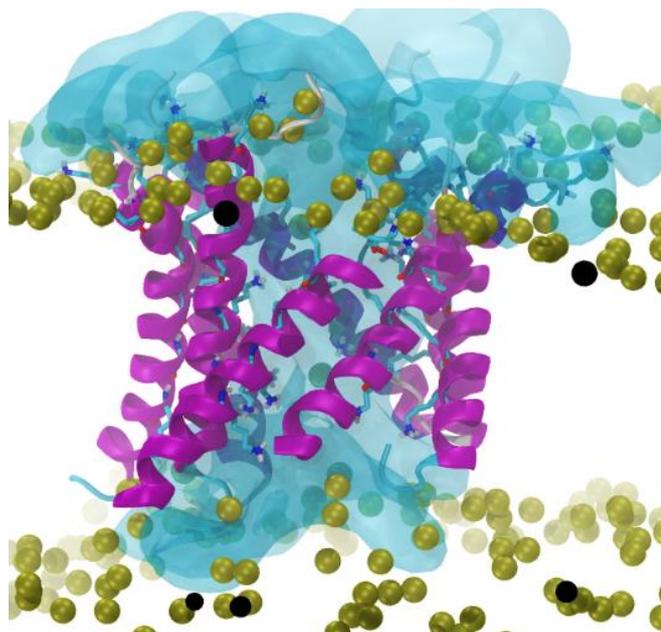


Figura 55: Poro aberto do sistema DDKporo8-popc, a representação da água translúcida passando por dentro do lúmen, em contato com as lisinas assinaladas na figura. As esferas amarelas são átomos de fósforo das cabeças fosfolipídicas dabicamada de POPC.

4.3.2 RMSD e RMSF dos sistemas com poros em POPC

RMSD do sistema DDKporo6-popc

Verificou-se nas simulações do poro pré-moldado com 6 peptídeos uma variação de RMSD entre 0,2 a 0,6 nm (Figura 56). O RMSD do monômero A teve a variação de RMSD 0,2 a 0,6 nm. O monômetro B teve valores de RMSD de 0,3 a 0,5 nm, o monômero C obteve valores de 0,2 a 0,6 nm, o monômero D 0,3 a 0,8 nm, o monômero E de 0,15 a 0,55 nm, o monômero F 0,2 a 0,4 nm. A estabilidade do poro com 6 monômeros foi confirmada pelas imagens moleculares pelos baixos valores de RMSD em relação aos outros estudados, mostrando que as estruturas se mantiveram próximas da estrutura de obtida por RMN empregada como referência. Na membrana, o peptídeo DD K se manteve estável. Ainda que o DDK seja um peptídeo flexível, a estrutura de membrana tende a

proteger sua desestruturação, já observada nos sistemas com os peptídeos sobre a membrana e em caixa contendo apenas água.

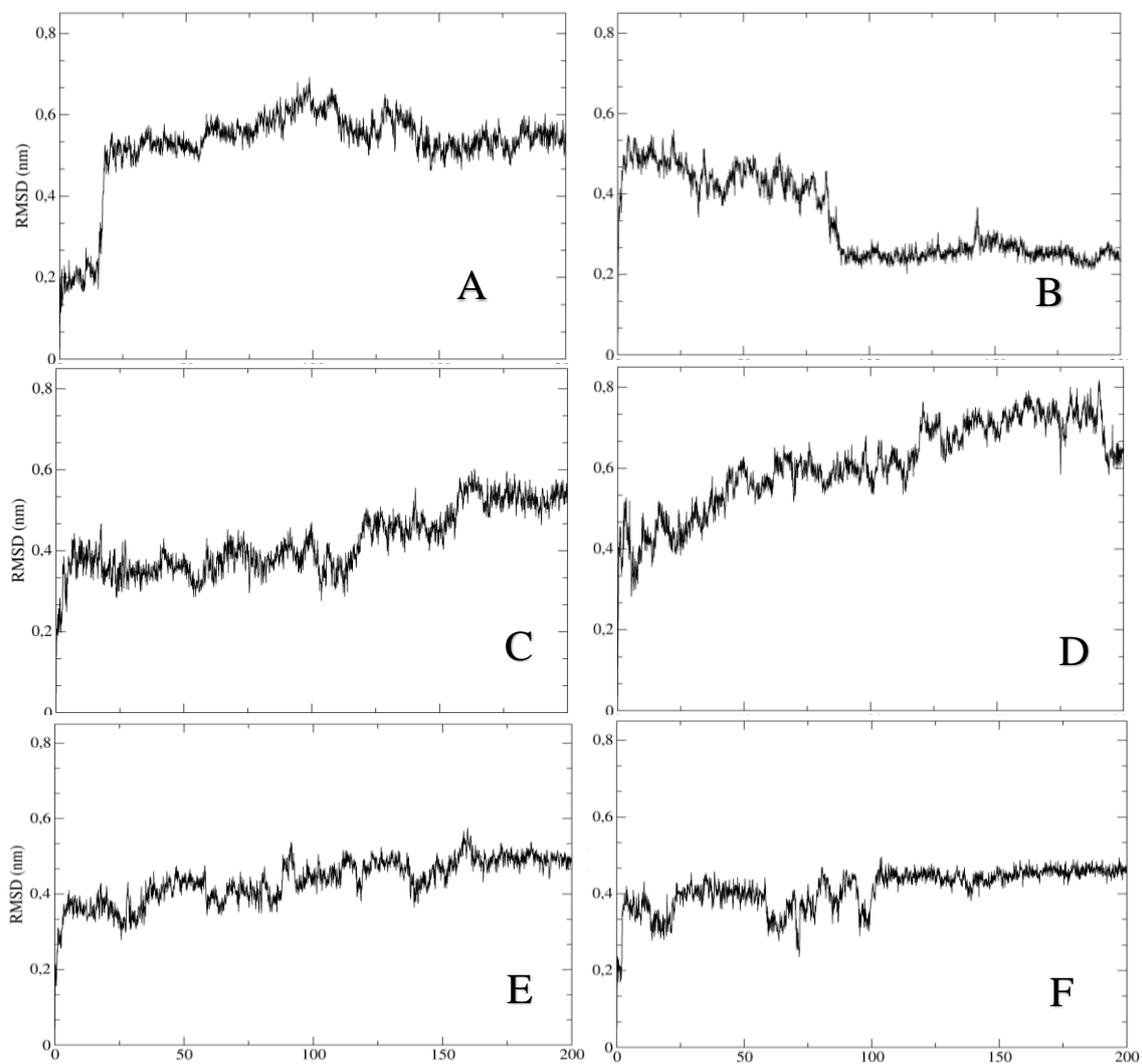


Figura 56: RMSD do *backbone* DDKporo6-popc em função do tempo de 200 ns.

RMSF do sistema DDKporo6-popc

Foram obtidos os valores de RMSF de acordo com o gráfico da Figura 57. Os monômeros que mais possuem flutuação são o A em vermelho e o D em amarelo. Os resíduos ALA-14, LYS-15 possuem maior flutuação no monômero A. Os resíduos com maiores valores de RMSF são ALA-8, ALA9, GLY-10 do monômero D.

A periodicidade na flutuação dos monômeros dos peptídeos, é observada na configuração em forma de poro, nos resíduos lisina e vizinhos, e pode ser explicada pelo fato desses resíduos possuírem cadeia lateral longa e flexível, que induziria maiores flutuações locais no esqueleto peptídico.

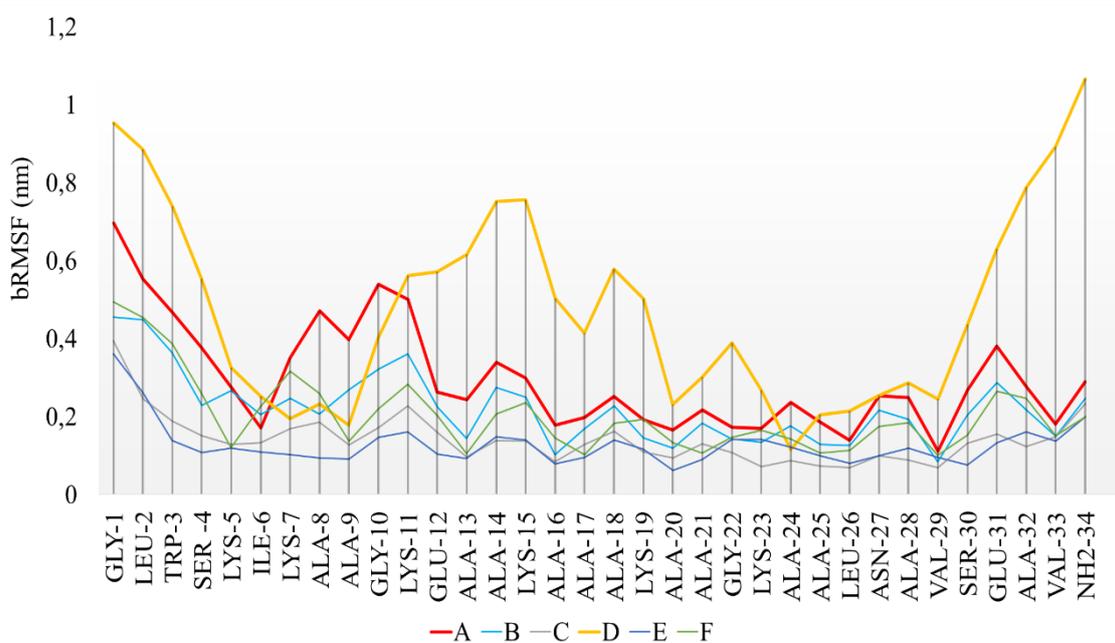


Figura 57: RMSF do *backbone* dos monômeros do sistema DDKporo6-popc em função dos resíduos.

RMSD do sistema DDK_{poro7-popc}

Os valores obtidos de RMSD da simulação do sistema DDK_{poro7-popc} estão representados nos gráficos da Figura 58. O monômero A obteve valores de RMSD entre 0,2 a 0,5 nm, o monômero B entre 0,25 a 0,32 nm, o monômero C entre 0,2 a 0,5 nm, o monômero D entre 0,25 a 0,5 nm, o monômero E entre 0,2 a 0,4 nm, o monômero F entre 0,35 a 0,5 nm e o monômero G entre 0,2 a 0,5 nm, mas em boa parte da simulação se estabiliza entre 0,2 e 0,25 nm.

Em comparação ao sistema de poro com 6 peptídeos, o poro com 7 peptídeos se apresenta mais estável, não havendo nenhum valor acima de 0,5 nm no RMSD. Talvez possamos inferir que quanto mais peptídeos, mais robusta a estrutura do poro em si, diminuindo assim a flexibilidade dos monômeros de peptídeo dentro da membrana.

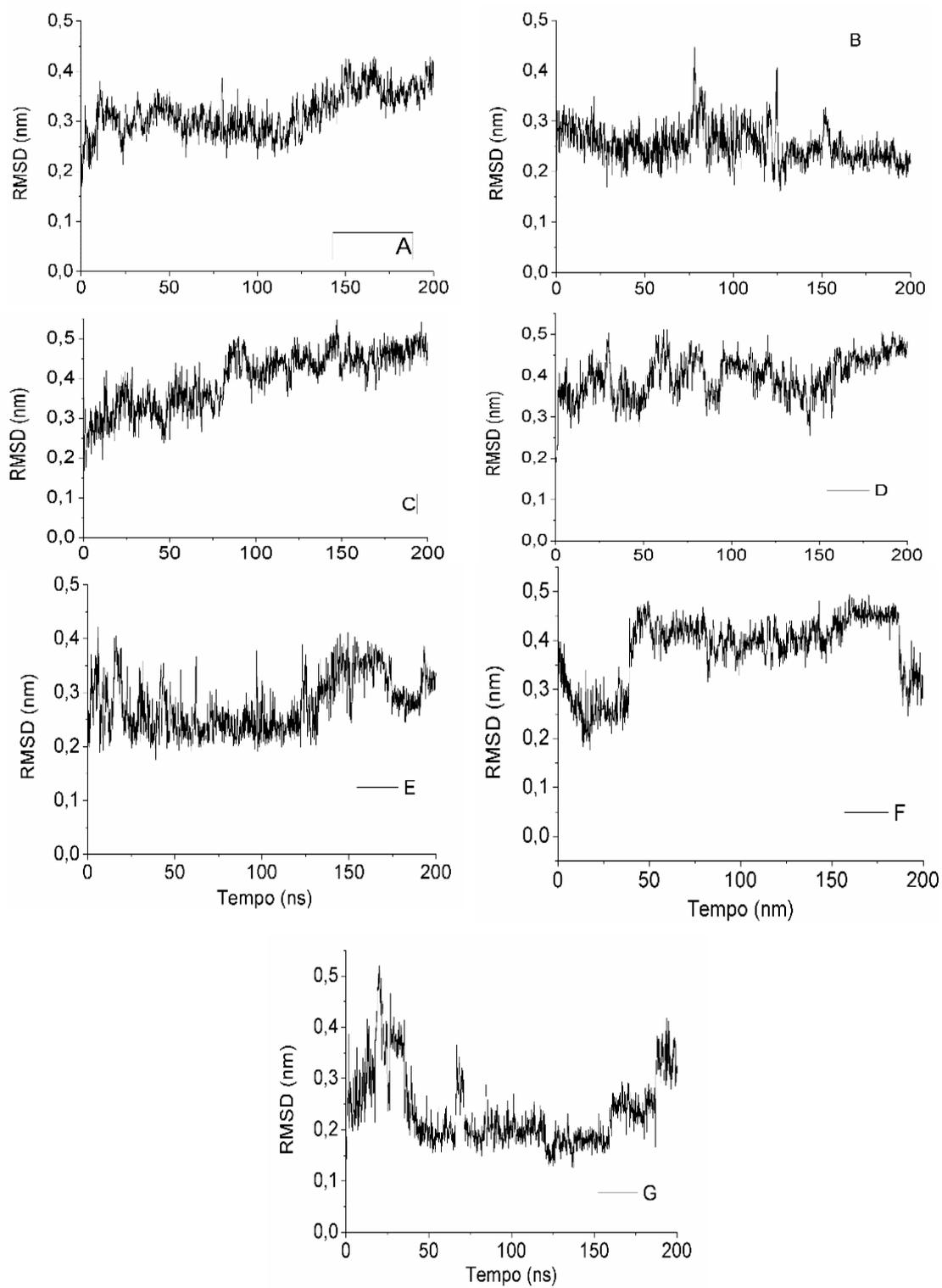


Figura 58: RMSD do *backbone* dos 7 monômeros que formam o poro em POPC.

RMSF do sistema DDKporo7-popc

O gráfico de RMSF do sistema DDKporo7-popc, mostrado na Figura 59, exibe periodicidade na flutuação entre os monômeros, tendo o F apresentado maiores valores em seus resíduos. Os contatos hidrofóbicos internos e as lisinas posicionadas externamente ao poro fazem a sustentação da estrutura do peptídeo. Os resíduos de lisina fazem contato com água e cabeças lipídicas e mantêm-se a cada volta da hélice posicionados na mesma face peptídica. Dessa forma o feixe de peptídeos também ao longo da dinâmica se mantém estável, unido pelas faces hidrofóbicas dos monômeros e dessa forma fechando o lúmen do poro.

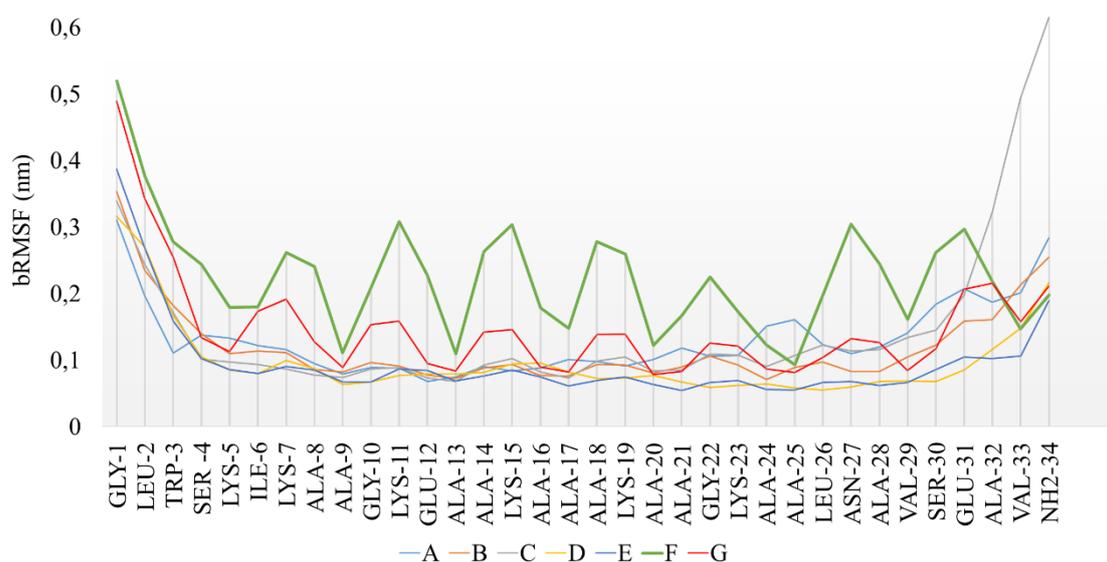


Figura 59: RMSF do *backbone* dos monômeros do sistema DDKporo7-popc.

RMSD do sistema DDKporo8-popc

O poro com 8 peptídeos teve o RMSD descrito nos gráficos da Figura 60, a variação dos valores é 0,4 nm a 0,6 nm. Verificamos que os valores de RMSD variam entre 0,2 a 0,5 nm para o monômero A, o monômero B possui variação entre 0,2 a 0,45 nm, o monômero C entre 0,45 a 0,5 nm, o monômero D entre 0,2 a 0,4 nm, o monômero E entre 0,45 a 0,5 nm, o monômero F entre 0,2 a 0,5 nm, o monômero G entre 0,25 a 0,3 nm e o monômero H entre 0,2 a 0,5 nm. O poro com 8 peptídeos também forma uma estrutura estável de acordo com os valores de RMSD, os monômeros fazem um movimento torcional e se acomodam muito próximos a cadeia acila da membrana como ilustrado na Figura 54.

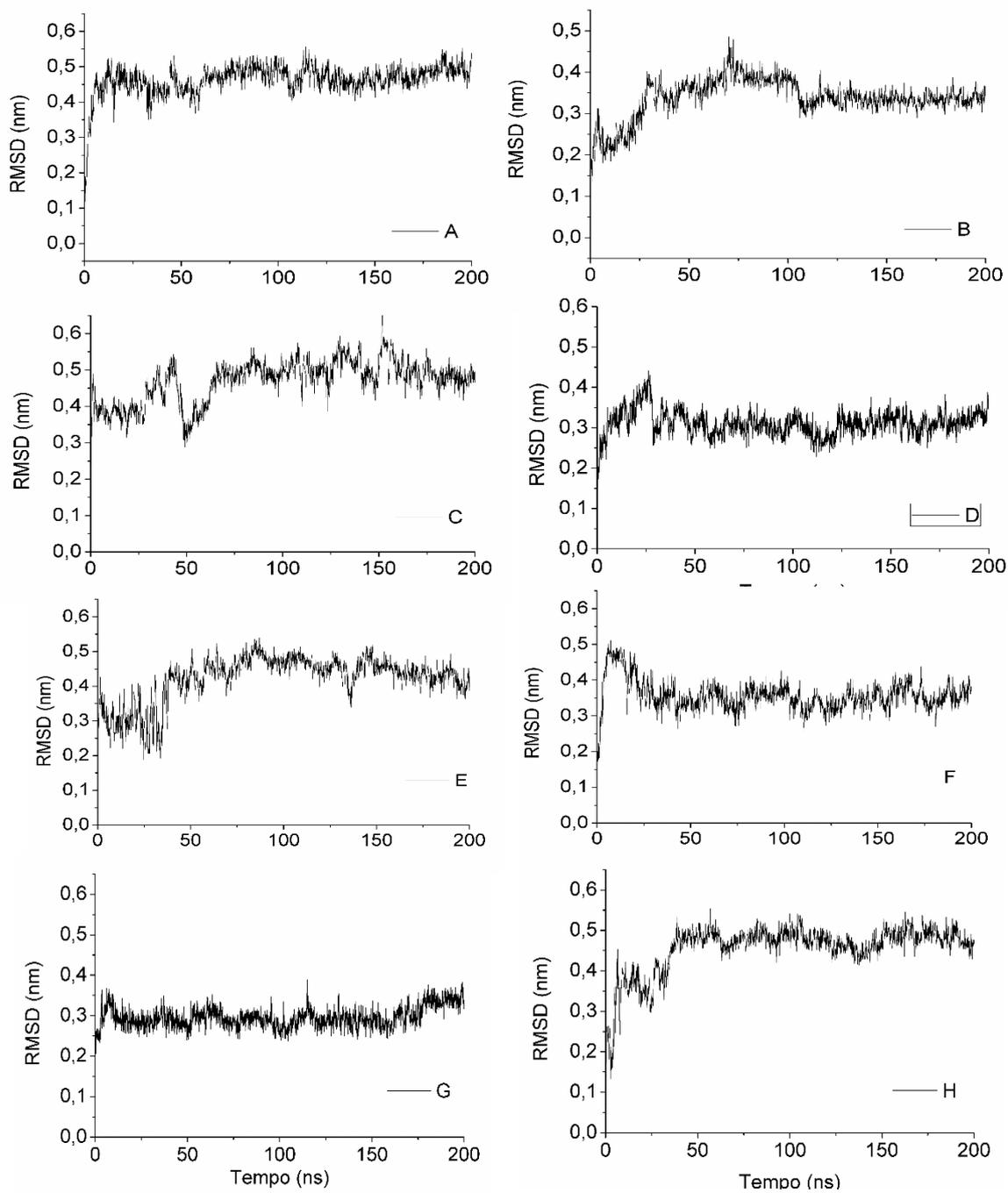


Figura 60: RMSD do *backbone* dos monômeros do sistema DDKporo8-popc .

RMSF do sistema DDKporo8-popc

Os monômeros do poro com 8 peptídeos de acordo com o gráfico de RMSF da Figura 61 apresentaram também uma variação conforme a helicidade do peptídeo, e uma periodicidade de flutuação que também foi constatada nos gráficos dos poros com 6 e 7 peptídeos.

De acordo com o gráfico da Figura 61 os valores de RMSF foram maiores também na região de lisinas. Ainda que as lisinas estejam voltadas para dentro do poro nesse sistema, elas continuam ajudando na sustentação dessa estrutura interagindo com a água e também garantindo que os monômeros fiquem afastados e o poro fique aberto. Sendo assim, foi feito também um estudo da distância média de afastamento de um monômero em relação aos demais monômeros, causada pela repulsão eletrostática entre os resíduos de lisina ao longo da trajetória, como mostra a Figura 62. Logo nos primeiros 5 ns, os monômeros se distanciam do centro de massa do poro de 1,55 para 1,65 nm, abrindo o poro, que após a flutuação durante a dinâmica se mantém estável.

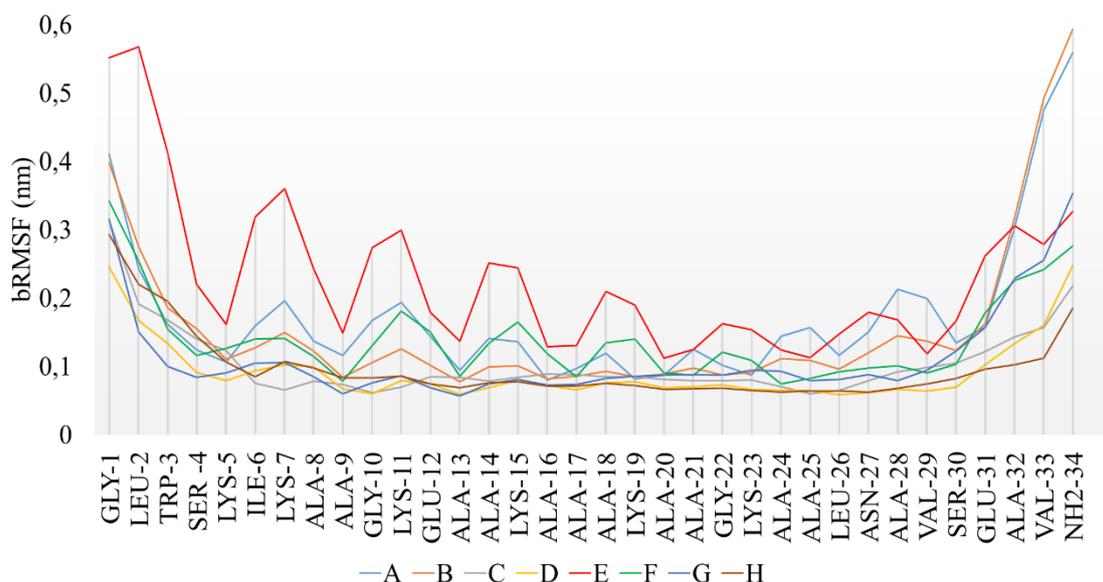


Figura 61: RMSF do *backbone* dos monômeros do sistema DDKporo8-popc.

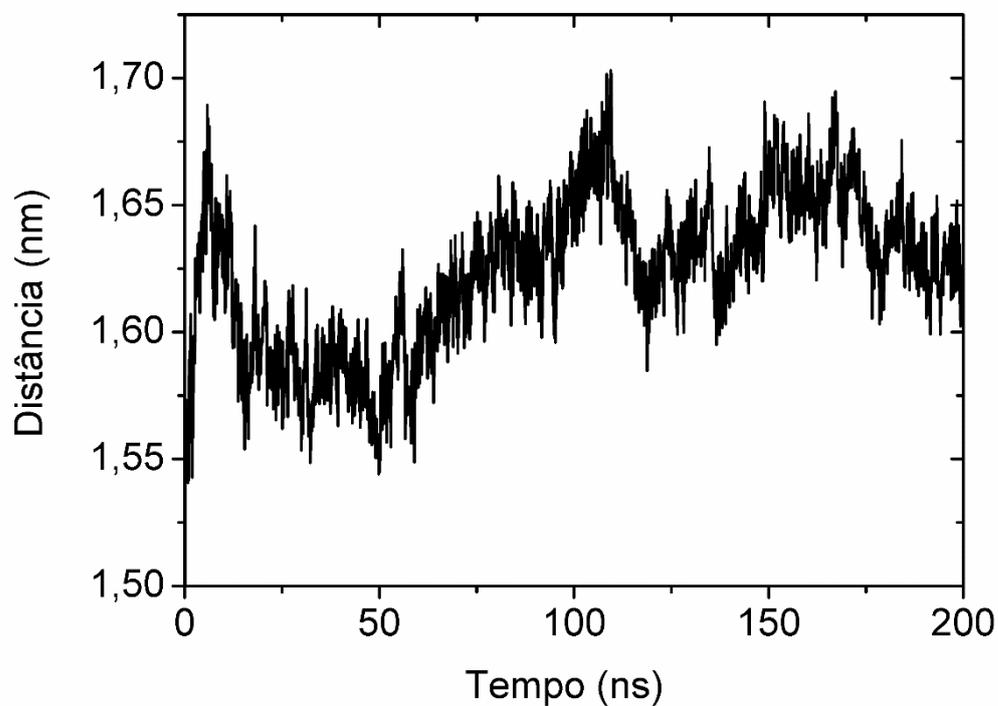


Figura 62: Distância entre os monômeros e o centro de massa do poro com 8 peptídeos.

No entanto de acordo com estudos com peptídeos antimicrobianos um número grande de resíduos de lisina poderia prejudicar a formação desse poro e comprometer sua estabilização. (MATSUZAKI, 1999) O modelo de poro com 8 peptídeos predito nesse trabalho se assemelha a configuração barril, que faz um feixe de hélices de monômeros de peptídeos formando um poro transmembranar. (ALESSANDRA *et al.*, 2014)

4.3.3 Prevalência das ligações de hidrogênio

A importância dos resíduos de lisina para os poros contendo 6 e 7 peptídeos de acordo com as conformações apresentadas foram evidenciadas nas simulações, sendo assim, foi necessário calcular a prevalência das ligações hidrogênio feitas entre as lisinas e os grupos de fosfato das moléculas de POPC.

A Figura 63 mostra que há ligações hidrogênios dos átomos de nitrogênios da cadeia lateral das lisinas e dos átomos de oxigênio da molécula de POPC. No gráfico, no eixo y, determina-se a porcentagem do tempo em que a cada ligação (NZ-O) formou, sendo a mais prevalente, durante 36% do tempo de simulação, para ligações entre o átomo de nitrogênio zeta da lisina 23 e o átomo de oxigênio C do fosfolípídeo de numeração 626.

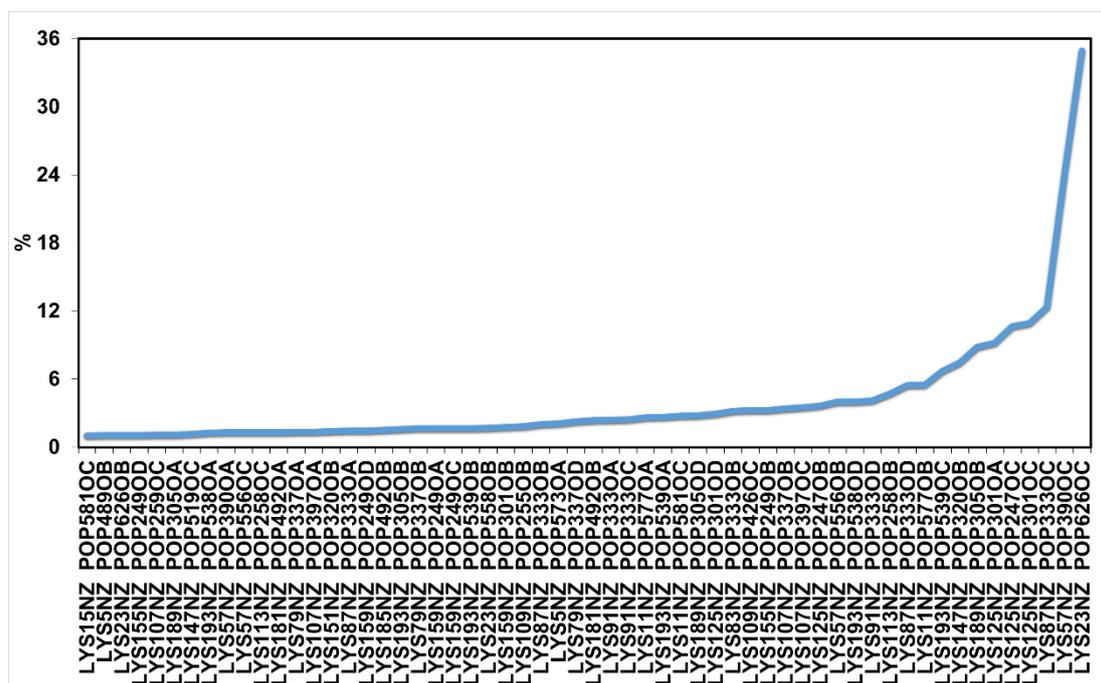


Figura 63: Porcentagem de prevalência temporal de ligações hidrogênio entre lisinas e grupos de fosfatos das moléculas de POPC do sistema DD Kporo6-popc.

No eixo x do gráfico da Figura 63, a identificação das moléculas tanto de lisina quanto das moléculas de POPC foi feita pela enumeração atribuídas à ordem das

moléculas no sistema, de acordo com a sequência de resíduos de aminoácidos do primeiro ao sexto peptídeo e da primeira à última molécula de POPC. Alguns resíduos de lisina aparecem mais de uma vez devido à formação, ao longo do tempo, da ligação com o átomo de oxigênio no grupo fosfato de diferentes moléculas de POPC. Da mesma forma, um determinado átomo de oxigênio interage com diferentes resíduos de lisina ao longo do tempo. Essa interação foi ilustrada na Figura 64 com a interação de maior prevalência já citados.

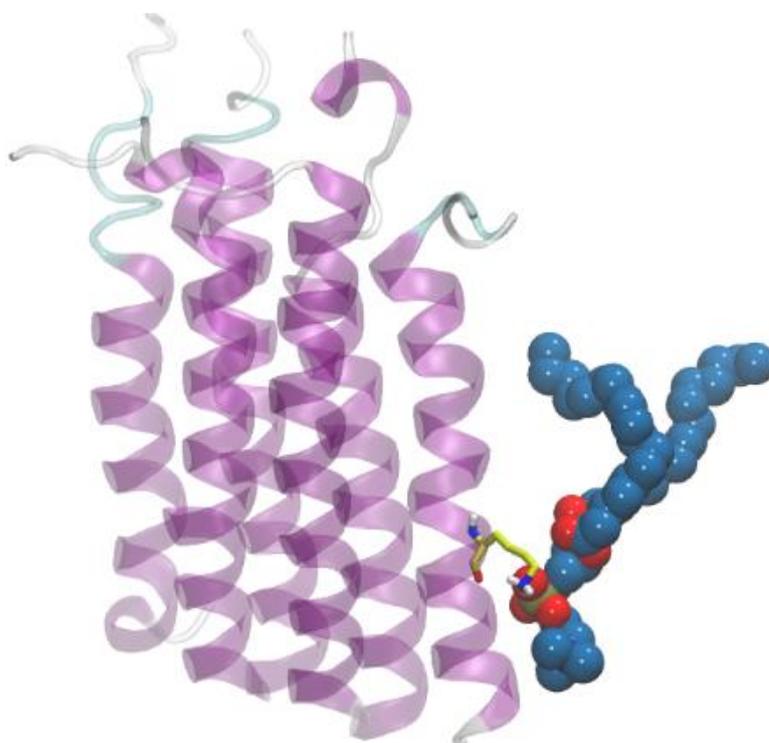


Figura 64: Representação da interação da lisina 23 com o a molécula 626 de POPC do sistema DD Kporo6-popc

A Figura 64 mostra também a inclinação da molécula de fosfolipídeo (azul) para ocorrer essa interação com a lisina (azul no peptídeo) demonstrando o começo da reorganização da membrana para estabilizar o poro. Essa é a ligação de maior prevalência segundo o gráfico da Figura 63.

O poro com 7 peptídeos mostrou a porcentagem de prevalência de ligações de hidrogênio entre as lisinas e os fosfolipídeos acima de 40 %, como mostra Figura 65, entre a lisina 148 e a molécula 286 de POPC (Figura 66). Essa porcentagem foi maior que a encontrada no poro com 6 peptídeos.

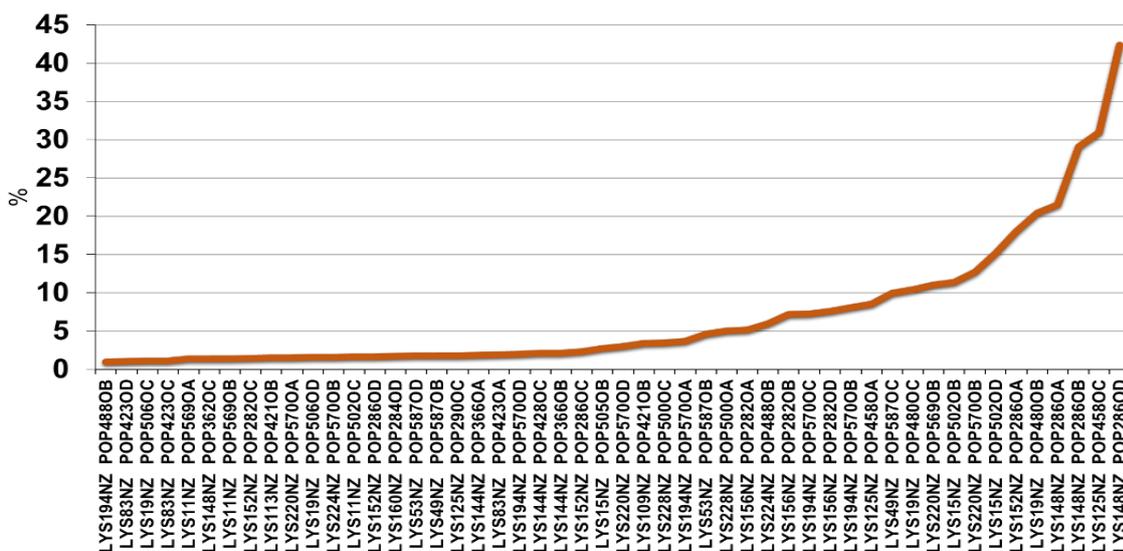


Figura 65: Prevalência temporal das ligações de hidrogênio entre os átomos de nitrogênio da cadeia lateral das lisinas e os átomos de oxigênio do grupo fosfato das moléculas POPC do sistema DD Kporo7-popc

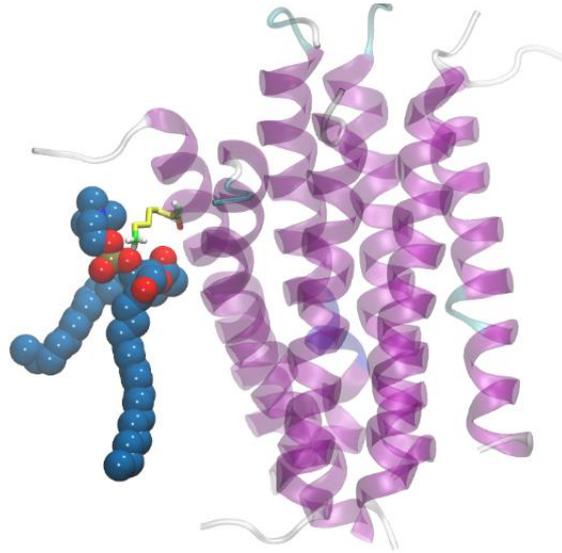


Figura 66: Representação da interação da lisina 148 com o a molécula 286 de POPC do sistema DD Kporo7-popc

4.3.4 Densidade eletrônica dos sistemas com poros em POPC

A Figura 67 indica os perfis de densidade do sistema controle e dos sistemas DDKporo6-popc, DDKporo7-popc e DDKporo8-popc. O gráfico A mostra o perfil de densidade do controle chegando a 240 e/nm^3 para a cauda que é mais densa que a cabeça lipídica chega a entre 160 e/nm^3 (Figura 67A). Como os sistemas com peptídeos possuem menos fosfolipídeos, pois possuem o poro, a densidade das estruturas da membrana é ligeiramente menor que 240 e/nm^3 para as caudas e que 160 e/nm^3 para as cabeças lipídicas (Figura 67B a Figura 67D). A entrada de água induzida pelo poro surgir faz densidade de água no interior da membrana, onde no controle é zero. Devido à pequena dimensão da caixa de simulação, isso faz baixar a densidade de água nos extremos da caixa perpendicular à membrana. Os resultados da Figura 67 não permitem estimar as variações e deslocamentos na densidade eletrônica das cabeças lipídicas com a presença dos poros. Sendo assim isolamos as densidades das cabeças de fosfolipídeos e subtraímos do valor do controle. Como mostra o gráfico da Figura 67, existe diferença quando há a

presença do poro mostrando uma visível perturbação nesse sistema devido o rearranjo dessas estruturas.

O resultado de densidade ainda não consegue ser claro quanto a reorganização da membrana para a entrada das cabeças dos fosfolipídeos na membrana.

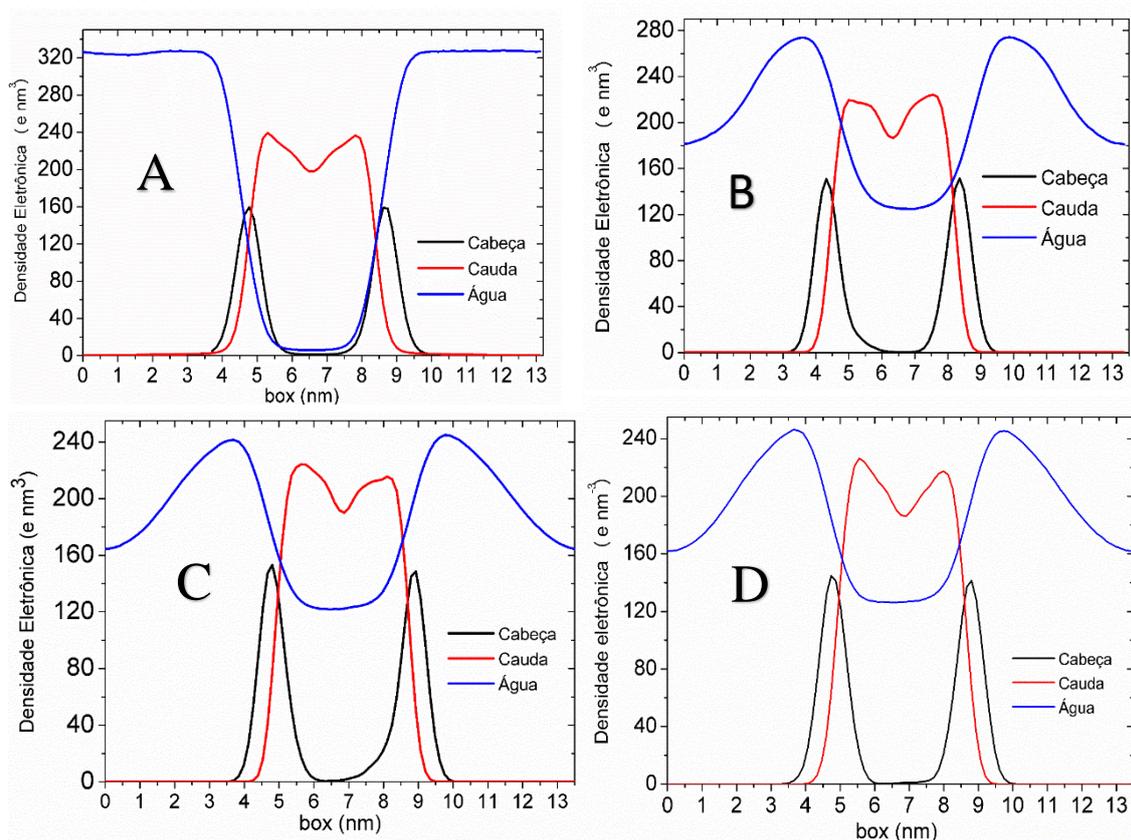


Figura 67: Perfil de densidade eletrônica da bicamada POPC em sistema com: A- controle B- Poro com 6 peptídeos, C- Poro com 7 peptídeos D- poro pré montado com 8 peptídeos

Sendo assim isolamos as densidades das cabeças de fosfolípídeo e diminuimos do valor do controle. Como mostra o gráfico da Figura 68, existe uma diferença negativa quando há a presença do poro mostrando que uma visível perturbação nesses sistemas devido o rearranjo dessas estruturas. Para comparação, foram inseridas as diferenças de densidade nas cabeças lipídicas para os sistemas com 2, 3, 4 peptídeos que não formaram poros, os dos primeiros resultados com a membrana desse trabalho. Como observado anteriormente, apesar de não se inserirem no core hidrofóbico da membrana, os sistemas com 2 a 4 peptídeos perturbam as cabeças lipídicas, deslocando sua densidade. O efeito da presença dos poros, porém, é diferente, levando a perturbação mais para o interior da membrana (Figura 68).

Ao observar a linha azul clara referente as cabeças lipídicas do sistema DDKporo6-popc e a linha rosa do sistema do poro DDKporo7-popc nota-se uma maior densidade de ambas no que seria a presença da cauda da membrana entre as distâncias 5.5 nm e 8.5 nm, mostrando um arraste das cabeças lipídicas com a diminuição da densidade em suas posições (Figura 68). O poro com 8 peptídeos, por outro lado, apresenta diminuição e aumento de densidade assimétrica, considerando ambas as interfaces, o que pode indicar somente ondulação da membrana e não arraste de cabeças lipídicas.

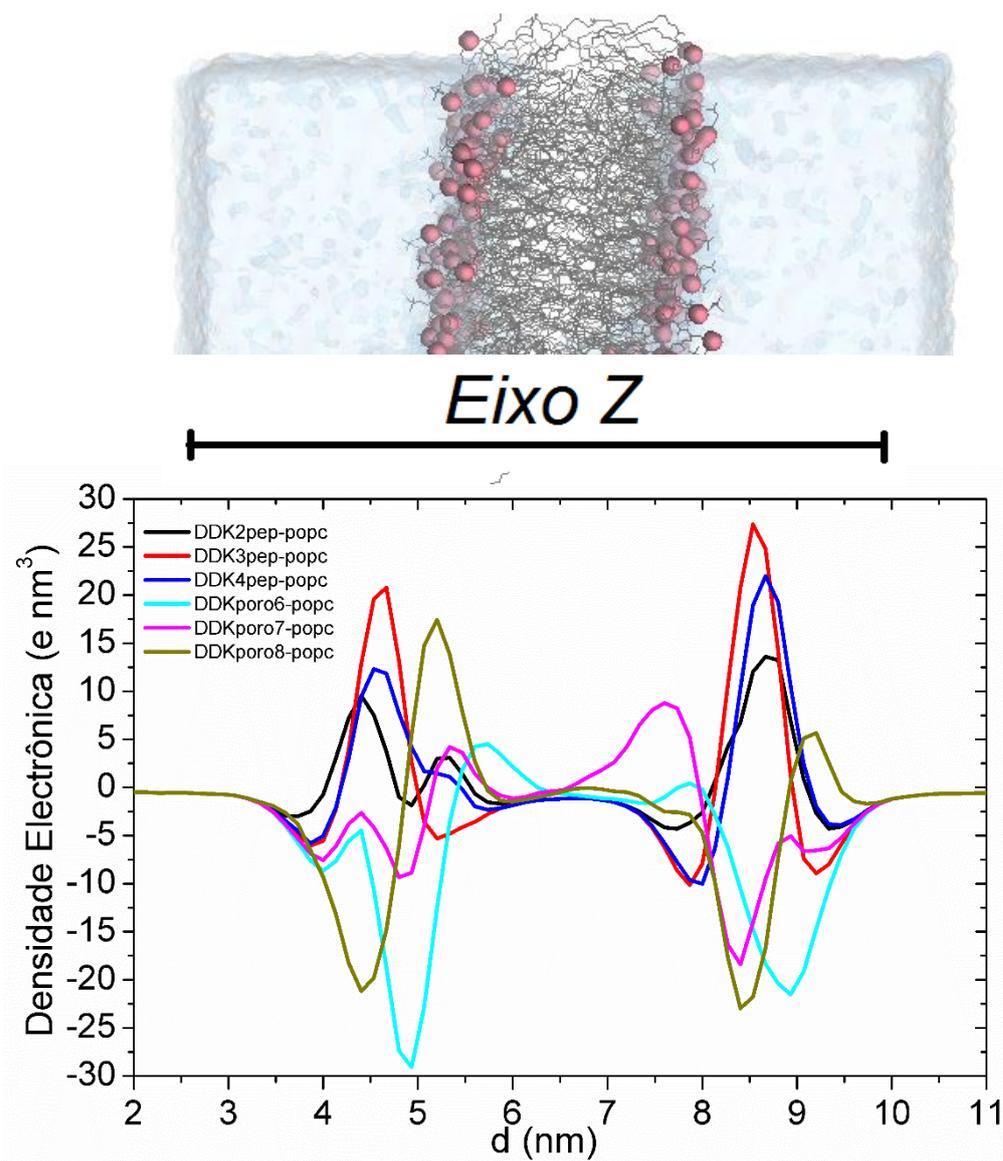


Figura 68: Diferença dos valores da densidade das cabeças de fosfolípídeos dos sistemas $DDK_{2pep-popc}$, $DDK_{3pep-popc}$, $DDK_{4pep-popc}$, $DDK_{poro6-popc}$, $DDK_{poro7-popc}$, $DDK_{poro8-popc}$ em função da distância no eixo z da caixa de simulação. Desenho em destaque representa o eixo Z como referência da posição das estruturas.

4.3.5 Parâmetro de ordem dos sistemas com poros em POPC

Essa análise é explicada na página 78. Pela Figura 69 observa-se o parâmetro de ordem das cadeias saturadas de moléculas de POPC, para a camada livre de peptídeos (verde), na presença de poro contendo 6 peptídeos (preto), 7 peptídeos (vermelho), 8 peptídeos (azul). Desta figura verifica-se que a presença do poro tende a ordenar as cadeias acílicas das moléculas de lipídeos em relação ao sistema livre peptídeos (controle) entre os carbonos de 6 a 13 da cauda da molécula de POPC. No entanto, os átomos de carbono de 1 a 5 que estão mais próximos dos átomos que estão próximos ao conjunto da cabeça das moléculas de POPC, possuem menor ordenação nos grupos com 6 e 7 moléculas de peptídeos em poro.

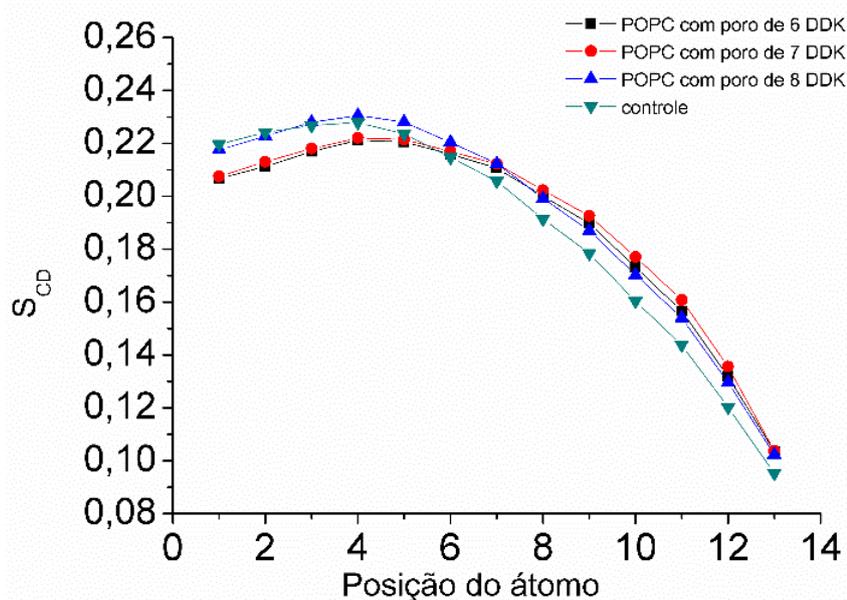


Figura 69: Parâmetro de ordem para cadeia saturada das moléculas de POPC dos sistemas: $DDK_{\text{poro6-popc}}$ (preto), $DDK_{\text{poro7-popc}}$ (vermelho), $DDK_{\text{poro8-popc}}$ (azul), controle (verde)

É observado que os peptídeos interagem preferencialmente com as cabeças fosfolipídicas e também provocam a desordenação na membrana devido à curvatura das moléculas de POPC produzida na presença dos poros com 6 e 7 peptídeos devido à

presença de água e lisinas expostas entre a estrutura do feixe peptídeos e membrana como ilustrado anteriormente. O mesmo não ocorre com o poro de 8 peptídeos, pois nestes as cabeças lipídicas são menos perturbadas e permanecem na sua posição de origem.

Como análise geral de tópicos, os modelos de poros na membrana POPC que foram sugeridos nesse trabalho para conjunto de até 7 peptídeos demonstraram uma configuração que não se encontrou descrita na literatura até o momento. No entanto uma vez que se sabe que os peptídeos apresentam formas diversas de poros, ainda podemos inferir a forma de poro observada com 6 e 7 monômeros de peptídeo DD K, o qual poderia ser denominado como poro colapsado de feixe unido de peptídeos por contato hidrofóbico.

Os peptídeos antimicrobianos desempenham vários mecanismos para promover abertura em membranas biológicas. A magainina, peptídeo antimicrobiano mais estudado, tem a capacidade de penetrar na membrana provocando uma curvatura da cabeça de fosfolipídeos, isso é o que diferencia o poro toroidal do poro barril, que é um mecanismo que tem sido só caracterizado para alametacina (LEE; CHEN & HUANG, 2004; MATSUZAKI *et al.*, 1998).

Os peptídeos cecropina e as dermaseptinas, a família do DD K, têm um mecanismo descrito como os modelos tapete em que uma grande quantidade de peptídeos cobre a superfície da membrana e provoca o rompimento (SHAI, 1995). Esse tipo de mecanismo foi representado ao colocar os monômeros do DD K na superfície da membrana, no entanto não foi observada inserção, mas para sistemas com maior quantidade de peptídeos foi possível perceber uma maior perturbação da membrana.

O estudo de poro mostrou o DD K posicionado perpendicularmente à membrana e de forma estável durante a simulação e foi possível ver a curvatura dos fosfolipídeos na membrana. A interação do peptídeo com membrana de POPC foi observado pelo RMN

em fase sólida, experimento que mostrou o peptídeo na superfície da membrana em contato com as cabeças de fosfolípidos (VERLY *et al.*, 2009) Observou-se peptídeo DD K com helicidade de 52% nesse modelo de membrana em estudos por dicroísmo circular na presença de vesículas zwitteriônicas, atribuindo-se isto ao fato de as constantes de partição serem menores nesse lipídeo em presença de peptídeos catiônicos.

A concentração do peptídeo DD K disposta na superfície da membrana pode ter sido insuficiente para observar uma ruptura, sendo a concentração crítica mais alta pelo menos para demonstrar o modelo carpete de peptídeo. (BECHINGER; RESENDE & AISENBREY, 2011; MANZINI *et al.*, 2014). Essa necessidade de aumentar a concentração foi percebida nas simulações com 3 e 4 monômeros do peptídeo, ocorrendo uma perturbação maior na membrana como ilustrado anteriormente. Porém, como os sistemas na simulação com membrana estão em condições periódicas de contorno, peptídeos escapam pela face superior e entram pela inferior da caixa de simulação, mudando a concentração no agregado. Além disso, sistemas maiores, com dezenas de peptídeos, demandariam tempos de simulação que podem chegar a microssegundos para se observar uma possível formação de poro, tornando essas simulações inviáveis.

Capítulo 5

Conclusões e Perspectivas

O objetivo maior desse trabalho foi a obter informações sobre o peptídeo Dermadistinctina K em mistura de solventes TFE/água e membrana modelo de membrana POPC, que pudessem contribuir para elucidar seu mecanismo de ação para o desenvolvimento de fármacos antimicrobianos.

A utilização do programa para predição estrutural desenvolvido no grupo baseado no *Generalized Simulated Annealing* através do programa Thor-GSA, em um protocolo combinado com a Dinâmica Molecular em mistura TFE/água (50%/50%), também proposto no grupo, mostrou-se eficiente para o enovelamento de peptídeos que se estruturam em interfaces biológicas. Nota-se que em água o peptídeo se desestrutura ao passo que a predição com o Thor-GSA mostra o peptídeo já em segmentos em hélice, embora não haja solvente no cálculo estocástico com esse método. A apresentação do solvente no Thor-GSA por uma função dielétrica sigmoideal, partindo de 4.5 para distâncias interatômicas curtas, abaixo de 5Å, e tendendo a 80 para distâncias acima de 20Å, simulou satisfatoriamente o ambiente TFE/água em que foi determinada a estrutura do peptídeo DD K por RMN.

As simulações com concentrações diferentes de peptídeos DD K demonstraram perturbação na membrana devido a formação de aglomerados, além disso sugeriu o início do mecanismo de ação dos monômeros sobre a membrana de POPC, dobras e aproximações em favor de aglomerados para provocar tensão local. No entanto não houve inserção do peptídeo na bicamada POPC como em estudos com esse modelo de

membrana feitos por Verly (2008)(VERLY *et al.*, 2008). Dessa forma acreditamos que a concentração de peptídeo não atingiu um mínimo para promover ação na membrana no sentido de rompê-la. Sendo necessário proporção maior de peptídeo para o tamanho de membrana proposto. O terminal-C amidado do peptídeo DD K é formado por resíduos hidrofóbicos como valina e a alanina. Isso fez com que terminal-C, logo nos primeiros nanossegundos fizesse contato com membrana, sendo essa estrutura do peptídeo, importante para a inserção transmembrantar. O contato entre os monômeros de peptídeo para a formação de aglomerados mostrou ser através das faces hidrofóbicas dos peptídeos.

Poros constituídos de 6 e 7 peptídeos foram preditos representando uma formação de poro com a face hidrofóbica do peptídeo voltada para o centro do poro. O poro colapsado manteve, nos dois sistemas, um feixe de peptídeos ao centro, com estrutura estável ao longo do tempo de simulação. Assim como relatado na simulação longa de 5,5 μ s com o peptídeo Tis B de sequência MNLVDIAILILKLIVAALQLLDAVLKYLK, nesse experimento também partiu de poros pré-formados, mas com seus resíduos polares voltados para o interior do poro e os resíduos apolares para as cadeias acilas da membrana, ainda sim também houve colapso entre os monômeros. Esse poro colapsado perdeu água em seu interior, no entanto permaneceu estável ainda dentro da membrana.(STEINBRECHER *et al.*, 2012)

Nesse estudo foi possível confirmar o que já se presumia com estudo em RMN e Dicroísmo Circular, há grande probabilidade que a face hidrofílica dos peptídeos que lisinas entre em contato com as cabeças lipídicas através dos resíduos de lisina, enquanto a face hidrofóbica forme o core hidrofóbico do poro.

O poro construído com 8 peptídeos também demonstrou ser estável, suas lisinas foram dispostas para o centro do poro e por causa da repulsão eletrostática entre elas, o

centro do poro abriu-se, como verificado na análise de distância das lisinas em relação ao centro do poro. Esse modelo sugeriu o modelo barril e, como não foi observado o arraste dos fosfolipídeos durante a simulação, se supõe a interação da face hidrofóbica do peptídeo com as cadeias acilas.

É notável a importância da determinação de um mecanismo para esse peptídeo, uma vez elucidado, também é possível otimizá-lo estruturalmente e da sua ação antimicrobiana, com substituição de resíduos e utilizando o GSA e Dinâmica Molecular para futuras etapas de teste desses análogos de peptídeo.

Referências Bibliográficas

AGOSTINI, F. P. et al. **Generalized simulated annealing applied to protein folding studies.** *Journal of Computational Chemistry*, 2006.

AGOSTINI, F. P. **Mapeamento de Parâmetros dos Simulated Annealing Generalizado aplicado ao problema do Enovelamento de Proteínas.** [s.l.] Laboratório Nacional de Computação Científica, 2008.

ALBERTS, B. JOHNSON, A. LEWIS, J. **Molecular Biology of the Cell. 4th edition.** 4. ed. New York, NY: Garland Science, 2002.

ALESSANDRA, V. R. et al. **Biochimica et Biophysica Acta The effects of the C-terminal amidation of mastoparans on their biological actions and interactions with membrane-mimetic systems.** *BBA - Biomembranes*, v. 1838, n. 10, p. 2357–2368, 2014.

AMARAL, A. C. et al. **Predicting antimicrobial peptides from eukaryotic genomes: in silico strategies to develop antibiotics.** *Peptides*, v. 37, n. 2, p. 301–8, 2012.

AMICHE, M.; GALANTH, C. **Dermaseptins as models for the elucidation of membrane-acting helical amphipathic antimicrobial peptides.** *Current pharmaceutical biotechnology*, v. 12, n. 8, p. 1184–93, 2011.

ANDRÉ, I. et al. **Prediction of the structure of symmetrical protein assemblies.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 45, p. 17656–17661, 2007.

ANDRÉ LAB. **ROSIE: Symmetric docking.** Disponível em:
<http://rosie.rosettacommons.org/symmetric_docking>.

ANDRICIOAEI, I.; STRAUB, J. **Generalized simulated annealing algorithms using Tsallis statistics: Application to conformational optimization of a tetrapeptide.** *Physical review. E, Statistical*

physics, plasmas, fluids, and related interdisciplinary topics, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9964765>>

ARTIMO, P. et al. **ExPASy: SIB bioinformatics resource portal**. *Nucleic Acids Research*, v. 40, n. W1, p. 597–603, 2012.

AZEVEDO CALDERON, L. DE et al. **Antimicrobial peptides from Phyllomedusa frogs: from biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications**. *Amino acids*, v. 40, n. 1, p. 29–49, 2011.

BAKÓ, I.; RADNAI, T.; BELLISENT FUNEL, M. C. **Investigation of structure of liquid 2,2,2-trifluoroethanol: neutron diffraction, molecular dynamics, and ab initio quantum chemical study**. *The Journal of chemical physics*, v. 121, n. 24, p. 12472–80, 2004.

BATISTA, C. V et al. **Antimicrobial peptides from the Brazilian frog Phyllomedusa distincta**. *Peptides*, v. 20, n. 6, p. 679–86, 1999.

BATISTA, C. V et al. **A novel heterodimeric antimicrobial peptide from the tree-frog Phyllomedusa distincta**. *FEBS letters*, v. 494, n. 1-2, p. 85–9, 2001.

BECHINGER, B. **Structure and Function of Membrane-Lytic Peptides**. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 23, n. 3, p. 271–292, 2004.

BENNETT, W. F. D.; TIELEMAN, D. P. **Computer simulations of lipid membrane domains**. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1828, n. 8, p. 1765–76, 2013.

BERENDSEN, H. J. C. et al. **Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration**. In: [s.l: s.n.]. p. 331–342.

BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. **GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation**. *Computer Physics Communications*, v. 91, n. 1-3, p. 43–56, 1995.

BEVINS, C. L.; ZASLOFF, M. **Peptides from frog skin.** *Annual review of biochemistry*, v. 59, n. 1, p. 395–414, 1990.

BOCCHINFUSO, G. et al. **Different mechanisms of action of antimicrobial peptides: insights from fluorescence spectroscopy experiments and molecular dynamics simulations.** *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society*, v. 15, n. 9, p. 550–8, 2009.

BOCKUS, A. A. T.; MCEWEN, C. M.; LOKEY, R. S. **Form and function in cyclic peptide natural products: a pharmacokinetic perspective.** *Current topics in medicinal ...*, v. 13, n. 7, p. 821–36, 2013.

BOMAN, H. G. **Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts.** *Journal of internal medicine*, v. 254, n. 3, p. 197–215, 2003.

BOND, P. J. et al. **Coarse-grained simulations of the membrane-active antimicrobial Peptide maculatin 1.1.** *Biophysical journal*, v. 95, n. 8, p. 3802–15, 2008.

BOND, P. J.; KHALID, S. **Antimicrobial and cell-penetrating peptides: structure, assembly and mechanisms of membrane lysis via atomistic and coarse-grained molecular dynamics simulations.** *Protein and peptide letters*, v. 17, n. 11, p. 1313–1327, 2010.

BOND, P. J.; WEE, C. L.; SANSOM, M. S. P. **Coarse-grained molecular dynamics simulations of the energetics of helix insertion into a lipid bilayer.** *Biochemistry*, v. 47, n. 43, p. 11321–31, 2008.

BRAND, G. D. et al. **Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. Anti-Trypanosoma cruzi activity without cytotoxicity to mammalian cells.** *The Journal of biological chemistry*, v. 277, n. 51, p. 49332–40, 2002.

BROOKS, B. R. et al. **CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations.** *Journal of Computational Chemistry*, v. 4, n. 2, p. 187–217, 1983.

CHEN, C. et al. **A fast peptide match service for UniProt knowledgebase.** *Bioinformatics*, v. 29, n. 21, p. 2808–2809, 2013.

CHENG, J. T. J. et al. **Effect of membrane composition on antimicrobial peptides aurein 2.2 and 2.3 from australian southern bell frogs.** *Biophysical Journal*, v. 96, n. 2, p. 552–565, 2009.

CRUZEIRO-SILVA, C. et al. **Structural biology of membrane-acting peptides: conformational plasticity of anticoccidial peptide PW2 probed by solution NMR.** *Biochimica et biophysica acta*, v. 1768, n. 12, p. 3182–92, 2007.

DESERNO, M.; HOLM, C. **How to mesh up Ewald sums. I. a theoretical and numerical comparison of various particle mesh routines.** *Journal of Chemical Physics*, v. 109, n. 18, p. 7678–7693, 1998.

EICHENBERGER, A. P.; VAN GUNSTEREN, W. F.; SMITH, L. J. **Structure of hen egg-white lysozyme solvated in TFE/water: A molecular dynamics simulation study based on NMR data.** *Journal of Biomolecular NMR*, v. 55, n. 4, p. 339–353, 2013.

FALLA, T. J.; KARUNARATNE, D. N.; HANCOCK, R. E. W. **Membranes and Bioenergetics : Mode of Action of the Antimicrobial Peptide Indolicidin Mode of Action of the Antimicrobial Peptide Indolicidin ***. v. 271, n. 32, p. 19298–19303, 1996.

FEHLBAUM, P. et al. **Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, n. 3, p. 1221–1225, 1996.

FENDLER, J. H. **Surfactant vesicles as membrane mimetic agents: characterization and utilization.** *Accounts of Chemical Research*, v. 13, n. 1, p. 7–13, 1980.

FERNANDES, T. V. A. **Estudo do Enovelamento de Peptídeos e Proteínas por Métodos Estocásticos e Dinâmica Molecular.** [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

FIORONI, M. et al. **A New 2,2,2-Trifluoroethanol Model for Molecular Dynamics Simulations.** *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 104, n. 51, p. 12347–12354, 2000.

GARRETT, R. H.; GRISHAM, C. M. **Biochemistry**. 2a. ed. [s.l.] Saunders Golden Sunburst Series, 1995.

GATTIKER, A. et al. **FindPept, a tool to identify unmatched masses in peptide mass fingerprinting protein identification**. *Proteomics*, v. 2, n. 10, p. 1435–1444, 2002.

GAZIT, E. et al. **Mode of Action of the Antibacterial Cecropin B2: A Spectrofluorometric Study**. *Biochemistry*, v. 33, n. 35, p. 10681–10692, 1994.

GAZIT, E. et al. **Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles**. *Biochemistry*, p. 11479–11488, 1995.

GERIG, J. T. **Toward a molecular dynamics force field for simulations of 40% trifluoroethanol-water**. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 118, n. 6, p. 1471–1480, 2014.

GIBBON, P.; SUTMANN, G. **Long-Range Interactions in Many-Particle Simulation**. [s.l.: s.n.]. v. 10

GOLD, V. **International Union of Pure and Applied Chemistry Compendium of Chemical Terminology**. p. 1670, 2014.

GUO, Y. et al. **A structural view of the antibiotic degradation enzyme NDM-1 from a superbug**. *Protein & cell*, v. 2, n. 5, p. 384–94, 2011.

HAMILL, P. et al. **Novel anti-infectives: is host defence the answer?** *Current Opinion in Biotechnology*, v. 19, n. 6, p. 628–636, 2008.

HANCOCK, R. E. **Peptide antibiotics**. *Lancet*, v. 349, n. 9049, p. 418–422, 1997.

HANCOCK, R. E. W.; SAHL, H.-G. **Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies**. *Nature biotechnology*, v. 24, n. 12, p. 1551–7, 2006.

HANEY, E. F. et al. **Novel lactoferrampin antimicrobial peptides derived from human lactoferrin**. *Biochimie*, v. 91, n. 1, p. 141–154, 2009.

HE, Y.; LAZARIDIS, T. **Activity determinants of helical antimicrobial peptides: a large-scale computational study.** *PloS one*, v. 8, n. 6, 2013.

HERZOG, I. M.; FRIDMAN, M. **Design and synthesis of membrane-targeting antibiotics: from peptides- to aminosugar-based antimicrobial cationic amphiphiles.** *MedChemComm*, v. 5, n. 8, p. 1014–1026, 2014.

HESS, B.; UPPSALA, S.-; LINDAHL, E. **GROMACS 4 : Algorithms for Highly Efficient , Load-Balanced , and Scalable Molecular Simulation.** p. 435–447, 2008.

HOCKNEY, R. .; EASTWOOD, J. W. **Computer Simulation Using Particles.** Mc Graw-Hi ed.New York, NY: [s.n].

HOLT, A.; KILLIAN, J. A. **Orientation and dynamics of transmembrane peptides: The power of simple models.** *European Biophysics Journal*, v. 39, n. 4, p. 609–621, 2010.

HU, G. **Understanding the Fundamentals of Peptides and Proteins.** *BioProcessing Journal*, v. 10, n. 1, p. 12–14, 2011.

HUANG, W.; LIN, Z.; GUNSTEREN, W. F. VAN. **Validation of the GROMOS 54A7 Force Field with Respect to β -Peptide Folding.** p. 1237–1243, 2011.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. **VMD: Visual molecular dynamics.** *Journal of Molecular Graphics*, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. **Peptide antimicrobial agents.** *Clinical microbiology reviews*, v. 19, n. 3, p. 491–511, 2006.

JOOSTEN, R. P. et al. **A series of PDB related databases for everyday needs.** *Nucleic acids research*, v. 39, n. Database issue, p. D411–9, 2011.

JÚNIOR, A. D.; SILVA, R. **Performance and parameterization of the algorithm Simplified Generalized Simulated Annealing. ... and Molecular Biology**, 2004.

KABSCH, W.; SANDER, C. **Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features.** *Biopolymers*, v. 22, n. 12, p. 2577–637, 1983.

KAMINSKI, G. A et al. **Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides †.** *Journal of Physical Chemistry B*, v. 105, p. 6474–6487, 2001.

KATAYAMA, H. et al. **Significance of a carboxyl-terminal amide moiety in the folding and biological activity of crustacean hyperglycemic hormone.** v. 23, p. 1537–1546, 2002.

KOEBNIK, R.; LOCHER, K. P.; VAN GELDER, P. **Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell.** *Molecular microbiology*, v. 37, n. 2, p. 239–253, 2000.

KOHANSKI, M. A; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. **How antibiotics kill bacteria: from targets to networks.** *Nature reviews. Microbiology*, v. 8, n. 6, p. 423–435, 2010.

KOZMA, D.; SIMON, I.; TUSNÁDY, G. E. **PDBTM: Protein Data Bank of transmembrane proteins after 8 years.** *Nucleic acids research*, v. 41, n. November 2012, p. D524–9, 2013.

KUKOL, A. **Lipid Models for Unit-atom Molecular Dynamics Simulation of Proteins.** *J of Chemical Theory and Computation*, v. 5, p. 615–626, 2009.

LEACH, A. R. **Molecular modelling: principles and applications.** [s.l: s.n.].

LEE, M. T.; CHEN, F. Y.; HUANG, H. W. **Energetics of Pore Formation Induced by Membrane Active Peptides.** *Biochemistry*, v. 43, n. 12, p. 3590–3599, 2004.

LEHRER, R. I.; GANZ, T. **Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence.** *Current opinion in immunology*, v. 11, n. 1, p. 23–7, 1999.

LEONTIADOU, H.; MARK, A. E.; MARRINK, S. J. **Antimicrobial peptides in action.** *Journal of the American Chemical Society*, v. 128, n. 37, p. 12156–61, 2006.

LIANG, J. F.; KIM, S. C. **Not only the nature of peptide but also the characteristics of cell membrane determine the antimicrobial mechanism of a peptide.** *The journal of peptide research : official journal of the American Peptide Society*, v. 53, n. 5, p. 518–22, 1999.

LOPEZ, C. F. et al. **Probing Membrane Insertion Activity of Antimicrobial Polymers via Coarse-Grain Molecular Dynamics.** *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 2, n. 3, p. 649–655, 2006.

LYSKOV, S. et al. **Serverification of Molecular Modeling Applications: The Rosetta Online Server That Includes Everyone (ROSIE).** *PLoS ONE*, v. 8, n. 5, p. 5–7, 2013.

MAIOROV, V. N.; CRIPPEN, G. M. **Size-independent comparison of protein three-dimensional structures.** *Proteins*, v. 22, n. 3, p. 273–83, 1995.

MARGUET, D. et al. **Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order.** *The EMBO journal*, v. 25, n. 15, p. 3446–3457, 2006.

MARRINK, S. J.; DE VRIES, A. H.; MARK, A. E. **Coarse Grained Model for Semiquantitative Lipid Simulations.** *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 108, n. 2, p. 750–760, 2004.

MATSUZAKI, K. et al. **Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2.** *Biochemistry*, v. 37, n. 34, p. 11856–11863, 1998.

MATSUZAKI, K. **Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes.** *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1462, n. 1-2, p. 1–10, 1999.

MATSUZAKI, K.; YONEYAMA, S.; MIYAJIMA, K. **Pore Formation and Translocation of Melittin.** v. 73, n. August, p. 831–838, 1997.

MELO, M. C. R. et al. **GSAFold: A new application of GSA to protein structure prediction.** *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, v. 80, n. 9, p. 2305–2310, 2012.

MESH DATA. **National Library of Medicine - Medical Subject Headings**. Disponível em: <http://www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/2011/MB_cgi?mode=&term=ACROSOME+REACTION\nhttp://www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/2011/MB_cgi?mode=&term=ACROSOME+REACTION>. Acesso em: 3 out. 2014.

METROPOLIS, N. et al. **Equation of State Calculations by Fast Computing Machines**. *The Journal of Chemical Physics*, v. 21, n. 6, p. 1087–1092, 1953.

MORET, M. A et al. **New stochastic strategy to analyze helix folding**. *Biophysical journal*, v. 82, n. 3, p. 1123–32, 2002.

MORET, M. A. et al. **Stochastic molecular optimization using generalized simulated annealing**. *Journal of Computational Chemistry*, v. 19, n. 6, p. 647–657, 1998.

MORGON, N. H.; COUTINHO, K. (EDS.). **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. São Paulo: Livraria da Física, 2007.

NAMBA, A. M.; SILVA, V. B.; SILVA, C. H. T. P. **Dinâmica molecular : teoria e aplicações em planejamento de fármacos**. v. 33, p. 13–23, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry 5th ed.** *Book*, 2008.

NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. **The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action**. *Trends in Biotechnology*, v. 29, n. 9, p. 464–472, 2011.

NICOLAS, P.; EL AMRI, C. **The dermaseptin superfamily: a gene-based combinatorial library of antimicrobial peptides**. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1788, n. 8, p. 1537–50, 2009.

OOSTENBRINK, C. et al. **A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6**. *Journal of computational chemistry*, v. 25, n. 13, p. 1656–76, 2004.

PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. **Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method**. v. 7182, n. 1981, 2012.

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

PESCHEL, A.; SAHL, H.-G. **The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance.** *Nature reviews. Microbiology*, v. 4, n. 7, p. 529–36, 2006.

PETER, C.; KREMER, K. **Multiscale simulation of soft matter systems.** *Faraday Discussions*, v. 144, p. 9, 2010.

POGER, D.; MARK, A. E. **On the Validation of Molecular Dynamics Simulations of Saturated and.** p. 325–336, 2010.

POGER, D.; VAN GUNSTEREN, W. F.; MARK, A. E. **A new force field for simulating phosphatidylcholine bilayers.** *Journal of Computational Chemistry*, v. 31, n. 6, p. 1117–1125, 2010.

PORCELLI, F. et al. **Structures of the dimeric and monomeric variants of magainin antimicrobial peptides (MSI-78 and MSI-594) in micelles and bilayers, determined by NMR spectroscopy.** *Biochemistry*, v. 45, n. 18, p. 5793–5799, 2006.

POWERS, J.-P. S.; HANCOCK, R. E. W. **The relationship between peptide structure and antibacterial activity.** *Peptides*, v. 24, n. 11, p. 1681–91, 2003.

RÃ-BUGIO, I. **FILOMEDUSA - Leaf frog - Monkey Frog.** Disponível em: <http://www.ra-bugio.org.br/ver_especie.php?id=157>. Acesso em: 11 nov. 2015.

RADIS-BAPTISTA, G.; KERKIS, I. **Crotamine, a Small Basic Polypeptide Myotoxin from Rattlesnake Venom with Cell-Penetrating Properties.** *Current Pharmaceutical Design*, v. 17, n. 38, p. 4351–4361, 2011.

RATES, B. et al. **Peptidomic dissection of the skin secretion of *Phasmahyla jandaia* (Bokermann and Sazima, 1978) (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae).** *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, v. 57, n. 1, p. 35–52, 2011.

RIVERO, M. et al. **Stacking of antimicrobial genes in potato transgenic plants confers increased resistance to bacterial and fungal pathogens.** *Journal of biotechnology*, v. 157, n. 2, p. 334–43, 2012.

SANDERSON, J. M. **Peptide-lipid interactions: insights and perspectives.** *Organic & biomolecular chemistry*, v. 3, n. 2, p. 201–12, 2005.

SATO, H.; FEIX, J. B. **Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides.** *Biochimica et biophysica acta*, v. 1758, n. 9, p. 1245–56, 2006.

SCHLICK, T. **Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide.** New York, NY: Springer New York, 2010. v. 21

SENGUPTA, D. et al. **Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder.** *Biochimica et biophysica acta*, v. 1778, n. 10, p. 2308–17, 2008.

SHAI, Y. **Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides.** *Trends in Biochemical Sciences*, v. 20, n. 11, p. 460–464, 1995.

SHAI, Y. **Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides.** *Biochimica et biophysica acta*, v. 1462, n. 1-2, p. 55–70, 1999.

SHAI, Y. **Mode of Action of Active Antimicrobial Peptides.** *Biopolymers*, v. 66, p. 236–248, 2002.

SHEINERMAN, F. B.; NOREL, R.; HONIG, B. **Electrostatic aspects of protein-protein interactions.** *Current Opinion in Structural Biology*, v. 10, n. 2, p. 153–159, 2000.

SHTATLAND, T. et al. **PepBank--a database of peptides based on sequence text mining and public peptide data sources.** *BMC bioinformatics*, v. 8, p. 280, 2007.

SILVA, L. P. et al. **Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: liposomes fusion and/or lysis investigated by fluorescence and atomic force microscopy.** *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, v. 151, n. 3, p. 329–35, 2008.

STEINBRECHER, T. et al. **Peptide-Lipid Interactions of the Stress-Response Peptide TisB That Induces Bacterial Persistence.** *Biophysical Journal*, v. 103, n. 7, p. 1460–1469, 2012.

STRAHILEVITZ, J. et al. **Spectrum of Antimicrobial Activity and Assembly of Dermaseptin-b and Its Precursor Form in Phospholipid Membranes.** n. Table 1, p. 10951–10960, 1994.

TAYLOR, J. W.; KAISER, E. T. **The structural characterization of beta-endorphin and related peptide hormones and neurotransmitters.** *Pharmacological reviews*, v. 38, n. 4, p. 291–319, 1986.

TODOKORO, Y. et al. **Structure of Tightly Membrane-Bound Mastoparan-X, a G-Protein-Activating Peptide, Determined by Solid-State NMR.** *Biophysical Journal*, v. 91, n. 4, p. 1368–1379, 2006.

TSALLIS, C. et al. **GENERALIZED SIMULATED ANNEALING** arXiv: cond-mat / 9501047v1 12 Jan 1995. [s.d.].

UNNERSTÅLE, S. **NMR Investigations of Peptide-Membrane Interactions , Modulation of Peptide-Lipid Interaction as a Switch in Signaling across the Lipid Bilayer** Licentiate thesis. [s.l.] Stockholm University, 2010.

VÁCHA, R.; FRENKEL, D. **Simulations suggest possible novel membrane pore structure.** *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, v. 30, n. 5, p. 1304–10, 2014.

VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. **Groningen Molecular Simulation (GROMOS) Library Manual.** *Biomos.*, p. 1–221, 1987.

VERLI, H. **Bioinformática da biologia à flexibilidade das moléculas**. Porto Alegre: [s.n.].

VERLY, R. M. et al. **Effect of cholesterol on the interaction of the amphibian antimicrobial peptide DD K with liposomes**. *Peptides*, v. 29, n. 1, p. 15–24, 2008.

VERLY, R. M. et al. **Structure and membrane interactions of the antibiotic peptide dermadistinctin K by multidimensional solution and oriented ^{15}N and ^{31}P solid-state NMR spectroscopy**. *Biophysical journal*, v. 96, n. 6, p. 2194–203, 2009.

VERLY, R. M. **Peptídeos Antimicrobianos: Síntese, Ensaios Biológicos, Estudos Termodinâmicos e Análise Estrutural por RMN em Meios Biomiméticos**. Peptídeos Antimicrobianos: Síntese, Ensaios Biológicos, Estudos Termodinâmicos e Análise Estrutural por RMN em Meios Bi. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

WANG, Z.; WANG, G. **APD: the Antimicrobial Peptide Database**. *Nucleic acids research*, v. 32, n. Database issue, p. D590–2, 2004.

WHILES, J. A. et al. **Orientation and Effects of Mastoparan X on Phospholipid Bicelles**. v. 80, n. January, p. 280–293, 2001.

WHO. **Antimicrobial resistance**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>>. Acesso em: 18 ago. 2015.

WONG, H.; BOWIE, J.; CARVER, J. **The solution structure and activity of caerin 1.1, an antimicrobial peptide from the Australian green tree frog, *Litoria splendida***. *European Journal of ...*, v. 557, p. 545–557, 1997.

YANG, L. et al. **Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores**. *Biophysical journal*, v. 81, n. 3, p. 1475–1485, 2001.

YAU, W. M. et al. **The preference of tryptophan for membrane interfaces**. *Biochemistry*, v. 37, n. 42, p. 14713–8, 1998.

YEAMAN, M. M. R.; YOUNT, N. N. Y. **Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance.** *Pharmacological reviews*, v. 55, n. 1, p. 27–55, 2003.

ZASLOFF, M. **Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 84, n. 15, p. 5449–5453, 1987.

ZELEZETSKY, I.; TOSSI, A. **Alpha-helical antimicrobial peptides-Using a sequence template to guide structure-activity relationship studies.** *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1758, n. 9, p. 1436–1449, 2006.

ANEXO I: Websites com plataformas destinadas a peptídeos biologicamente ativos descritos na literatura.

Disponível em: <http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep/32-bioactive-peptide-databases> em 02/08/2015 às 22:35

AMPer	http://marray.cmdr.ubc.ca/cgi-bin/amp.pl	<i>Database of antimicrobial peptides and program searching for fragments with sequences similar to antimicrobial peptides in query protein sequence</i>
ANTIMIC	http://research.i2r.a-star.edu.sg/Templar/DB/ANTIMIC	<i>Database of antimicrobial peptides. Enables to search the similarities using BLAST.</i>
APD	http://aps.unmc.edu/AP/main.html	<i>Database of antimicrobial and anticancer peptides</i>
ArachnoServer	http://www.arachnoserver.org/mainMenu.html	<i>Database of toxic peptides and proteins from spider venoms</i>
ATDB	http://protchem.hunnu.edu.cn/toxin	<i>Database of toxic proteins and peptides of animal origin</i>
BACTIBASE	http://bactibase.pfba-lab-tun.org	<i>Database of antibacterial peptides (bacteriocins)</i>
BAGEL2	http://bagel2.molgenrug.nl/	<i>Database of antibacterial peptides (bacteriocins)</i>
BioPD	http://biopd.bjmu.edu.cn	<i>Database of biologically active peptides</i>
CAMP	http://www.bicnirrh.res.in/antimicrobial/	<i>Database of antimicrobial peptides and proteins</i>
ConoServer	http://research1t.imb.uq.edu.au/conoserver/	<i>Database of biologically active peptides of snails from the genus Conus.</i>
Defensins knowledgebase	http://defensins.bii.astar.edu.sg	<i>Database of antimicrobial peptides from the defensins family</i>
EROP-Moscow	http://erop.inbi.ras.ru	<i>Database of biologically active peptides</i>
Hmrbase	http://crdd.osdd.net/raghava/hmrbase/	<i>Database of hormones, e.g. peptides</i>
NORINE	http://bioinfo.lifl.fr/norine/	<i>Database of nonribosomally synthesized bioactive peptides</i>
PepBank	http://pepbank.mgh.harvard.edu	<i>A database of biologically active peptides providing program searching for fragments with sequences similar to peptides in the database.</i>
PeptideDB	http://www.peptides.be/	<i>Major database of biologically active peptides, peptide precursors and motifs in Metazoa.</i>
PepX	http://pepx.switchlab.org/	<i>Database of structures of protein-peptide complexes</i>
PhytAMP	http://phytamp.pfba-lab.org	<i>Database of antimicrobial peptides and proteins of plant origin</i>
RAPD	http://faculty.ist.unomaha.edu/chen/rapd/index.php	<i>Database of recombinant antimicrobial peptides</i>
SwePep	http://www.swepep.org	<i>Database of biologically active peptides including sophisticated computing tools for peptide mass spectra interpretation.</i>

Tutorial de Preparação de Sistemas em Membranas - GROMACS

Arquivos Necessários:

- Coordenadas da Proteína (pdb)
- Coordenadas da Membrana (pdb)
- Topologia da Membrana (itp)

Passo 1 - Preparação da Membrana

As coordenadas da membrana lipídica bem como sua topologia podem ser encontradas na internet, inclusive na página do próprio GROMACS:

http://www.gromacs.org/Downloads/User_contributions/Molecule_topologies

O conjunto de arquivos contidos em "LipidsForGro96_53a6.zip" e documentado em "Kukol, A (2009), Lipid Models for United-Atom Molecular Dynamics Simulations of Proteins, J Chem Theo Comput, foi utilizado ao longo deste tutorial.

Após a realização do download e descompactação, deve-se e copiar os arquivos pdb e itp do lipídio desejado para um diretório de trabalho.

A geração de uma membrana do tamanho desejado é realizada com a utilização do comando "genconf" que cria cópias do sistema nos eixos X, Y e Z.

- `genconf -f unidade.pdb -o membrana-A.pdb -nbox x y z`

Onde o arquivo "unidade.pdb" corresponde à caixa unitária de lipídios e X Y e Z correspondem ao número de unidades da caixa lipídica em cada eixo. Normalmente o valor de Z será 1 e os valores de X e Y determinarão a área da membrana.

Por fim, removeremos as moléculas de água da superfície da membrana. Para isso, abriremos o arquivo da membrana no VMD e, com auxílio do TK Console, selecionaremos apenas os lipídios e salvaremos um novo arquivo de coordenadas.

- `set sel [atomselect top "not water"]`
- `$sel writepdb membrana-B.pdb`

Passo 2 - Posicionamento da Proteína na Membrana

Esta etapa pode ser realizada de várias formas, através de diferentes softwares. Neste tutorial será descrita uma maneira simples e intuitiva, realizada através do software Pymol.

Deve-se abrir concomitantemente, no Pymol, a estrutura da membrana e da proteína a ser nela inserida. Na barra de ferramentas, selecionar Mouse > 3 Button Editing. Segurando-se a tecla shift, pode-se mover apenas a proteína em relação à membrana até obter-se o posicionamento desejado.

ATENÇÃO: Não devemos mover a membrana segurando a tecla shift, pois não salvaremos suas novas coordenadas.

Uma vez posicionada corretamente, pode-se salvar a estrutura da proteína. O próximo passo será a geração da topologia da proteína com o programa "pdb2gmx".

➤ `pdb2gmx -f proteina-A.pdb -o proteina-B.pdb -p proteina.top -ignh`

OBS: Neste ponto, devemos escolher o campo de forças, o modelo da água a ser utilizada e outras peculiaridades do sistema como protonação, pontes dissulfeto, etc.

•

Em seguida, utilizamos o comando "cat" para unir as coordenadas da proteína reposicionada e da membrana lipídica.

➤ `cat proteina-B.pdb membrana-B.pdb > sistema-A.pdb`

No arquivo "sistema.pdb", utilizaremos um editor de texto para remover a linha que determina o fim do modelo: "ENDMDL". Para isto basta localizar este termo, deletar a linha e salvar o documento.

O próximo passo consiste no ajuste da numeração das coordenadas e é realizado com o programa "editconf".

➤ `editconf -f sistema-A.pdb -o sistema-B.pdb -resnr 1`

Passo 3 - Criação do Orifício na Membrana

Deve-se abrir o "sistema-B.pdb" no VMD e utilizar o TK Console para criar uma seleção que exclua os lipídeos que estão próximos ou sobrepostos à proteína e, em seguida salvar suas coordenadas.

➤ `vmd of protein"]`
➤ `$sel writepdb sistema-C.pdb`

O valor 2.3 corresponde à distância, em nanômetros, que os lipídios devem distar da proteína para serem incluídos na seleção, outros valores podem ser utilizados conforme a necessidade.

OBS: Vale a pena utilizar o painel Representations do vmd para testar as seleções antes de utilizar o TK Console.

ATENÇÃO: Em sistemas com íons precisamos ter cuidados maiores pois eles podem ser removidos caso estejam próximos à proteína, neste caso, acrescentamos "rename (nome do íon) or" antes da expressão de seleção.

Passo 4 - Criação da Caixa de Simulação e Preenchimento com Moléculas de Água

Nesta etapa utilizaremos o programa "editconf" para criar a caixa de simulação, entretanto, primeiramente, é necessário descobrir o comprimento e a largura da membrana. Para isto, basta buscar o tamanho dos vetores da caixa de simulação no pdb original da membrana e multiplicar pelo número de cópias da mesma em cada eixo.

Feito isto, deve-se executar o programa editconf utilizando as opções "-box" e "-princ". Esta última orienta a caixa de simulação conforme os eixos principais de um determinado grupo (no caso, os lipídios).

```
editconf -f sistema-C.pdb -o sistema-D.pdb -box X Y Z
```

Onde X, Y e Z são os comprimentos obtidos anteriormente. É necessário também escolher o grupo de referência para orientação dos eixos.

Posteriormente, utiliza-se o programa genbox para preencher a caixa de simulação com moléculas de água.

```
➤ genbox -cp sistema-D.pdb -cs -o sistema-E.pdb
```

Passo 5 - Remoção das Moléculas de Água do Interior da Membrana

Nesta etapa, abrimos o sistema solvatado (sistema-D) no VMD e utilizamos o TK Console para excluir as moléculas de água indesejadas. Primeiramente devemos conhecer as dimensões da membrana:

```
➤ set sel [atomselect top "resname LIP"]
```

ATENÇÃO: Substitua LIP pelo nome de resíduo das moléculas da membrana.

```
➤ measure minmax $sel
```

O resultado deste comando são dois vetores que definem as dimensões da seleção (a membrana). O interesse nesta etapa é nos valores mínimo e máximo de Z (o último número de cada vetor). Deve-se registrar esses valores e utilizar a seguinte string, no menu "Graphics > Representations" para excluir as moléculas de água do interior da membrana:

```
not (water and (z > MINVALUE) and (z < MAXVALUE))
```

Onde MINVALUE corresponde ao limite inferior da membrana no eixo Z e MAXVALUE corresponde ao limite superior da membrana no eixo Z, obtidos com o comando anterior (measure minmax).

OBS: Teste valores ligeiramente maiores e menores para ajustar a camada de água sobre a superfície da membrana. Uma vez tendo ajustado os valores de forma satisfatória, siga para o próximo passo.

- set sel [atomselect top "not same residue as(water and (z > **MINVALUE**) and (z < **MAXVALUE**))"]
same residue as (para nao cortar as moléculas de água)
- \$sel writepdb sistema-F.pdb

Passo 6 - Edição da Topologia

Abrir o arquivo "proteína.top" com um editor de texto e inserir na seção ";Include Forcefield Parameters", a linha:

```
#include "LIPIDIO.itp"
```

Trocando LIPIDIO pelo nome correto do arquivo itp da molécula escolhida para composição da membrana.

Ainda no arquivo de topologia, deve-se acrescentar o número de moléculas de água assim como o número de moléculas do lipídio. Pode-se utilizar o VMD para realizar a contagem; no TK Console:

- set sel [atomselect top "resname SOL"]
- \$sel num
- set sel [atomselect top "resname LIPIDIO"]
- \$sel num

Deve-se substituir LIPIDO pelo nome de resíduo das moléculas de lipídio. Além disso, deve-se também, dividir o número de átomos de solvente por 3 e o número de átomos de lipídio pelo numero de átomos em cada molécula do mesmo. Encontrando assim o número de moléculas. Por fim, adiciona-se na seção "[molecules]" o número de moléculas de solvente e de lipídeos, utilizando a nomenclatura correta.

```
popc54a7.itp
```

Passo 7 - Considerações Sobre Minimização de Energia e Dinâmica Molecular

A partir deste ponto, pode-se prosseguir com os passos padrão de uma Dinâmica Molecular comum, começando pela adição de íons para equilibrar a carga do sistema através do programa "genion". Considere utilizar etapas de minimização mais longas para evitar problemas maiores, devido à complexidade do sistema. Além disso, para dinâmicas moleculares em membranas é importante utilizar um acoplamento de pressão Semi Isotrópico.

ANEXO III: Arquivo Mdp com os parâmetros da Dinâmica Molecular para os sistemas com bicamada lipídica.

```
; RUN CONTROL PARAMETERS
integrator          = md      ----> tipo de integrador
; Start time and timestep in ps
tinit              = 0
dt                 = 0.002   ----> "time-step", para integralização
nsteps             = 100000000 ----> número de passos
; For exact run continuation or redoing part of a run
init_step          = 0
; Part index is updated automatically on checkpointing (keeps files separate)
simulation_part    = 1
; mode for center of mass motion removal
comm-mode          = Linear
; number of steps for center of mass motion removal
nstcomm           = 500000
; group(s) for center of mass motion removal
comm-grps         =

; LANGEVIN DYNAMICS OPTIONS
; Friction coefficient (amu/ps) and random seed
bd-fric           = 0
ld-seed           = 1993

; ENERGY MINIMIZATION OPTIONS
; Force tolerance and initial step-size
emtol             = 42.0
emstep            = 0.01
; Max number of iterations in relax_shells
niter             = 20
; Step size (ps^2) for minimization of flexible constraints
fcstep           = 0
; Frequency of steepest descents steps when doing CG
nstcgsteep       = 1000
nbgfscorr        = 10
; TEST PARTICLE INSERTION OPTIONS
rtpi              = 0.05
; OUTPUT CONTROL OPTIONS
; Output frequency for coords (x), velocities (v) and forces (f)
nstxout          = 500000    -> Frequência de escrita da trajetória
nstvout          = 500000    -> Frequência de escrita das velocidades
nstfout         = 500000
; Output frequency for energies to log file and energy file
nstlog           = 500000
nstcalcenergy    = 500000
nstenergy        = 500000    --> frequência de escrita das energias
; Output frequency and precision for .xtc file
nstxtcout        = 50000     -> frequência de escrita trajetória
xtc-precision    = 50000
; This selects the subset of atoms for the .xtc file. You can
; select multiple groups. By default all atoms will be written.
xtc-grps         =
; Selection of energy groups
energygrps       = Protein POP SOL_CL  -> grupos de monitoramento de
energia
; NEIGHBORSEARCHING PARAMETERS
cutoff-scheme    = Verlet

; ns algorithm (simple or grid)
ns_type          = grid
; Periodic boundary conditions: xyz, no, xy
pbc              = xyz
nstlist          = 20
```

```

rlist                = 1.2  -> raio de corte para vizinhos de baixo
alcance
rcoulomb             = 1.2
rvdw                 = 1.2  -> raio de corte para Lennard-Jones
; long-range cut-off for switched potentials
rlistlong           = -1
; OPTIONS FOR ELECTROSTATICS AND VDW
; Method for doing electrostatics
coulombtype         = PME  --> tratamento eletrostático
pme_order           = 4
; Relative dielectric constant for the medium and the reaction field
epsilon-r           = 1
epsilon_rf          = 1
; Method for doing Van der Waals
vdw-type            = Cut-off -> tipo de energia van der Waals
; cut-off lengths
rvdw-switch         = 0
; Apply long range dispersion corrections for Energy and Pressure
DispCorr            = EnerPres
; Extension of the potential lookup tables beyond the cut-off
table-extension     = 1
; OPTIONS FOR WEAK COUPLING ALGORITHMS
; Temperature coupling
Tcoupl              = V-rescale -> Tipo de acoplamento de temperatura
nsttcouple          = -1
nh-chain-length     = 10
; Groups to couple separately
tc-grps             = System
; Time constant (ps) and reference temperature (K)
tau-t               = 0.1
ref-t               = 293.15
; Pressure coupling
Pcoupl              = Parrinello-Rahman -> Termostato de pressão
Pcoupltype         = semiisotropic
; Time constant (ps), compressibility (1/bar) and reference P (bar)
tau-p               = 2
compressibility     = 4.5e-5 -> Compressibilidade da água a 1 atm
ref-p               = 1.0 -> Referencial para o barostato de Berendsen
; Scaling of reference coordinates, No, All or COM
refcoord_scaling   = No
; Random seed for Andersen thermostat
andersen_seed       = 815131
; GENERATE VELOCITIES FOR STARTUP RUN
gen_vel             = no
gen-temp            =
gen-seed            = 173529
; OPTIONS FOR BONDS
constraints         = all-bonds
; Type of constraint algorithm
constraint-algorithm = Lincs -> algoritmo de constrição para vincular os
comprimentos de ligação
; Do not constrain the start configuration
continuation        = yes
; Use successive overrelaxation to reduce the number of shake iterations
Shake-SOR          = no
; Relative tolerance of shake
shake-tol          = 0.0001
; Highest order in the expansion of the constraint coupling matrix
lincs-order         = 4
; Number of iterations in the final step of LINCS. 1 is fine for
; normal simulations, but use 2 to conserve energy in NVE runs.
; For energy minimization with constraints it should be 4 to 8.
lincs-iter         = 1
; Lincs will write a warning to the stderr if in one step a bond
; rotates over more degrees than
lincs-warnangle     = 30

```